

**T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**



**YÜKSEK LİSANS TEZİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEZ BAŞLIĞI
TEKRARLAYAN GEBELİK KAYIPLARINDA ISI ŞOK
PROTEİNLERİNDEN HSP 70'in EKSPRESYONU**

Taner ÖZEL

**Danışman
Doç. Dr. Tamer ZEREN**

MANİSA-2024

TANER
ÖZEL

TEKRARLAYAN GEBELİK KAYIPLARINDA ISI ŞOK
PROTEİNLERİNDEN HSP 70' in EKSPRESYONU

2024

TAAHHÜTNAME

Bu tezin Manisa Celal Bayar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Fizyoloji Ana Bilim Dalında akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını, tamamen kendi çalışmam olduğunu, her alıntıya kaynak gösterdiğimi, tezin yazımında akademik ve etik kurallara aykırı herhangi bir yapay zeka ve program kullanmadığımı beyan ederim.

Taner ÖZEL



ÖZET
Yüksek Lisans Tezi

Taner ÖZEL
Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Fizyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Tamer ZEREN

Amaç: Tekrarlayan gebelik kaybı, prevalansı oldukça yüksek olan bir sağlık sorunudur. Isı şok proteinleri, proteinlerin dördüncül yapısının oluşumunda, serbest radikal düzeyinin hücre içi dengelenmesinde ve stres faktörlerine karşı hücrel savunmada önemli role sahiptir. Amacımız, tekrarlayan gebelik kaybı hastalarından alınan düşük materyalinde ısı şok proteinlerinden olan HSP 70 proteininin ekspresyon düzeylerini incelemek ve beta-aktin referans proteini ile normalizasyonunu yapmaktır.

Gereç ve Yöntem: 24 gönüllü hasta “sağlıklı ve gebe olmayanlar (Grup 1)”, “sağlıklı ve gebeler (Grup 2)” ve “tekrarlayan gebelik kaybı (Grup 3)” olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. Grup 2 ve 3’ten düşük materyalleri, Grup 1’den endometriyal biyopsi alınmıştır. Alınan örnekler ile Western Blot çalışması yapılarak HSP 70 ve beta-aktin proteinlerinin ekspresyon seviyelerine ayrı ayrı bakılarak normalizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: HSP 70 proteininin Grup 3 hastalarındaki ekspresyon seviyesinde azalma ($p<0,05$) meydana gelmiştir. Beta-aktin proteininin Grup 3 hastalarındaki ekspresyon seviyesinde artış ($p<0,05$) meydana gelmiştir. Normalizasyon işlemi (HSP 70 / Beta-Aktin) yapıldığında Grup 3 hastalarında bir azalma ($p<0,05$) gözlemlenmiştir.

Sonuçlar: Tekrarlayan gebelik kayıplarında, HSP 70 protein seviyelerinde bir azalma ve beta-aktin protein seviyelerinde bir artış olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan istatistiksel analizler, tekrarlayan gebelik kaybı grubuna ait hastalarda anlamlı sonuçlar ortaya koymuştur. HSP 70 proteininin kontrol grubuna göre diğer gruplarda daha az eksprese olması gebelik kaybının etiyolojik nedenlerinden biri olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Isı Şok Proteini (HSP 70), Western Blot, Beta-Aktin, Düşük Materyali, Tekrarlayan Gebelik Kaybı

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

Taner ÖZEL

**Manisa Celal Bayar University
Graduate School of Education
Department of Physiology**

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Tamer ZEREN

Aim: Recurrent pregnancy loss is a health issue with a high prevalence. Heat shock proteins play a crucial role in the formation of the quaternary structure of proteins, intracellular balance of free radicals, and cellular defense against stress factors. Our aim is to investigate the expression levels of HSP 70 protein, one of the heat shock proteins, in the abortus material of patients experiencing recurrent pregnancy loss and to normalize it with the reference protein beta-actin.

Material and Method: 24 volunteer patients were divided into three groups: "healthy non-pregnant individuals (Group 1)", "healthy pregnant individuals (Group 2)," and "individuals with recurrent pregnancy loss (Group 3)." Abortus materials from Groups 2 and 3 and endometrial biopsy samples from Group 1 were obtained. Western Blot analysis was conducted on the collected samples, and the expression levels of HSP 70 and beta-actin proteins were individually examined, followed by the normalization process.

Results: There has been a decrease in the expression level of the HSP 70 protein in Group 3 patients ($p<0.05$). An increase in the expression level of the beta-actin protein has occurred in Group 3 patients ($p<0.05$). When the normalization process (HSP 70 / Beta-Actin) was conducted, a decrease ($p<0.05$) was observed in Group 3 patients.

Conclusion: A decrease in HSP 70 protein levels and an increase in beta-actin protein levels have been observed in recurrent pregnancy losses. Statistical analyses have revealed significant results in patients belonging to the recurrent pregnancy loss group. The lower expression of the HSP 70 protein in comparison to the control group in other groups suggests that it could be one of the etiological reasons for pregnancy loss.

Keywords: Heat Shock Protein (HSP 70), Western Blot, Beta-Actin, Abortus Material, Recurrent Pregnancy Loss

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Çalışmamızın konusu “Tekrarlayan Gebelik Kayıplarında Isı Şok Proteinlerinden HSP 70’in Ekspresyonu”dur. Bu çalışmada; Tekrarlayan Gebelik Kaybı tanımı ve nedenleri, Isı Şok proteinleri tanımı ve fizyolojik özellikleri, Beta Aktin proteinleri ve özellikleri Western Blot yönteminden bahsedilmiştir. Laboratuvar sonucu elde edilen verileri ve bu veriler ışığında yapılan istatistiksel çalışmaların sonuçlarına yer verilmiştir.

Bu çalışma boyunca bilgi, tecrübe ve yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Tamer ZEREN’ e; Fizyoloji Yüksek Lisans eğitimi süresince değerli katkılarından dolayı bölüm hocalarım Prof. Dr. Necip KUTLU; Prof. Dr. Mustafa ÖZBEK’e ve tüm Fizyoloji Anabilim Dalı ailesine; deneyimleri ile yol gösteren ve her zaman yanımda olan Dr. Öğr. Gör. H. Fehmi ÖZEL’e; yüksek lisansa başladığım günden beri yardımlarını ve dostluğunu esirgemeyen Dr. Öğr. Gör. Hasan KAZDAĞLI’ya; maddi ve manevi desteklerinden dolayı aileme; bütün bu süreçlerde hep yanımda olan, her konuda anlayış ve yardımlarını esirgemeyen Ayşegül BİLİZ’e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Taner ÖZEL

Manisa-2024

İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
ABSTRACT	II
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ	XII
GİRİŞ	1
BİRİNCİ BÖLÜM	3
GENEL BİLGİLER	3
1.1. TEKRARLAYAN GEBELİK KAYBI (TGK)	3
1.1.1 Tekrarlayan Gebelik Kaybı Nedenleri	4
1.1.1.1 Serviks (Rahim Ağzı) Yetersizliği ve Uterus (Rahim) Yapısal Bozuklukları	4
1.1.1.2. Endokrin (Hormonal) Bozukluklar	5
1.1.1.2.1 Diyabet (Şeker Hastalığı)	5
1.1.1.2.2. Tiroid Bezi Hastalıkları	5
1.1.1.2.3. Korpus Luteum Yetmezliği	5
1.1.1.3. Enfeksiyonlar	6
1.1.1.4. Genetik Bozukluklar	6
1.1.1.5. Trombofili	6
1.1.1.6. İmmünolojik Durum	7
1.1.1.7. Çevresel ve Diğer faktörler	9
1.2. ISI ŞOK PROTEİNLERİ (HSPs)	9
1.2.1. Isı Şok Protein Ailesi	10
1.2.2. Memelilerdeki Isı Şok Proteinleri ve Fonksiyonları	10
1.2.2.1. HSP110-100	10
1.2.2.2. HSP 90	10
1.2.2.3. HSP 70 (HSP 72-73)	11
1.2.2.4. HSP 60-65	11
1.2.2.5. sHSP (Küçük Isı Şok Proteini)	11
1.2.3. Isı Şok Proteinlerinin Fizyolojik Fonksiyonları	11
1.2.3.1. Isı Şok Proteinlerinin Hücre Dışı Fonksiyonları	11

1.2.3.2.	Isı Şok Proteinlerinin Hücre İçi Fonksiyonları	12
1.2.3.3.	Isı Şok Protein Gen Transkripsiyonu	12
1.2.3.4.	Isı Şok Proteinleri ve Bağışıklık	13
1.2.3.5.	Isı Şok Proteinleri ve Kanser	13
1.2.3.6.	Isı Şok Proteinleri ve Viral Enfeksiyonlar	14
1.2.3.7.	Isı Şok Proteinleri ve Kalp Hastalıkları	14
1.2.3.8.	Isı Şok Proteinleri ve Oksidatif Stres	14
1.2.4.	Isı Şok Proteinlerinin Teşhis Yöntemleri	15
1.2.5.	HSP 70 ailesi	15
1.3.	AKTİN PROTEİNLERİ (β -Aktin vs.)	17
1.4.	WESTERN BLOT	19
1.4.1.	İmmün Saptamaya Etki Eden Faktörler	20
1.4.1.1.	Tamponlar	21
1.4.1.2.	Bloklama	21
1.4.1.3.	Antikorlar	21
1.4.1.4.	Yıkama	21
1.4.1.5.	Saptama Solüsyonları	21
1.4.2.	Western Blot Yöntemi ve Genel Aşamaları	22
1.4.2.1.	Örneklerin Hazırlanması	22
1.4.2.2.	Yürütme ve Transfer	22
1.4.2.3.	İlgili Proteinin İşaretlenmesi ve Boyanması	23
1.4.2.4.	Görüntüleme ve Analiz	23
1.4.3.	Spektrofotometre ile Protein Konsantrasyonu Tayini	23
1.4.4.	Coomassie Blue Brilliant Boyama	24
İKİNCİ BÖLÜM		25
GEREÇ VE YÖNTEM		25
2.1.	Deney Örneklerinin Alınması ve Grupların Oluşturulması	25
2.2.	Total Protein Assay Çalışması ve Gerekli Materyaller	26
2.3.	Commassie Blue Boyama Çalışması ve Gerekli Materyaller	26
2.4.	Western Blott Çalışması ve Gerekli Materyaller	27
2.4.1.	Doku Materyalinin Hazırlanması ve Saklanması	27
2.4.2.	Jel Kalıbının Oluşturulması	28
2.4.3.	Örneklerin Hazırlanması	28
2.4.4.	Elektroforez Tankının Hazırlanması	29

2.4.5.	Örneklerin Jele Yüklenmesi ve Elektroforez	29
2.4.6.	Proteinlerin Jel'den Membrana Transferi	30
2.4.7.	Blokaj	30
2.4.8.	Membrana Birincil (Primer) Antikor Ekleme	30
2.4.9.	Membrana İkincil (Sekonder) Antikor Ekleme	31
2.4.10.	Bantların Görünür Hale Getirilmesi	31
2.4.11.	Bant Yoğunluklarının Analizi	31
2.4.12.	İstatistiksel Analizler	31
	ÜÇÜNCÜ BÖLÜM	32
	BULGULAR	32
3.1.	Commassie Blue Boyama ile Proteinlerin Kantitatif Analizi ve Sonuçları	32
3.2.	Spektrofotometre ile Total Protein Analizi ve Standart Grafiğinin Belirlenmesi	32
3.3.	Western Blot Çalışması	34
3.3.1.	HSP 70 ve β -Aktin Bant Görüntülerinin Tablo Halinde Gösterilmesi	34
3.3.2.	HSP 70 ve β -Aktin Proteinlerinin Bant Yoğunluk Değerleri Tablosu ve Grafikleştirilmesi	34
3.3.3.	HSP 70 Proteini Ortalama ve Standart Sapma Değerleri	38
3.3.4.	β -Aktin Proteini Ortalama ve Standart Sapma Değerleri	38
3.3.5.	HSP 70 Proteininin β -Aktin proteini ile Normalizasyon ve Ortalama Değerleri (HSP 70/ β -Aktin)	39
3.3.6.	HSP 70 ve β -Aktin proteinlerinin ve Normalizasyon işlemine ait SPSS analiz verileri	41
	DÖRDÜNCÜ BÖLÜM	44
	TARTIŞMA	44
4.1	Total Protein Assay Çalışması	44
4.2.	Commassie Blue Boyama Çalışması	45
4.3.	Western Blot Çalışması	45
4.4.	Grafikleştirme, Normalizasyon ve Analizler	45
4.4.1.	HSP 70 Proteini Grafikleştirme ve Analiz	45
4.4.2.	Beta Aktin Proteini Grafikleştirme ve Analiz	46
4.4.3.	Normalizasyon ve Analiz	46
4.5.	Verilerin Yorumlanması ve Literatür ile Karşılaştırılması	47
4.5.1.	HSP 70 Protein Verilerinin Yorumlanması ve Literatür ile Karşılaştırılması	47
4.5.2.	Beta Aktin Protein Verilerinin Yorumlanması ve Literatür ile Karşılaştırılması	47
4.5.3.	Normalizasyon Verilerinin Yorumlanması	48

BEŞİNCİ BÖLÜM	49
SONUÇLAR ve ÖNERİLER	49
ALTINCI BÖLÜM	52
KAYNAKÇA	52



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BCIP/NBT	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium
AC/BIS	Acrylamide/Bisacrylamide
ATP	Adenozin trifosfat
ATPaz	Adenozin trifosfataz
AP	Alkalen fosfataz
APS	Amonyum Persülfat
ANA	Anti Nükleer Antikor
β-Aktin	Beta-Aktin
BSA	Bovin Serum Albumin
MHC	Büyük Doku Uyuşum Kompleksi
DNA	Deoksiriboz nükleik asit
DVT	Derin Ven Trombozu
dH ₂ O	Distile Su
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
G1	Grup 1
G2	Grup 2
G3	Grup 3
TGK	Habituel Abortuslar
HSP 110-100	Isı Şok Proteini 110-100
HSP 60-65	Isı Şok Proteini 60-65
HSP 70	Isı Şok Proteini 70
HSP 90	Isı Şok Proteini 90
HSPs	Isı Şok Proteinleri
HSF	Isı Şoku Transkripsiyon Faktörü
HSF 1	Isı Şoku Transkripsiyon Faktörü 1
IFN-γ	İnterferon Gama
IL-10	İnterlökin-10
IL-2	İnterlökin-2
IL-4	İnterlökin-4
sHSP	Küçük Isı Şok Proteini
MBL	Mannoz Bağlayıcı Lektin
MTHFR	Metilentetrahidrofolat Redüktaz
NK	Naturel Killer
OD	Optik Yoğunluk Absorbansı
PBS-Tween 20	PBS-Tween 20 Phosphate Buffered Saline-Tween 20
PBS	Phosphate Buffered Saline
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
rRNA	Ribozomal RNA
RNA	RNA Ribonükleik asid
SV40	Simian Virüsü 40
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel Elektroferez
NaCl	Sodyum Klorür
HSE	Stres Protein Elemanları
TGK	Tekrarlayan Gebelik Kaybı
TEMED	Tetrametilendiamin
TBS	Tris Buffered Saline

TBS-Tween 20
Tris-HCl
TNF- α

Tris Buffered Saline-Tween 20
Tris Hidroklorür
Tümör Nekroz Faktörü Alfa



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Anne yaşına göre düşük riski (Cunningham ve ark. 2005)	4
Şekil 2. Hücresel sıcaklık algılama ve HSP 70/HSF1 etkileşimleri (Pockley 2001)	13
Şekil 3. HSP 70'in 3 boyutlu yapısı, domain organizasyonu (https://www.researchgate.net/figure/Hsp70-protein-structure_fig2_279182099 2015)	17
Şekil 4. β -Aktin proteinin kromozom yerleşim bölgesi ve 3 boyutlu yapısı (https://en.m.wikipedia.org/wiki/File:Protein_ACTB_PDB_1atn.png 2009)	18
Şekil 5. Membran temelli immün saptama (Burnette 1981)	20
Resim 1. HSP 70 Proteinini'nin Western Blot Bant görüntüsü (https://www.abcam.com/products/primary-antibodies/hsp70-antibody-5a5-ab2787.html 2023)	17
Resim 2. β -Aktin proteinini'nin Western Blot Bant görüntüsü (https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/b-actin-antibody/4967 2023)	19
Resim 3. Commassie Blue boyama sonucunda elde edilen görüntüler	32
Resim 4. HSP 70 protein detaylı t-Test sonuçları	41
Resim 5. Beta Aktin protein detaylı t-Test sonuçları	42
Resim 6. HSP 70/Beta Aktin Proteinleri Normalize detaylı t-Test sonuçları	43
Resim 7. HSP 70 protein t-Test sonuçları anlamlılık değerleri	49
Resim 8. Beta-Aktin protein t-Test sonuçları anlamlılık değerleri	50
Resim 9. HSP 70/Beta Aktin Proteinleri Normalize t-Test sonuçları anlamlılık değerleri	50
Grafik 1. Bovin Serum Albumine ait, 280 nm dalga boyunda ölçülmüş optik yoğunluk grafiği (O.D.). Western blot total protein yükleme hesaplamalarında Grup 1, 2, 3 hasta örnekleri için BSA ile oluşturulmuş standart yoğunluk grafiği kullanılarak oluşturulmu	33
Grafik 2. Grup 1, HSP 70 protein ekspresyon seviyelerinin tespiti için, Western Blot sonucu elde edilen bant yoğunluklarının ImageJ programındaki analiz değerleri ve grafiklendirilmesi.	35
Grafik 3. Grup 2, HSP 70 protein ekspresyon seviyelerinin tespiti için, Western Blot sonucu elde edilen bant yoğunluklarının ImageJ programındaki analiz değerleri ve grafiklendirilmesi.	35
Grafik 4. Grup 3, HSP 70 protein ekspresyon seviyelerinin tespiti için, Western Blot sonucu elde edilen bant yoğunluklarının ImageJ programındaki analiz değerleri ve grafiklendirilmesi.	36
Grafik 5. Grup 1, β -Aktin protein ekspresyon seviyelerinin tespiti için, Western Blot sonucu elde edilen bant yoğunluklarının ImageJ programındaki analiz değerleri ve grafiklendirilmesi.	36
Grafik 6. Grup 2, β -Aktin protein ekspresyon seviyelerinin tespiti için, Western Blot sonucu elde edilen bant yoğunluklarının ImageJ programındaki analiz değerleri ve grafiklendirilmesi.	37
Grafik 7. Grup 3, β -Aktin protein ekspresyon seviyelerinin tespiti için, Western Blot sonucu elde edilen bant yoğunluklarının ImageJ programındaki analiz değerleri ve grafiklendirilmesi.	37
Grafik 8. Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 hastalarına ait HSP 70 proteininin ekspresyon seviyelerinin ortalamasının grafiklendirilmesi	38

Grafik 9. Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 hastalarına ait β -Aktin proteininin ekspresyon seviyelerinin ortalamasının grafiklendirilmesi. 39

Grafik 10. Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 hastalarına ait HSP 70 proteininin β -Aktin proteini ile normalizasyon (HSP 70/ β -Aktin) değerlerinin ortalamasının ekspresyon seviyelerinin grafiklendirilmesi. 40



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1- Habituel Abortuslar (TGK) için hesaplanan risk değerleri (Regan ve ark. 1989)	3
Tablo 2- Trombofilik faktörlerin tekrarlayan gebelik kayıpları ilişkisi ile ilgili bilgiler (Cunningham ve ark. 2005, Robertson ve ark. 2006)	7
Tablo 3. 5 ml BSA ile oluşturulan standart değerler ve ortalamaları	32
Tablo 4. Grup 1 için ölçülen total protein değerleri ve jele yüklenen protein miktarları gösterilmiştir.	32
Tablo 5. Grup 2 için ölçülen total protein değerleri ve jele yüklenen protein miktarları gösterilmiştir.	33
Tablo 6. Grup 3 için ölçülen total protein değerleri ve jele yüklenen protein miktarları gösterilmiştir.	33
Tablo 7. Grup1,2,3 hastalarına ait Western Blot çalışması sonucu elde edilen HSP 70 ve β -Aktin proteinlerinin bant görüntüsü	34
Tablo 8. Western Blot çalışması sonucu elde edilen Grup1, Grup 2 ve Grup 3 hastalarına ait HSP 70 proteinin ImageJ programı ile ekspresyon seviyelerinin analizine ait sayısal veriler gösterilmiştir.	34
Tablo 9. Western Blot çalışması sonucu elde edilen Grup1, Grup 2 ve Grup 3 hastalarına ait β -Aktin proteinin ImageJ programı ile ekspresyon seviyelerinin analizine ait sayısal veriler gösterilmiştir.	36
Tablo 10. Western Blot çalışması sonucu elde edilen Grup1, Grup 2 ve Grup 3 hastalarına ait HSP 70 proteinin ImageJ programı ile ekspresyon seviyelerinin analizinin sayısal değerleri, değerlerin ortalaması ve standart sapması gösterilmiştir.	38
Tablo 11. Western Blot çalışması sonucu elde edilen Grup1, Grup 2 ve Grup 3 hastalarına ait HSP 70 proteinin ImageJ programı ile ekspresyon seviyelerinin analizinin sayısal değerleri, değerlerin ortalaması ve standart sapması gösterilmiştir.	38
Tablo 12. Western Blot çalışması sonucu elde edilen Grup 1-Grup 2 ve Grup 3 hastalarına ait HSP 70 proteinin β -Aktin proteinine göre normalize edilmesi sonucu elde edilen ekspresyon seviyelerinin sayısal değerleri, değerlerin ortalaması ve standart sapma	39

GİRİŞ

Tekrarlayan gebelik kayıpları (TGK) etiyolojisinde birçok sebep yatan, prevalansı çok yüksek olan ve kadınlarda ergenlik dönemi sık karşılaşılan jinekolojik sorunlardan birisidir. Hastalar üzerinde psikolojik ve toplumsal öneme sahip etkileri vardır. Bu sorunun aydınlatılması ve çözümler üretilerek minimum düzeye indirilmesi önem arz etmektedir. Bu bağlamda 1977 senesinde Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ‘nın yaptığı tanımlamaya göre abortus; gebeliğin 20. haftasından önce, 500 gramdan daha az embriyo veya fetüs ve buna ilaveten eklerinin, tamamının ya da belirli bir kısmının uterus boşluğu dışına atılması olayıdır (Ford ve Schust 2009, Salat-Baroux 1988). Yapılan çalışmalar ışığında TGK’ya sebep olduğu düşünülen birden fazla etyolojik faktör tanımlanmıştır. Bu faktörler yapısal veya sayısal kromozom anomalileri, genetik sebepler, luteal faz yetmezliği, polikistik over sendromu, endokrin sebepler, uterus yapısal bozuklukları, servikal yetmezlik, immunolojik sebepler, trombofilik bozukluklar, sigara kullanımı, çevresel faktörler ve ovaryan rezerv düşüklüğüdür (Clifford ve ark. 1997, Regan ve ark. 1989). TGK üzerinde yapılan birçok araştırmanın sonuçlarına göre olguların %50’sinden fazlasında kayda değer bir etyolojik faktör saptanamamıştır (Cunningham ve ark. 2005, Pluchino ve ark. 2014).

Isı şoku proteinleri (HSP), tüm canlı organizmalarda bulunan yüksek derecede koruyucu özelliğinin yanı sıra çok işlevli polipeptitlerden oluşan bir protein ailesidir (Simón ve ark. 1998, Munné ve ark. 1999). Isı şoku proteinleri (HSP) ilk olarak yüksek sıcaklığa maruz kalan hücre gruplarında keşfedilmiştir. Hipertermi, serbest oksijen radikalleri, ağır metaller, enflamasyon ve enfeksiyonun da içinde olduğu birden çok duruma karşı yanıt olarak ifade edildiği görülmüştür (Hassold 1980). Buna ek olarak HSP, fizyolojik koşullar altında hücresel işlev için gerekli olan çeşitli süreçlerde de etkili bir rol almaktadır (Ford ve Schust 2009, Cunningham ve ark. 2005, Hassold 1980). Yüksek oranda evrimsel olarak korunmuş HSP’ler hücresel homeostazın düzenlenmesinde moleküler şaperonlar olarak da görev yapar. Genel olarak, organizma üzerinde yıkıcı etkiye sahip olabilecek çeşitli stres faktörleri tarafından indüklenirler, fakat stres yokluğunda da büyük ölçüde yapısal olarak ifade edildiği gözlemlenmiştir. Çeşitli HSP ifadeleri, embriyonik ve ekstra embriyonik yapıların oluşum aşamalarında ve embriyonik gelişim sırasında meydana gelen hücre

hareketleri, çoğalma, morfogenez ve apoptozis süreçlerinde kritik öneme sahip olmaktadır (Güven ve ark. 2006).

Aktin proteinleri, tüm ökaryotik hücrelerde en çok bulunan, birçok genel ve özel hücresel işlev için gerekli olan ve aynı zamanda da yüksek oranda korunan proteinlerdir. Ayrıca hücre iskeleti, kas kasılması, sitokinez, göç, kromatinin yeniden şekillenmesi, transkripsiyonel düzenleme ve hücre şeklinin düzenlenmesi gibi birçok hücresel fonksiyonlarda etkilidirler. β -aktin ve γ -aktin olmak üzere iki izoformu bulunmaktadır. Bu iki izoform her yerde ifade edilirken amino asit sekansında da %99'luk bir benzerlik göstermektedir. Ancak yapılan daha önceki çalışmalarda, yalnızca β -aktin proteinin yaşam için vazgeçilmez olduğu gösterilmiştir (Pollard ve Cooper 2009).

Western Blot tekniği, doku veya hücrelerdeki spesifik bir proteinin ekspresyon seviyesinin anlaşılması ve analizi konusunda yardımcı olan moleküler biyoloji tekniklerinden biridir. Temel olarak proteinleri belirli yüzdelikteki jel içerisinde elektrikli ortamda moleküler büyüklüklerine göre ayırma tekniğidir. Western Blot tekniği ile doku ve hücrelerde bulunan bir proteinin varlığının olup olmaması, moleküler ağırlığı, yağunluğu, yoğunluk değişimleri, farklı gruplar arasındaki yoğunluklarının karşılaştırılması gibi vb. araştırılabilir. Blotlama yöntemleri; Western Blott protein tayini, Southern Blott DNA tayini ve Northern Blott ise RNA tayinin de kullanılmaktadır (Cunningham ve ark. 2005, Robertson ve ark. 2006).

BİRİNCİ BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

1.1. TEKRARLAYAN GEBELİK KAYBI (TGK)

Tekrarlayan Gebelik Kaybı (TGK) veya tıbbi literatürdeki ismiyle “Habituel Abortus”, peş peşe en az üç gebelikte ve bununla beraber ilk 20 haftada, 500 gr’dan düşük ağırlıklı fetüsün spontan kaybı olarak adlandırılmaktadır. TGK yaklaşık olarak %1-2 oranında görülmektedir (Ford ve Schust 2009). Gebeliğin erken dönemlerinde kadınlar hali hazırda gebe olduklarının farkına varmaksızın, adet kanaması ile "sessiz düşük" yapabilirler. Klinik olarak tanımlaması yapılan gebeliklerin ise yaklaşık olarak %15 kadarı düşük ile sonuçlanmaktadır (Salat-Baroux 1988). 12 haftanın altında olan kayıplar erken düşük, 12 haftadan sonra olan kayıplar ise geç düşük olarak adlandırılmaktadır. İnsidans (hastalığa yakalanma olasılığı) açısından bakıldığında toplumda bir kez düşük yapma olasılığı % 15-40, iki kez ard arda düşük yapma olasılığı %2-5 ve üç kez ard arda düşük olma olasılığı %1’den az oranda olduğu gözlemlenmiştir. Epidemiyolojik bulgulara göre bir kez yapılan düşüktan sonra tekrar düşük yapma olasılığı ailenin yaşayan bir çocuğu varsa yaklaşık olarak % 24, yoksa bu oran % 46 civarındadır. Tekrar düşük riski oranı, daha önce iki kez düşük yapanlarda %24, üç kez düşük yapanlarda ise %40 civarında olduğu tespit edilmiştir (Clifford ve ark. 1997).

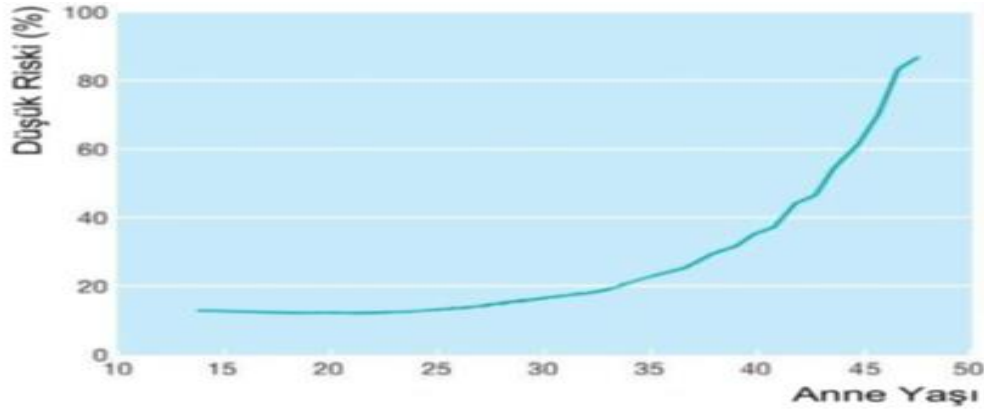
Habituel Abortuslar (TGK) için hesaplanan risk değer oranları Tablo 1’de gösterilmiştir (Regan ve ark. 1989).

Tablo 1- Habituel Abortuslar (TGK) için hesaplanan risk değerleri (Regan vark. 1989)

Gebelik Geçmişi	Sonraki Gebelikte Abort Riski
Geçmiş Gebeliği Yoksa	15%
Son Gebeliği Abort ise	19%
Tüm Gebelikleri (>2) Abort ise	24%
Tüm Gebelikleri (>2) Abort Değilse	4%

Düşüklerin nedenine bakıldığında anne yaşının da bu bağlamda önemli bir faktör olduğu bilinmektedir. 25 yaşından sonra yükselmeye başlayan düşük riski oranı, 45 yaş üstü kadınlarda %75-80'lere ulaştığı gözlemlenmiştir. Bu bilgiler ışığında Anne

yaşı yükseldikçe düşük yapma oranı yaşa bağlı olarak yükselmektedir. Anne yaşına göre düşük riski Şekil 1’de gösterilmiştir (Cunningham ve ark. 2005).



Şekil 1. Anne yaşına göre düşük riski (Cunningham ve ark. 2005)

1.1.1 Tekrarlayan Gebelik Kaybı Nedenleri

1.1.1.1 Serviks (Rahim Ağzı) Yetersizliği ve Uterus (Rahim) Yapısal Bozuklukları

Serviks yetersizliği, özellikle gebeliğin 4. ve 6. ayları arasında serviks’in sancısız bir şekilde açılması ve gebelik zarlarının yırtılması sonucu fetusun dışarıya doğru atılmasıyla sonuçlanan bir duruma verilen addır. Tedavisinde genel cerrahi müdahale yapılmaktadır. Bu müdahale üçüncü ayın sonunda servikse uygun şekilde dikiş konularak yapılmaktadır (McDonald ve Shirodkar ameliyatları). Uterusun yapısal bozuklukları ise myomlar, rahim içi yapışıklıklar (adezyonlar), rahim içinde bir bölmenin olması (Uterin septum), çift rahim (Uterus didelfis) ve diğer şekil bozukluklarını kapsamaktadır. TKG yaşayanlarda bu bozuklukların olma sıklığı %10-15 civarındadır. Bu durumlar neticesinde; damarlanma kötü yönde etkilelenebilir ya da uterus boşluğunun boyutları küçülerek fetusun yerleşeceği bölge uygunsuz hale gelebilmektedir. Meydana gelen anormallikler cerrahi olarak düzeltilerek düşük oranları azaltılabilmektedir (Ford ve Schust 2009, Pluchino ve ark. 2014).

1.1.1.2. Endokrin (Hormonal) Bozukluklar

Çoğunlukla üç tür bozukluk TKG sebebi olarak düşünülmektedir. Bunlar; Diyabet, Tiroid Bezi Hastalıkları ve Korpus Luteum Yetmezliği'dir (Ford ve Schust 2009, Pluchino ve ark. 2014).

1.1.1.2.1 Diyabet (Şeker Hastalığı)

Kontrol altında tutulan diyabet hastalığının düşük riskini arttırmadığı bilinmektedir. Hamile kalan bir diyabet hastasının kan şekeri takibi iyi bir şekilde yapılırsa düşük yapma olasılığı artmaz. Fakat yeterli bir takip yapılmadığında ise düşük riski artmaktadır (Ford ve Schust 2009, Pluchino ve ark. 2014).

1.1.1.2.2. Tiroid Bezi Hastalıkları

Tiroid hastalığının gebelik kaybına sebep olduğu ile ilgili bilimsel olarak kanıtlar yetersizdir. Ama protein temelli hormonların üretilmesinden dolayı bu alana olan araştırmalar yoğunlaşmaktadır (Ford ve Schust 2009, Pluchino ve ark. 2014).

1.1.1.2.3. Korpus Luteum Yetmezliği

Korpus Luteum veya sarı cisimcik yumurtlama döngüsü tamamlanıp, yumurta vücuttan atıldıktan sonra geriye kalan yapıdır. Gebeliğin devamlılığına katkısı olan progesteron hormonunun üretiminden sorumludur. Bu hormon gebeliğin ilk trimesterinde, vücut tarafından reddedilmesini engeller. Korpus Luteumun ömrü ile progesteron hormonunun salgılanma süresi arasında bir doğru orantı vardır. Bu orantı gebeliğin olmadığı durumlarda geçerlidir. Gebelik olduğu halde korpus luteum olması gerektiğinden daha kısa sürede yaşlanması halinde korpus luteum yetmezliği ortaya çıkar. Bu yetmezlik sonucunda da düşük olayı gerçekleşir. Endometrial biyopsi yöntemi ile rahim içi zarından örnek alınarak teşhis edilir. Progesteron hormonunun salınım sorunları ortadan kaldırılarak tedavi edilebilmektedir (Ford ve Schust 2009, Pluchino ve ark. 2014).

1.1.1.3. Enfeksiyonlar

Gebelik kaybıyla ilişkilendirilen bazı mikroorganizmalar vardır. Bunlardan bazıları U. Urealyticum, Coxackievirus, M. Hominis, H. Simplex, Cytomegalovirus, Grup B β -Hemolitik streptokok, T. Gondii, Rubella ve Chlamydia vb dir. TKG'lı hastalarda daha çok rastlamakla beraber bakteriyal vajinoza doğumla yakın ilişkilidir. Uygun tedaviler ile düşük riski oldukça azaltılmaktadır. Bununla beraber TKG da literatüre geçen birçok enfeksiyon olmasına rağmen, ispatı gerçekleşmiş hiçbir enfeksiyöz bulunmamaktadır (Ford ve Schust 2009, Pluchino ve ark. 2014).

1.1.1.4. Genetik Bozukluklar

Tekrarlayan Gebelik kayıplarının %20 'sini genetik faktörler oluşturur. Kromozomal anomaliye sahip embriyolarda %90 oranında spontane abortuslar gözlemlenir. Abort mateyallerinde en çok gözlemlenen anomaliler; trizomiler, triploidiler ve monozomi X tir. Fetal kromozom anomali riskini arttıran en önemli faktörlerden biri ileri anne yaşıdır. Bununla beraber baba yaşının ileri olmasında anomali riskini arttıran önemli bir etkidir (Ford ve Schust 2009, Simón ve ark. 1998, Munné ve ark. 1999).

İlk abortuslarında anomali bulunan hastaların bir sonraki abortuslarında anomali çıkma olasılığı %70'tir. Bu oran ilk abortuslarında anomali bulunmayan hastalarda ise %20 'dir (Ford ve Schust 2009, Hassold 1980).

TKG endikasyonu ile başvuran her 20 hastadan 1'inde parental anomali tespit edilmiştir. TKG'da en sık rastlanan anomaliler dengeli translokasyonlardır. Bu translokasyonlar ve daha birçok anomali çeşitli genetik testler ile tespit edilebilmektedir. Bununla birlikte hastalara genetik uzmanları tarafından danışmanlık verilerek TKG riski en aza indirilebilir (Ford ve Schust 2009, Cunningham ve ark. 2005, Hassold 1980).

1.1.1.5. Trombofili

Tekrarlayan gebelik kayıplarına sahip olan hastalar incelendiğinde %60'lara varan bir trombofili insidans yüzdesi bulunmuştur. Bununla beraber antifosfolipid antikolar ve trombofilik defektler sebebiyle plasental vasküler tromboz gerçekleşmektedir. Bu gerçekleşen olaylar herediter veya sonradan kazanılmış

durumlar olabilirler. Bu durumlarda, gebelik yan etkileri ve TKG riski önemli ölçüde yükselmektedir (Güven ve ark. 2006). Trombofilik faktörler arasında en sık rastlanılanlar Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) C677T, Faktör V Leiden G1691A, Protrombin G20210A ve A1298C mutasyonlarıdır. Bu faktörler trombozun tanımlanmasında moleküler anlamda anahtar role sahiptir. Annede meydana gelen pıhtılaşma faktöründeki bir mutasyon vücut içi dengenin bozulmasına ve ek olarak plasental mikrosikülasyonda da sorunlara sebep olabilmektedir. Bunun sonucunda tromboz meydana gelerek düşük oluşabilmektedir (Güven ve ark. 2006). Tekrarlayan gebelik kayıpları ile trombofilik faktörler arasındaki bağlantı Tablo 2’te gösterilmiştir (Cunningham ve ark. 2005, Robertson ve ark. 2006).

Tablo 2- Trombofilik faktörlerin tekrarlayan gebelik kayıpları ilişkisi ile ilgili bilgiler (Cunningham ve ark. 2005, Robertson ve ark. 2006)

Trombofilik Mutasyonları	Faktörleri	Prevelans	Venöz Tromboemboli	TKG Riski
Faktör V Leiden G1691A		% 2-15	Homozigot: 100 Kat Heterozigot: 5-12 Kat	3-8 Kat
Prothrombin G20210A		% 4-9	Homozigot: 26 Kat Heterozigot: 2-19 Kat	2-12 Kat
MTHFR C677T		% 11	Homozigot: 1-3 Kat	1-4 Kat
Protein C		% 0.2-0.3	10-15 Kat	?
Protein S		% 0.1-2.1	2-6 Kat	1-3 Kat
Antitrombin		% 0.02	25-50 Kat	?

Trombofilik testlerinin özellikle yapıldığı durumlar aşağıdaki şekilde sıralanmıştır

- Tekrarlayan Gebelik Kayıpları (Bütün Gebelik Dönemlerinde)
- İkinci ve Üçüncü Dönemlere ait Bir Gebelik Kaybı
- DVT, İnme
- Preeklampsi
- Damarın pıttı ile tıkanması durumları
- Pulmoner Emboli

1.1.1.6. İmmünolojik Durum

Rejeksiyon gebelik kayıplarında rol oynayan bir diğer etkidir. Rejeksiyon, T hücre ve humoral immün mekanizmalar aracılığıyla olan adaptif immün yanıttır. Gebe olmayan ve TKG geçmişine sahip bireylerin endometriyumundan alınan örnekler incelendiğinde naturel killer (NK) hücrelerinin oranının yüksek olduğu tespit

edilmiştir. Endometrium incelendiğinde CD56bright doğal öldürücü hücrelerin normalden daha fazla bulunduğu ve bu hücrelerin blastokistin dış tabakasından şekillenen hücreler olarak adlandırılan trofoblastların gelişimine ve büyümesine olumlu etkileri vardır. Ayrıca trofoblastları öldürücü etkileri de daha az bulunmuştur. Yapılan birden fazla bilimsel çalışmalarda; doğumda atılan, dökülen endometriyum kısmı olarak adlandırılan desiduada, CD56bright doğal öldürücü hücrelerin yapmış olduğu defekt düşük olma riskini arttırdığı gözlemlenmiştir. Ayrıca periferik kanda bulunan monoküler hücrelerin sahip olduğu ve doğal öldürücü hücreler olarak adlandırılan CD56dim de düşük oranını ve riskini artırmaktadır. Bütün bunlara ilaveten dendritik ve uterin makrofaj hücrelerinin de TKG ile ilişkisi bulunmuştur (Clifford ve ark. 1999).

Aracı ürünler olarak adlandırılan sitokinler, immünolojik sistemin hem çalışmasında hem de oto kontrolünde görev alan elmanlardır. Th1 hücresi tümör nekroz faktörü (TNF)- α , interferon (IFN)- γ ve interleukin (IL)-2 salınımını yaparken Th2 hücresi de IL-10 ve IL-4 salınımını gerçekleştirmektedir. TKG 'da Th1 sitokinleri gebelik öncesi dönem incelendiğinde endometriyal hücrelerde ve periferik kanın mononükleer hücrelerinde yüksek bulunmuştur. Ayrıca düşük olayı sonrasında yapılan çalışmalarda da desidua hücrelerindeki salınımın yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Clifford ve ark. 1999).

İmmün sistem elemanlarından olan MBL (Mannoz bağlayıcı lektin) monositlerden sitokin üretimini arttırmaktadır. Seviyesinin düşük düzeyde olması kötü gebelik ve tekrarlayan gebelik kayıplarında ilişkili olduğu bulunmuştur (Kilpatrick ve ark. 1995).

TKG'ya sahip olan hastalar incelendiğinde ANA yani antinükleer antikor pozitifliği görülmüştür. Antinükleer antikor (ANA); hücre çekirdeği yapısında yer alan (DNA, histon, sentromer gibi) yapılara karşı gelişen antikorlardır. Bu pozitiflik gebelik sürecini olumsuz etkilemektedir. Bu sebeple TKG hastalarında ANA taramasının yapılması oldukça önemlidir. Nihayetinde TKG'ya sahip hastalar değerlendirildiğinde MBL ve ANA taraması önerilir (Xu ve ark. 1990).

1.1.1.7. Çevresel ve Diğer faktörler

İlerleyen tıp ile birlikte üreme sağlığı konusunda birçok bilgiye ulaşabilmekteyiz. Bu sayede gebelik kayıplarının nedenlerini de daha iyi anlayabilmekteyiz. Buna rağmen TGK'ya sahip hastalar incelendiğinde kesin bir sebep bulunamamaktadır. Üreme sağlığını en çok etkileyen faktörler arasında kafein, alkol, nikotin ve sigara gelmektedir. Bununla beraber çeşitli kimyasallar (örn: arsenik, kurşun, formaldehit) radyasyon gibi faktörler de üreme sağlığını etkilemektedir. TGK'ya sahip olup nedeninin bulunamadığı bazı hastalarda tedavi edilemediği halde canlı doğum oranında oldukça fazladır. Çevresel faktörlerin yanı sıra hastaların ileri yaşlarında TGK'da etkilidir. Bu hastalar genel sağlık hakkında yakından takip edilmeli ve bilgilendirilmelidir (Smith ve ark. 2003).

1.2. ISI ŞOK PROTEİNLERİ (HSPs)

Çevresel strese maruz kalan hücreler hayati fonksiyonlarını durdurur ya da protein, DNA ve RNA gibi önemli bileşenlerin aktivitesini yavaşlatır. Bununla beraber birçok sistemde strese karşı tepkiler oluşmaktadır. Isı şok protein ailesi olarak adlandırılan HSP proteinleri bu tepkilerin en net görüldüğü protein ailesidir. İlk kez yüksek ateşe bağlı olarak hücrelerde keşfedilmiştir. HSP proteinleri insandan bakterilere kadar bütün organizmalarda bulunmaktadır. Yüksek oranda korunmuş bu proteinler çevresel ve kimyasal faktörlere karşı savunma mekanizmasına sahiptir. Bu mekanizma UV, sıcaklık, enfeksiyon, ağır metaller, etanol, yaşlanma vb. etkenler tarafından indüklenmektedir (Kregel 2002).

Reaktif oksijen türleri (ROS) ve oksidatif stres gibi patolojik süreçler sonucu HSP'ler hücresel dengenin yeniden sağlanması için moleküler şaperon olarak görev yapar (Benjamin ve McMillan 1998, Kalmar ve Greensmith 2009). HSP'lerin asıl görevleri; proteinlerin spesifik katlanmaları, onarımları, üç boyutlu yapılarının korunması ve hücre zarı üzerindeki katlanmalarıdır (Poon ve ark. 2004). Bunun yanı sıra hücresel stres sonucunda hücrenin yaşamasına veya ölümüne karar verilmesi, hücrenin kademeli olarak apoptozise uğratılması, hücrenin sinyal iletiminin düzenlenmesi ve stresin indüklenmesinde de önemli rol oynar. Daha küçük molekül HSP'erin ise tanınal amaçlarda kullanıldığı bilinmektedir (George ve ark. 1999). Molekül ağırlıkları 15 kDA ile 110 kDA değişmektedir. Stres faktörleri veya ani ısı değişiklikleriyle karşılaşıldığında HSP'lerin hücre içi miktarlarında artış gözlemlenir.

Bu sayede hücre içinde strese karşı direnç güçlenmektedir. Çoğu canlıda yapısı benzerlik göstermektedir. 1962 yılında Ferrucia Ritessa Drosophila Melanogaster canlısının lavralarında tükürük hücrelerinde ısı-şok cevabının gen aktiviteleri sonucu olduğu bulunmuştur. 1974 yılında ısı şok proteini adını almıştır (George ve ark. 1999).

1.2.1. Isı Şok Protein Ailesi

HSP'ler moleküler ağırlıklarına göre alt gruplara ayrılırlar. Bunun yanı sıra başka benzer özelliklerine göre de sınıflandırılabilirler. Örneğin HSP60 ve HSP 70 ailelerine bakacak olursak ister insan ister bitki hücrelerinde bulunsun gösterdiği fonksiyonlar ve amino asit sıralamaları %50'nin üzerinde benzerlik gösterir (Jakob ve ark. 1999). HSP'ler 5 ana gruba ayrılırlar. Bu gruplar; HSP 110-100, HSP 90, HSP 70-72-73, HSP 60-65 ve küçük ısı şok proteinleridir.

1.2.2. Memelilerdeki Isı Şok Proteinleri ve Fonksiyonları

1.2.2.1. HSP110-100

Nükleolustaki rRNA ile bağlantı kurmaktadırlar. Kümelenen proteinleri ayırmak için onları eritirler. Ayrıca HSP 100 mayalarda sıcaklık toleransının kazanılmasında da görev alırlar. Bitkilerde ise HSP 100 belli bir ısı toleransının ardından kapasitesini yitirmektedir (Anonim 2006, Pockley 2001).

1.2.2.2. HSP 90

HSP 90a ve HSP 90b diye iki alt gruba ayrılır. HSP 90b, HSP 90a'dan miktar olarak daha fazla bulunmaktadır. Hedef proteinleri sitoplazmada fikse eder. Ligand yokluğunda ise hormon reseptör bağlayıcı olarak etki göstermektedir. Ayrıca steroid reseptörlerine bağlantı sağlarlar ve steroid hormonlarının bağlanmasına kadar nükleer DNA'ya bağlanmaya çalışan reseptörlerin engellenmesi işini gerçekleştirmiş olurlar. Bunun sonucunda ise steroid reseptörler ile DNA olması gereken zamandan önce bir etkileşime girmemiş olur (Russell ve ark. 2000). Ek olarak inaktif olan steroid reseptörlerini, kinazları, hücre yaşam süresinin yenilenmesi ve immünite devamlılığının sağlanmasında görev almaktadır. ATP'yi bağlar, ancak ATPaz aktivitesi bilinmemektedir (Russell ve ark. 2000).

1.2.2.3. HSP 70 (HSP 72-73)

Hücresel döngünün düzenlenmesinde görev almaktadırlar. HSP 72 uyarıcı olarak etki gösterirken, HSP 73 ise düzenleme görevine sahiptir. Bu iki proteinde sitoplazma ve nukleusta bulunmaktadır. HSP 70 ailesi; açılmamış proteinlerin yakalanarak parçalanma için hazır bir hale getirilmesi, yanlış katlanmış proteinler arasındaki dengenin sağlanması, ATP'ye bağlanma ve güçlü ATPaz aktivitesi ile çeşitli fonksiyonlara sahiptir (Henle ve ark. 1998).

1.2.2.4. HSP 60-65

Mitokondriada büyük oligomerler halinde bulunurlar. Hücre solunumu ve makromoleküler proteinlerin yapım aşamasında görev almaktadırlar. Hipoksi sürecinde stress proteinlerinin uyarılması ve ayrıca da hipoksi durumlarında hücresel homeostasinin devamlılığında önemli bir yere sahiptirler. Ayrıca ATP'ye bağlanır ve ATPaz aktivitesi gösterirler (Ganju ve ark. 1999).

1.2.2.5. sHSP (Küçük Isı Şok Proteini)

sHSP monomer molekülü 15-45 kDA ağırlığa sahiptir. Sitoplazma ve çekirdekte yer alırlar. Stress altında olan hücrelerde önemli ölçüde arttığı bulunmuştur. Ek olarak antioksidan özelliğe de sahiptirler (Anonim 2006, Pockley 2001). Memeli hücreleri incelendiğinde yalnızca stres ile başa çıkmada değil, beraberinde başka hücre içi ve dışı olaylarda da (apoptoz ve farklılaşma vs.) görev yaptığı gözlemlenmiştir (Wang ve ark. 2004).

1.2.3. Isı Şok Proteinlerinin Fizyolojik Fonksiyonları

1.2.3.1. Isı Şok Proteinlerinin Hücre Dışı Fonksiyonları

HSP'ler normalde hücrenin içinde bulunur. Hücreler öldüğünde ve içerikleri uzaklaştırıldığında hücre dışında gözlenirler. Buna, dağınık hücrelerin plansız ölümü anlamına gelen "nekroz" denir. Hücre dışı HSP'ler, bağışıklık sistemini hastalık ve enfeksiyona karşı uyarmak için çok güçlü bir indüktif etkiye sahiptir (Pockley 2001).

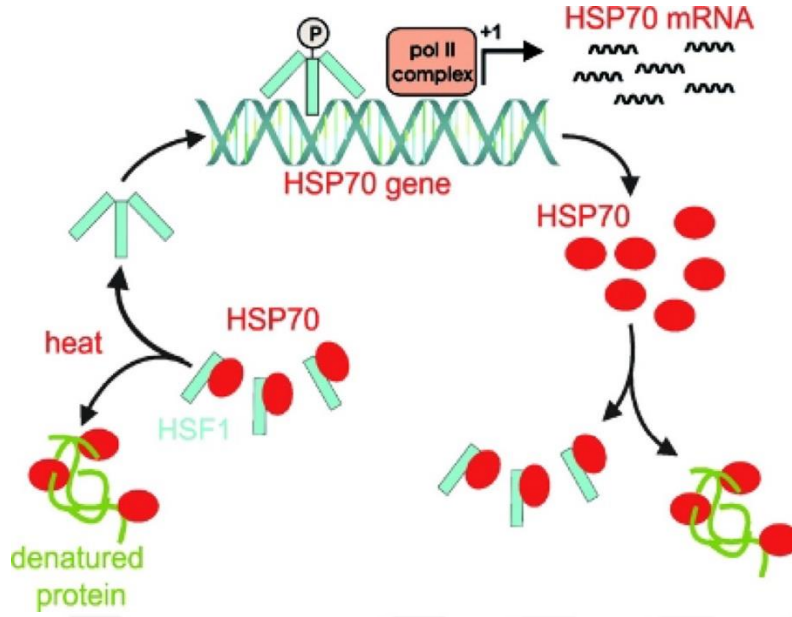
1.2.3.2. Isı Şok Proteinlerinin Hücre İçi Fonksiyonları

HSP'lerin normal işlevleri, her proteinin hücreye bağlanmasını sağlamaktır (protein katlanmasına yardımcı olmak ve protein üretimini düzenlemek). HSP'ler peptidlerin hücreye alınması görevinde yardımcı olur. Ayrıca hücre içi peptitleri çevreler ve sınırlandırır. Bu proteinler hücresel şaperon görevi görse de; ayrıca protein sentezi ve taşınmasında da rol oynarlar. Çünkü bu proteinlerin hücrede kendine özgü bir lokalizasyonu vardır (Pockley 2001).

Stres; birçok temel yapısal enzim ve proteinde istenmeyen yapısal ve fonksiyonel değişikliklere neden olur. Böylece stres altında hücrenin hayatta kalma süreci, proteinlerin işlevsel yapısının korunmasını, doğal olmayan proteinlerin birikmesinin önlenmesini, denatüre proteinlerin işlevsel yapılarını yeniden düzenleyecek şekilde yeniden düzenlenmesini ve işlevsel olmayan ancak potansiyel olarak zararlı peptitlerin ortadan kaldırılmasını içerir. Bu nedenle HSP'ler hücre savunmasında tamamlayıcı rol oynarlar ve bazen proteinleri stresten korumak için birlikte hareket ederler (Wang ve ark. 2004).

1.2.3.3. Isı Şok Protein Gen Transkripsiyonu

Isı şoku protein geninin transkripsiyonu, protein geninin promotor bölgelerindeki ısı şoku elemanlarının uygun transkripsiyon faktörleriyle etkileşimi ile sağlanır. Normal koşullar altında, sitoplazmada DNA'ya bağlanmayan monomerik bir molekül olarak bulunur. Stres koşulları altında HSF 1, DNA'ya bağlanma yeteneğine sahip olacak şekilde trifosfat formuna dönüşür ve sitoplazmadan çekirdeğe doğru hareket eder. HSP'ler çekirdekte DNA promoter bölgelerine bağlanır. Böylece HSP sentezi artarak HSP geninin transkripsiyonunu sağlar (Pockley 2001).



Şekil 2. Hücresel sıcaklık algılama ve HSP 70/HSF1 etkileşimleri (Pockley 2001)

1.2.3.4. Isı Şok Proteinleri ve Bağışıklık

Hücre dışı HSP'ler, bağışıklık sistemini hastalık veya enfeksiyon konusunda uyarmak için çok güçlü tehlike sinyalleri gönderir (Pockley 2001). Bunlar, konakçıda birçok patolojik ajana karşı immün yanıtın oluşturulmasında rol oynayan antijenlerdir. Stres proteinlerine verilen bağışıklık tepkileri, çapraz reaksiyonlar yoluyla hücrenin kendi kendine reaksiyonlar vermesine yol açabilir.

Sağlıklı insanların, enfeksiyona veya strese maruz kaldıklarında hücrelerinden kurtulmak için kendi stres proteinlerine karşı bağışıklık tepkisi verme yeteneklerini kullanabilecekleri öne sürülmüştür. Bu yeteneklerin düzensizliği bazı otoimmün hastalıklara neden olabilir. Stres proteinleri, bağışıklık tepkisinin hedefleri olmanın yanı sıra, antijen sunumunda da önemli bir rol oynar (Laad ve ark. 1999).

1.2.3.5. Isı Şok Proteinleri ve Kanser

1981 yılında Promod Srivastara adlı bir öğrenci bir dizi deneyle tümör hücrelerini parçaladı. Daha sonra farelere nakledilen her tümör hücresi ile gelişmesini umduğu kanserden korunduğunu gördü. Daha sonraki deneyler, fareleri kansere karşı korumaktan sorumlu elemanların ısı şok proteinleri olduğunu gösterdi (Laad ve ark. 1999). Çoğu kanser türünde ısı şoku proteinlerinin üretimi artar. Isı şok proteinleri,

bağışıklık sisteminin çoğalması, farklılaşması, istilası, metastazı, ölümü ve tümör hücrelerinin tanınmasında rol oynar (Ciocca ve Calderwood 2005).

HSP-peptit kompleksleri kanser hastalarının kanserli hücrelerinde oluşur. Bir hastanın hücrelerinde bu anormal peptitlerin varlığı kanser çeşidine ve bireyden bireye değişir. Bu nedenle çok küçük miktarlarda anormal peptidlerin oluşumu bile kanser riskine yol açar. Ayrıca ısı şok proteinleri, belirli kanser hücresi türlerinin farklılaşma derecesinin bir göstergesi olabilir. Bazı kanser tedavilerinde HSP üretiminin artması tedavinin etkinliğinin bir işaretidir. Örneğin meme kanserinde HSP 27 ve HSP 70'in artması kemoterapiye direncin göstergesidir (Laad ve ark. 1999).

1.2.3.6. Isı Şok Proteinleri ve Viral Enfeksiyonlar

Virüsler, hücrenin DNA kopyalama mekanizmasını ele geçirmek için HSP'leri kullanır. Simian virüsü 40 (SV40) T antijeni, hücre gelişimini kontrol eder ve HSP'leri kullanarak doku dönüşümüne neden olur (Zügel ve Kaufmann 1999).

1.2.3.7. Isı Şok Proteinleri ve Kalp Hastalıkları

Artan HSP 70 salınımı kalp yetmezliğine karşı koruyucu bir mekanizma oluşturur. Deneysel iskemi olgusunda, çalışmalar genetiği değiştirilmiş farelerde HSP 70'in arttırılmasının hasarı büyük ölçüde ortadan kaldırabildiğini göstermiştir (Landry 1998).

1.2.3.8. Isı Şok Proteinleri ve Oksidatif Stres

Stres, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler kanıtlar da dahil olmak üzere çeşitli tepkilere neden olur. Bu durumda oksidatif stres HSP ekspresyonunun artmasına neden olur. Stres altında sıçan damar endotel hücrelerinde HSP düzeylerinin arttığı gözlemlendi. Kan basıncındaki ani artışlar bu reaksiyonlara bağlanmıştır (Landry 1998).

Isı şoku proteinlerinin, hücre döngüsü ve hücre ölümü düzenleyicileri de dâhil olmak üzere çok sayıda sinyal molekülüyle ilişkili hücre sinyal ağlarında anahtar rol oynadığı tespit edilmiştir. Bu konuyla ilgili çok sayıda araştırma, bitkilerde ve diğer organizmalarda etkileşim mekanizmalarının benzer olduğunu göstermektedir (Landry 1998).

Aslında Arabidopsis'te ısı şok transkripsiyon faktörleri, antioksidan askorbik asit peroksiteksin ekspresyonuna bağılıdır ve HSF (ısı şoku faktörü) yalnızca HSP sentezinde rol oynamakla kalmaz, aynı zamanda antioksidan genlerin ekspresyonu yoluyla oksidatif stresin düzenlenmesine de katılır (Wang ve ark. 2004). Memeli hücrelerinde, sHSP'lerin antioksidan özelliklere sahip olduğu ve yalnızca oksidatif strese karşı korumada değıl aynı zamanda apoptoz ve farklılaşma gibi diğerk hücreseel fonksiyonların düzenlenmesinde de rol oynadığı bilinmektedir (Arrigo 1998).

1.2.4. Isı Şok Proteinlerinin Teşhis Yöntemleri

- Elektroforez
- PCR (Özellikle küçük ısı şok proteinlerinin teşhisinde tercih edilir)
- ELİSA
- Western Blotting

1.2.5. HSP 70 ailesi

HSP 70 ailesi, hücreleri ksenobiyotiklerin varlığında hasara karşı koruyan bir protein ailesidir (Sharp ve ark. 1999). Birincisi, proteinlerin kontrolü ve dizilenmesinde rol oynar. HSP 70 tarafından tanımlanan hatalı dizili proteinler, proteozom veya lizozomda yok edilir. Bu nedenle hasarlı proteinlerin temizlenmesi HSP 'lerin varlığında gerçekleştirilir. Bazı durumlarda yanlış katlanmış proteinler, düzenli olarak yeniden katlanmaları sağlanarak kurtarılabilir (Kalmar ve Greensmith 2009). HSP 70, hücreleri ve dokuları ölümcül sıcaktan ayrıca da birçok diğerk çevresel ve patolojik stres faktörlerinden korumaktadır. HSP 70 şaperonları TNF, monosit, oksidatif stres, seramid, terminal farklılaşma, UV radyasyon, kaspaz3'ün aşırı ekspresyonu, iskemik yaralanma, sepsis kaynaklı yaralanma, hidrojen peroksit zehirlenmesi, apoptozis, nitrikoksit asit ajanları ve toksik ilaçlar tarafından indüklenen hücre ölümüne direnci arttırır.

HSP 70 ailesi, kemirgenlerde 71 kDa ve insanlarda 72 kDa moleküler ağırlığa sahip, HSP'lerin en uyarılabilir grubudur. Bu grup, endoplazmik retikulumda lokalize olan ve yapısal olarak glikoz ve proteinlerden oluşank HSC 70'i (P72; HSC73; Hspa8), onun uyarılabilir formu HSP 72 ve GRP 75'i içerir (Poon ve ark. 2004). Sinir sisteminin çeşitli lezyonlarında HSP 70 sentezinin önemli ölçüde arttığı tespit edildi.

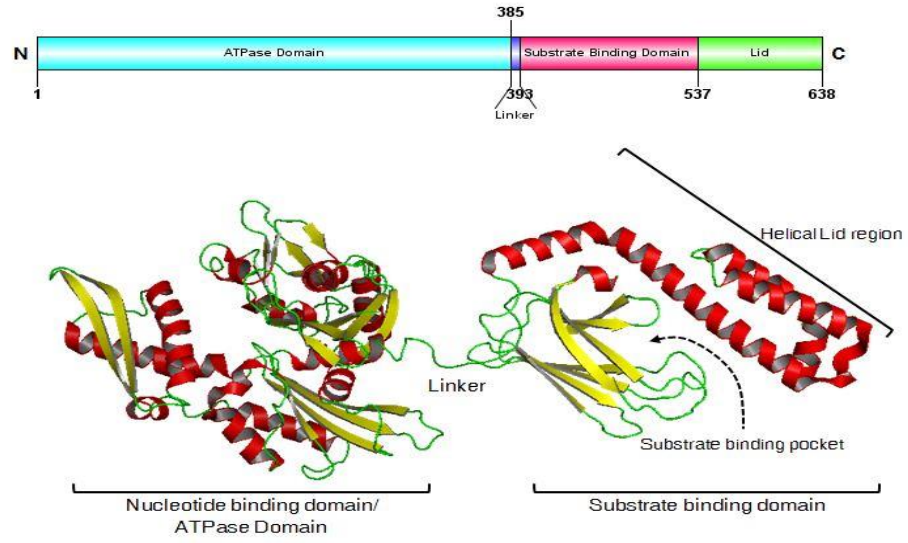
HSP 70'in ekspresyonunun engellenmesi hücrenin yaşamı kısaltır (Jäättelä 1999, Witzmann ve ark. 1996, Riabowol ve ark. 1988). Memeli hücrelerinin HSP 70 geni hücre döngüsünün S fazı sırasında geçici bir aktivasyon üretmek için serum tarafından uyarılabilir (Milarski ve Morimoto 1986). Ayrıca HSP 70 spermatogenesis sırasında da ifade edilir (Mori ve ark. 1999). Üretimi insan endometrial hücrelerindeki hormonlar tarafından düzenlenebilir (Tang ve ark. 1995).

HSP 70 ve ayrıca da Hsp90 birçok immünolojik süreçlerde rol oynarlar. Bu moleküller şaperonlar proteozomlar arasındaki antijen peptit transferinde ve endoplazmik retikulumun yanısıra moleküler süreçlerde antijen ile ilgili geçişlerde etki gösterirler. Onlara insan MHC Sınıf I moleküllerinin evrimsel bir protitipi olarak bakılabilir (Sargent ve ark. 1989, Srivastava ve Maki 1991). HSP 70 ailesinin N-terminal substrat bağlanma bölgesinin üç boyutlu yapısı MHC Sınıf I moleküllerinin alfa1 ve alfa 2 domainleri üzerindeki peptit bağlayıcı olukla benzerdir. İlaveten MHC genleri kromozom bandının 6p21.3 bölgesinde lokalize olmuşlardır. Lokalize olunan kromozom bölgesinde çok sayıda HSP 70 ailesinin fonksiyonel genleri bulunmuştur (Milner ve Campbell 1990).

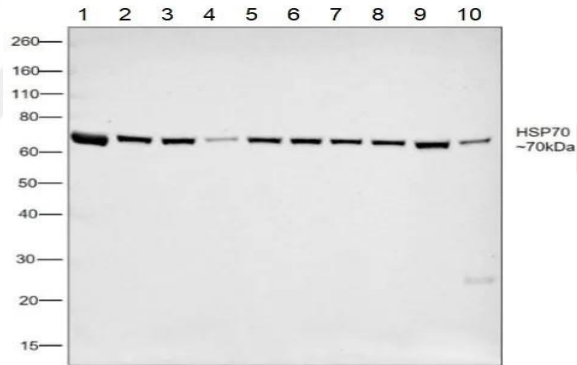
Ayrıca da HSP 70 antijen sunan hücreler, modifiye antijen sunumu, endojen antijenlerinin sunumunun engellenmesi ve sunum için yeni antijenlerin ilave edilmesi tarafından antijen süreci sırasında peptitlerin farklı bağlanma motifleri ile etkileşim halindedir (Shi ve Thomas 1992). Bu protein çeşitli patojenlere karşı immün yanıtta korunmuş bir antijen olarak T hücreleri tarafından tanınmakta ve oto-immunitede hedef bir molekül olarak görülmektedir (Mizzen 1998).

HSP sentezi, denatüre proteinler tarafından aktive edilen HSF (ısı şoku transkripsiyon faktörü) tarafından indüklenir. Aktive edilmiş HSF, hücre çekirdeğine fosforile edilmiş tridimerler olarak girer. HSF hücre çekirdeğine girdiğinde HSE (stres protein elemanları) ile birleşir ve HSP genleri DNA yapısında transkripte edilir. HSP 70, denatüre proteinlerine ATP bağımlı bir şekilde bağlar (Poon ve ark. 2004, Franklin ve ark. 2005).

Sudaki organizmalar (algler, rotiferler, yumuşakçalar, eklembacaklılar, kabuklular, balıklar vb.) üzerinde yapılan toksikolojik çalışmalar, HSP 70 gibi yüksek moleküler ağırlıklı stres proteinlerinin, genellikle protein denatürasyonuna yol açan, toksik maddelere hücresel düzeyde verilen tepkinin biyobelirteçleri olduğunu göstermiştir (Currie ve ark. 2002, Deane ve Woo 2005).



Şekil 3. HSP 70'in 3 boyutlu yapısı, domain organizasyonu
(https://www.researchgate.net/figure/Hsp70-protein-structure_fig2_279182099 2015)



Resim 1. HSP 70 Proteini'nin Western Blot Bant görüntüsü
(<https://www.abcam.com/products/primary-antibodies/hsp70-antibody-5a5-ab2787.html> 2023)

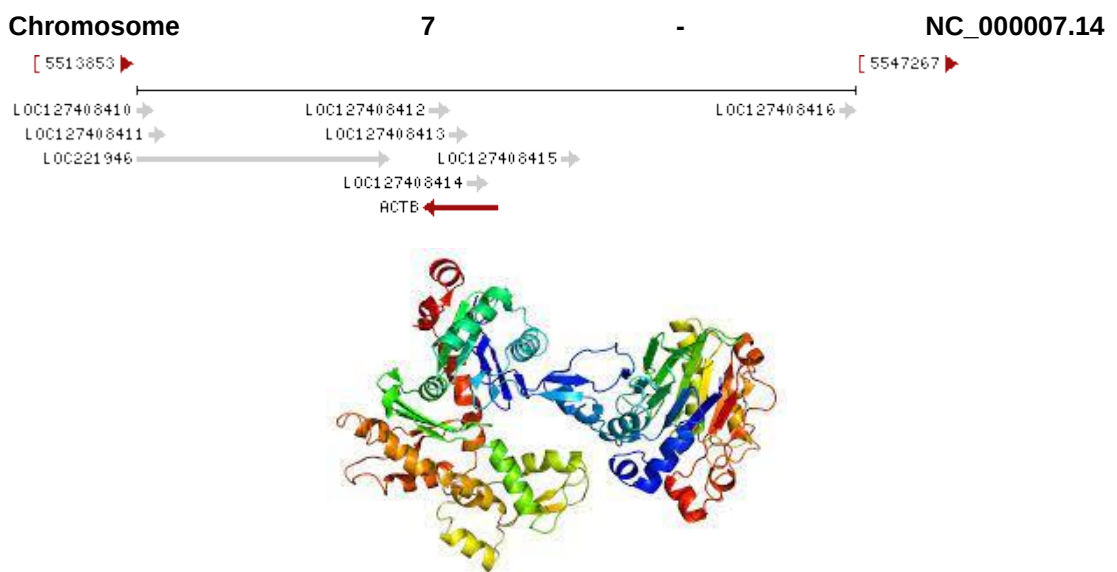
1.3. AKTİN PROTEİNLERİ (β-Aktin vs.)

Aktin, birçok genel ve özel hücresel işlev için gerekli olup hemen hemen tüm ökaryotik hücrelerde en çok bulunan ve yüksek oranda korunan proteinlerdir. Ayrıca hücre iskeleti, kas kasılması, sitokinez, göç, kromatinin yeniden şekillenmesi, transkripsiyonel düzenleme ve hücre şeklinin düzenlenmesi gibi çok çeşitli hücresel fonksiyonlara katkıda bulunur. İki izoform bulunur; β-aktin ve γ-aktin. Her yerde eksprese edilir ve amino asit sekansında %99 özdeşdir. Ancak daha önceki çalışmalar, yalnızca β-aktinin yaşam için vazgeçilmez olduğunu göstermiştir (Pollard ve Cooper 2009).

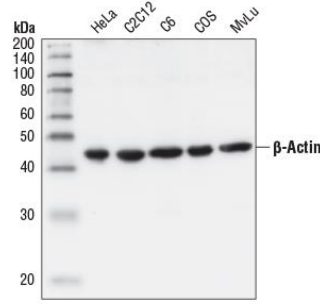
Genellikle tek bir protein olarak düşünülmesine rağmen, aslında ayrı genler tarafından kodlanan 6 aktin izoformu mevcuttur. Sitoplazmik β - ve γ -aktin izoformları her yerde eksprese olurken, diğer 4 aktin ise kaslarda eksprese olmaktadır. Sitoplazmik aktinler, hem gen hem de protein düzeyinde oldukça benzerdirler. Actb ve Actg1'in kodlama dizileri %89 aynıdır ve β - ve γ -aktin, 375 aa kalıntısının yalnızca 4'ünde farklılık gösterir. Ayrıca, insan ve fare Actb kodlama dizileri %90 özdeşir. Ek olarak β - ve γ -aktin birincil dizileri kuşlar ve memelilerde de aynıdır (Perrin ve Ervasti 2010).

Housekeeping proteinleri, Western blot analizinde protein yüklemesi için dahili kontrol ve referans olarak kullanılır. Bu uygulama, bu tür housekeeping genlerinin her dokuda her yerde ve yapısal olarak eksprese edildiği ve normal hücre fonksiyon için gereken minimum sayıda temel transkript ürettiği fikrine dayanmaktadır. En yaygın kullanılan housekeeping proteinleri gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH), β -tubulin ve β -aktindir (Li ve Shen 2013).

Ayrıca housekeeping genler; Western blot, Northern blot, RT-PCR, vb. çalışmalarda gen ifadesinin veya protein ekspresyon seviyesi normalizasyonu için dahili kontroller olarak da yaygın bir şekilde kullanılırlar. Genel olarak vücudun veya organizmanın tüm hücrelerinde aynı seviyede ifade edildiklerine inanılmaktadır. Çünkü bu genlerin hücrenin temel işlevlerini sürdürebilmesi için gerekli olduğu düşünülmektedir. Western blot ve gerçek zamanlı RT-PCR gibi deneylerde ifadeleri gelişim aşamasına, incelenen doku türüne, deney koşullarına vb. bağlı olarak değişebileceği ortaya konulmuştur (Lin ve Redies 2012).



Şekil 4. β -Aktin proteinin kromozom yerleşim bölgesi ve 3 boyutlu yapısı (https://en.m.wikipedia.org/wiki/File:Protein_ACTB_PDB_1atn.png 2009)



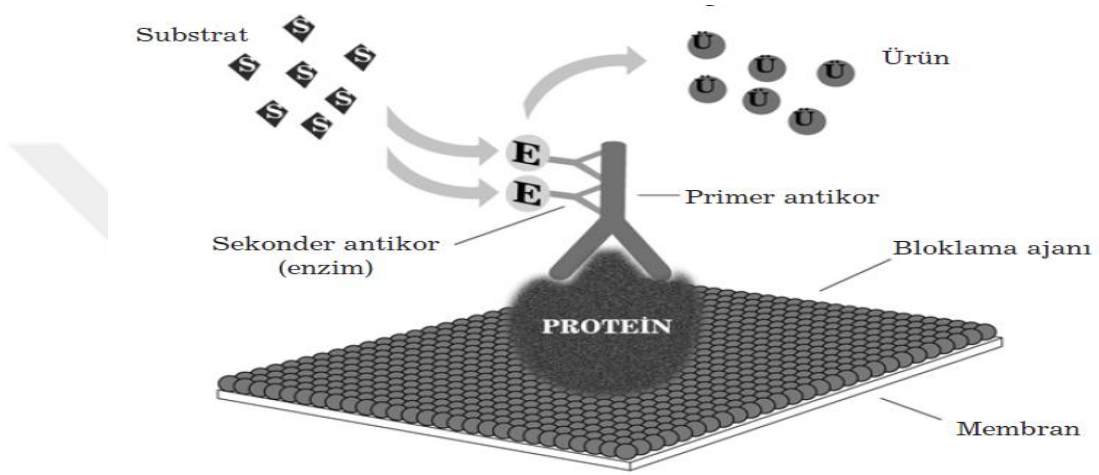
Resim 2. β -Aktin proteini'nin Western Blot Bant görüntüsü
(<https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/b-actin-antibody/4967>
2023)

1.4. WESTERN BLOT

1975 yılında Southern, nitroselüloz membran filtreleri kullanılarak jel elektroforezi ile ayrılan spesifik DNA parçalarını tanımladı. Bu teknik hızla kabul edildi ve Southern blot olarak adlandırıldı. Bu teknik moleküler biyolojinin temel taşı haline geldi. Kısa bir süre sonra, RNA moleküllerini filtre matrislerinde hareketsizleştirerek (immobilize) analiz etmek için yeni bir teknik geliştirildi. Bu tekniğin ismi Northern Blot olarak adlandırıldı. Jeolojik açıklamalar serisinin devamında; 1979'da keşfedilen yeni tekniğe protein blotlama veya çoğumuzun bildiği gibi Western Blot adı verildi. "Western blot" veya "immünoblot" tekniği, antikor tespitinin özgüllüğünü jel elektroforezinin farkedilebilir en küçük değişim ölçüsü olarak tanımlanan rezolüsyonunu birleştiren bir yöntemdir. Blot tekniği, protein antijenlerinin, antijenin varlığı ve miktarı, moleküler ağırlığı ve antijen izolasyonunun etkinliği gibi önemli özelliklerini belirlemek için kullanılabilir (Towbin ve ark. 1979).

1979 yılında jel yönteminin keşfiyle protein transferi (blotlama) araştırma laboratuvarlarında rutin bir araç haline geldi. Geleneksel olarak karmaşık bir numunedeki küçük miktardaki proteini tespit etmek veya protein sentezini ve eliminasyonunu izlemek için kullanılır. En basit protein blotlama yöntemi olan dot blot yönteminde numune vakumlu filtreleme kullanılarak mikro gözenekli bir zara aktarılır. Bu yöntem, toplam protein sentezi miktarı hakkında niteliksel bilgi sağlayabilir ve birden fazla örnek paralel olarak test edilebilir, ancak proteinin moleküler ağırlığı hakkında bilgi sağlamaz (Towbin ve ark. 1979).

Diğer yöntemlere göre daha karmaşık olan Western blot yöntemi, temel olarak protein karışımının jel elektroforezi ile ayrıldıktan sonra uygun bir membrana aktarılması (transfer) süreçlerini içermektedir. Bir protein, etiketli bir antikor veya antijen ile spesifik bir reaksiyon yoluyla tanımlanabilir. Bu yöntemi kullanarak belirli bir proteinin moleküler ağırlığı hakkında bilgi edinmek ve dönüştürülmüş ürünlerin izoformlarını ayırt etmek mümkündür. Protein uygun bir membrana aktarıldıktan sonra görüntüleme için boyanabilir, N-terminal dizilimi ile doğrudan tanımlanabilir ve kütle spektrofotometrisi veya immünoteksiyon gerçekleştirilebilir (Burnette 1981).



Şekil 5. Membran temelli immün saptama (Burnette 1981)

1.4.1. İmmün Saptamaya Etki Eden Faktörler

Yeni bir Western blot protokolü geliştirilirken tüm bileşenler ve bunların etkileşimleri dikkate alınmalıdır. Antikor konsantrasyonu, tampon içeriği, bloke edici ajan ve inkübasyon süresi deneysel olarak kontrol edilmeli ve en iyi koşullar belirlenmelidir. Su kalitesinin her düzeyde önemli olduğu ve minimum kirliliğin bile ciddi sorunlara yol açabileceği sıklıkla gözden kaçırılmaktadır. Örneğin yaban turpu olarak adlandırılan ‘horseradish’ teki peroksidaz enzimi, en saf suda bile yaygın olarak bulunan pirojenler tarafından inhibe edilir ve azit antikor çözeltilerinde koruyucu olarak kullanılır (Towbin ve ark. 1989).

1.4.1.1 Tamponlar

Genellikle iki tampon çözeltisi kullanılır. Tris Buffered Saline (TBS) ve Phosphate Buffered Saline (PBS) dir. Bu tamponların farklı konsantrasyonlar da kullanımı çeşitli makalelerde yayınlanmıştır. Burada önemli olan nokta tamponun antikorun biyolojik aktivitesini sürdürebilmesidir (Towbin ve ark. 1989).

1.4.1.2. Bloklama

Anlamlı bir sonuç elde etmek için antikorların yalnızca ilgili membran proteinlerine bağlanması gerekir. Antikorların spesifik olmayan bağlanmasını sınırlamak için membranın boş kısımları, etkileşime girmeyen proteinler veya iyonik olmayan deterjanlarla bloke edilir. Bloke edici ajanın membrana afinitesi, antikora göre daha yüksek olmalıdır. En sık kullanılan bloke edici maddeler sığır serum albümini (BSA, %0,2 ila %5), yağsız süt tozu, kazein, jelatin ve seyreltilmiş Tween 20 çözeltileridir (Towbin ve ark. 1989).

1.4.1.3. Antikorlar

Membran bloke edildikten sonra ilgilenilen proteine özel bir birincil (primer) antikorla inkübe edilir. Bağlanmamış birincil antikorun çıkarılmasından sonra membran, birincil antikora bağlı bir ikincil antikor kompleksi oluşturmak üzere konjuge bir enzim veya boya içeren ikincil (sekonder) bir antikorla inkübe edilir. Doğrudan etiketlenmiş bir birincil antikorun kullanılması mümkün olsa da; İkincil antikorların kullanımının hassasiyeti artırması gibi birçok avantajı vardır (Towbin ve ark. 1989).

1.4.1.4. Yıkama

TBSTween 20 (TBST) veya PBS-Tween 20 (PBST) çözümleri, ortamda bağlanmadan kalan ve spesifik olmayan yüksek sinyallere veya spesifik düşük sinyallere neden olan antikorları uzaklaştırmak için kullanılır (Towbin ve ark. 1989).

1.4.1.5. Saptama Solüsyonları

Membrana spesifik bağlanmayı saptamak için, ikincil bir antikora (horseradish peroksidaz veya alkalin fosfat) bağlı bir enzimle reaksiyona girerek sinyal üreten

substratların kullanılması gerekir. Yaygın olarak üç tip substrat kullanılır. Kemifloresans, kimyasal ışıltama olarak adlandırılan kemilüminesans ve renk değişimine neden olan kromojenik substratlardır. Western blot, araştırmacının kullanacağı ilgili proteininin hücre veya doku daki miktarına, fizyolojik koşullara ve kullanılan antikor tipine bağlı olarak çeşitli modifikasyonlar gerektirebilir (Towbin ve ark. 1989).

1.4.2. Western Blot Yöntemi ve Genel Aşamaları

Western blot, bir dokudaki spesifik bir proteinin analizine olanak sağlayan bir moleküler biyoloji tekniğidir. Bu tekniği kullanarak dokudaki proteinlerin varlığını, boyutlarını, konsantrasyonlarını, konsantrasyon değişikliklerini, farklı gruplar arasındaki konsantrasyon karşılaştırmasını vb. belirlemek mümkündür (Towbin ve ark. 1989).

Western Blotlama prosedürü 4 ana kısımdan oluşur:

1.4.2.1. Örneklerin Hazırlanması

Hem in vitro (hücre kültürleri vb.) hem de in vivo (hayvanlar üzerinde deneysel çalışmalar) deneyler yapıldıktan sonra öncelikle kültürdeki doku hücreleri veya hücreler parçalanır ve protein içeren kısım diğerinden ayrılır. Elde edilen protein karışımlarındaki protein konsantrasyonu daha sonra spektrofotometrik yöntem kullanılarak belirlenir. Bu adımın en iyi şekilde gerçekleştirilmesi Western jelin her kuyucuğuna eşit miktarda protein yüklenebilirliğini sağlar (Towbin ve ark. 1989).

1.4.2.2. Yürütme ve Transfer

İlk olarak proteinler denatüre edilir, indirgenir ve düzgün çalışması için hazırlanır. Numuneler daha sonra jelin kuyucuklarına yüklenir, elektroforez (akış) yoluyla moleküler ağırlığa göre bantlara ayrılır (running) ve ardından bir membrana aktarılır (transfer edilir). Bu adımın amacı antikorlarla işaretlenebilecek bir yapı (membran veya blot) elde etmektir (Towbin ve ark. 1989).

1.4.2.3. İlgili Proteinin İşaretlenmesi ve Boyanması

İmmünohistokimya gibi bloklama, primer antikor, yıkama, sekonder antikor, yıkama ve boyamadan oluşur. Görünür dalga boyundaki boyalar yerine kemilüminesans etiketleme veya enzim-substrat ilişkisini kullanan yöntemler (alken fosfataz yöntemi) kullanılır (Towbin ve ark. 1989).

1.4.2.4. Görüntüleme ve Analiz

Görüntüleme işlemi karanlık bir oda da film üzerine veya normal bir laboratuvar koşullarında membran üzerinde de yapılabilir. Bantlar görünür hale gelir ve analiz edilebilir. Protein ekspresyon seviyeleri daha sonra analiz programları kullanılarak analiz edilir. Önceki adımların sorunsuz ilerlemesi bu adımın da sorunsuz bir şekilde ilerleyeceğini göstermektedir (Towbin ve ark. 1989).

1.4.3. Spektrofotometre ile Protein Konsantrasyonu Tayini

Spektrometre (spektrofotometre, spektrograf veya spektroskop) veya spektroskop, elektromanyetik spektrumun belirli bir bölümünde ışığın özelliklerini ölçerek spektroskopik analiz yoluyla materyalleri belirlemek için sıklıkla kullanılan hem bir yöntem hem de bir araçtır. Western Blot'ta spektrofotometre ile protein absorbansı ölçülür. Bunun için genellikle Bradford yöntemi kullanılır. Numunenin belli bir oranı iyice karıştırılarak mikroküvete aktarılır. Daha sonra Bradford Protein Assay Reagent (Sigma®) eklenir. Numuneler ölçülmeden önce öncelikle standart protein çözeltileri hazırlanır (0,1-1,4 mg/ml aralığında) ve protein konsantrasyonu-absorbsiyon grafiği olarak adlandırılan standart bir grafik oluşturulur. Bu işlem her örnek ölçüm çalışması öncesinde yapılmaktadır (Towbin ve ark. 1989).

Daha sonra numunelerin absorbansı ölçülür. Karışım herhangi bir kalıntı veya parçacık içermemelidir. Bu amaçla öncelikle numuneye Bradford çözümünün uygulanması tavsiye edilir. Bradford'u ekledikten sonra, iyice karışmasını sağlamak için tüp birkaç kez ters çevrilmelidir. Ölçüm ilgili dalga boyunda gerçekleştirilir. Absorbans değeri protein konsantrasyonuyla doğru orantılıdır. Referans proteini olarak BSA (sığır serum albümini) kullanıldığında doğrusal konsantrasyon aralığı 0,1 ila 1,4 mg/ml'dir. Absorbans değerleri her numune için karşılık gelen nm'de ölçülür. Oluşturulan standart grafiğin eğiminden OD (optik yoğunluk absorbansı) değerini

bildiğimiz bir proteinin C değerini (konsantrasyon) hesaplayabiliriz. Bu işlemlerden elde edilen verilere göre numunelerdeki protein miktarı belirlenir. Sonuç olarak jele yüklenecek total protein miktarı hesaplanır (Towbin ve ark. 1989).

1.4.4. Coomassie Blue Brilliant Boyama

Coomassie mavisi çeşitli formlarda (R250 veya G250 gibi), protein boyama için yaygın olarak kullanılan bir belirteçtir. Bu boyalar proteinlerle kimyasal reaksiyona girmezler, sadece kovalent olmayan kompleksler oluştururlar. Etkileşimin öncelikle iyonik nitelikte olduğuna inanılmaktadır, ancak bağlanma, proteinlerdeki ana grupların varlığından kaynaklanmaktadır ve potansiyel olarak polar olmayan (apolar) Van der Waals kuvvetleri ile bağlanmaktadır. Bu nedenle boyalar tüm proteinlere eşit şekilde bağlanmaz. Ancak iki boya yapısal olarak benzerdir; Bununla birlikte, farklı fiziksel prosedürler ve boyama prosedürleri gerektirirler ve hiçbir parçacık protokolü birbirinin yerine kullanılamaz (Bradford 1976). Coomassie mavisi genellikle jellerdeki proteinleri boyamak için kullanılır ve özellikle R250 formundadır. Bu işlem boyayı proteinlere bağlayarak sudan etkilenmemesini ve çözünmemesini sağlar. Jeli yıkadığınızda, boyanın tamamını değil çoğunu çıkarmış olursunuz. Böylece mavi boya bağlandığında proteinler görünür hale gelir. Poliakrilamid jelde yaklaşık 0.1 µg protein tespit edilebilir. Diğer bazı boyalar proteinlere sıkı bir şekilde bağlanır. Ancak çoğu Coomassie mavisi kadar duyarlı değildir (Tal ve ark. 1985).

İKİNCİ BÖLÜM

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Deney Örneklerinin Alınması ve Grupların Oluşturulması

23/10/2013 20.478.486-257 Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Etik kurulu izinli çalışmada; alınan izin doğrultusunda Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Biriminde ya da Merkez Efendi Devlet Hastanesi Kadın hastalıkları ve Doğum Kliniği'nde

- Gebelik dışı anormal uterin kanama nedeniyle tedavi ve tetkik amaçlı endometrial örnekleme önerilen hastalardan
- Gebeliği kendi isteği ile sonlandırmak istediği için küretaj olan hastalardan ve
- Missed abortus ya da gebelik tahliye istemi tanılarıyla servise yatırılmış olan ve çalışma kriterlerini taşıyan hastalardan

Onamları alındıktan sonra küretaj materyallerinden 2cc'lik bir örnek alınmıştır.

Bu çalışma daha önce etik kurul izinleri alınarak toplanmış (23/10/2013 20.478.486-257) düşük materyali üzerinde yapılmıştır.

Çalışma üç grup olarak tasarlanmıştır:

Grup 1: Sağlıklı, gebe olmayanlar grubu (gebelik dışı anormal uterin kanama nedeniyle tedavi ve tetkik amaçlı endometrial örnekleme önerilen hastalardan oluşacaktır).

Grup 2: Sağlıklı gebeler grubu (gebeliği kendi isteği ile sonlandırmak istediği için küretaj olan hastalar)

Grup 3: Tekrarlayan gebelik kayıpları grubu (en az 2. kez missed abortus nedeniyle küretaj işlemi uygulanacak hastalar)

Grup 2 ve 3'ten düşük materyalleri, Grup 1'den endometriyal biyopsi alınmıştır. Hastalara çalışma için ek bir girişim yapılmadığından devam niteliğindeki bu çalışmada da ek bir girişim yapılmamıştır. Küretaj endikasyonları olan hastaların küretaj materyallerinden bir kısmı çalışma için ayrılmıştır.

2.2. Total Protein Assay Çalışması ve Gerekli Materyaller

Total Protein Assay çalışmasında Bradford yöntemi kullanıldı. 50 µl örnek (5 µl Süpernatant ve 45 µl Distile su ile 10 kat seyreltildi), iyice karıştırılarak mikroküvette aktarıldı. Sonrasında bu karışım üzerine 1500 µl Bradford protein assay reagent (Sigma®) eklenmiştir. Örneklerin absorbans değerlerinin ölçümüne geçmeden önce ilk olarak, 0,1-1,4 mg/mL arasında değişen standart protein solüsyonları hazırlandı. Bu solüsyonlar kullanılarak protein konsantrasyonu-absorbans değerlerinin olduğu Standart Grafiği elde edildi. Bu grafik elde etme işlemi protein ölçümü yapılmadan önce her seferinde yeniden oluşturulmuştur. Standart Grafiği oluşturulurken 5 ml BSA (0,01 gr toplam) 2 mg/ml kullanıldı ve 2-1-0,5-0,25 mg/ml ölçüleri dikkate alındı. Bu ölçüler sonucunda Standart Grafiği oluşturuldu. Daha sonra her bir örnek için 280 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı. Her bir grup için 30 µg total protein için jele yüklenecek miktar belirlenerek yükleme işlemi bu değerlere göre yapıldı.

Bu işlem esnasında kullanılan cihaz ve solüsyonlar; Spektrofotometre cihazı, Bradford protein assay reagent, 30 µl örnek (5 µl Süpernatant, 25 µl Distile su), Standart 5 ml BSA (0,01 gr toplam) 2 mg/ml %25 Sampling buffer (4X) ve Distile sudur.

2.3. Coomassie Blue Boyama Çalışması ve Gerekli Materyaller

İlk etapta 1L Coomassie Stain solüsyonu %0.1 Coomassie R250 (1 gr), %10 Glacial Asetik Asid (100 ml), %40 Methanol (400 ml), ddH₂O (500 ml); 1 L De-Stain solüsyonu %20 Methanol (200 ml), %10 Glacial Asetik Asid (100 ml), ddH₂O (700 ml) ölçüleri kullanılarak hazırlandı. SDS-PAGE Elektroferez sonucu elde edilen jel Coomassie Stain solüsyonu ile 30 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra solüsyon jel üzerinde alınarak tekrar kullanılmak üzere ayrı bir tüpe konuldu ve jel 2-3 kez distile su ile yıkandı. Yıkama sonrası jel üzerine De-Stain solüsyonu ilave edildi ve 60 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra solüsyon alınarak jel tekrar yıkandı. Net bir görüntü alındıktan sonra jelin fotoğrafı çekilerek deneye son verildi. Bu deney sonucunda proteinlerin kantitatif analizi yapılmıştır.

Kullanılan materyaller şu şekildedir: Coomassie Stain & De-Stain, Coomassie Brilliant Blue R250, Glacial Acetic Acid, Methanol, ddH₂O.

2.4. Western Blott Çalışması ve Gerekli Materyaller

Tüm gruplardan alınmış doku örnekleri homojenizatör ile RIPA buffer içerisinde parçalanarak protein ekstraksiyonu yapılmış ve daha önceki çalışmada belirtilen proteinlerin ekspresyon düzeyleri Western Blot analizleriyle incelenmiştir. Bunun dışında Spektrofotometre ile total protein analizi yapılarak jele yüklenecek protein miktarları ölçülmüştür. Ayrıca Commassie Blue boyama yapılarak proteinlerin kantitatif analizi yapılmıştır. Burada bir önceki çalışmada kullanılan örneklerle, ısı şok proteinlerinden HSP 70 Western Blot tekniğiyle incelenmiştir.

Kullanılan materyaller şu şekildedir: Lysis buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM EDTA, and 5% glycerol), SDS-PAGE jel (4% stacking gel and 15%, 12%, 10%, 8% separating gel), Semidry Transfer Cihazı, Nitroselüloz Membran, Semidry Transfer Buffer (25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, 1000 ml = 200 ml methanol ve 800 ml H₂O), Dry Milk, Running Buffer (35 mM SDS, 250 mM Tris-HCl, 1,92 M Glycine), TBS-Tween 20 (TBS-T) (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,02 % Tween 20), Primer Antikor (HSP 70, β -Aktin), Sekonder Antikor (Alkalen fosfataz-konjugat) (AP Konjuge), Marker (Belirteç), BCIP/NBT Solüsyonu, Dikey Elektrophoretik Tankı, Shaker, Heat Blok, Mini Satrifüj, ImageJ software (1.44p NIH, USA).

2.4.1. Doku Materyalinin Hazırlanması ve Saklanması

Doku materyali 100 μ l of lysis buffer (RIPA buffer) (25 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM EDTA, and 5% glycerol) ile mekanik homojenizasyona tabi tutuldu. Homojenizasyonu takiben dokunun proteinli kısmını ayırıştırılarak santrifügasyon (14000 rpm, +4°C, 15 dakika) yapıldı. Üstte kalan sıvıya süpernantant, altta kalan kısma ise pellet yani çökelti denir. Süpernatant mikropipet yardımıyla ayrı bir ependorf tüpüne alınarak santrifügasyon işlemi birkez daha tekrar edildi. Daha sonra süpernatant ependorf tüplerine eşit miktarda dağıtılarak -20 °C’de saklandı.

2.4.2. Jel Kalıbının Oluşturulması

Bu işlem için iki cam plaka kullanıldı. Plakalar alkol ile iyice temizlenerek jelin döküleceği kaste yerleştirildi. Alttan sızıntı olup olmadığı distile su ile kontrol edildi.

Bu işlemden sonra %12'lik 20 ml Separating Jel (Ayrırma Jeli) hazırlandı. Separating Jel için kullanılan maddeler ve miktarları şu şekildedir: 6600 µl dH₂O, 5000 µl 1.5 M Tris-HCl, pH:8.8, 100 µl %20'lik SDS, 8000 µl AC/BIS (Acrylamide/Bisacrylamide), 200 µl APS (Amonyum Persülfat) ve 8 µl TEMED. Jeli hazırladıktan sonra iki cam plaka arasına döküldü. Cam Plakaları tam doldurulmayarak üstte Stacking Jel için belli bir alan bırakıldı. Daha sonra jelin üst kısmı düzgün bir yüzey oluşturması ve hava kabarcıkları oluşmaması için %0.1 SDS ile doduruldu. 30 dakika bekleme süresinden sonra jel polimerleşti ve üzerindeki SDS çözeltisi uzaklaştırıldı. Bundan sonraki aşama ise Stacking Jel'in (Toplama Jeli) hazırlanması ve diğer hazır olan jelin üzerine dökülmesidir. 10 ml Stacking Jel için kullanılan maddeler ve miktarları şu şekildedir: 5600 µl dH₂O, 2500 µl 0.5 M Tris-HCl, pH : 6.8, 50 µl %20'lik SDS, 1700 µl AC/BIS (Acrylamide/Bisacrylamide), 100 µl APS (Amonyum Persülfat) ve 10 µl TEMED. Hazırlanan Stacking Jel Separating Jel' üzerine döküldü ve proteinlerin yüklenip yürütüleceği kuyuları oluşturan tarak (comb) yerleştirilerek polimerleşmeye bırakılarak bırakıldı. Polimerleşme işleminden sonra tarak çıkartılarak kuyular hazır hale getirildi. Böylelikle jel kalıbı oluşturma aşaması da bitirilmiş oldu.

2.4.3. Örneklerin Hazırlanması

-20°C'deki Grup 1,2,3 örnekler çıkarılarak oda sıcaklığında erimeye bırakıldı. Örnekler eridikten sonra her bir örnekten daha önce spektrofotometre ölçümlerinde belirlenmiş olan yüklenecek miktarlar mikropipet yardımıyla ayrı bir 2 ml lik ependorf tüplerine alındı. Daha sonra her bir örnek üzerlerine 5 µl Sample Buffer (5X) ilave edildi. Pipetajlama işlemi ile buffer ve örnek karıştırıldı. Hazırlanan örnekler 100°C'de 5 dakika heat blokta inkübasyona bırakıldı. Inkübasyondan sonra örnekler heat bloktan alınarak kısa bir santrifügasyon işlemi sonucunda yüklenmeye hazır hale getirildi.

2.4.4. Elektroforez Tankının Hazırlanması

Önceden hazırlanmış can plakalarının da içinde bulunduğu sistem tank içerisine yerleştirildi. Üzerine elektrik akımını ileten Running buffer (Yürütme Tamponu) eklemesi yapıldı. Bu işlem için 500 ml Running Buffer kullanıldı.

2.4.5. Örneklerin Jele Yüklenmesi ve Elektroforez

Yükleme yapmadan önce kuyucuklar içerisindeki jel kalıntılarını engellemek için yürütme yapılacak tankın içinde bulunan tampon çözelti ile kalıntı kalmayacak şekilde yıkama yapıldı. Pipet ile her bir kuyucuğa, öncesinde hesaplanarak hazırlanan örnekler taşma olmayacak şekilde yavaşça yüklendi. Jelin ilk kuyucuğa proteinlerin ağırlıklarının hesaplanmasında kullanılan ve standart olarak kabul edilen 7 µl hacminde marker konuldu. Diğer kuyucuklara ise belirlenen miktarlarda örnek konularak yürütme işlemine geçildi. Yürütme işlemi öncesinde dikey elektroforez sisteminin kapağı kapatılarak elektrotlar + ve – kutuplara bağlandı. Güç kaynağı çalıştırılarak yürütme işlemi başlatıldı. Sisteme öncelikle 80V akım verildi. Seperate jel (toplama jeli) kısmını geçen proteinler stacking jel (ayırma jeli) bölgesine geçtikten sonra akım 120-130V arasında arttırıldı. Örneklerin yürümesi sample buffer yardımı ile kontrol edildi. Yaklaşık 1,5 saat boyunca örnekler jelde yürürümeye bırakıldı. Moleküler ağırlığına bağlı olarak araştırılan proteinler poliakrilamid jel üzerinde yeterli seviyede ayrıldıktan sonra güç kaynağı kapatılarak yürütme işlemi sona erdirildi. Tamamı eksi yükle yüklenmiş olan proteinler moleküler büyüklüklerine göre yukarıdan aşağıya doğru, yani eksiden artıya doğru hareket ederek ayrılmış oldular.

Belirlenen yürütme süresi bittikten sonra jel kalıpları vidalar gevşetilerek yerlerinden çıkartıldı. Cam plakalar arasındaki jel zarar görmeden dikkatli bir şekilde alındı. Jel üst kenarındaki kuyucuklar ve toplama jeli ile beraber düzgün bir şekilde bistüri ile kesilerek uzaklaştırıldı. Çıkarılan jeller daha önce hazırlanmış olan Semi-Dry Transfer Buffer içerisine konuldu.

2.4.6. Proteinlerin Jel'den Membrana Transferi

Transfer için Nitroselüloz Membran kullanıldı. Membran jelin boyutuna uygun kesildi ve semi-dry transfer buffer içerisine konularak ıslatma işlemi yapıldı. Transfer makinesine ilk olarak transfer buffer içerisinde daha önce ıslatılmaya bırakılan watman kâğıdı tek kat olarak alta konuldu. Üzerine buffer içerisindeki membran konuldu ve bunu takiben membran üzerine jeller uygun bir şekilde yerleştirildi. Ve üzerlerine aynı şekilde ıslatılmış tek kat olacak şekilde watman kâğıdı konularak işlem tamamlandı.

Transfer makinası kapatılarak 30 dakika 80 mA de transfer işlemi gerçekleştirildi. Transfer işlemi bittikten sonra güç kaynağı kapatıldı ve membran jelden ayrılarak ayrı bir blokaj solüsyonu içerisine konuldu.

2.4.7. Blokaj

Blokaj işlemi, membranla antikorlar arasında oluşan non-spesifik bağlanmaları en aza indirmek için uygulanan bir yöntemdir. Bu işlem, membranı bir dilue protein çözeltisi içerisinde (Yağsız Süt tozu-TBST karışımı veya BSA-Bovin Serum Albumin olarak bilinen) oda sıcaklığında 20 dakika çalkalayıcıda bırakılarak gerçekleştirildi.

Bu solüsyon içerisinde ki mevcut proteinler membran üzerinde bulunan ve hedef proteinlerin olmadığı tüm bölgeyi kaplamaktadır. Böylelikle sonraki aşama da kullanılacak olan primer antikorların yalnızca hedef proteince bağlanmaları sağlanmış olur. Sonuçta zemin kirliliğinin sebep olduğu yanlış bağlanmalar bu şekilde önlenmiş olmaktadır.

2.4.8. Membrana Birincil (Primer) Antikor Ekleme

Membranlar üzerine birincil antikor olarak kullandığımız HSP 70 ve β -Aktin antikorları konularak +4 °C 'de gece boyu (over night) inkübasyona bırakıldı. (Antikor solüsyonları içeriği şu şekildedir: 14 ml TBS-T +7 μ l HSP 70 (1/2000), 14 ml TBS-T + 7 μ l β -Aktin (1/2000).

Gece boyu inkübasyondan sonra membran üstündeki birincil antikor toplandı. Sonrasında üzerine 20 ml yıkama solüsyonu veya TBST (TBS+ %0.1 Tween-20) eklenerek 3 kez 10 dakika çalkalayıcıda yıkama yapıldı.

2.4.9. Membrana İkincil (Sekonder) Antikor Ekleme

Burada önemli olan, birincil antikor ve ikincil antikorun içeriğinin aynı tip antikoru barındırmasıdır (Mouse=Mouse veya Rabbit=Rabbit). Yani birincil antikor hangi hayvanın antijenine karşı üretilmişse ikincil antikorda da yine o hayvana ait olmalıdır. Bu aşamamızda mouse-monoclonal antikor kullanıldı. Yıkamadan sonra membran üzerine 20 ml ikincil antikor koyuldu ve bu antikorumuz AP (Alkalen Fosfatase)-Konjuge'dir. Membran ikincil antikolar ile +4 °C de 2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra antikor toplanarak membran üzerine 20 ml yıkama solüsyonu veya TBST (TBS+ %0.1 Tween-20) eklenerek 3 kez 10 dakika çalkalayıcıda yıkama yapıldı.

2.4.10. Bantların Görünür Hale Getirilmesi

BCIP/NBT Solüsyonu hazırlanarak yıkanan membran üzerine döküldü ve 1 saatlik inkübasyondan sonra bantlar görünür hale geldi. İlgili solüsyonun hazırlanış şekli şu şekildedir: 10 ml Alkalen fosfataz Buffer (100mM Tris-HCl [pH 9.0], 150mM NaCl, 1mM MgCl₂) ve üzerine mix halde bulunan BCIP/NBT çözeltisinden 30 µl ilave edildi.

2.4.11. Bant Yoğunluklarının Analizi

Görünür hale getirilen bantlar tarayıcıdan geçirilerek bilgisayar ortamına aktarıldı. Aktarılan bu bant görüntüleri ImageJ software (1.44p NIH, USA) yazılımı ile analiz edildi.

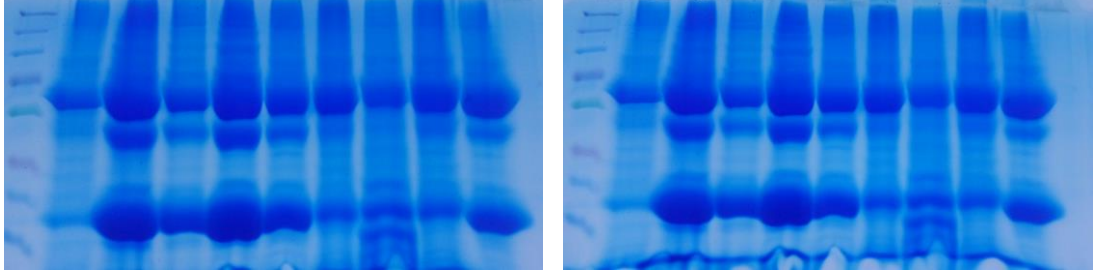
2.4.12. İstatistiksel Analizler

Grup 1,2,3 örnekleri ile yapılan western blott çalışması ve ImageJ software (1.44p NIH, USA) programında yapılan analizlerin sonucunda gruplar arası istatistiksel farklar “IBM SPSS Statistics 20” paket programı kullanılarak, “paired” t-testi ile $p < 0.05$ önemlilik derecesine göre karşılaştırıldı.

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

BULGULAR

3.1. Commassie Blue Boyama ile Proteinlerin Kantitatif Analizi ve Sonuçları



Resim 3. Commassie Blue boyama sonucunda elde edilen görüntüler

3.2. Spektrofotometre ile Total Protein Analizi ve Standart Grafiğinin Belirlenmesi

Tablo 3. 5 ml BSA ile oluşturulan standart değerler ve ortalamaları

Standart					Ortalama
5 ml BSA (0,01 gr toplam) 2 mg/ml					
mg/ml	2	1,175	1,175	1,177	1,175667
mg/ml	1	0,503	0,505	0,506	0,504667
mg/ml	0,5	0,167	0,167	0,168	0,167333
mg/ml	0,25	0,011	0,011	0,012	0,011333

Tablo 4. Grup 1 için ölçülen total protein değerleri ve jele yüklenen protein miktarları gösterilmiştir.

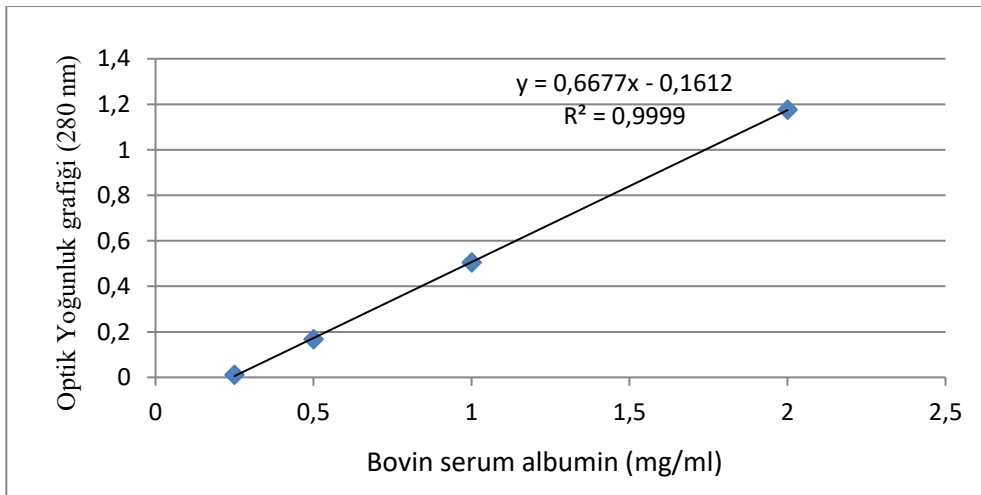
Grup 1					mg/ml	30 µg total protein için yüklenecek µl miktarı
1	0,667	0,667	0,668	0,667	1,240	24
2	0,685	0,685	0,686	0,685	1,267	24
3	0,661	0,662	0,663	0,662	1,232	24
4	0,600	0,600	0,601	0,600	1,140	26
5	0,649	0,650	0,650	0,649	1,214	25
6	0,660	0,660	0,661	0,660	1,230	24
7	0,731	0,733	0,734	0,732	1,338	22
8	0,627	0,629	0,630	0,628	1,182	25

Tablo 5. Grup 2 için ölçülen total protein değerleri ve jele yüklenen protein miktarları gösterilmiştir.

Grup 2					(mg/ml)	30 µg total protein için yüklenerek µl miktarı
1	0,659	0,661	0,663	0,661	1,231	24
2	0,611	0,612	0,613	0,612	1,158	26
3	0,601	0,602	0,603	0,602	1,143	26
4	0,642	0,642	0,643	0,642	1,203	25
5	0,69	0,691	0,692	0,691	1,276	24
6	0,598	0,599	0,599	0,598	1,138	26
7	0,587	0,588	0,589	0,588	1,122	27
8	0,572	0,572	0,573	0,572	1,098	27

Tablo 6. Grup 3 için ölçülen total protein değerleri ve jele yüklenen protein miktarları gösterilmiştir.

Grup 3					(mg/ml)	30 µg total protein için yüklenerek µl miktarı
1	0,779	0,78	0,781	0,78	1,409615	21
2	0,68	0,681	0,682	0,681	1,261345	24
3	0,746	0,747	0,748	0,747	1,360192	22
4	0,682	0,684	0,685	0,683	1,265339	24
5	0,662	0,663	0,664	0,663	1,234387	24
6	0,651	0,651	0,651	0,651	1,216415	25
7	0,648	0,648	0,648	0,648	1,211922	25
8	0,638	0,639	0,64	0,639	1,198442	25



Grafik 1. Bovin Serum Albumine ait, 280 nm dalga boyunda ölçülmüş optik yoğunluk grafiği (O.D.). Western blot total protein yükleme hesaplamalarında Grup 1, 2, 3 hasta örnekleri için BSA ile oluşturulmuş standart yoğunluk grafiği kullanılarak oluşturulmu

3.3. Western Blot Çalışması

3.3.1. HSP 70 ve β -Aktin Bant Görüntülerinin Tablo Halinde Gösterilmesi

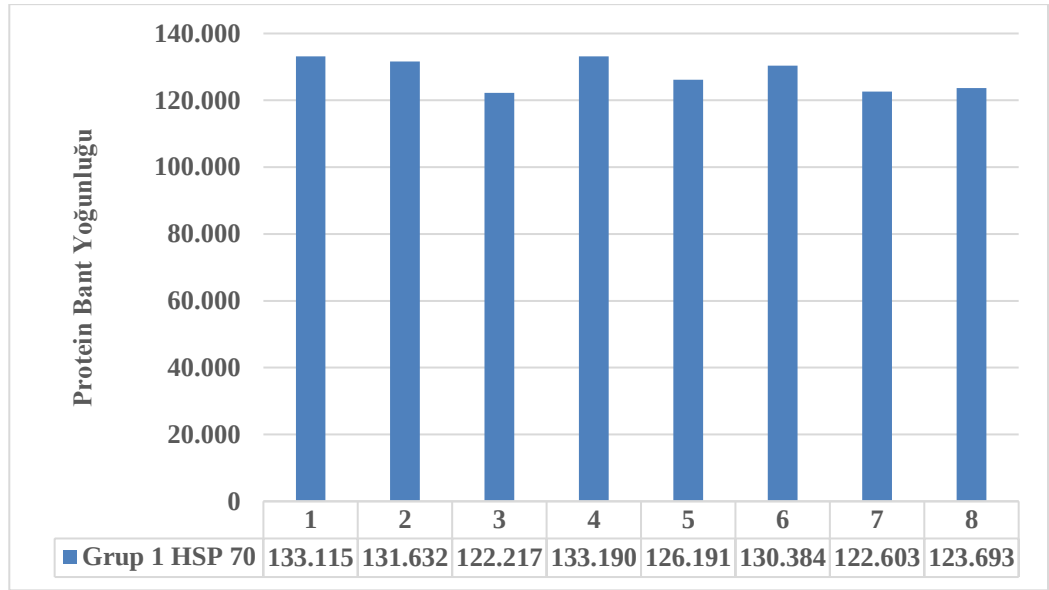
Tablo 7. Grup1,2,3 hastalarına ait Western Blot çalışması sonucu elde edilen HSP 70 ve β -Aktin proteinlerinin bant görüntüsü

	Grup 1 HSP 70
	Grup 2 HSP 70
	Grup 3 HSP 70
	Grup 1 β -Aktin
	Grup 2 β -Aktin
	Grup 3 β -Aktin

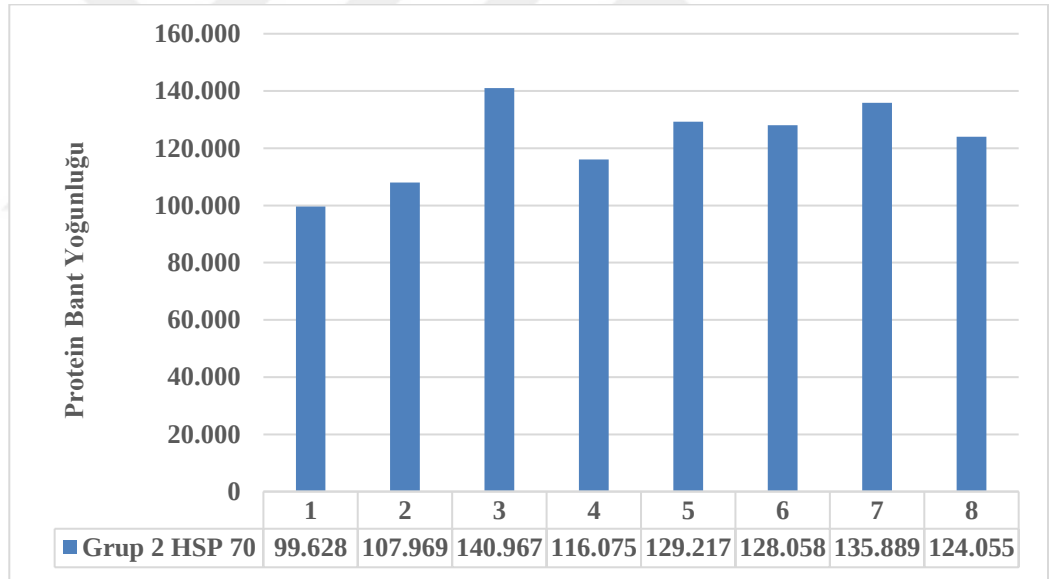
3.3.2. HSP 70 ve β -Aktin Proteinlerinin Bant Yoğunluk Değerleri Tablosu ve Grafikleştirilmesi

Tablo 8. Western Blot çalışması sonucu elde edilen Grup1, Grup 2 ve Grup 3 hastalarına ait HSP 70 proteininin ImageJ programı ile ekspresyon seviyelerinin analizine ait sayısal veriler gösterilmiştir.

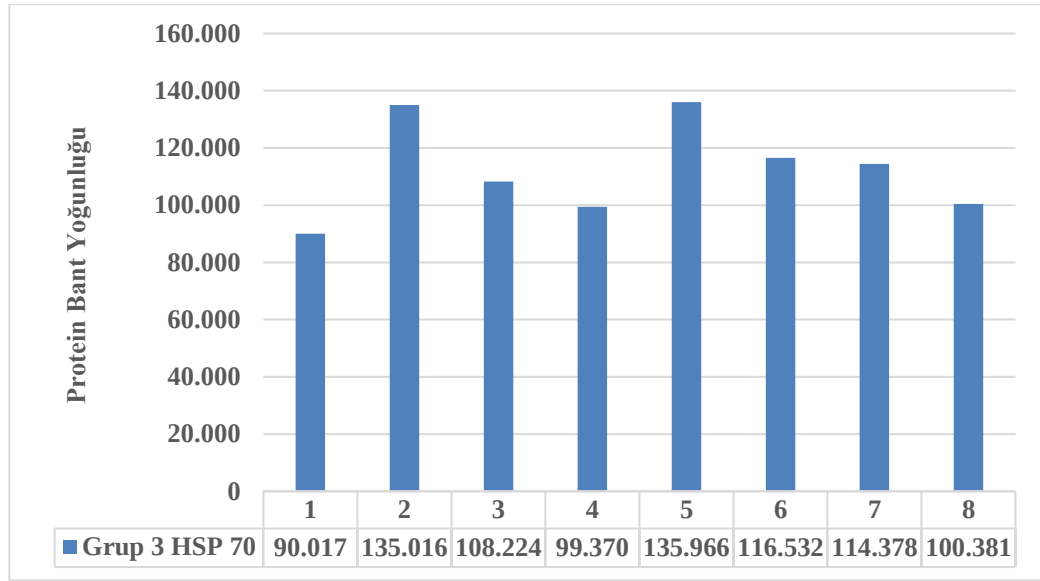
HSP 70	1	2	3	4	5	6	7	8
Grup 1	133,115	131,632	122,217	133,190	126,191	130,384	122,603	123,693
Grup 2	99,628	107,969	140,967	116,075	129,217	128,058	135,889	124,055
Grup 3	90,017	135,016	108,224	99,370	135,966	116,532	114,378	100,381



Grafik 2. Grup 1, HSP 70 protein ekspresyon seviyelerinin tespiti için, Western Blot sonucu elde edilen bant yoğunluklarının ImageJ programındaki analiz değerleri ve grafiklendirilmesi.



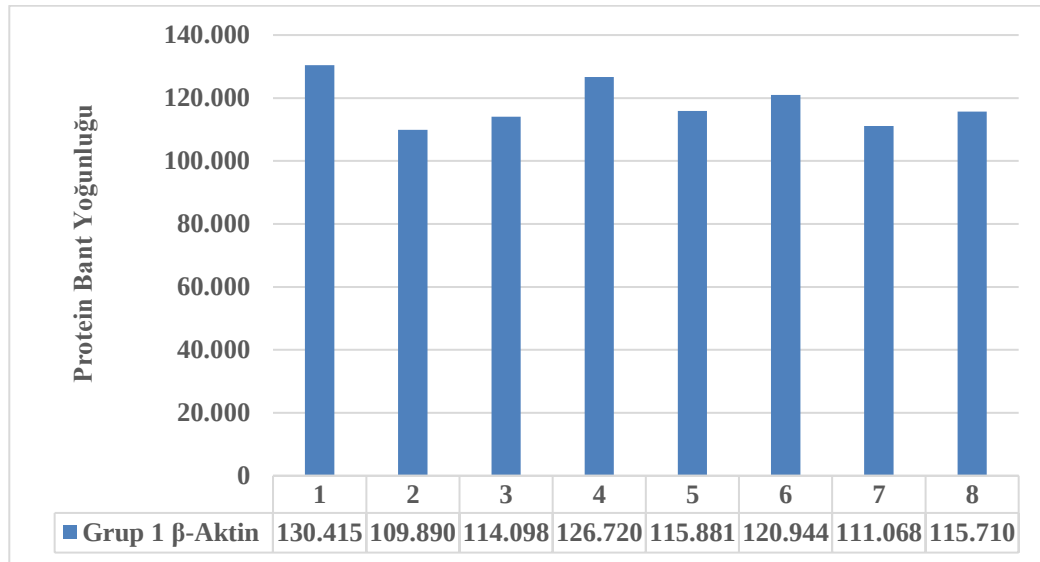
Grafik 3. Grup 2, HSP 70 protein ekspresyon seviyelerinin tespiti için, Western Blot sonucu elde edilen bant yoğunluklarının ImageJ programındaki analiz değerleri ve grafiklendirilmesi.



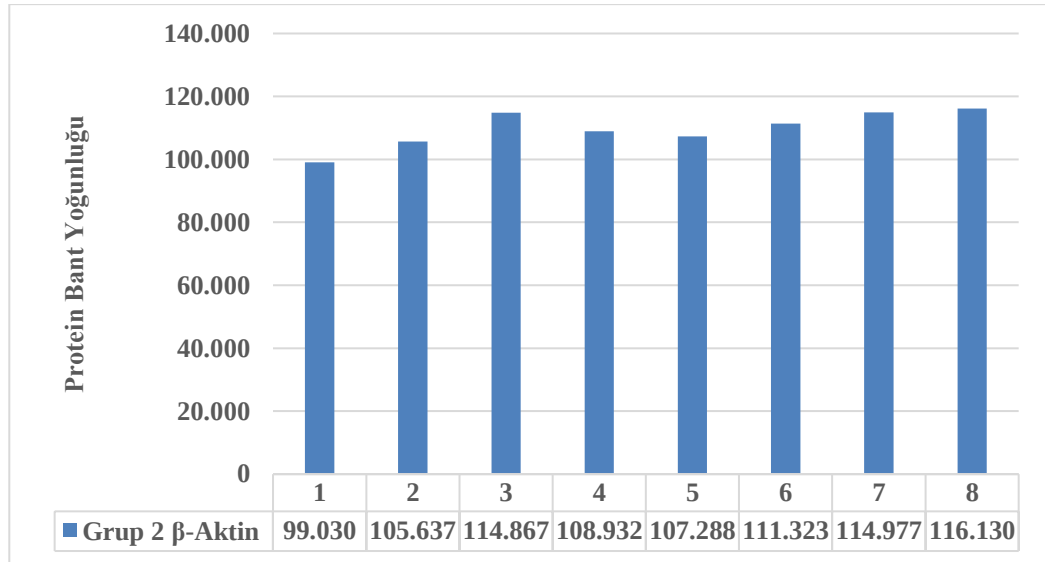
Grafik 4. Grup 3, HSP 70 protein ekspresyon seviyelerinin tespiti için, Western Blot sonucu elde edilen bant yoğunluklarının ImageJ programındaki analiz değerleri ve grafiklendirilmesi.

Tablo 9. Western Blot çalışması sonucu elde edilen Grup1, Grup 2 ve Grup 3 hastalarına ait β -Aktin proteininin ImageJ programı ile ekspresyon seviyelerinin analizine ait sayısal veriler gösterilmiştir.

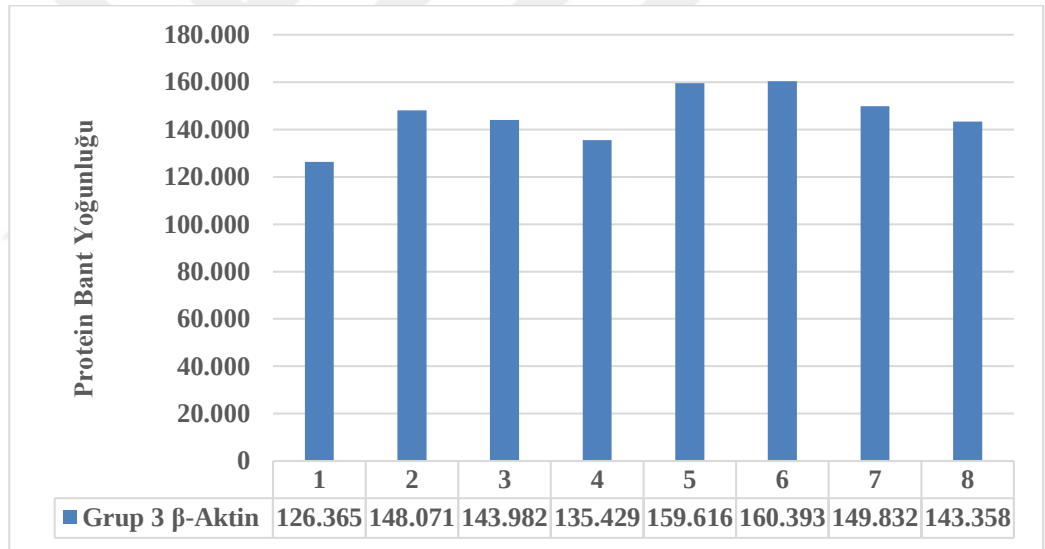
β -Aktin	1	2	3	4	5	6	7	8
Grup 1	130,415	109,890	114,098	126,720	115,881	120,944	111,068	115,710
Grup 2	99,030	105,637	114,867	108,932	107,288	111,323	114,977	116,130
Grup 3	126,365	148,071	143,982	135,429	159,616	160,393	149,832	143,358



Grafik 5. Grup 1, β -Aktin protein ekspresyon seviyelerinin tespiti için, Western Blot sonucu elde edilen bant yoğunluklarının ImageJ programındaki analiz değerleri ve grafiklendirilmesi.



Grafik 6. Grup 2, β -Aktin protein ekspresyon seviyelerinin tespiti için, Western Blot sonucu elde edilen bant yoğunluklarının ImageJ programındaki analiz değerleri ve grafiklendirilmesi.

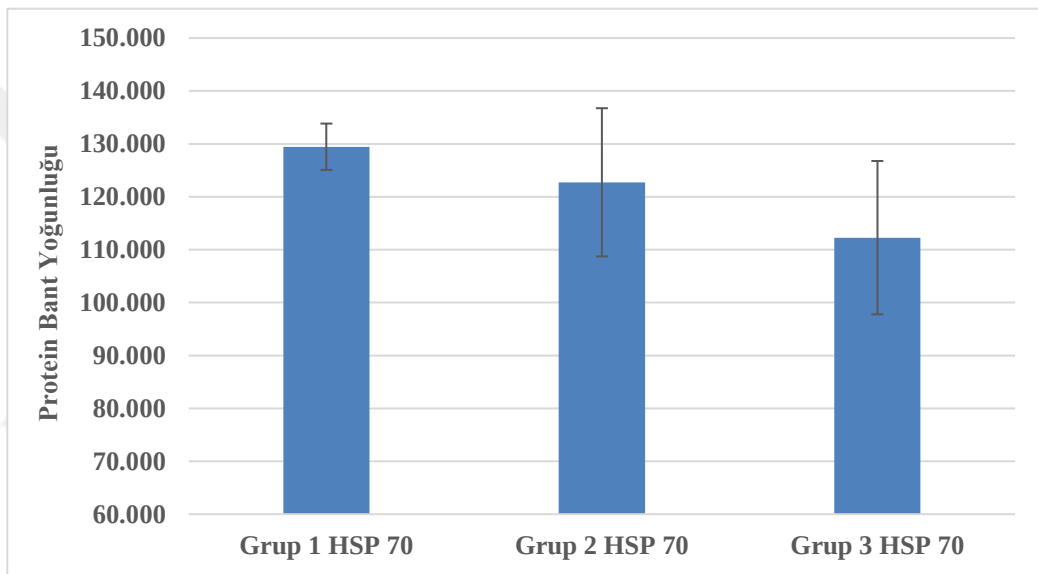


Grafik 7. Grup 3, β -Aktin protein ekspresyon seviyelerinin tespiti için, Western Blot sonucu elde edilen bant yoğunluklarının ImageJ programındaki analiz değerleri ve grafiklendirilmesi.

3.3.3. HSP 70 Proteini Ortalama ve Standart Sapma Değerleri

Tablo 10. Western Blot çalışması sonucu elde edilen Grup1, Grup 2 ve Grup 3 hastalarına ait HSP 70 proteinin ImageJ programı ile ekspresyon seviyelerinin analizinin sayısal değerleri, değerlerin ortalaması ve standart sapması gösterilmiştir.

HSP 70	1	2	3	4	5	6	7	8	ORT	STD SP.
Grup 1	133,115	131,632	122,217	133,190	126,191	130,384	122,603	123,693	127,878	4,725
Grup 2	99,628	107,969	140,967	116,075	129,217	128,058	135,889	124,055	122,732	14,009
Grup 3	90,017	135,016	108,224	99,370	135,966	116,532	114,378	100,381	112,486	16,563

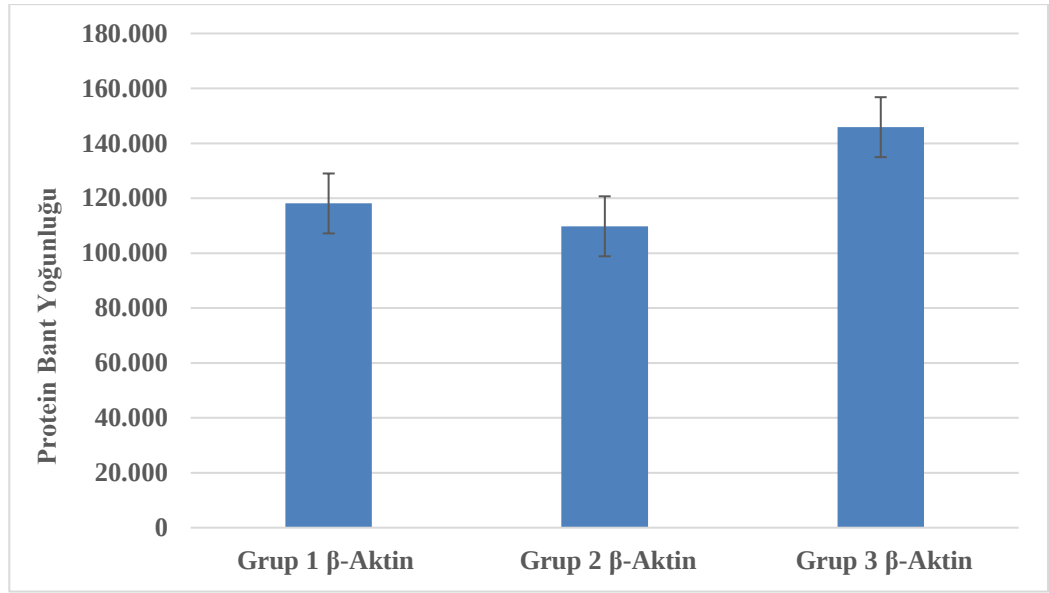


Grafik 8. Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 hastalarına ait HSP 70 proteininin ekspresyon seviyelerinin ortalamasının grafiklendirilmesi

3.3.4. β -Aktin Proteini Ortalama ve Standart Sapma Değerleri

Tablo 11. Western Blot çalışması sonucu elde edilen Grup1, Grup 2 ve Grup 3 hastalarına ait HSP 70 proteinin ImageJ programı ile ekspresyon seviyelerinin analizinin sayısal değerleri, değerlerin ortalaması ve standart sapması gösterilmiştir.

β -Aktin	1	2	3	4	5	6	7	8	ORT	STD SP.
Grup 1	130,415	109,890	114,098	126,720	115,881	120,944	111,068	115,710	118,091	7,344
Grup 2	99,030	105,637	114,867	108,932	107,288	111,323	114,977	116,130	109,773	5,797
Grup 3	126,365	148,071	143,982	135,429	159,616	160,393	149,832	143,358	145,881	11,463

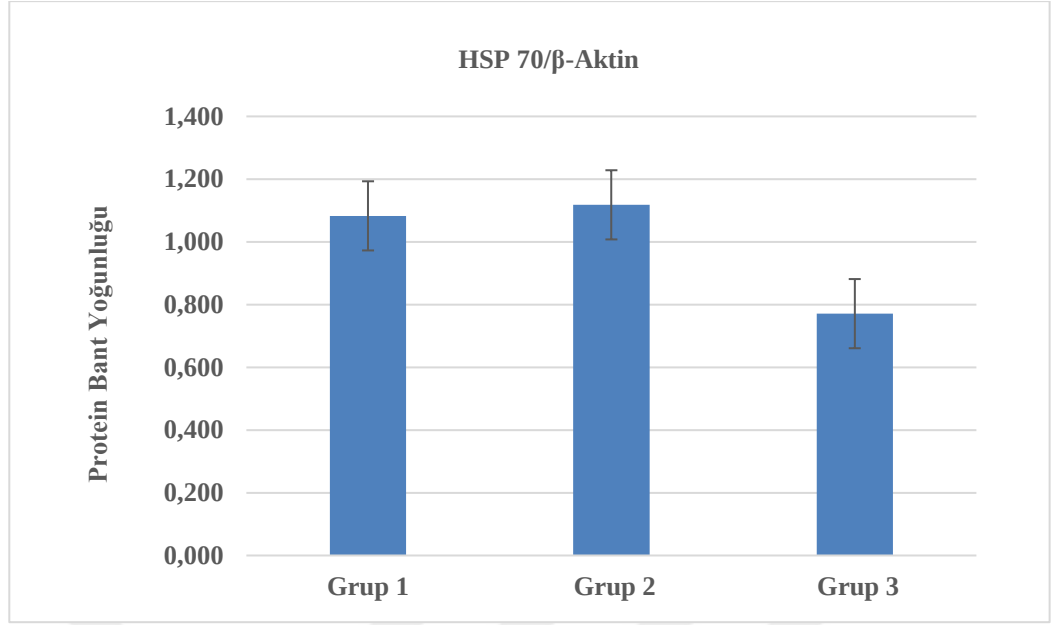


Grafik 9. Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 hastalarına ait β -Aktin proteininin ekspresyon seviyelerinin ortalamasının grafiklendirilmesi.

3.3.5. HSP 70 Proteininin β -Aktin proteini ile Normalizasyon ve Ortalama Değerleri (HSP 70/ β -Aktin)

Tablo 12. Western Blot çalışması sonucu elde edilen Grup 1-Grup 2 ve Grup 3 hastalarına ait HSP 70 proteinin β -Aktin proteinine göre normalize edilmesi sonucu elde edilen ekspresyon seviyelerinin sayısal değerleri, değerlerin ortalaması ve standart sapma

HSP 70/ β -Aktin	1	2	3	4	5	6	7	8	ORT	STD SP.
Grup 1	1,021	1,198	1,071	1,051	1,089	1,078	1,104	1,069	1,083	0,643
Grup 2	1,006	1,022	1,227	1,066	1,204	1,150	1,182	1,068	1,118	2,417
Grup 3	0,712	0,912	0,752	0,734	0,852	0,727	0,763	0,700	0,771	1,445



Grafik 10. Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 hastalarına ait HSP 70 proteininin β -Aktin proteini ile normalizasyon (HSP 70/ β -Aktin) değerlerinin ortalamasının ekspresyon seviyelerinin grafiklendirilmesi.

3.3.6. HSP 70 ve β -Aktin proteinlerinin ve Normalizasyon işlemine ait SPSS analiz verileri

T-Test HSP 70

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	G1	127,8781	8	4,72454	1,67038
	G2	122,7323	8	14,00944	4,95308
Pair 2	G1	127,8781	8	4,72454	1,67038
	G3	112,4855	8	16,56348	5,85607
Pair 3	G2	122,7323	8	14,00944	4,95308
	G3	112,4855	8	16,56348	5,85607

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Significance	
				One-Sided p	Two-Sided p
Pair 1	G1 & G2	8	-,836	,005	,010
Pair 2	G1 & G3	8	-,123	,386	,772
Pair 3	G2 & G3	8	,233	,289	,578

Paired Samples Test

		Paired Differences				
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
Pair 1	G1 - G2	5,14588	18,14693	6,41591	-10,02534	20,31709
Pair 2	G1 - G3	15,39262	17,77458	6,28426	,53270	30,25255
Pair 3	G2 - G3	10,24675	19,03637	6,73037	-5,66806	26,16156

Paired Samples Test

		Significance			
		t	df	One-Sided p	Two-Sided p
Pair 1	G1 - G2	,802	7	,224	,449
Pair 2	G1 - G3	2,449	7	,022	,044
Pair 3	G2 - G3	1,522	7	,086	,172

Resim 4. HSP 70 protein detaylı t-Test sonuçları

T-Test Beta Actin

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	G1	118,0908	8	7,34416	2,59655
	G2	109,7730	8	5,79711	2,04959
Pair 2	G1	118,0908	8	7,34416	2,59655
	G3	145,8808	8	11,46264	4,05266
Pair 3	G2	109,7730	8	5,79711	2,04959
	G3	145,8808	8	11,46264	4,05266

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Significance	
				One-Sided p	Two-Sided p
Pair 1	G1 & G2	8	-,563	,073	,146
Pair 2	G1 & G3	8	-,597	,059	,118
Pair 3	G2 & G3	8	,414	,154	,308

Paired Samples Test

		Paired Differences				
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
Pair 1	G1 - G2	8,31775	11,64039	4,11550	-1,41386	18,04936
Pair 2	G1 - G3	-27,79000	16,90669	5,97742	-41,92434	-13,65566
Pair 3	G2 - G3	-36,10775	10,48661	3,70758	-44,87478	-27,34072

Paired Samples Test

		Significance			
		t	df	One-Sided p	Two-Sided p
Pair 1	G1 - G2	2,021	7	,041	,083
Pair 2	G1 - G3	-4,649	7	,001	,002
Pair 3	G2 - G3	-9,739	7	<,001	<,001

Resim 5. Beta Aktin protein detaylı t-Test sonuçları

T-Test HSP 70/Beta Actin Normalize

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	G1	1,0851	8	,05196	,01837
	G2	1,1156	8	,08562	,03027
Pair 2	G1	1,0851	8	,05196	,01837
	G3	,7690	8	,07432	,02628
Pair 3	G2	1,1156	8	,08562	,03027
	G3	,7690	8	,07432	,02628

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Significance	
				One-Sided p	Two-Sided p
Pair 1	G1 & G2	8	-,042	,461	,922
Pair 2	G1 & G3	8	,845	,004	,008
Pair 3	G2 & G3	8	,033	,469	,938

Paired Samples Test

		Paired Differences				
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
Pair 1	G1 - G2	-,03050	,10199	,03606	-,11577	,05477
Pair 2	G1 - G3	,31613	,04116	,01455	,28171	,35054
Pair 3	G2 - G3	,34662	,11149	,03942	,25342	,43983

Paired Samples Test

				Significance	
		t	df	One-Sided p	Two-Sided p
Pair 1	G1 - G2	-,846	7	,213	,426
Pair 2	G1 - G3	21,724	7	<,001	<,001
Pair 3	G2 - G3	8,794	7	<,001	<,001

Resim 6. HSP 70/Beta Aktin Proteinleri Normalize detaylı t-Test sonuçları

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

TARTIŞMA

Bu çalışmamda aşağıda özellikleri belirtilen hastaların onamları alındıktan sonra küretaj materyalinden 2 cc'lik bir örnek alınmıştır.

- Gebelik dışı anormal uterin kanama nedeniyle tedavi ve tetkik amaçlı endometrial örnekleme önerilen hastalar
- Gebeliği kendi isteği ile sonlandırmak istediği için küretaj olan hastalar
- Missed abortus ya da gebelik tahliye istemi tanılarıyla servise yatırılmış olan ve çalışma kriterlerini taşıyan hastalar

Çalışma metoduna göre Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 olarak sınıflandırılmıştır. Bu grupların özellikleri aşağıdaki gibidir.

- Grup 1: Sağlıklı, gebe olmayanlar grubu (gebelik dışı anormal uterin kanama nedeniyle tedavi ve tetkik amaçlı endometrial örnekleme önerilen hastalar)
- Grup 2: Sağlıklı gebeler grubu (gebeliği kendi isteği ile sonlandırmak istediği küretaj olan hastalar)
- Grup 3: Tekrarlayan gebelik kayıpları grubu (en az 2. kez missed abortus nedeniyle küretaj işlemi uygulanan hastalar)

Grup 2 ve 3'ten düşük materyalleri, Grup 1'den endometriyal biyopsi alınmıştır.

Alınan örnekler ile Western Blott çalışması yapılarak HSP 70 ve Beta Aktin proteinlerinin ekspresyon seviyelerine ayrı ayrı bakılarak normalizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızı 5 Ana başlık altında değerlendirebiliriz;

4.1 Total Protein Assay Çalışması

Total Protein Assay çalışmasında özellikle Bradford protein assay reagent kullanıldı. Belirli oranda (5 µl Süpernatant ve 45 µl Distile su) örnekler hazırlanarak üzerine Bradford protein assay reagent eklenmiştir. Örneklerin absorbans ölçümlerine geçilmeden önce Standart Grafiği elde edildi. Bu grafikte protein konsantrasyon ve absorbans değerleri bulunmaktadır. Standart Grafiği oluşturulurken 5 ml BSA (0,01 gr toplam) 2 mg/ml kullanıldı ve 2-1-0,5-0,25 mg/ml ölçüleri dikkate alındı. Sonrasında her bir örnek için 280 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı. Her

bir gruptaki örneğin 30 µg total protein için yükleme yapılacak miktar belirlenmiş oldu ve bu değerler baz alınarak jel üzerindeki kuyucuklara yükleme işlemi yapıldı.

4.2. Coomassie Blue Boyama Çalışması

Coomassie mavisi, R250 veya G250 gibi çeşitli formlarda, proteinlerin boyanması için yaygın olarak kullanılan bir işaretleyicidir. Bu boyalar proteinlerle kimyasal olarak reaksiyona girmez ve sadece kovalent olmayan kompleksler oluşturur. Her ne kadar bu etkileşimin öncelikle iyonik olduğu düşünülse de, bağlanma muhtemelen protein üzerindeki ana gruplar aracılığıyla polar olmayan van der Waals kuvvetleriyle meydana gelir. Bu nedenle boya tüm proteinlere eşit şekilde bağlanmaz (Bradford 1976). Çalışmamızda özellikle Coomassie Blue boyasını kullanmamızın amacı diğer boya tiplerine göre daha hassas bir bağlanma gerçekleştirmesidir (Tal ve ark. 1985). Çalışma sonunda elde edilen görüntüde proteinlerin kantitatif olarak ölçümleri yapılmıştır.

4.3. Western Blot Çalışması

Bu çalışmada Western Blot yöntemini kullandık. Bu yöntem ilgili doku, kan, hücre vs gibi çeşitli örneklerdeki proteinlerin belirli yüzdelikte oluşturulan jele yüklenerek elektriksel ortamda moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılması işlemidir. Her bir gruptaki örneklerin HSP 70 ve Beta Aktin proteinleri moleküler ağırlıklarına göre ayrılmıştır. Bu proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrılması işleminden sonra bant görüntüleri elde edilmiştir. Bu görüntüler Image-J programında taranarak ekspresyon seviyelerinin sayısal olarak verileri elde edilmiş olup ardından elde edilen veriler ile grafiklendirme işlemleri yapılmıştır.

4.4. Grafiklendirme, Normalizasyon ve Analizler

4.4.1. HSP 70 Proteini Grafiklendirme ve Analiz

Çalışmamızda Image-J programında taranan HSP 70 protein bant görüntülerinin ekspresyon seviyelerinin sayısal olarak elde edilen verilerinin grafiklendirme işlemleri yapılmıştır. Bulgular kısmındaki Grafik 2, Grafik 3 ve Grafik 4'te bu yapılan işlemler gösterilmiştir. Grafik 2 Grup 1 hastalarına ait veriler ile, Grafik 3 Grup 2 hastalarına ait veriler ile ve Grafik 4 ise Grup 3 hastalarının verileri ile

oluşturulmuştur. Sonrasında Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 hastalarına ait ekspresyon seviyelerinin her bir gruba ait ortalama değerleri hesaplanmıştır. Bu değerler ile Grafik 8 elde edilmiştir. Grafik 8'e bakıldığında HSP 70 proteininin Grup 3 hastalarındaki ekspresyon seviyesinde Grup 1 ve Grup 2'ye göre azalma meydana geldiği gözlemlenmiştir. Grup 1-Grup 2, Grup 1-Grup 3 ve Grup 2-Grup 3 arasında yapılan istatistiksel analizlerde sadece Grup1 ile Grup3 arasında istatistiksel olarak ($p<0,05$) anlamlılık bulunmuştur. Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır.

4.4.2. Beta Aktin Proteini Grafikleştirme ve Analiz

Çalışmamızda Image-J programında taranan Beta Aktin protein bant görüntülerinin ekspresyon seviyelerinin sayısal olarak elde edilen verilerinin grafikleştirme işlemleri yapılmıştır. Bulgular kısmındaki Grafik 5, Grafik 6 ve Grafik 7 de bu yapılan işlemler gösterilmiştir. Grafik 5 Grup 1 hastalarına ait veriler ile, Grafik 6 Grup 2 hastalarına ait veriler ile ve Grafik 7 ise Grup 3 hastalarının verileri ile oluşturulmuştur. Sonrasında Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 hastalarına ait ekspresyon seviyelerinin her bir gruba ait ortalama değerleri hesaplanmıştır. Bu değerler ile Grafik 9 elde edilmiştir. Grafik 9'a bakıldığında Beta Aktin proteininin Grup 3 hastalarındaki ekspresyon seviyesinde Grup 1 ve Grup 2'ye göre artış meydana geldiği gözlemlenmiştir. Grup 1-Grup 2, Grup 1-Grup 3 ve Grup 2-Grup 3 arasında yapılan istatistiksel analizler sonucunda Grup 1 ile Grup 3 ve Grup 2 ile Grup 3 arasında istatistiksel olarak ($p<0,05$) anlamlılık bulunmuştur.

4.4.3. Normalizasyon ve Analiz

HSP 70 ile Beta Aktin proteini ile normalizasyon işlemi yapılmıştır (HSP 70/Beta Aktin). Bu yapılan işlem sonucu Grafik 10 elde edilmiştir. Grafik 10'a bakıldığında Grup 3 hastalarında Grup 1 ve Grup 2 hastalarına göre HSP 70/Beta Aktin ekspresyon seviyesinde bir azalma gözlemlenmektedir. Grup 1-Grup 2, Grup 1-Grup 3 ve Grup 2-Grup 3 arasında yapılan analizler sonucunda Grup1 ile Grup 3 ve Grup 2 ile Grup 3 arasında istatistiksel olarak ($p<0,05$) anlamlılık bulunmuştur.

4.5. Verilerin Yorumlanması ve Literatür ile Karşılaştırılması

4.5.1. HSP 70 Protein Verilerinin Yorumlanması ve Literatür ile Karşılaştırılması

HSP 70 proteinin ekspresyon seviyelerinin ortalamasının alınarak oluşturulan Grafik 8'e bakıldığında Grup 3 hastalarının Grup 1 ve Grup 2 hastalarına göre protein ekspresyon seviyesinde düşük olduğu gözlemlenmiştir. İstatistiksel olarak ta yapılan analiz neticesinde Grup 1-Grup 3 arasında istatistiksel anlamlılık ($p<0,05$) bulunurken Grup 1-Grup 2 ve Grup 2-Grup 3 arasında anlamlılık ($p>0,05$) bulunamamıştır. Literatür taraması yapıldığında; 'Preeklampsili İnsan Plasentasının Proteomik Analizi ve Normal Gebelik' konulu çalışmada HSP 70 proteininin Normal gebelik yapan hastalara göre Preeklampsili hastalarda ekspresyon seviyesinde bir azalma olduğu bulunmuştur (Yang ve ark. 2015). Yapılan başka bir çalışmada ise Desidual makrofajların (dMs) işlev bozukluğu tekrarlayan gebelik kaybı ile yakında ilişkili bulunmuştur. Bu çalışmada HSP 70 ekspresyon seviyesi kontrol grubuna tekrarlayan gebelik kaybı olan hastalarda düştüğü gözlemlenmiştir (Yang ve ark. 2023). Başka bir çalışmada ise ektopik gebelik yaşayan hastalardan alınan materyal üzerinden yapılan çalışmada ise HSP 70 seviyesinde artış gözlemlenmiştir (Yıldız ve ark. 2022). Preeklampsili hastaları üzerinde yapılan diğer bir çalışma sonucunda ise HSP 70 ekspresyon seviyesinde artış gözlemlenmiştir (Abdulsid ve ark. 2013). Farklı bir çalışmada ise normal gebelik ile ilk trimesterde düşük yapan hastalarda HSP90 ve HSP 70 protein ekspresyonları karşılaştırılmıştır ve ilk trimesterde düşük yapan hastalarda normal hastalara göre HSP 70 ve HSP 90 proteinlerinin ekspresyon seviyelerinde artış meydana geldiği saptanmıştır (Sotiriou ve ark. 2004). Bizim çalışmamızda ise art arda 3 ve daha fazla düşük yapan hastaların HSP 70 protein seviyesinde diğer grup hastalara göre ciddi derecede düşüş meydana geldiği gözlemlenmiştir. HSP 70 proteininin kontrol grubuna göre diğer gruplarda daha az eksprese olması, ısı şok proteinlerinin eksikliğinin gebelik kaybının etiyolojik nedenlerinden biri olabileceğini gösterebilir.

4.5.2. Beta Aktin Protein Verilerinin Yorumlanması ve Literatür ile Karşılaştırılması

Beta Aktin proteinin ekspresyon seviyelerinin ortalamasının alınarak oluşturulan Grafik 9'a bakıldığında Grup 3 hastalarının Grup 1 ve Grup 2 hastalarına

göre protein ekspresyon seviyesinde artış olduğu gözlemlenmiştir. İstatistiksel olarak ta yapılan analiz neticesinde Grup 1-Grup 3 ve Grup 2-Grup 3 arasında istatistiksel anlamlılık ($p<0,05$) bulunurken Grup 1-Grup 2 arasında anlamlılık bulunamamıştır. Literatüre bakıldığında, yapılan bir çalışmada preeklampsi hastalarının Beta Aktin protein ekspresyon seviyesi kontrol grubuna göre artmış olarak bulunmuştur (Wang ve ark. 2020). Diğer bir çalışmada, Beta Aktin proteininin ekspresyon seviyesinde, özellikle tekrarlayan gebelik kaybı yaşayan hastalarda normal gebelik yaşayan hastalara göre artış olduğu gözlemlenmiştir (Gharezi-Fard ve ark. 2014). Bizim bulgularımız da literatürdeki beta aktin seviyesindeki artışı destekler nitelikte olup gebelik kaybındaki meydana gelen bir takım fizyolojik olaylar sonucunda beta aktin ekspresyon seviyesinin arttığı anlaşılmaktadır.

4.5.3. Normalizasyon Verilerinin Yorumlanması

HSP 70 proteini ve Beta Aktin proteini arasında bir normalizasyon işlemi yapılmıştır. HSP 70 ve Beta Aktin proteinlerinin gruplardaki ortalama ekspresyon seviyelerinin değerleri kullanılmıştır. HSP 70 proteinine ait olan değerler Beta Aktin protein değerlerine ait veriler ile bölünerek yeni bir değer elde edilmiştir. Bu değer her bir grup için tek tek hesaplanmıştır. Hesaplanan bu değerler ile gruplar arası istatistiksel bir analiz yapılmıştır. Grup 1 – Grup 3 ve Grup 2 – Grup 3 arasında anlamlılık varken ($p<0,05$), Grup 1 – Grup 2 arasında bir anlamlılık bulunamamıştır. Beta Aktin proteini protein ekspresyon seviyesi normalizasyonu için en sık kullanılan referans proteinlerden biri olup, çalışmamızda da tercih edilmiştir. HSP 70 proteini üç veya daha fazla düşük yapan kadınlarda düşük seviyede eksprese olmuştur. Vücutta yaşanan bu ve buna benzer bir takım fizyolojik olaylar neticesinde protein yapılarında bozuklukları meydana gelebilmektedir. Bu ekspresyon seviyesindeki düşüklük gebelik kaybındaki meydana gelen bir takım fizyolojik olaylar neticesinde protein seviyesinde yaşanan bozukluklardan kaynaklı olduğu düşünülebilir. Yapılan literatür taramalarında çalışmamıza benzer hasta örnek gruplarını içeren birebir bir çalışma olmadığı bulunmuştur ve bu durum çalışmamızın özgünlüğünü arttırmaktadır.

BEŞİNCİ BÖLÜM

SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmada Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 hastalarına ait örneklerde Total protein ölçümü (Spektrofotometrik ölçüm), Commesie Blue ile boyama, Western Blot çalışması ve İstatistiksel Analizler (SPSS) yapılmıştır. Total protein ölçümü ile Western Blot basamağında ilgili jelin kuyucuğuna ne kadar hacimde örnek yüklemesi yapılacağı hesaplanmıştır. Commesie Blue ile boyamada proteinlerin kantitatif analizi yapılmıştır. Western Blott çalışması ile HSP 70 ve Beta Aktin proteinlerinin ekspresyon seviyelerine bakılmıştır. Son olarak elde edilen veriler istatistiksel olarak anlamlandırılmıştır. Western Blott çalışması ile Grup 1 ve Grup 2'ye göre Grup 3 hastalarında HSP 70 ekspresyon seviyesi düşüş gösterirken Beta Aktin seviyesinde bir artış meydana gelmiştir. Sonrasında yapılan normalizasyon (HSP 70/Beta Aktin) işlemi sonucunda Grup 1 ve Grup 2'ye göre Grup 3'te ekspresyon seviyesinde bir azalma gözlemlenmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına göre;

HSP 70 ekspresyon seviyesinde Grup 1 ile Grup 3 arasında istatistiksel olarak ($p<0,05$) anlamlılık bulunurken, Grup 1 ile Grup 2 ve Grup 2 ile Grup 3 arasında anlamlılık bulunamamıştır. Beta Aktin ekspresyon seviyesinde Grup 1 ile Grup 3 ve Grup 2 ile Grup 3 arasında istatistiksel olarak ($p<0,05$) anlamlılık bulunurken, Grup 1 ile Grup 2 arasında anlamlılık bulunamamıştır. Normalizasyon işlemi sonucunda Grup 1 ile Grup 3 ve Grup 2 ile Grup 3 arasında istatistiksel olarak ($p<0,05$) anlamlılık bulunurken, Grup 1 ile Grup 2 arasında anlamlılık bulunamamıştır.

İstatistiksel olarak anlamlılıkların olduğu veriler aşağıdaki gibidir;

HSP 70		Paired Samples Test			
		Significance			
		t	df	One-Sided p	Two-Sided p
Pair 1	G1 - G2	,802	7	,224	,449
Pair 2	G1 - G3	2,449	7	,022	,044
Pair 3	G2 - G3	1,522	7	,086	,172

Resim 7. HSP 70 protein t-Test sonuçları anlamlılık değerleri

BETA ACTİN		Paired Samples Test			
		Significance			
		t	df	One-Sided p	Two-Sided p
Pair 1	G1 - G2	2,021	7	,041	,083
Pair 2	G1 - G3	-4,649	7	,001	,002
Pair 3	G2 - G3	-9,739	7	<,001	<,001

Resim 8. Beta-Aktin protein t-Test sonuçları anlamlılık değerleri

HSP 70/Beta Actin Normalize		Paired Samples Test			
		Significance			
		t	df	One-Sided p	Two-Sided p
Pair 1	G1 - G2	-,846	7	,213	,426
Pair 2	G1 - G3	21,724	7	<,001	<,001
Pair 3	G2 - G3	8,794	7	<,001	<,001

Resim 9. HSP 70/Beta Aktin Proteinleri Normalize t-Test sonuçları anlamlılık değerleri

Çalışmamızda Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 üzerinde gerçekleştirilen analizler, belirtildiği gibi protein ekspresyon seviyelerindeki farklılıkların bir fizyolojik sürecin belirtisi olabileceğini göstermektedir. Bu fizyolojik süreçlerin yaşanması sonucunda hastalık gruplarında protein seviyelerinde belirgin farklılıklar gözlemlenmiştir. Tekrarlayan gebelik kayıplarında, HSP 70 protein seviyelerinde bir azalma ve Beta Aktin protein seviyelerinde bir artış olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan istatistiksel analizler, tekrarlayan gebelik grubuna ait hastalarda anlamlı sonuçlar ortaya koymuştur. Hem HSP 70 hem de Beta aktin proteininin fizyolojik süreçteki rolleri göz önünde bulundurulduğunda çalışma sonuçlarından elde edilen veriler bu hastalık sürecinde protein seviyesindeki meydana gelebilecek değişiklikleri gösteriyor olabilir. Bu bulgular, stres faktörlerine karşı hücrel savunmada önemli role sahip olan ısı şok proteinlerinin eksikliğinin tekrarlayan gebelik kayıplarının etiyolojik nedeni olabileceği öngörülmektedir. Yaşamsal bir öneme sahip olan beta aktin protein seviyesindeki artış ise fizyolojik bir savunma mekanizması olarak değerlendirilebilir.

Literatür incelemesi yapıldığında çalışmamızda kullanılan hasta gruplarının düşük materyallerinde ısı şok protein ekspresyon analizlerine ait çalışma bulunmadığından, bu çalışmanın TKG konusunda özgün bir çalışma olduğu

görülmektedir. Bu çalışma sonunda elde edilecek moleküler düzeydeki veriler problemin moleküler temellerinin aydınlatılmasına, tekrarlayan gebelik kayıplarının çözümüne ve farklı tedavi metotlarının geliştirilmesine yardımcı olacaktır.



ALTINCI BÖLÜM

KAYNAKÇA

Abdulsid, A., Hanretty, K., & Lyall, F. (2013). Heat shock protein 70 expression is spatially distributed in human placenta and selectively upregulated during labor and preeclampsia. *PloS one*, 8(1), e54540. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054540> (Retraction published PLoS One. 2018 Jun 21;13(6):e0199804)

Anonim. (2006) Heat shock proteins- structure and overview. <http://www.cs.stedwards.edu/chem/Chemistry/Chem43/Chem43/HSP/Structure>.

Arrigo, A. P. (1998). Small stress proteins: chaperones that act as regulators of intracellular redox state and programmed cell death. *Biological chemistry*, 379(1), 19–26.

Benjamin, I. J., & McMillan, D. R. (1998). Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circulation research*, 83(2), 117–132. <https://doi.org/10.1161/01.res.83.2.117>

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>

Burnette, W. N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical biochemistry*, 112(2), 195–203. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90281-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90281-5)

Ciocca, D. R., & Calderwood, S. K. (2005). Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell stress & chaperones*, 10(2), 86–103. <https://doi.org/10.1379/csc-99r.1>

Clifford, K., Flanagan, A. M., & Regan, L. (1999). Endometrial CD56+ natural killer cells in women with recurrent miscarriage: a histomorphometric study. *Human reproduction* (Oxford, England), 14(11), 2727–2730. <https://doi.org/10.1093/humrep/14.11.2727>

Clifford, K., Rai, R., & Regan, L. (1997). Future pregnancy outcome in unexplained recurrent first trimester miscarriage. *Human reproduction* (Oxford, England), 12(2), 387–389. <https://doi.org/10.1093/humrep/12.2.387>

Cunningham, F. G., Leveno, K. J., Bloom, S. L., Hauth, J. C., Gilstrap III, L. C., Wenstrom, K. D. (2005). *Williams Obstetrics*. 22nd Edition, McGraw Hill, New York.

Currie, S. R., Wilson, K. G., & Curran, D. (2002). Clinical significance and predictors of treatment response to cognitive-behavior therapy for insomnia secondary to chronic pain. *Journal of behavioral medicine*, 25(2), 135–153. <https://doi.org/10.1023/a:1014832720903>

Deane, E. E., & Woo, N. Y. (2005). Growth hormone increases hsc70/hsp70 expression and protects against apoptosis in whole blood preparations from silver sea bream. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1040, 288–292. <https://doi.org/10.1196/annals.1327.044>

Ford, H. B., & Schust, D. J. (2009). Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. *Reviews in obstetrics & gynecology*, 2(2), 76–83.

Franklin, T. B., Krueger-Naug, A. M., Clarke, D. B., Arrigo, A. P., & Currie, R. W. (2005). The role of heat shock proteins Hsp70 and Hsp27 in cellular protection of the central nervous system. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group*, 21(5), 379–392. <https://doi.org/10.1080/02656730500069955>

Ganju, L., Chanda, S., Karan, D., & Srivastava, K. K. (1999). Induction of stress proteins in response to hypoxia. *Indian journal of experimental biology*, 37(4), 344–349.

George, K. I., Mathilakath M. V., Rob B. F., Paige A. A. (1999). Heat Shock Proteins and Physiological Stress in Fish. *American Zoologist*, Volume 39, Issue 6, Pages 901–909, doi: 10.1093/icb/39.6.901.

Gharesti-Fard, B., Zolghadri, J., & Kamali-Sarvestani, E. (2014). Alteration in the expression of proteins in unexplained recurrent pregnancy loss compared with in the normal placenta. *The Journal of reproduction and development*, 60(4), 261–267. <https://doi.org/10.1262/jrd.2013-096>

Güven, E., Güven, S., İslamoğlu, G. A., Demir, B., Serdar G.S. (2006). Tekrarlayan Gebelik Kayıplarında Güncel Algoritma. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 37:117-123.

Hassold, T. J. (1980). A cytogenetic study of repeated spontaneous abortions. *American journal of human genetics*, 32(5), 723–730.

Henle, K. J., Jethmalani, S. M., & Nagle, W. A. (1998). Stress proteins and glycoproteins (Review). *International journal of molecular medicine*, 1(1), 25–32.

Jäättelä, M. (1999). Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Annals of medicine*, 31(4), 261–271. <https://doi.org/10.3109/07853899908995889>

Jakob, U., Muse, W., Eser, M., & Bardwell, J. C. (1999). Chaperone activity with a redox switch. *Cell*, 96(3), 341–352. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80547-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80547-4)

Kalmar, B., & Greensmith, L. (2009). Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. *Advanced drug delivery reviews*, 61(4), 310–318. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.02.003>

Kilpatrick, D. C., Bevan, B. H., & Liston, W. A. (1995). Association between mannan binding protein deficiency and recurrent miscarriage. *Human reproduction* (Oxford, England), 10(9), 2501–2505. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a136330>

Kregel, K. C. (2002). Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. : 1985), 92(5), 2177–2186. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01267.2001>

Laad, A. D., Thomas, M. L., Fakih, A. R., & Chiplunkar, S. V. (1999). Human gamma delta T cells recognize heat shock protein-60 on oral tumor cells. *International journal of cancer*, 80(5), 709–714. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19990301\)80:5<709::aid-ijc14>3.0.co;2-r](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19990301)80:5<709::aid-ijc14>3.0.co;2-r)

Landry, J. (1998). Protein Interactions and Molecular Chaperones. <http://www.tulane.edu/biochem/med/hsp.htm>.

Li, R., & Shen, Y. (2013). An old method facing a new challenge: re-visiting housekeeping proteins as internal reference control for neuroscience research. *Life sciences*, 92(13), 747–751. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.02.014>

Lin, J., & Redies, C. (2012). Histological evidence: housekeeping genes beta-actin and GAPDH are of limited value for normalization of gene expression. *Development genes and evolution*, 222(6), 369–376. <https://doi.org/10.1007/s00427-012-0420-x>

Milarski, K. L., & Morimoto, R. I. (1986). Expression of human HSP70 during the synthetic phase of the cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*

of the United States of America, 83(24), 9517–9521.
<https://doi.org/10.1073/pnas.83.24.9517>

Milner, C. M., & Campbell, R. D. (1990). Structure and expression of the three MHC-linked HSP70 genes. *Immunogenetics*, 32(4), 242–251.
<https://doi.org/10.1007/BF00187095>

Mizzen, L. (1998). Immune responses to stress proteins: applications to infectious disease and cancer. *Biotherapy* (Dordrecht, Netherlands), 10(3), 173–189.
<https://doi.org/10.1007/BF02678295>

Mori, C., Allen, J. W., Dix, D. J., Nakamura, N., Fujioka, M., Toshimori, K., & Eddy, E. M. (1999). Completion of meiosis is not always required for acrosome formation in HSP70-2 null mice. *Biology of reproduction*, 61(3), 813–822.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod61.3.813>

Munné, S., Magli, C., Cohen, J., Morton, P., Sadowy, S., Gianaroli, L., Tucker, M., Márquez, C., Sable, D., Ferraretti, A. P., Massey, J. B., & Scott, R. (1999). Positive outcome after preimplantation diagnosis of aneuploidy in human embryos. *Human reproduction* (Oxford, England), 14(9), 2191–2199.
<https://doi.org/10.1093/humrep/14.9.2191>

Perrin, B. J., & Ervasti, J. M. (2010). The actin gene family: function follows isoform. *Cytoskeleton* (Hoboken, N.J.), 67(10), 630–634.
<https://doi.org/10.1002/cm.20475>

Pluchino, N., Drakopoulos, P., Wenger, J. M., Petignat, P., Streuli, I., & Genazzani, A. R. (2014). Hormonal causes of recurrent pregnancy loss (RPL). *Hormones* (Athens, Greece), 13(3), 314–322.
<https://doi.org/10.14310/horm.2002.1505>

Pockley, A. G. (2001). Heat shock proteins in health and disease: therapeutic targets or therapeutic agents?. *Expert reviews in molecular medicine*, 3(23), 1–21.
<https://doi.org/10.1017/S1462399401003556>

Pollard, T. D., & Cooper, J. A. (2009). Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* (New York, N.Y.), 326(5957), 1208–1212.
<https://doi.org/10.1126/science.1175862>

Poon, H. F., Calabrese, V., Scapagnini, G., & Butterfield, D. A. (2004). Free radicals and brain aging. *Clinics in geriatric medicine*, 20(2), 329–359.
<https://doi.org/10.1016/j.cger.2004.02.005>

Regan, L., Braude, P. R., & Trembath, P. L. (1989). Influence of past reproductive performance on risk of spontaneous abortion. *BMJ (Clinical research ed.)*, 299(6698), 541–545. <https://doi.org/10.1136/bmj.299.6698.541>

Riabowol, K. T., Fink, J. S., Gilman, M. Z., Walsh, D. A., Goodman, R. H., & Feramisco, J. R. (1988). The catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase induces expression of genes containing cAMP-responsive enhancer elements. *Nature*, 336(6194), 83–86. <https://doi.org/10.1038/336083a0>

Robertson, L., Wu, O., Langhorne, P., Twaddle, S., Clark, P., Lowe, G. D., Walker, I. D., Greaves, M., Brenkel, I., Regan, L., Greer, I. A., & Thrombosis: Risk and Economic Assessment of Thrombophilia Screening (TREATS) Study (2006). Thrombophilia in pregnancy: a systematic review. *British journal of haematology*, 132(2), 171–196. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05847.x>

Russell, K. S., Haynes, M. P., Caulin-Glaser, T., Rosneck, J., Sessa, W. C., & Bender, J. R. (2000). Estrogen stimulates heat shock protein 90 binding to endothelial nitric oxide synthase in human vascular endothelial cells. Effects on calcium sensitivity and NO release. *The Journal of biological chemistry*, 275(7), 5026–5030. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.7.5026>

Salat-Baroux, J. (1988). Les avortements spontanés à répétition [Recurrent spontaneous abortions]. *Reproduction, nutrition, developpement*, 28(6B), 1555–1568.

Sargent, C. A., Dunham, I., Trowsdale, J., & Campbell, R. D. (1989). Human major histocompatibility complex contains genes for the major heat shock protein HSP70. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(6), 1968–1972. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.6.1968>

Sharp, F. R., Massa, S. M., & Swanson, R. A. (1999). Heat-shock protein protection. *Trends in neurosciences*, 22(3), 97–99. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(98\)01392-7](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(98)01392-7)

Shi, Y., & Thomas, J. O. (1992). The transport of proteins into the nucleus requires the 70-kilodalton heat shock protein or its cytosolic cognate. *Molecular and cellular biology*, 12(5), 2186–2192. <https://doi.org/10.1128/mcb.12.5.2186-2192.1992>

Simón, C., Rubio, C., Vidal, F., Gimenez, C., Moreno, C., Parrilla, J. J., & Pellicer, A. (1998). Increased chromosome abnormalities in human preimplantation embryos after in-vitro fertilization in patients with recurrent miscarriage. *Reproduction, fertility, and development*, 10(1), 87–92. <https://doi.org/10.1071/r98030>

Smith, G. C., Pell, J. P., & Walsh, D. (2003). Spontaneous loss of early pregnancy and risk of ischaemic heart disease in later life: retrospective cohort study. *BMJ* (Clinical research ed.), 326(7386), 423–424. <https://doi.org/10.1136/bmj.326.7386.423>

Sotiriou, S., Liatsos, K., Ladopoulos, I., & Arvanitis, D. L. (2004). A comparison in concentration of heat shock proteins (HSP) 70 and 90 on chorionic villi of human placenta in normal pregnancies and in missed miscarriages. *Clinical and experimental obstetrics & gynecology*, 31(3), 185–190.

Srivastava, P. K., & Maki, R. G. (1991). Stress-induced proteins in immune response to cancer. *Current topics in microbiology and immunology*, 167, 109–123. https://doi.org/10.1007/978-3-642-75875-1_7

Tal, M., Silberstein, A., & Nusser, E. (1985). Why does Coomassie Brilliant Blue R interact differently with different proteins? A partial answer. *The Journal of biological chemistry*, 260(18), 9976–9980.

Tang, P. Z., Gannon, M. J., Andrew, A., & Miller, D. (1995). Evidence for oestrogenic regulation of heat shock protein expression in human endometrium and steroid-responsive cell lines. *European journal of endocrinology*, 133(5), 598–605. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1330598>

Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9), 4350–4354. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>

Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1989). Immunoblotting in the clinical laboratory. *Journal of clinical chemistry and clinical biochemistry. Zeitschrift fur klinische Chemie und klinische Biochemie*, 27(8), 495–501.

Tünay, K. A., Nuray, E., Vecihe, T. (2007). Isı Şok Proteinler ve Fizyolojik Roller. *Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi* 13(1): 109-114. DOI:10.9775/kvfd.2006.38-D

Wang, H., Wang, P., Liang, X., Li, W., Yang, M., Ma, J., Yue, W., & Fan, S. (2020). Down-regulation of endothelial protein C receptor promotes preeclampsia by affecting actin polymerization. *Journal of cellular and molecular medicine*, 24(6), 3370–3383. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15011>

Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., & Altman, A. (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in plant science*, 9(5), 244–252. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.03.006>

Witzmann, F. A., Fultz, C. D., & Lipscomb, J. C. (1996). Toxicant-induced alterations in two-dimensional electrophoretic patterns of hepatic and renal stress proteins. *Electrophoresis*, 17(1), 198–202. <https://doi.org/10.1002/elps.1150170132>

Xu, L., Chang, V., Murphy, A., Rock, J. A., Damewood, M., Schlaff, W., & Zacur, H. A. (1990). Antinuclear antibodies in sera of patients with recurrent pregnancy wastage. *American journal of obstetrics and gynecology*, 163(5 Pt 1), 1493–1497. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(90\)90612-b](https://doi.org/10.1016/0002-9378(90)90612-b)

Yang, D., Dai, F., Wang, L., Cai, S., Zhang, Y., Diao, L., & Cheng, Y. (2023). HSP70 regulates lipid metabolism of decidual macrophages to maintain normal pregnancy. *Journal of reproductive immunology*, 156, 103829. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2023.103829>

Yang, J. I., Kong, T. W., Kim, H. S., & Kim, H. Y. (2015). The Proteomic Analysis of Human Placenta with Pre-eclampsia and Normal Pregnancy. *Journal of Korean medical science*, 30(6), 770–778. <https://doi.org/10.3346/jkms.2015.30.6.770>

Yıldız, Ş., Karakaş, S., Kaya, C., Kural, A., Gedikbaşı, A., Ekin, D., Serhanoğlu, Z., Çaypınar, S. S., & Ekin, M. (2022). Evaluation of HSP70 levels in ectopic pregnancy, abortus imminens and intrauterine pregnancy. *Biomarkers in medicine*, 16(18), 1251–1258. <https://doi.org/10.2217/bmm-2022-0550>

Zügel, U., & Kaufmann, S. H. (1999). Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. *Clinical microbiology reviews*, 12(1), 19–39. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.1.19>