



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**METABOLİK SENDROMLU SIÇAN
KORTİKAL NÖRONLARINDA
ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİYLE İLGİLİ
FAKTÖRLERİN ARAŞTIRILMASI**

Şule KIZIL

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Belgin CAN**

**ANKARA
2017**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**METABOLİK SENDROMLU
SIÇAN KORTİKAL NÖRONLARINDA
ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİYLE İLGİLİ
FAKTÖRLERİN ARAŞTIRILMASI**

Şule KIZIL

**HİSTOLOJİ- EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Belgin CAN**

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
16L0230006 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**ANKARA
2017**

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Metabolik Sendromlu Sıçan Kortikal Nöronlarında Endoplazmik Retikulum Stresiyle İlgili Faktörlerin Araştırılması” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Şule KIZIL

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Histoloji ve Embriyoloji (Tıp) Anabilim Dalında Şule KIZIL tarafından hazırlanan
“Metabolik Sendromlu Sıçan Kortikal Nöronlarında Endoplazmik Retikulum Stresiyle İlgili
Faktörlerin Araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak
OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 16.10.2017



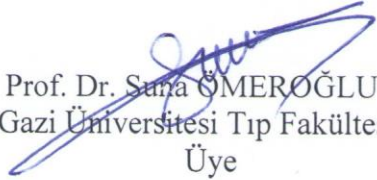
Prof. Dr. Belgin CAN
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Belma TURAN (TİK)
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Üye



Prof. Dr. Bizden SABUNCUOĞLU
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Üye



Prof. Dr. Sema ÖMEROĞLU
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Üye



Yrd. Doç. Dr. Hilal NAKKAŞ
Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi
Raportör

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	xi
Çizelgeler	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1. Sinir Sistemi	1
1.1.1. Beyin	1
1.1.2. Beyin Lobları ve Prefrontal Korteks	3
1.1.3. Beyin Gelişimi	4
1.2. Endoplazmik Retikulum	7
1.2.1. ER'nin Genel Yapısı	7
1.2.2. ER'nin Fonksiyonu	9
1.2.3. ER Stresi ve Katlanmamış Protein Yanıtı (KPY)	10
1.2.3.1. IRE1 α Yolağı	12
1.2.3.2. ATF6 Yolağı	13
1.2.3.3. PERK Yolağı	14
1.2.4. ERAD Yolağı	15
1.2.5. ER Stresi İle İlişkili Apoptoz	17
1.2.6. ER Stresi İle İlişkili Hastalıklar	19
1.2.6.1. ER Stresi, Metabolik Sendrom ve Tip 2 Diyabet	20
1.2.6.2. ER Stresi ve Nörodejeneratif Hastalıklar	21
1.2.6.3. ER Stresi ve Kardiyovasküler Hastalıklar	22
1.2.6.4. ER Stresi ve Kanser	23
1.3. Metabolik Sendrom	24
2. GEREÇ VE YÖNTEM	28
2.1. Kullanılan Hayvanlar ve Dokuların Eldesi	28
2.2. Sıçanlarda MetS Deney Modelinin Oluşumunun Doğrulanması	29
2.2.1. Açlık Kan Şekeri Ölçümü	29
2.2.2. Kan Basıncı Ölçümü	29
2.2.3. OGTT ile Oral Glukoz Toleransının Ölçümü	30
2.2.4. Kan İnsülin Seviyesinin Belirlenmesi	30
2.3. MetS+İnsülin Grubuna İnsülin Enjeksiyonu	31
2.4. Işık Mikroskopik (IM) İncelemeler İçin Yapılan Çalışmalar	31
2.4.1. %10'luk Tamponlu Formalin İçin Takip Protokolü	32
2.4.2. Hematoksilin-Eozin (HE) Boyama Protokolü	32
2.4.3. Krezil Viyole Boyama Protokolü	33
2.4.4. İmmünohistokimya ve İmmünofluoresan İncelemeler İçin Yapılan Çalışmalar	33
2.4.4.1. İmmünohistokimya İşaretleme Protokolü	33

2.4.4.2. TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick and labeling) ile Apoptotik Hücreleri İşaretleme Protokolü	35
2.4.4.3. İmmünofluoresan İşaretleme Protokolü	35
2.5. Western Blotlama İçin Yapılan Çalışmalar	36
2.5.1. Toplam Protein Miktarının Belirlenmesi	37
2.5.2. Proteinlerin Jel Elektrophorez ile Ayırıştırılması	37
2.5.3. İmmünoblotlama	39
2.6. İstatistiksel Analiz	41
3. BULGULAR	42
3.1. Genel Değerlendirme Bulguları	42
3.2. Sıçanlarda Deneysel MetS Oluşturulmasının Doğrulanması	42
3.3. MetS Oluşturulan Sıçanlara İnsülin Uygulanmasının Değerlendirilmesi	43
3.4. Işık Mikroskopik Değerlendirme Bulguları	44
3.5. ER Stresiyle İlişkili Belirteçlerin İmmünohistokimya, İmmünofluoresan ve Western Blotlama Bulguları	47
3.5.1. IRE1 α Bulguları	47
3.5.2. p-IRE1 Bulguları	49
3.5.3. PERK Bulguları	50
3.5.4. p-PERK Bulguları	52
3.5.5. ATF6 Bulguları	52
3.5.6. GRP78 Bulguları	54
3.5.7. EDEM Bulguları	55
3.5.8. Pro-Caspase 12 Bulguları	57
3.5.9. GSK3 α/β	58
3.5.10. Caspase 3 Bulguları	60
3.5.11. TUNEL Bulguları	61
3.6. İstatistiksel Bulgular	63
4. TARTIŞMA	64
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	70
ÖZET	72
SUMMARY	73
KAYNAKLAR	74
EKLER	78
EK-1: Etik Kurul Raporu	78
ÖZGEÇMİŞ	79

ÖNSÖZ

Metabolik sendromun (MetS) en temel parametrelerinden biri insülin direncidir. Metabolik, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar gibi patolojilere de neden olan endoplazmik retikulum (ER) stresi aynı zamanda insülin sinyal yolağının düzenlenmesinde de rol oynamaktadır. Bu doktora tezi çalışmasında da MetS geliştirilmiş sıçanların kortikal nöronlarında ER stresinin varlığını ve egzojen insülinin ER stresi üzerine etkilerini göstermek üzere ER stresine ilgili belirteçlerin araştırılması amaçlanmıştır. Bu tez çalışması Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün 16L0230006 proje numarası ile desteklenmiştir.

Doktora eğitimim ve tez çalışmalarımda bilgi ve donanımını benden esirgemeyen, her konuda destek ve anlayışla yaklaşan değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Belgin CAN'a,

Doktora eğitimim boyunca yetişmemde çok emekleri geçen, her zaman anlayışla yaklaşan Anabilim Dalı başkanımız Sn. Prof. Dr. Alp CAN'a; Anabilim Dalımız öğretim üyeleri Sn. Prof. Dr. Nurşen SARAÇ'a, Sn. Prof. Dr. Esra ERDEMLİ'ye, Sn. Prof. Dr. Bizden SABUNCUOĞLU'na, Sn. Prof. Dr. Oya EVİRGİN'e, Sn. Prof. Dr. Sevim AYDIN'a, Sn. Prof. Dr. Özgür ÇINAR'a, Sn. Yrd. Doç. Dr. Deniz BİLLUR'a; Anabilim Dalımız emekli öğretim üyeleri Sn. Prof. Dr. Canan AKBAY'a ve Sn. Prof. Dr. Cengiz GÜVEN'e,

Tez çalışmalarım sırasında verdikleri destekten dolayı Biyofizik Anabilim Dalı'ndan Sn. Prof. Dr. Belma TURAN'a, Arş. Gör. Ayşegül TOY DURAK'a ve Arş. Gör. Yusuf OLGAR'a,

Her zaman bana destek ve yardımcı olan çalışma arkadaşlarım Uzm. Dr. Ferda TOPAL ÇELİKKAN'a, Arş. Gör. İrem İNANÇ'a, Arş. Gör. Rukiye KAYA'ya, Arş.

Gör. Dr. Ebru ÇELİK'e, Arş. Gör. Dr. Derya ÖZDEMİR'e, Uzm. Bio. Selda KAHVECİ'ye, Bio. Ceren MUNGAN'a, Bio. Merve SUCU'ya; Anabilim Dalı çalışanlarımız Serap BATI'ya, Erdoğan ÇALIŞKAN'a, Abdülkerim DİLBAZ'a ve Remzi ATA'ya,

Anabilim Dalımızda geçirdiğim süre boyunca yardım ve desteklerini benden esirgemeyen, hayatıma hiç silinmesini istemediğim renkler katan Yrd. Doç. Dr. Hilal NAKKAŞ'a, Dr. Emine Nazlı HAYIRLI'ya, Vet. Hek. Masoud AFSHANI'ye, Arş. Gör. Pınar BAYRAM'a,

Bu günlere gelmemde her türlü emek ve sabrı gösteren, çalışmalarım boyunca maddi manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan annem, babam ve kardeşlerime,

Tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AER	Agranüler Endoplazmik retikulum
APS	Ammonium Per Sulphate
ASK1	Apoptosis signal-regulating kinase 1
ATF4	Activating transcription factor 4
ATF6	Activating transcription factor-6
β	Beta
BAK	Bcl-2 homologous antagonist/killer
BAX	Bcl-2-associated X protein
BCA	Bicinchoninic Acid
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BIP/GRP78	Binding immunoglobulin protein/78-kDa glucose-regulated protein
BSA	Bovine Serum Albumin
Ca^{2+}	Kalsiyum
CHOP	CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein
CNX	Kalneksin
CRT	Kalretikülin
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DDIT-3	DNA damage-inducible transcript 3
dH ₂ O	Distile Su
DTT	Dithiothreitol
EDEM	ER degradation-enhancing α -mannosidase-like protein
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EGTA	Egtazik asit
eIF2	Eukaryotic Initiation factor 2
ER	Endoplazmik retikulum
ERAD	ER-associated degradation
ERGIC	ER-Golgi intermediate compartment
ERMan1	ER α 1,2 mannosidase 1
ERQC	Endoplasmic reticulum quality control

GADD153/CHOP	C/EBP homologous protein
GER	Granüllü Endoplazmik retikulum
GRP40	40-kDa glucose-regulated protein
GSK3/3 β	Glycogen synthase kinase 3/3 β
HDL	High density lipoprotein= Yüksek dansiteli lipoprotein
HE	Hematoksilin-Eozin
Herp	Homocysteine-responsive endoplasmic reticulum-resident ubiquitin-like domain
HOMA-IR	Homeostasis model assessment – insülin resistance
Hsp40	Heat Shock Protein 40
Hsp70	Heat Shock Protein 70
Hsp90	Heat Shock Protein 90
HPA	Hipotalamus-hipofiz-adrenal aksı
IgG	İmmünglobulin G
IKK	I κ B kinase
IM	Işık Mikroskopik
IP3	İnositol 1,4,5-trifosfat
IP3R	İnositol 1,4,5-trifosfat reseptörü
IRE1 α	İnositol-requiring protein 1 α
IRS1	İnsülin reseptör substrat 1
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KCl	Potasyum Klorür
KPY	Katlanmamış protein yanıtı
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MetS	Metabolik Sendrom
miRNA	MikroRNA
μ g	Mikrogram
μ l	Mikrolitre
μ M	Mikromolar
μ m	Mikrometre
mL	Mililitre
mM	Milimolar

mRNA	Mesajcı RNA
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
Na ₃ VO ₄	Sodium orthovanadate
NaCl	Sodyum Klorür
NaF	Sodyum Florid
NFκB	Nuclear factor-κB
ng	Nanogram
nM	nano molar
nm	Nanometre
OGTT	Oral glukoz tolerans testi
PBS	Phosphate buffered saline
PERK	Protein kinase RNA-like ER kinase
PMSF	Phenylmethysulfonyl fluoride
PSS	Periferik Sinir Sistemi
PVDF	Polyvinylidene flüoride
RIDD	Regulated IRE1α-dependent decay
Rpm	Revolutions per minute
RyRs	Ryanodin reseptörleri
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SREBP	Sterol regulatory element-binding proteins
SRP	Sinyal tanıma parçacığı
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TDAG51	T-cell death-associated gene 51
TBS-T	Tris-tamponlu salin
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TRAF2	Tumor necrosis factor receptor-associated factor 2
TRIC	TCP1-ring complex
Tris-HCl	Hydroxymethyl aminomethane hydrochloride
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick and labeling
UGTT	UDP-glucose: glycoprotein glucosyl transferase
UPS	Ubikütün/proteazom sistemi
XBP1	X-box binding protein 1

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Beyin tabakalarının şematik ve histolojik olarak gösterilmesi.	3
Şekil 1.2. Beyin lobları ve prefrontal korteksin yerleşimi.	3
Şekil 1.3. Beyin gelişimi. A) 18. ve 20. günlere ait embriyonda nöral oluk, nöral katlantılar ve somitlerin görünümü. B) 22. ve 23. günlere ait embriyonun dorsal görünümü. C) Gelişimin 28. gününde oluşan beyin taslakları. D) Gelişimin 32. gününde ilkel beyinin sagital görünümü.	5
Şekil 1.4. Prefrontal korteks tabakalarının gelişimi.	6
Şekil 1.5. Hücre içi ER ağı.	8
Şekil 1.6. IRE1 α yolağı.	13
Şekil 1.7. ATF6 yolağı.	13
Şekil 1.8. PERK yolağı.	14
Şekil 1.9. ERAD yolağı.	15
Şekil 1.10. ER stresi ve apopitoz.	19
Şekil 1.11. Er stresi ve ilişkili hastalıklar.	20
Şekil 1.12. Er stresi ve nörodejeneratif hastalıklar.	22
Şekil 2.1. Kontrol ve deney gruplarına ait Hematoksilin-Eozin ile boyanmış kesitlerde prefrontal korteksin genel görünümü. A) ve B) Kontrol grubu, C) ve D) MetS grubu, E) ve F) MetS+İnsülin grubu. Ok: Pia mater. Boya: Hematoksilin-Eozin. Bar: 100 μ m.	45
Şekil 2.2. Kontrol ve deney gruplarına ait Krezil Viyole ile boyanmış kesitlerde prefrontal korteksin genel görünümü. A) ve B) Kontrol grubu, C) ve D) MetS grubu, E) ve F) MetS+İnsülin grubu. Ok: Pia mater. Boya: Krezil Viyole. Bar: 100 μ m.	46
Şekil 2.3. Kontrol ve deney gruplarına ait kesitlerde IRE1 α ekspresyonları. Kontrol ve MetS+İnsülin gruplarında yoğun IRE1 α ekspresyonu görülürken, MetS grubunda IRE1 α ekspresyonlarının daha az yoğunlukta oldukları görülmektedir. Bar: 50 μ m	48

- Şekil 2.4.** Kontrol ve deney gruplarından alınan prefrontal korteks örneklerinde IRE1 α proteininin miktarı (Western blot). 48
- Şekil 2.5.** Kontrol ve deney gruplarına ait kesitlerde p-IRE1 ekspresyonları. A) Kontrol grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda p-IRE1 ekspresyonuna rastlanmamıştır. B) MetS grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda orta ve yoğun şiddette p-IRE1 ekspresyonu izlenmektedir. C) MetS+İnsülin grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda orta şiddette p-IRE1 ekspresyonu izlenmektedir. D) p-IRE1 primer antikorunun negatif işaretlenmesi. Bar: 50 μ m. 49
- Şekil 2.6.** Kontrol ve deney gruplarından alınan prefrontal korteks örneklerinde p-IRE1 proteininin miktarı (Western blot). 50
- Şekil 2.7.** Kontrol ve deney gruplarına ait kesitlerde PERK ekspresyonları. A) Kontrol grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda orta ve kuvvetli şekilde PERK ekspresyonu gözlenmektedir. B) MetS grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda zayıf ve orta şiddette PERK ekspresyonu gözlenmektedir. C) MetS+İnsülin grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda zayıf ve orta şiddette PERK ekspresyonu gözlenmektedir. D) PERK primer antikorunun negatif işaretlenmesi. Bar: 50 μ m. 51
- Şekil 2.8.** Kontrol ve deney gruplarından alınan prefrontal korteks örneklerinde PERK proteininin miktarı (Western blot). 51
- Şekil 2.9.** Kontrol ve deney gruplarından alınan prefrontal korteks örneklerinde p-PERK proteininin miktarı (Western blot). 52
- Şekil 2.10.** Kontrol ve deney gruplarına ait kesitlerde ATF6 ekspresyonları. A) Kontrol grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda orta ve kuvvetli şiddette değişen ATF6 ekspresyonları izlenmektedir. B) MetS grubuna ait prefrontal

- kortekste piramidal nöronlarda zayıf ve orta şiddette değişen ATF6 ekspresyonları izlenmektedir. C) MetS+İnsülin grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda zayıf ve orta şiddette değişen ATF6 ekspresyonları izlenmektedir. D) ATF6 primer antikorunun negatif işaretlenmesi. Bar: 50 µm. 53
- Şekil 2.11.** Kontrol ve deney gruplarından alınan prefrontal korteks örneklerinde ATF6 proteininin miktarı (Western blot). 53
- Şekil 2.12.** Kontrol ve deney gruplarına ait kesitlerde GRP78 ekspresyonları. A) Kontrol grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda GRP78 ekspresyonu izlenmemektedir. B) MetS grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda kuvvetli şiddetle GRP78 ekspresyonu görülmektedir. C) MetS+İnsülin grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda zayıf ve orta şiddetle GRP78 ekspresyonu görülmektedir. D) GRP78 primer antikorunun negatif işaretlenmesi. Bar: 50 µm. 54
- Şekil 2.13.** Kontrol ve deney gruplarından alınan prefrontal korteks örneklerinde GRP78 proteininin miktarı (Western blot). 55
- Şekil 2.14.** Kontrol ve deney gruplarına ait kesitlerde EDEM ekspresyonları. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MetS ve MetS+İnsülin gruplarında yoğun EDEM ekspresyonu görülmektedir. Bar: 50 µm. 56
- Şekil 2.15.** Kontrol ve deney gruplarından alınan prefrontal korteks örneklerinde EDEM proteininin miktarı (Western blot). 56
- Şekil 2.16.** Kontrol ve deney gruplarına ait kesitlerde pro-Caspase 12 ekspresyonları. A) Kontrol grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda kuvvetli şiddette pro-Caspase 12 ekspresyonu izlenmektedir. B) MetS grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda orta ve kuvvetli şiddette pro-Caspase 12 ekspresyonu izlenmektedir. C) MetS+İnsülin grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda orta ve kuvvetli şiddette pro-Caspase 12 ekspresyonu izlenmektedir.

D) pro-Caspase 12 primer antikorunun negatif işaretlenmesi.
Bar: 50 μ m.

57

Şekil 2.17. Kontrol ve deney gruplarından alınan prefrontal korteks örneklerinde pro-Caspase 12 proteininin miktarı (Western blot).

58

Şekil 2.18. Kontrol ve deney gruplarına ait kesitlerde GSK3 α/β ekspresyonları. A) Kontrol grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda zayıf ve orta şiddette GSK3 α/β ekspresyonu izlenmektedir. B) MetS grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda zayıf ve orta şiddette GSK3 α/β ekspresyonu izlenmektedir. C) MetS+İnsülin grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda zayıf ve orta şiddette GSK3 α/β ekspresyonu izlenmektedir. D) GSK3 α/β primer antikorunun negatif işaretlenmesi. Bar: 50 μ m.

59

Şekil 2.19. Kontrol ve deney gruplarından alınan prefrontal korteks örneklerinde GSK3 α/β proteininin miktarı (Western blot).

59

Şekil 2.20. Kontrol ve deney gruplarına ait kesitlerde Caspase 3 ekspresyonları. A) Kontrol grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda Caspase3 ekspresyonuna rastlanılmamıştır. B) MetS grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda zayıf ve orta şiddette Caspase3 ekspresyonu izlenmektedir. C) MetS+İnsülin grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda zayıf ve orta şiddette Caspase3 ekspresyonu izlenmektedir. D) Caspase3 primer antikorunun negatif işaretlenmesi. Bar: 50 μ m.

60

Şekil 2.21. Kontrol ve deney gruplarından alınan prefrontal korteks örneklerinde Caspase 3 proteininin miktarı (Western blot).

61

Şekil 2.22. Kontrol ve deney gruplarına ait kesitlerde TUNEL pozitivitesi. A) Kontrol grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda TUNEL pozitivitesine rastlanılmamıştır. B) MetS grubuna ait prefrontal kortekste

piramidal nöronlarda zayıf şiddette TUNEL pozitivitesi izlenmektedir. C) MetS+İnsülin grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda zayıf şiddette TUNEL pozitivitesi izlenmektedir. D) TUNEL'in negatif boyanması. Bar: 20 µm.

62



ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Metabolik sendrom tanı kriterleri.	25
Çizelge 2.1. Kontrol ve MetS gruplarına ait genel parametreler.	43
Çizelge 2.2. MetS ve MetS+İnsülin gruplarına ait genel parametreler.	43
Çizelge 2.3. Normal dağılım gösteren verilerin istatistiksel olarak karşılaştırılması.	63
Çizelge 2.4. Normal dağılım göstermeyen verilerin istatistiksel olarak karşılaştırılması.	63



1. GİRİŞ

1.1. Sinir Sistemi

Sinir sistemi, vücudun iç ve dış çevresini algılamasına yol açarak bilgi elde eden, elde ettiği bilgiyi işleyerek vücut içerisinde oluşturduğu hücre ağı sayesinde sinyallerin farklı bölgelere iletimini sağlayan, organ ve organ sistemlerinin aktivitelerini düzenleyen bir sistemdir. Anatomik olarak; kraniyal kavite ve spinal kanal içerisinde yer alan spinal kordun oluşturduğu merkezi sinir sistemi (MSS) ile MSS'ye gelen, MSS'den giden impulsları ileten kraniyal, spinal ve periferik sinirler, MSS dışında sinir hücre topluluklarını içeren gangliyonlar ve özelleşmiş sinir sonlanmalarından oluşan periferik sinir sistemi (PSS) olmak üzere iki bölümde incelenmektedir (Ross ve Pawlina, 2011).

1.1.1. Beyin

En büyük MSS organıdır. Yüzeyi meninks adı verilen zarlarla çevrilidir ve iki hemisferden oluşmuştur. Erişkindeki ağırlığı 1300-1400 g arasında değişmektedir. Beyin, gri cevherden oluşan bir dış (serebral) korteks ve beyaz cevherden oluşan bir merkezi bölge içerir.

Beyaz cevher sadece kortekste yer alan nöronların aksonlarını ve glia hücrelerini içermektedir. Beyaz cevherde bulunan lifler, korteksi sinir sisteminin alt merkezlerine bağlayan projeksiyon lifleri, aynı hemisferdeki farklı kortikal alanları birbirine bağlayan asosiasyon lifleri ve hemisferlerdeki benzer yapı ve fonksiyondaki homolog alanları birbirine bağlayan komissural liflerdir.

Beynin en dış tabakasını oluşturan serebral korteks ise nöron gövdelerini, aksonları, dendritleri ve merkezi glia hücrelerini içermektedir. Serebral korteks, 1,5-

4,5 mm kalınlıktadır ve insan beyninin ağırlığının %40'nı oluşturan 15 milyardan fazla nörondan oluşur. En dış yüzeydeki girus ve sulkuslar ile yaklaşık 2000 cm²'lik bir yüzey alanı bulunmaktadır.

Serebral korteks filogenetik, ontogenetik ve fonksiyonel kriterlere göre allokorteks ve izokorteks olarak bölümlere ayrılır. Allokorteks, arşikorteks ve paleokorteks bölümlerinden oluşmaktadır ve her iki bölüm farklı tip ve yoğunlukta nöron popülasyonlarına sahip moleküler tabaka, granüler tabaka ve piramidal tabaka olmak üzere 3 tabakadan meydana gelmektedir. İzokorteks, neokorteks olarak da adlandırılır ve korteksin %90'ını oluşturmaktadır. Bununla birlikte farklı tip ve yoğunlukta nöron popülasyonlarına sahip 6 tabakadan meydana gelmektedir (Şekil 1.1) (Müftüoğlu ve ark., 2009; Ross ve Pawlina, 2011; Hürdağ, 2016).

Moleküler (pleksiform) tabaka: Yüzeyel yerleşim gösteren ilk tabakadır ve büyük oranda çoğu yüzeye paralel seyreden liflerden oluşmaktadır. Bölgede bulunan hücrelerin çoğu nöroglial hücreler olmakla birlikte az sayıda da Cajal'ın horizontal hücreleri görülmektedir.

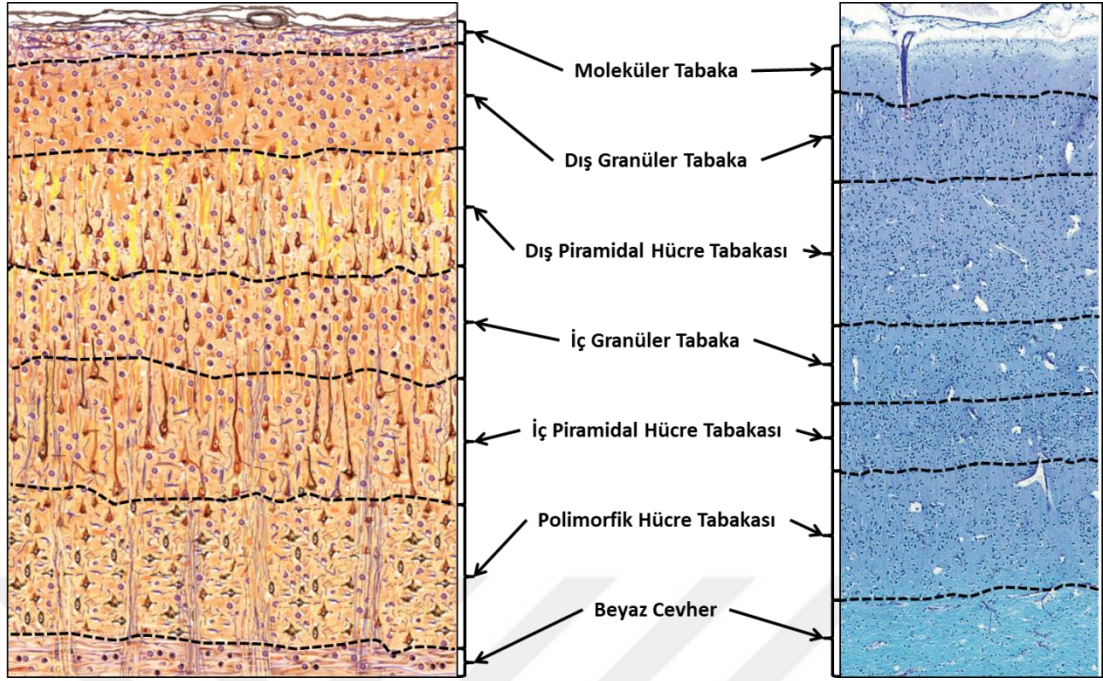
Dış granüler tabaka: Küçük piramidal hücrelerden ve stellat hücre de denilen granüler hücrelerden oluşmaktadır.

Dış piramidal hücre tabakası: Dış granüler tabaka ile sınırı keskin olarak çizilememekle birlikte daha büyük piramidal hücrelerden oluşmaktadır.

İç granüler tabaka: Küçük granüler hücreler ve piramidal hücrelerden oluşmaktadır.

İç piramidal hücre tabakası: Özellikle serebral korteksin motor bölgesinde büyük olan ve Betz hücreleri olarak adlandırılan hücrelerden oluşmaktadır.

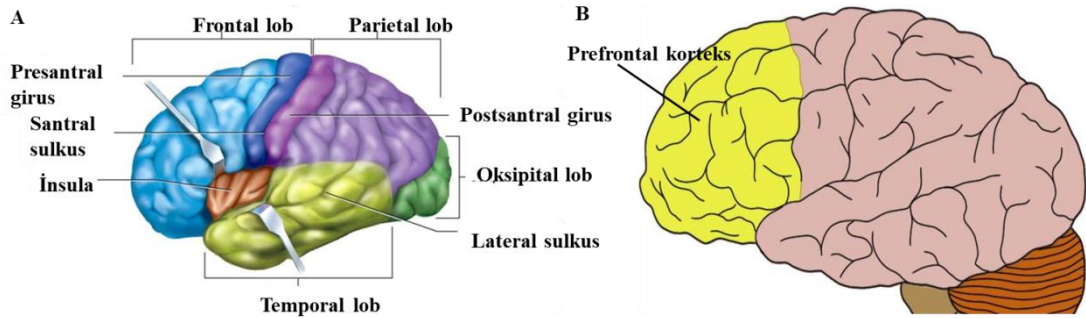
Polimorfik hücre tabakası: Beyaz cevhere bitişik olan bu tabaka füziform hücreler, granüler hücreler, stellat hücreleri ve Martinotti hücreleri gibi çeşitli şekil ve boyutlarda hücreler içermektedir (Ross ve Pawlina, 2011; Eroschenko, 2013).



Şekil 1.1. Beyin tabakalarının şematik ve histolojik olarak gösterilmesi.

1.1.2. Beyin Lobları ve Prefrontal Korteks

Beyin, frontal, parietal, temporal, oksipital ve derindeki insula olmak üzere, kabaca üzerindeki kemiğe göre adlandırılan loblara bölünmüştür. Frontal ve parietal lobların arasında santral sulkus kesin bir sınır oluşturmaktadır. Parietal-okspital sulkusun lateraldeki köşesinden preoksipital çentiğe uzanan lateral parietotemporal hat, oksipital lobu, parietal ve temporal loblardan ayırır. Lateralde uzanan derin lateral fissürün üzerinde önde frontal lob, arkada parietal lob, altında temporal lob ve dibinde ise insula bulunmaktadır (Şekil 1.2.).

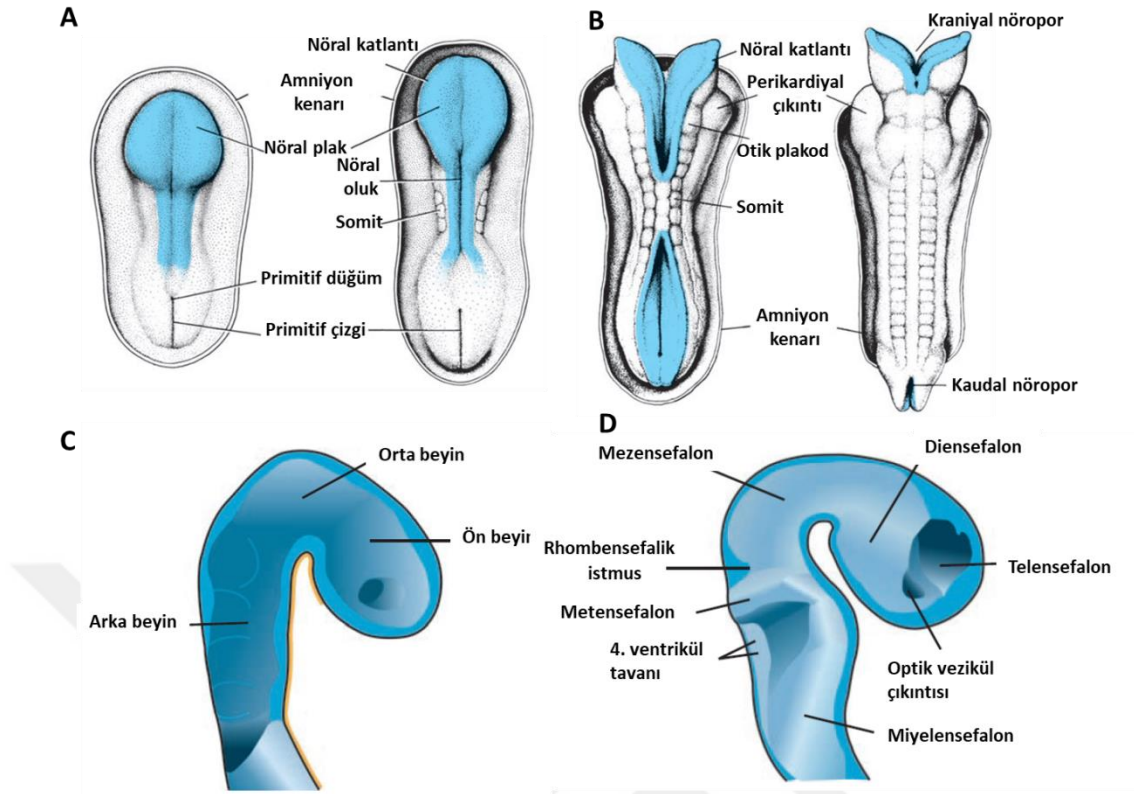


Şekil 1.2. Beyin lobları ve prefrontal korteksin yerleşimi.

Frontal lob, motor hareketler, konuşma, bilişsel fonksiyonlar ve duygulanım süreçlerinde önemli rol oynar. Frontal lob korteksi, serebral korteksin toplam alanının üçte birini oluşturmaktadır. Frontal lobun ön kısmını kaplayan serebral korteks bölgesi “prefrontal korteks” olarak adlandırılır (Şekil 1.2.). Prefrontal korteks, kişilik ve davranışlar ile ilgili hayati rol oynayan merkezleri içermektedir. Bu merkezler, Alman anatomist Korbinian Brodmann tarafından serebral korteksin hücresel organizasyondaki farklılıklarına göre ayrılmış olan 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 24, 25, 32, 44, 45, 46 ve 47. Brodmann alanlarıdır. Prefrontal alanlar; dikkatin sürdürülmesi, yazılan sözcüklerin tanınması, çalışan bellek, planlama ve kontrol etme gibi birçok bilişsel fonksiyonda görev almaktadır. Bununla birlikte, duygunun kontrolü ve konuşma kabiliyeti üzerinde de etki göstermektedir. Geleceği tahmin etme, gelen duyuşal sinyallere cevabı geciktirerek en iyi olduğuna karar verilen cevabın hazırlanması, motor hareketlerin uygulanmadan sonucunun kestirilmesi, komplike matematik ve karmaşık soyut problemlerin çözülmesi, işlevlerin kurallara göre denetlenmesi gibi zihinsel faaliyetlerin amaca yönelik sıralanmasında önemli rol oynamaktadır (Miller ve ark., 2002; Fuster, 2008; Teffer ve Semendeferi, 2012).

1.1.3. Beyin Gelişimi

İnsanda sinir sistemi gelişimi 3. haftanın başında nöral plak olarak adlandırılan embriyonik ektodermin kalınlaşması ile başlar. Nöral plağın kenarları yükselerek nöral katlantıları oluşturur. Nöral katlantıların orta hatta birbirine yaklaşmasıyla nöral oluk ve katlantıların birleşmesiyle de nöral tüp oluşur. Kraniyal nöropor 25. günde, kaudal nöropor ise 27. günde kapanır. Dördüncü haftada nöral tüpün sefalik ucunda 3 ilkel beyin vezikülü oluşur: prozensefalon (ön beyin), mezensefalon (orta beyin) ve rhombensefalon (arka beyin) (Şekil 1.3.). Embriyon 5. haftaya ulaştığında prozensefalon 2 kısımdan oluşur; iki primitif lateral hemisferi oluşturan telensefalon ve diensefalon. Prozensefalonun lateral duvarının bilateral dışa çıkışı şeklinde oluşan serebral hemisferlerin anterior, dorsal ve inferior yönlerde büyümesi sonucunda frontal, temporal ve oksipital loblar şekillenir (Başaklar, 2011; İrez ve Erkan, 2016).

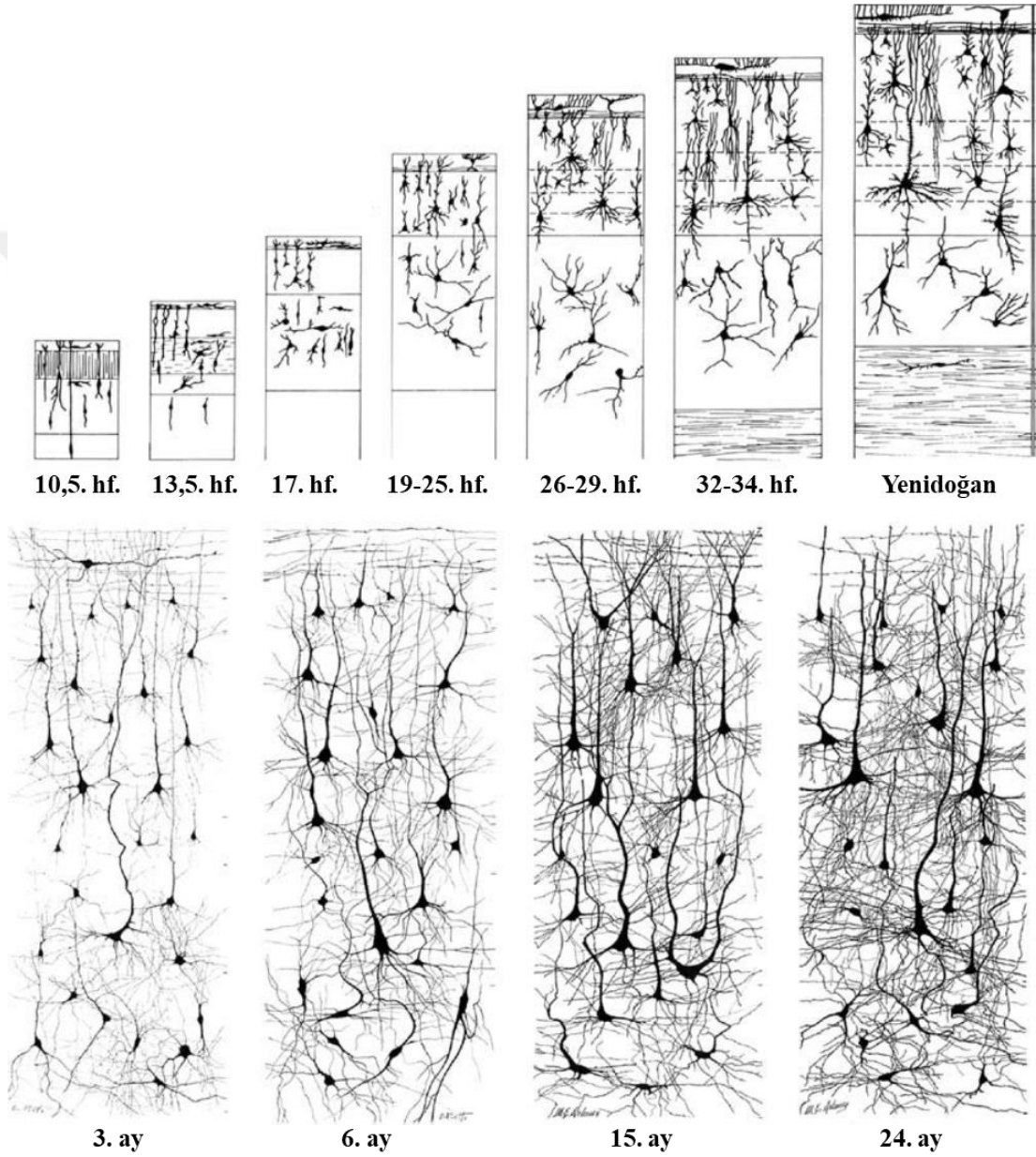


Şekil 1.3. Beyin gelişimi. A) 18. ve 20. günlere ait embriyonda nöral oluk, nöral katlantılar ve somitlerin görünümü. B) 22. ve 23. günlere ait embriyonun dorsal görünümü. C) Gelişimin 28. gününde oluşan beyin taslakları. D) Gelişimin 32. gününde ilkel beyinin sagittal görünümü.

6. haftada nöron üretimi başlar ve 13-20. haftalar arasında telensefalonun neokortikal bölgesinde nöron sayısı katlanarak artar ve 20. haftada kortikal bölge ve marjinal bölgede $5,87 \times 10^9$ nöron bulunur. 22. haftada nörogenez yavaşlar ve nöron sayısı gebeliğin sonlarında yaklaşık 30×10^9 'a ulaşır (Teffer ve Semendeferi, 2012).

Serebral korteks palliumdan gelişir. Pallium, korpus striatumun lateralinde bulunan paleopallium (arşikorteks, allokorteks) ve hipokampus ile paleopallium arasında bulunan neopallium bölgelerinden oluşur. Neopalliumda bulunan nöroblastlar subpial bir yerleşim göstermek için dalgalar halinde göç ederler ve daha sonra olgun nöronlara farklanırlar. Yeni oluşmuş nöroblast dalgası bölgeye ulaştığında, kendilerinden önce oluşmuş hücre tabakaları arasında göç ederek daha yüzeyel pozisyon alırlar (Başaklar, 2011).

Prefrontal korteksin dorsolateral ve lateral bölgelerinde piramidal nöronların dendritik yapıları 17-25. haftalar arasında gelişim gösterir. 26-34. haftalar arasında III ve V. tabakalarda dendritler olgunlaşmaya devam eder, dendritik dikenler gelişir, bazal dendritik uzunluklar artar ve IV. tabakada ara nöronlar farklanmaya başlar (Şekil 1.4.).



Şekil 1.4. Prefrontal korteks tabakalarının gelişimi.

Erken çocukluk döneminde beyin boyutu 4 katına çıkar ve 6 yaşına kadar yetişkin beyin hacminin yaklaşık %90'ına kadar büyür. Başlangıçta hızlı bir şekilde

gerçekleşen nörogenez ve sinaptogenezin yerini, aşırı üretimin yönetilmesi için, budama ve nöronal ölüm alır. Çocukluk ve gençlik dönemleri arasında gri cevherde gerileme ve beyaz cevher hacminde artış görülür. Beyin gelişiminin bu döneminde prefrontal korteksin hacmi 2 katına çıkar (Teffer ve Semendeferi, 2012).

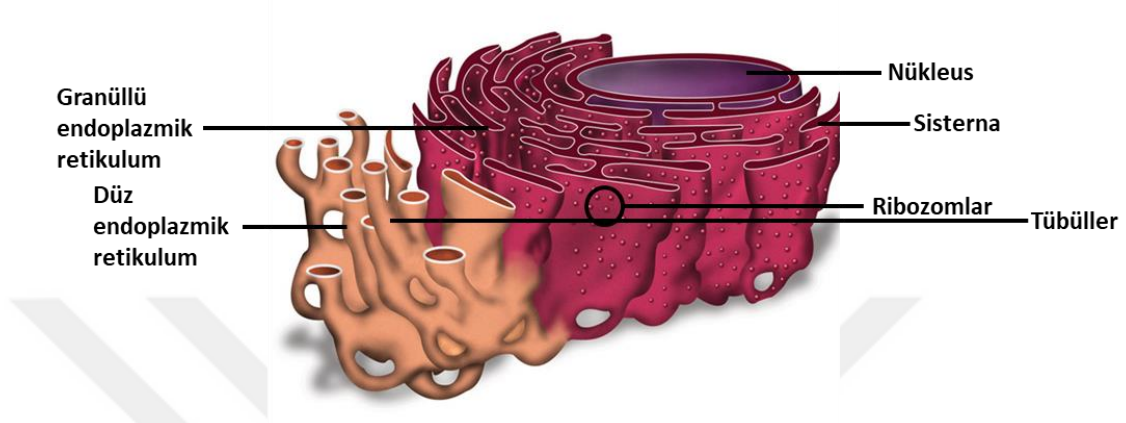
1.2. Endoplazmik Retikulum

Hücresel ağ düşüncesi ilk defa kültüre edilmiş hücrelerde elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda “dantel benzeri” yapının görülmesiyle ortaya atılmıştır. “Endoplazmik retikulum (ER)” terimi, veziküler yapıların endoplazma olarak bilinen sitoplazmanın perinükleer bölgesindeki lokalizasyonunu tarif etmek üzere 1952 yılında Porter ve Kallman tarafından ortaya atılmıştır (Bravo ve ark., 2013). 1972 yılında yapılan bir çalışmada, ER’nin biyokimyasal ve morfolojik özellikleri ve çökeltme özelliklerine göre düşük yoğunluklu fraksiyonda geri kazanılan tübüler yapı ile yüksek yoğunluklu fraksiyonda bulunan küresel veziküler yapı olmak üzere 2 ana membranöz yapı tarif edilmiştir (Heuson-Stiennon ve ark., 1972).

1.2.1. ER’nin Genel Yapısı

ER, hücredeki en büyük organel olup, protein sentezi ve taşınması, protein katlanması, lipid ve steroid sentezi, karbonhidrat metabolizması ve kalsiyum depolamasının gerçekleştiği yerdir (Schwarz ve Blower, 2016). Yaklaşık olarak hücre hacminin %10’unu kaplamaktadır; ancak bu oran sekresyon yapan hücrelerde daha yüksektir (Anken ve Sitia, 2016). Periferik ER olarak da adlandırılan düz veya granüllü tübüller ve tabaka benzeri yapılar, nükleer zarfı da içeren sürekli bir zar sistemi oluşturur (Voeltz ve Prinz, 2007). Tübüller tüm sitozol boyunca uzanır ve ağ oluşturmak üzere dallanır. ER’nin morfolojisinin belirlenmesinde, ER membranında bulunan kama benzeri proteinler ve retikülonlar gibi proteinler rol oynarlar (Voeltz ve ark., 2006). Periferik ER tabakalarının boyutları değişiklik gösterebilir ancak luminal aralık çok tutarlıdır, genellikle memelilerde 50 nm’dir (Bernales ve ark.,

2006). Tübüller ve tabakalar çok farklı yapısal özelliklere sahiptir ve bu nedenle farklı hücresel süreçlerde rol oynarlar (West ve ark., 2011). ER alt alanlarının morfolojisi ve hücre içi konumu, bu yapıların işlevine ve bulundukları uzmanlaşmış hücrenin rolüne katkıda bulunur (Şekil 1.5.) (Schwarz ve Blower, 2016).



Şekil 1.5. Hücre içi ER ağı.

Granüllü (kaba yüzlü) endoplazmik retikulum (GER): Birbirleriyle ağzlaşan tübüller ve yer yer bu tübüllerin genişlemesinden oluşan sisternalar ile keseciklerden oluşur (Aşan ve Dağdeviren, 2012). GER'in dış yüzeyi, granüllü görünmesini sağlayan ribozomlarla kaplıdır. Dış nükleer membran, perinükleer sisternayı GER sisternasına bağlayacak şekilde GER membranı ile devam eder. GER membranı içinde riboforin adı verilen büyük ribozomal alt ünitenin bağlandığı reseptörler bulunur. Proteinden zengin salgı üreten hücrelerde bol miktarda bulunur. Sitozolik yüzeydeki yüksek yoğunluklu ribozomlarla tanımlanan granüllü tabakalar, salgılanan veya membrana bağlı proteinler için sentez, katlanma ve translasyon sonrası modifikasyonların ana alanıdır (West ve ark., 2011).

Agranüler (düz yüzlü) endoplazmik retikulum (AER): Yüzeyinde ribozomlardan yoksun olduğu için düz görünen, membranda riboforin bulunmayan ve genellikle tübüler ya da veziküller şeklinde dallanmış ve anastomozlaşmış yapılardır (Ross ve Pawlina, 2011). Lipid biyogenezi ve Ca^{2+} metabolizmasında rol oynar.

1.2.2. ER'nin Fonksiyonu

Protein sentezi ve katlanması: ER'nin en önemli fonksiyonlarından biri, hücredeki salgı proteinleri, sitozolik proteinler ve integral proteinlerin sentezlenmesidir (Schwarz ve Blower, 2016). Salgılanan proteinlerin translasyonu sitoplazmada başlatılır ve daha sonra bu mRNA'ları içeren ribozomlar, sinyal tanıma parçacığı (SRP) tarafından tanınan ve bağlanan olgunlaşmamış polipeptidin amino ucundaki bir sinyal dizisi ile ER membranına tutunur. mRNA-ribozom-olgunlaşmamış polipeptid-SRP kompleksi, ER membranı üzerindeki SRP reseptörüne bağlanır (Gilmore ve ark., 1982). ER'de devam eden translasyon sırasında translokon adı verilen kanallar ile yeni polipeptid ER lümenine girer. Yeni sentezlenen ve ER lümenine giren proteinler, şaperonlar ve katlama enzimleri yardımıyla katlanır ve N-bağlı glikozilasyon, disülfid bağ oluşumu, oligomerizasyon gibi çeşitli modifikasyonlar geçirirler. Katlanma aşamasında bazı proteinler doğal ve fonksiyonel şekillerini alamazlar ve yanlış katlanırlar ya da ER'de birikirler. Bu proteinler ER lümeninde kalabileceği gibi übikütinle etiketlenerek proteazom aracılı ERAD (ER-associated degradation: ER-ilişkili yıkım) yoluyla parçalanır (Liu ve Chang, 2008; Ruggiano ve ark., 2014).

Lipid biyogenezi: ER, Golgi aygıtı ile birlikte “endomembran sistemi” olarak adlandırılır ve membran lipidlerinin biyogenezinin gerçekleşmesinde görev alır. Membranın temel lipid içeriğini oluşturan proteinler ve fosfolipidler, ER'ye taşınır ve ERGIC (ER-Golgi intermediate compartment: ER-Golgi ara bölmesi) olarak adlandırılan ER'nin Golgi aygıtına yakın olan bölgesinde biyokimyasal modifikasyona uğrarlar (Fagone ve Jackowski, 2009). Protein ve lipidler, ERGIC'e en yakın olan cis-Golgi ve daha sonra trans-Golgi aracılığıyla doğrudan veya dolaylı olarak membrana taşınır (Schwarz ve Blower, 2016).

Kalsiyum (Ca^{2+}) metabolizması: Ca^{2+} , proteinlerin diğer proteinler, organeller ve nükleik asitlerle lokalizasyonu, fonksiyonu ve etkileşimi gibi çeşitli süreçleri etkileyebilecek bir sinyal molekülüdür. ER, protein sentezi ve katlanması ile lipid

biyogenezindeki rolünün yanında hücreiçi Ca^{2+} deposu olarak da görev alır. Normal koşullarda Ca^{2+} konsantrasyonu sitoplazmada ~ 100 nM, hücre dışı ortamda ~ 2 mM iken ER lümeninde bu oran ~ 100 - 800 μM arasında değişmektedir (Clapham, 2007). ER membranında bulunan Ca^{2+} salınımından sorumlu ryanodin reseptörleri (RyRs) ve inositol 1,4,5-trifosfat (IP3) reseptörleri (IP3R) gibi çeşitli kalsiyum kanalları, hücreiçi Ca^{2+} seviyesi düştüğünde ER'den sitoplazmaya Ca^{2+} geçişini sağlarlar.

1.2.3. ER Stresi ve Katlanmamış Protein Yanıtı (KPY)

Yeni sentezlenmiş proteinler ER lümeninde translasyon sonrasında N-bağlı glikozilasyon, disülfid bağlarının oluşumu ve oligomerizasyon gibi çeşitli modifikasyonlar geçirirler. Fizyolojik koşullar altında, ER'de ve sitozolde bulunan şaperonlar, yeni sentezlenmiş proteinlerin katlanmasını sağlar ve yanlış katlanmış proteinler ER'deki kalite kontrol mekanizmaları ile tespit edilerek proteazom, lizozom ve otofaji yolları ile parçalanırlar. Protein homeostazı veya proteostaz olarak bilinen bu süreç, anormal protein birikimini önleyerek, hücre sağlığı ve fonksiyonun sürdürülmesinde önemlidir (Hetz ve Mollereau, 2014; Hetz ve Saxena, 2017). Salgı proteinlerinin yüksek miktarda ekspresyonu, katlanma işlevinde görevli proteinlerdeki mutasyonlar, besin kıtlığı, ER Ca^{2+} seviyesindeki anormal değişimler ve viral enfeksiyonlar gibi çeşitli hücre stres durumlarında ER lümeninde katlanmamış ve/veya yanlış katlanmış proteinlerin biriktiği görülmektedir. Yanlış katlanan ve/veya katlanmamış proteinler biriken hücrelerde, hücre proteostazı sürdürmek zorlu ve karmaşık hale gelir. ER kalite kontrol (ERQC: endoplasmic reticulum quality control) mekanizmasını kullanarak lümende hatalı katlanmış ve/veya katlanmamış proteinlerin birikimini önlemeye çalışır. Hatalı katlanmış ve/veya katlanmamış protein seviyeleri ERQC için kapasite-talep dengesini bozarak ERQC'yi baskılar ve hatalı katlanan ve/veya katlanmamış proteinlerin birikimi sonucunda ER stresi oluşur ve katlanmamış protein yanıtı (KPY) olarak adlandırılan adaptif sinyal yollarını içeren hızlı ve koordine bir biyokimyasal süreci tetikler (Wang ve Kaufman, 2016).

KPY, protein birikmesini önlemek amacıyla ER enzimlerinin, şaperonların ve hücre içi taşıyıcıların ekspresyonlarını arttırarak katlama kontrollerini arttırır; ER lümenindeki katlanmamış protein miktarının artmasını engellemek üzere protein translasyonunu azaltır (Remondelli ve Renna, 2017); ERAD ile yanlış katlanmış proteinlerin yıkımını uyarır; büyük protein kümelerini ve zarar görmüş organelleri ortadan kaldırmak üzere makrotofajiyi uyarır (Hetz ve Mollereau, 2014). Bununla birlikte şiddetli ve uzamış ER stresi durumunda apoptotik hücre ölümünü aktifleştirir (Remondelli ve Renna, 2017).

Bir sinyal iletim yolağı olan KPY, iki ana bileşenden oluşur: ER membranında bulunan stres sensörleri ve stresin hafifletilmesi için gen ekspresyonlarını yeniden programlayan ya da pro-apoptotik yolağı indükleyen transkripsiyon faktörleri (Hetz ve Saxena, 2017). KPY hedef genleri, doku içeriğine ve ER stresine neden olan fizyolojik düzensizlik/huzursuzluğun tipine göre değişiklik gösterir. Bu değişiklik transkripsiyon faktörleri, translasyon sonrası gerçekleşen modifikasyonlar ve epigenetik değişiklikler arasında farklı heterodimerlerin oluşumundan kaynaklanabilmektedir (Hetz ve ark., 2015). Bununla birlikte KPY'nin başlatılmasında 3 temel tip-1 transmembran proteini rol oynar: IRE1 α (inositol-requiring protein 1 α), ATF6 (activating transcription factor-6) ve PERK (protein kinase RNA-like ER kinase) (Schroder ve Kaufman, 2005).

Normal koşullarda, IRE1 α , PERK ve ATF6, BIP/GRP78 (binding immunoglobulin protein/78-kDa glucose-regulated protein) şaperonu ile fiziksel etkileşim halindedirler ve inaktiftirler. BIP/GRP78, yeni sentezlenen proteinlere karboksil ucundaki substrat bağlanma bölgesi ile geçici olarak bağlanırken, katlanmamış proteinlere amino ucundaki ATPaz bölgesi ile hem daha kalıcı bir şekilde bağlanır hem de bu proteinlerde yapısal değişiklikler meydana getirerek katlanmalarını gerçekleştirir. Normal koşullarda BIP/GRP78, IRE1 α , PERK ve ATF6 transmembran proteinlerinin, ER lümenine bakan yüzlerine de bağlanır. ER stresine cevap olarak BIP/GRP78, ER lümeninde artan katlanmamış proteinlere bağlanır ve IRE1 α , PERK ve ATF6'yı serbestleştirerek stres düzenleyici yolları aktifleştirir (Zhu ve Lee, 2015).

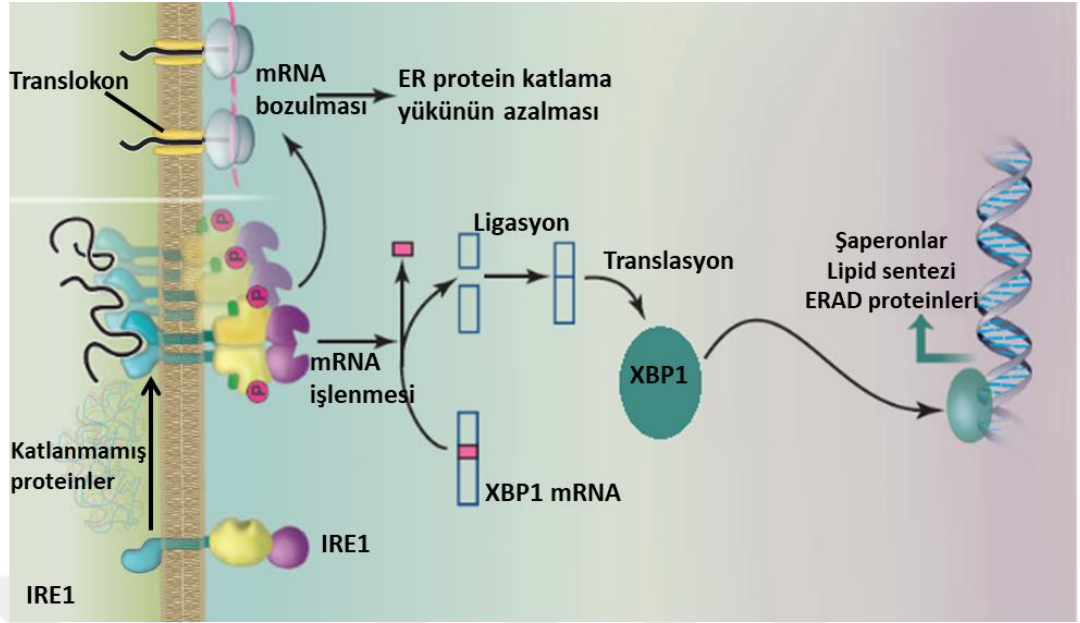
1.2.3.1. IRE1 α Yolağı

IRE1 α , sitozolik bölgesinde RNaz ve kinaz bölgelerini içeren ve evrimsel süreçte korunmuş bir ER stres düzenleyicisidir. Aktivasyonu ile dimerleşme ve otofosforilasyon gösterir ve sitoplazmada bulunan endoribonükleaz bölgesi ile XBP1 (X-box binding protein 1) transkripsiyon faktörünü kodlayan mRNA'dan yaklaşık 26 nükleotid uzunluğunda bir intron parçasını çıkarır. Bu kırılma sonucunda XBP1s olarak adlandırılan aktif ve kararlı bir transkripsiyon faktörü eksprese olur (Walter ve Ron, 2011). XBP1s'nin aktivitesi, protein katlama ve kontrol mekanizmalarını ve ERAD sistemini aktifleştiren çeşitli genlerin ekspresyonlarını indükleyerek proteostazi destekleyen sağkalımsal olaylarla bağlantılıdır. XBP1s ayrıca ER ve Golgi bileşenlerinin biyogenezini uyararak protein sekresyonunu artırır.

IRE1 α , RIDD (regulated IRE1 α -dependent decay: düzenlenmiş IRE1 α -bağımlı bozulma) olarak bilinen bozulma süreciyle ilgili mRNA ve miRNA'ları uyarır (Coelho ve Domingos, 2014). RIDD çeşitli fonksiyonlarla birçok proteinin ekspresyonunda değişime yol açtığından, hücrelerde stresin hafifletilmesi, inflamasyon ve apoptoz gibi farklı mekanizmaları etkilemektedir.

Ayrıca aktif IRE1 α , NF κ B (nuclear factor- κ B) içeren MAPK (mitogen-activated protein (MAP) kinase), otofaji ve inflamatuvar yolları gibi diğer stres yolları ile etkileşen adaptör proteinleri uyarabilir.

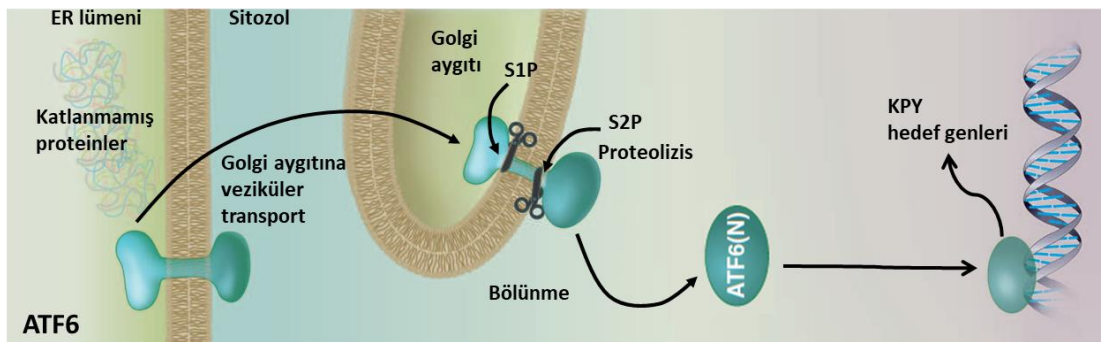
Sonuç olarak kronik ER stresine yanıtta IRE1 α , XBP1s yoluyla adaptasyona, MAPK yolağı ve RIDD ile apoptozun indüklenmesine aracılık eder (Şekil 1.6.) (Hetz ve Saxena, 2017).



Şekil 1.6. IRE1α yolağı.

1.2.3.2. ATF6 Yolağı

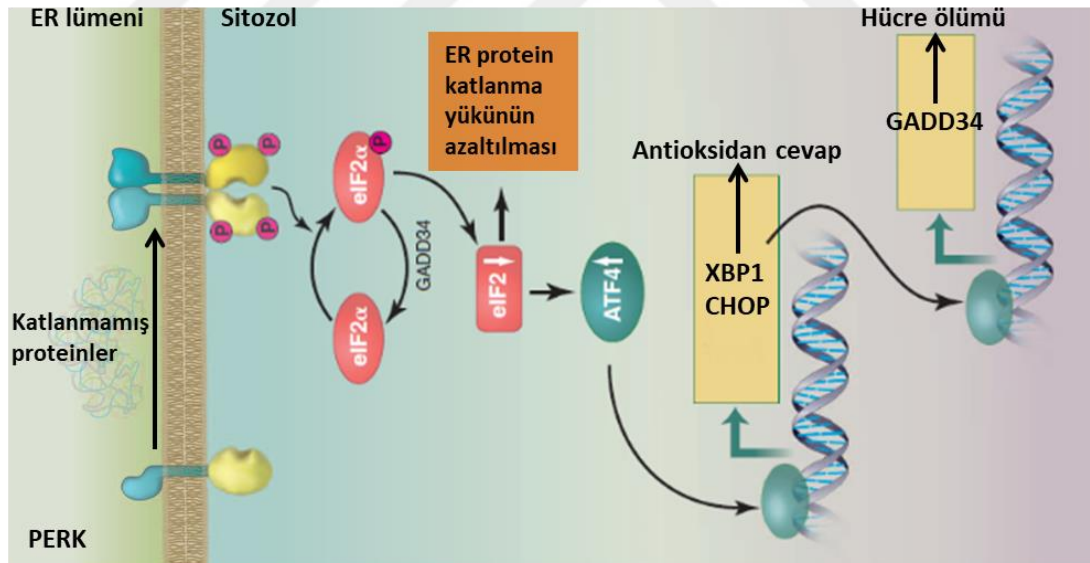
ATF6'nın α ve β olmak üzere 2 formu, ER'nin her yerinde eksprese edilir ve sitozolik bölgesinde bir tane bazik lösin fermuarlı (basic leucine zipper) transkripsiyon faktör bölgesi içerir. ER stresi, ATF6'nın Golgi aygıtına taşınmasına neden olur. ATF6, Golgi aygıtının lümene bakan yüzeyinde endopeptidaz S1P ve Golgi membranı içerisinde endopeptidaz S2P aracılığıyla transkripsiyon faktör bölgesini içeren ATF6f olarak adlandırılan bölge kesilir ve sitoplazmaya salınır. ATF6f nüklusa göç ederek ERAD ve protein katlanmasında rol oynayan genler ile XBP1s'nin ekspresyonlarını indükler (Şekil 1.7.) (Walter ve Ron, 2011).



Şekil 1.7. ATF6 yolağı.

1.2.3.3.PERK Yolağı

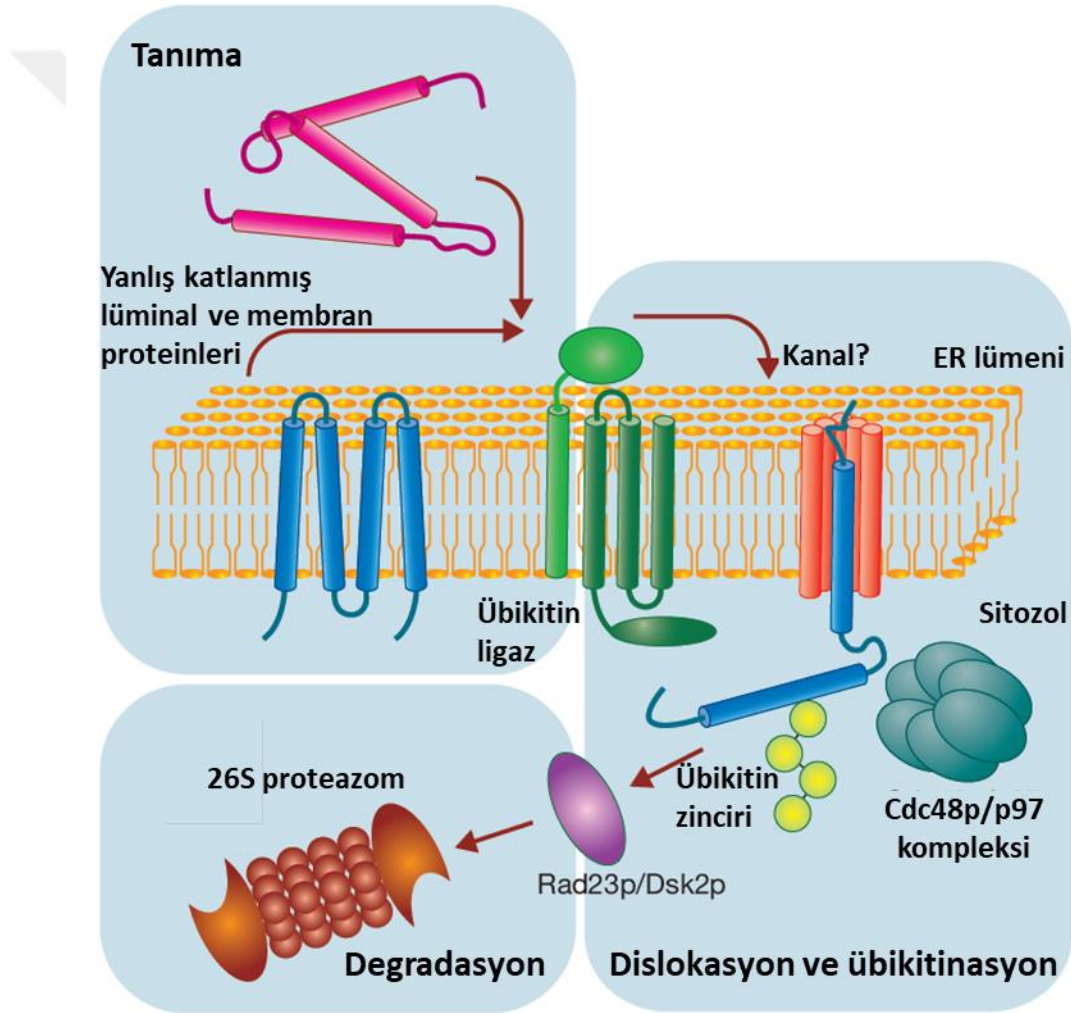
Diğer ER stres yollarından farklı olarak PERK yolağı, translasyon seviyesinde bir yanıt oluşturmaktadır. ER stresi ile aktive olan PERK'in kinaz bölgesi, eIF2'nin (eukaryotic Initiation Factor 2: euökaryotik translasyon başlatıcı faktör 2) α -alt birimini fosforlayarak inaktifleştirir. eIF2 α 'nın inaktivasyonu, protein sentezini inhibe ederek ER lümeninde proteinlerin aşırı birikmesini engeller. eIF2 α 'nın fosforilasyonu redoks kontrolü, amino asit metabolizması, otofaji, protein katlanması ve protein senteziyle ilişkili proteinleri kodlayan genlerin düzenlenmesinde önemli olan ATF4 (Activating transcription factor 4) transkripsiyon faktörünün seçici translasyonuna yol açar. ATF4 ayrıca, transkripsiyon faktörü DDIT-3 (GADD153/CHOP), reaktif oksijen türleri ve apoptoz düzenleyicisi BCL-2 aile üyelerini indükleyerek hücre ölüm yollarını etkiler (Şekil 1.8.) (Hetz ve Saxena, 2017).



Şekil 1.8. PERK yolağı.

1.2.4. ERAD Yolağı

ER’de katlama sistemindeki bozulmalar veya gende meydana gelen değişiklikler nedeniyle hatalı katlanan ve/veya katlanmamış proteinler ERAD yolağı ile ortadan kaldırılır (Meusser ve ark., 2005). ERAD yolağında hatalı katlanmış ve/veya katlanmamış proteinler şaperonlar tarafından tanınır, retrotranslokonlara hedeflenir, ER’den sitoplazmaya taşınır ve übikütin/proteazom sistemi (UPS) ile yıkılır (Şekil 1.9.) (Kadowaki ve Nishitoh, 2013).



Şekil 1.9. ERAD yolağı.

Substrat seçimi ve hedeflenmesi: Çözünür integral membran proteinleri, translasyon sonrası modifikasyonu gerçekleşmeyen polipeptidler ve hatalı katlanmış

ve/veya katlanmamış proteinlerin potansiyel ERAD substratları olmalarıyla birlikte, hücrenin toksik agregat birikimini riske alamaması nedeniyle bütün şüpheli proteinler ERAD substratları haline gelmektedir. ER'ye giren salgı proteinleri kümelenmeyi en aza indirgeyen, doğal yapının oluşumunu kolaylaştıran ve oligomerik düzeni gerçekleştiren bir şaperon sistemi ağıyla karşılaşırlar. Bu şaperon sistemi Hsp40 (J-proteinleri), Hsp70 (Grp78/BiP/Kar2) ve Hsp90 (Grp94) şaperonları ile non-kovalent etkileşimleri, kalneksin (CNX) ve kalretikülin (CRT) gibi lektin-benzeri şaperonları ve protein disülfid izomerazları (PDI) içermektedir (Brodsky ve Skach, 2011).

ER'ye giren proteinler genellikle bir N-bağlı glikanın ($\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9\text{Glc}_3$) eklenmesiyle modifiye edilir (Vembar ve Brodsky, 2008). Proteinin olgunlaşmamış zincirine $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9\text{Glc}_3$ 'nin eklendikten sonra glukozidazlar tarafından 2 adet glukoz uzaklaştırılır ve ER'de glikoproteinlerin katlanmasından sorumlu olan CNX ve CRT ile bağlanabilen monoglukozlu glikoprotein oluşur. Son glukozun Glukozidaz II tarafından kırılmasıyla CNX-CRT döngüsü sonuçlanır ve bunun sonucunda doğal yapısını kazanan glikoproteinler ER'den çıkabilir. Doğal yapılarına ulaşamayan glikoproteinlere UGTT (UDP-glucose: glycoprotein glucosyl transferase) kompleksi tarafından tek bir glukoz eklenerek tekrardan CNX-CRT döngüsüne girmeleri sağlanır. Bu döngü sonrasında da doğal yapısına ulaşamayan proteinlerin mannoz kalıntıları, ER $\alpha 1,2$ mannosidase 1 (ERMan1) tarafından uzaklaştırılır ve bu proteinler EDEM (ER degradation-enhancing α -mannosidase-like protein) tarafından tanınarak ERAD ile yıkılmak üzere retro-translokasyon ile sitoplazmaya gönderilirler (Ellgaard ve Helenius, 2003).

Retrotranslokasyon: UPS, ER'nin sitozolik bölgesinde gerçekleştiği için hatalı katlanmış proteinlerin ER membranından retrotransloke olması gerekmektedir. Çözünebilir ERAD substratlarının retrotranslokasyonu kanal-benzeri yapılarla gerçekleşmektedir ve bunun için Sec61 translokon kompleksi ile Derlin membran protein ailesinin bazı üyelerinin (Derlin -1, -2 ve -3) kullanıldığı düşünülmektedir (Brodsky, 2012; Thibault ve Ng, 2012). Sitozolik bölgeler içeren transmembran proteinleri, uygun kanal yapısı olmaması durumunda, doğrudan “çekme”

mekanizması ile retrotranslokasyon gösterirler. Retrotranslokasyonun en önemli basamaklarından birisi poli-übikütinasyondur. Çözünebilir substratlar ve transmembran proteinleri poli-übikütinasyon geçirmedi ER lümeninden sitozole geçemezler (Thibault ve Ng, 2012). ER'nin sitoplazmik bölgesinde, retrotranslokasyon kompleksine bağlı Cdc48-Ufd1-Npl4 ayırma makinesi, poli-übikütinlenmiş proteinleri parçalanma için proteazoma gönderir (Stolz ve Wolf, 2010).

Proteazomal degradasyon: Proteinlerin übikütinasyon ve proteazom-bağımlı yıkımı için, ATP hidrolizi ve übikütin adenilasyonundan sorumlu E1 (übikütin-aktive edici enzim), adenile übikütinin transfer olduğu E2 (übikütin-konjuge enzimler) ve yıkıma gidecek proteinleri seçerek adenile übikütinin hedef proteine transferini indükleyen E3'e (übikütin ligazlar) gereksinim vardır. ERAD sisteminde rol alan temel ligazlar yıkılacak proteini 26S proteazoma hedef göstererek burada yıkımını gerçekleştirir (Vembar ve Brodsky, 2008).

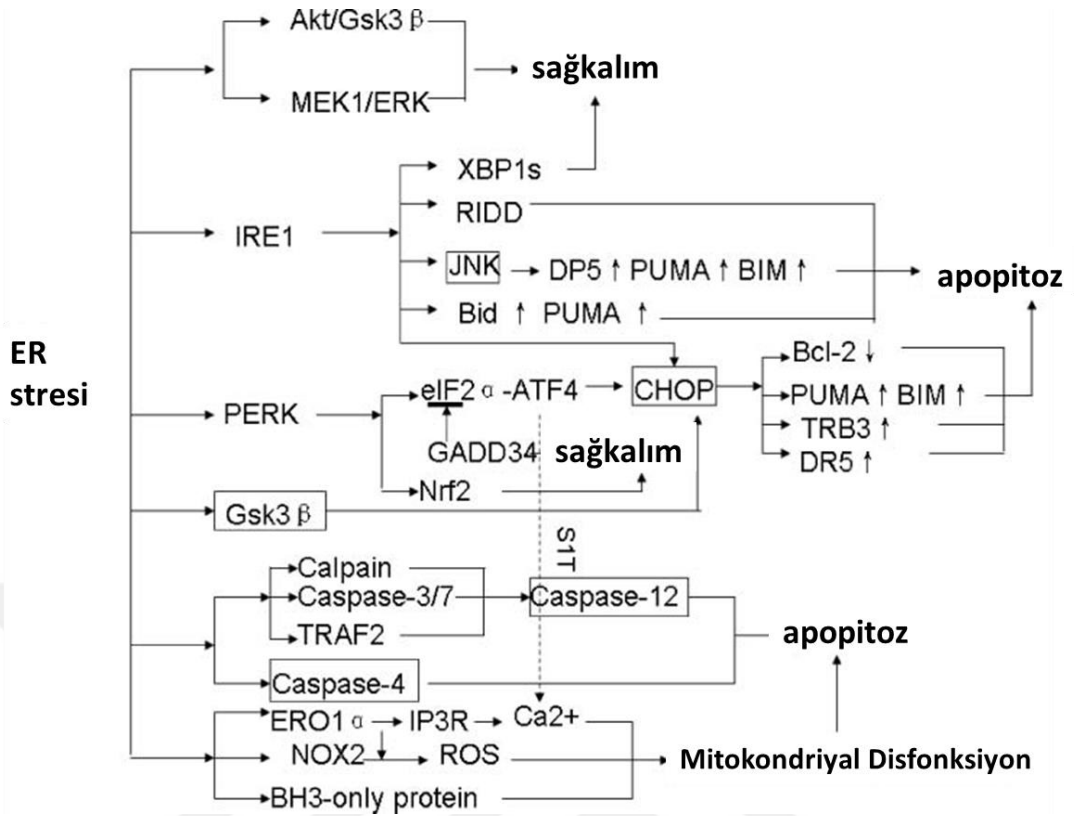
1.2.5. ER Stresi İle İlişkili Apoptoz

ER lümeninde hatalı katlanmış ve/veya katlanmamış proteinlerin birikmesi hücre için toksiktir. KPY, her zaman ER stresinin hafifletilmesi ve ER'de fonksiyonel bir dengenin oluşturulmasıyla sonuçlanmaz. PERK, IRE1 ve ATF6 yollarının ER stresini önleyememesi durumunda organizmanın sağkalımının sağlanabilmesi için apoptotik yollar devreye girer (Yoshida, 2007). Diğer ER stres yanıtlarına benzer olarak hücre ölümüyle ilişkili sinyal yolları da sıkı bir şekilde düzenlenmektedir. PERK yoluyla birlikte CHOP (CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein) indüklenirken caspase-12 ve JNK (c-Jun N-terminal kinase) sinyalleri aktive edilir ve IRE1α yolu ile de pro-apoptotik Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) proteinlerinden BAX (Bcl-2-associated X protein) ve BAK (Bcl-2 homologous antagonist/killer) devreye girer. Buna ek olarak, ER stresi ile indüklenmiş IRE1α'nın fosforilasyonu ile TRAF2 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 2) ve ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1), ER

membranının sitozolik bölgesine göç eder. PERK ve IRE1 yollarının aktivasyonları, ER stresi sırasında IKK (I κ B kinase) aktivasyonu veya p65 altbiriminin yıkımıyla, NF- κ B-IKK sinyal yolağının düzenlenmesine yol açar. NF- κ B aktivitesi aynı zamanda KPY'nın ATF6 yolağıyla da düzenlenebilir. Tüm bu sinyaller, ER stresinin aşırı ve uzamış olduğu zamanlarda, apoptotik yanıtların tetiklenmesine katkıda bulunur (Hotamisligil, 2010). Kronik veya çözülmemiş ER stres durumunda JNK, GSK3/3 β (Glycogen synthase kinase 3/3 β), CHOP ve caspase-12 yollarının aktivasyonu ile nöronal apoptoz indüklenmektedir (Şekil 1.10.) (Liu ve ark., 2013).

GSK3/3 β ile apoptozun tetiklenmesi: GSK3, çeşitli hücrel süreçlerde apoptozun aktivasyonunda önemli bir düzenleyici olarak rol oynar. GSK3 α ve GSK3 β olmak üzere aynı gen tarafından kodlanan 2 izoformu bulunur. ER stresi sırasında KPY'nin hedef proteinlerinden biridir ve ER stresi ilişkili CHOP ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili nöronal apoptozda rol oynadığı kanıtlanmıştır (Liu ve ark., 2013).

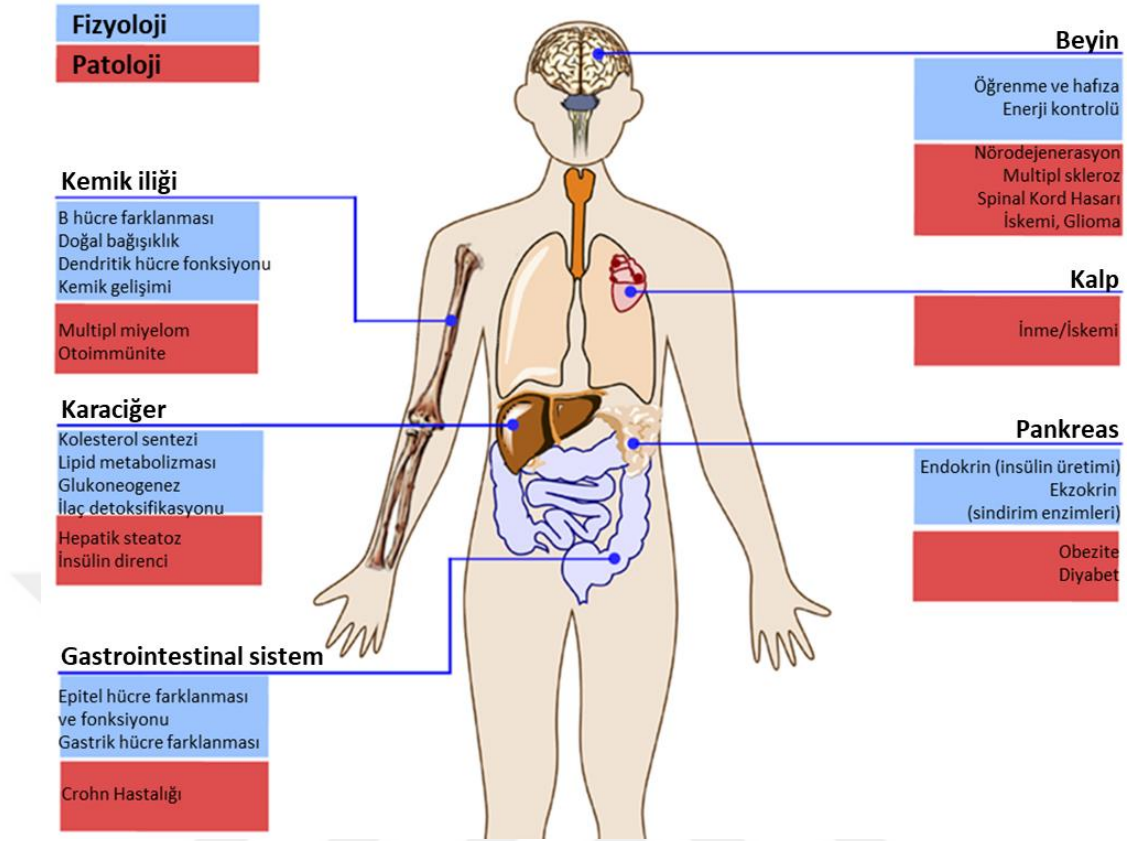
Caspase-12 sinyal yolağı ve apoptoz: Caspase-12, kaspaz aktivasyon kaskadında hücre ölümünün birincil uygulayıcısı olan procaspase-3'ün parçalanması için procaspase-9'u aktive eden ER-ilişkili bir moleküldür. Spesifik olarak ER'nin sitoplazmik bölgesinde yerleşim gösterir. ER stresiyle indüklenmiş apoptozda spesifik düzenleyici olarak rol oynamaktadır (Nakagawa ve ark., 2000; Liu ve ark., 2013).



Şekil 1.10. ER stresi ve apoptoz.

1.2.6. ER Stresi İle İlişkili Hastalıklar

ER, çeşitli süreçlerin fizyolojik regülasyonunda önemli rol oynamaktadır. Hatalı katlanmış ve/veya katlanmamış proteinler, ER lümeninde ve sitozolde agregatlar oluştururlar. Agrezom ve inklüzyon cisimcikleri gibi büyük agregatlar sitoprotektif etki gösterirken, küçük agregatlar UPS'yi bozup CREB-bağlanma proteini ve TATA-bağlanma proteini gibi transkripsiyon faktörlerini ayırarak yüksek toksisite gösterirler. HSP70 ve TRIC (TCP1-ring complex) gibi moleküler şaperonlar, bu protein agregatlarının oluşumunu ve toksisitesini baskılayabilirler. ER homeostazını engelleyen/bozan patolojik koşullar, nörodejeneratif bozukluklar, tip 2 diyabet ve kanser gibi birçok hastalığın patogenezinde rol oynayan KPY'nın kronik aktivasyonuna neden olmaktadır (Şekil 1.11.) (Yoshida, 2007; Ozcan ve Tabas, 2012).



Şekil 1.11. Er stresi ve ilişkili hastalıklar.

1.2.6.1.ER Stresi, Metabolik Sendrom ve Tip 2 Diyabet

ER stresine katkıda bulunan uyaranlar, insülin direnci gibi MetS bileşenlerinin gelişimini dolaylı olarak teşvik edebilirler (Cornier ve ark., 2008). Hücrelerin besin dalgalanma/değişimiyle başa çıkma kapasitesinde ER stresi önemli bir rol oynamaktadır. Yüksek yağlı diyet, KPY ve patolojik ER stres sinyalizasyonunun iyi bir uyarıcısıdır. Yüksek yağlı diyet sonucunda farelerin karaciğer ve yağ dokularında PERK ve IRE1α fosforilasyonunun arttığı ve JNK'nın aktifleştiği görülmüştür. Yüksek yağlı diyetin neden olduğu ER stresi, tip 2 diyabetle ilişkili olarak insülin direnci mekanizmasında da rol oynamaktadır. XBP1'in genetik ablasyonu sonucunda ER stresi, insülin direnci, insülin reseptör substrat 1'in (IRS) yıkılmasına karşı duyarlılığın arttığı görülmüştür. Ayrıca ER stresinin sonucu olarak stres kinaz aktivasyonu, IRS1'in fosforilasyonuna neden olur ve insülin reseptör sinyalinin ayrılmasıyla insülin direncine sebep olur.

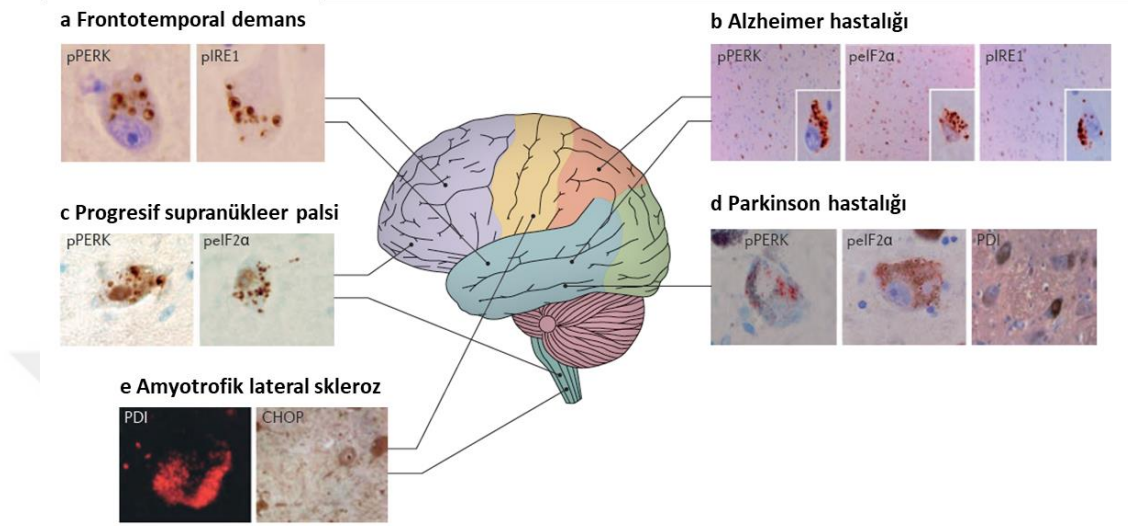
ER stresi glukoneojenik enzimlerin STAT3-bağımlı baskılanmasını önleyerek obezite ve diyabette hepatik glukoz üretiminin artmasında da rol oynar. Yapılan çalışmalarda ATF6 yolağıyla ilişkili olarak ATF4'ün, karaciğer, yağ ve kas dokularında insülin duyarlılığını arttırarak glukoz metabolizmasını değıştirdiğı görölmüştür.

Ayrıca T2DM'da yapılan son çalışmalarda pankreatik β -hücrelerinin ölümünde doğrudan KPY'nın rol oynadığı görölmektedir. PERK yolağıyla ilişkili olarak eIF2 α fosforilasyonlarındaki bozulma, düzensiz pro-insülin translasyonu, artmış oksidatif hasar, β -hücre-spesifik genlerin ekspresyonlarında azalma ve apoptoz nedeniyle diyabet oluşturmaktadır (Sano ve Reed, 2013).

1.2.6.2.ER Stresi ve Nörodejeneratif Hastalıklar

Nörodejeneratif hastalıklar, beynin spesifik bölgelerinde nöronların ilerleyen fonksiyon kaybı ve ölümüyle karakterize konformasyonel hastalıklardır. Konformasyonel hastalıklar, spesifik bir proteinin stabil şekline gelememesi sonucunda yanlış katlanıp ilişkili kalite kontrol mekanizmalarıyla yıkılması veya oligomerleşip birikinti oluşturmaları nedeniyle hücrenin proteom bütünlüğünün bozulmasıyla karakterize hastalıklardır. Hücrenin doğru katlanmış proteinden yoksun olması ya da proteinlerin yanlış katlanıp kümelenmesiyle hücrede fonksiyon kaybı ve/veya bozulma ile çeşitli hastalıklara yol açmaktadır. İlerleyen yaşla birlikte proteomdaki dengesizlik ve kalite kontrol mekanizmalarındaki değışikliklerin neden olduğı proteostazda meydana gelen bozulmalar, nörodejeneratif hastalıkların özellikle ilerleyen yaşlarda ortaya çıkmasına neden olur (Ogen-Shtern ve ark., 2016). Alzheimer hastalığı (AD), Parkinson hastalığı (PD), Huntington hastalığı (HD) ve prionla ilişkili hastalıklar (PrDs) da dahil olmak üzere tüm önemli nörodejeneratif hastalıklar nöronlarda protein agregasyonu ile fonksiyon bozukluğu ve kaybı açısından benzerlik gösterirler (Şekil 1.12.). AD'de amiloid beta, PD'de alfa sinüklein, HD'de huntingtin ve PrDs'de prion proteini birikimi görölür. Farklı protein kümelenmeleri görölen tüm bu nörodejeneratif hastalıklarda, dendritik diken

kaybına yol açan sinaptik fonksiyon bozukluğu, sinaptik ağın kaybolmasına neden olan sinaptik densite bozukluğu ve hücre ölümü benzerlik gösteren anomalilerdir (Shah ve ark., 2015).



Şekil 1.12. Er stresi ve nörodejeneratif hastalıklar.

1.2.6.3.ER Stresi ve Kardiyovasküler Hastalıklar

ER stresi, kardiyomiyosit homeostazı ve aterosklerozda önemli rol oynamaktadır. Transvers aortik daralmaya bağlı olarak basıncın artışı, ER şaperonlarının ve ER stres-indüklü apoptozun uyarılmasına neden olarak kardiyak hipertrofiye yol açar. Sekresyon yolağının erken aşamasında ER şaperonları için önemli bir reseptör olan KDEL’de meydana gelen mutasyon, bozulmuş ER kalite kontrol makinesi ve artmış ER stresi nedeniyle dilate kardiyopatiye yol açar. ER şaperonlarının artışı, kardiyomiyositleri ER stres-indüklü apoptoza karşı korumaktadır (Yoshida, 2007).

Ateroskleroz risk faktörlerinden biri olan homosistein, sülfür amino asitlerinin metabolizması sırasında üretilen bir ara üründür ve ER stresini indükleyerek BIP/GRP78, GRP40 (40-kDa glucose-regulated protein), CHOP, Herp (Homocysteine-responsive endoplasmic reticulum-resident ubiquitin-like domain) ve TDAG51 (T-cell death-associated gene 51) moleküllerinin ekspresyonlarında artışa

neden olmaktadır. Homosistein ile indüklenen ER stresi SREBP (Sterol regulatory element-binding proteins) transkripsiyon faktörünü aktive ederek kolesterol sentezini artırır. CHOP ve TDAG51'in indüksiyonu ve kolesterolün birikimi, makrofajların apoptozunu uyarak damarlarda makrofaj debrislerinin birikmesine yol açar ve hiperhomosisteinemi de aterosklerozun gelişimine neden olur (Yoshida, 2007).

1.2.6.4.ER Stresi ve Kanser

Kanser hücreleri yüksek oranda büyüme ve proliferasyon göstermeleri nedeniyle ER'de protein katlanma oranında artışa ihtiyaç duyarlar. Malignitenin artışı takiben tümör kitlesinin yetersiz vaskülarizasyonu, besin açlığı, hipoksi ve redoks ortamında değişikliklere yol açarak KPY yolaklarının aktifleşmesine neden olur. Kanser hücrelerinin sağkalım yolağında KPY önemli bir rol oynamaktadır. Birçok kanser türünde KPY belirteçleri ve ER şaperonlarının ekspresyonları artmaktadır. Meme, kolon ve adenokarsinoma kanser hücre hatlarında ve hepatokarsinomalarda GRP78 ekspresyonunda artış görülmektedir ve bu artışın kanser hücrelerine sağkalım sinyalleri ve ilaç direnci sağladığı düşünülmektedir. Ayrıca artmış GRP78 düzeyi meme, karaciğer, prostat, kolon ve gastrik kanserli hastalarda yüksek patolojik grade, rekürens ve düşük sağkalım oranları ile korelasyon göstermektedir (Ozcan ve Tabas, 2012).

1.3. Metabolik Sendrom

Metabolik sendrom (MetS) terimi ilk olarak 1975'te Almanya'da yapılan bir bilimsel toplantıda Haller ve Hanefold tarafından obezitenin neden olduğu, hiperglisemi, dislipidemi ve bozulmuş glukoz metabolizması ile bunları takiben kardiyovasküler hastalıklar, hiperürisemi ve hepatik steatoz riskinin kombinasyonu olarak tanımlanmıştır (Meisinger ve ark., 2006; O'Neill ve O'Driscoll, 2015). 1988 yılında Reaven tarafından merkezi patofizyolojik özelliği insülin direnci olan glukoz intoleransı, hiperinsülinemi, hipertansiyon, artmış VLDL (very-low density lipoprotein) ve azalmış HDL (high density lipoprotein) gibi birçok kardiyovasküler risk faktörünü “sendrom X” olarak tanımlamış ve MetS konseptinin gelişimine büyük bir katkıda bulunmuştur (Reaven, 1988). 2001 yılında yapılan “Ulusal Kolesterol Eğitim Programı, Yetişkin Tedavisi Panel III (NCEP:ATPIII: The National Cholesterol Education Program, Adult Treatment Panel III)” raporunda bahsi geçen kardiyovasküler risk faktörleri ve metabolik bozukluklar “metabolik sendrom” olarak adlandırılmıştır (Meisinger ve ark., 2006). Hastalığın tanımlanmasından sonraki süreçte hastalığın klinik teşhisi için WHO (World Health Organisation: Dünya Sağlık Örgütü), NCEP:ATPIII, IDF (International Diabetes Federation: Uluslararası Diyabet Federasyonu) gibi farklı organizasyonlarda tanı kriterleri tanımlanmıştır (O'Neill ve O'Driscoll, 2015). Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği Metabolik Sendrom Çalışma Grubu, MetS tanı kriterleri arasında insülin direncinin yer alması gerektiğini savunmaktadır. Bu nedenle, insülin direncini içeren 1999 WHO ve insülin direncini içermeyen fakat daha sıkı metabolik eşik değerler hedefleyen 2001 NCEP:ATPIII tanı kriterlerinden oluşan yeni bir MetS tanı kılavuzunu önermektedir (Çizelge 1.1.) (Arslan ve ark., 2009).

Çizelge 1.1. Metabolik sendrom tanı kriterleri.

WHO - 1999	Aşağıdakilerden en az biri: • İnsülin direnci • Bozulmuş glukoz toleransı • Diyabet	Aşağıdakilerden en az ikisi: • Hipertansiyon (kan basıncı > 140/90 mmHg) • Dislipidemi (trigliserid düzeyi >150 mg/dl veya HDL değeri erkekte <35 mg/dl, kadında < 39 mg/dl) • Abdominal obezite (beden kitle indeksi (BDİ)>30 kg/m² veya bel/kalça oranı erkekte > 0,9 kadında > 0,85) • Mikroalbuminüri (idrar albümin atılımı > 20 mcg/dk veya albümin kreatinin oranı > 30 mg/g)
NCEP:ATPIII - 2001	Aşağıdakilerden en az üçü: • Abdominal obezite (bel çevresi: erkeklerde >102 cm, kadınlarda >88 cm) • Hipertrigliseridemi (trigliserid düzeyi ≥ 150 mg/dl) • Düşük HDL (erkeklerde < 40 mg/dl, kadınlarda < 50 mg/dl) • Hipertansiyon (kan basıncı ≥ 130/85 mmHg) • Hiperglisemi (açlık kan glukozu ≥ 110 mg/dl)	
IDF - 2005	Abdominal obezite ve aşağıdakilerden en az ikisi: • Dislipidemi (trigliserid düzeyi ≥ 150 mg/dl veya HDL düzeyi erkekte < 40 mg/dl, kadında < 50 mg/dl) • Hipertansiyon (kan basıncı ≥ 130/85 mmHg) • Hiperglisemi (açlık kan glukozu ≥ 100 mg/dl veya T2DM)	
Türk Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği -2009	Aşağıdakilerden en az biri: • Diyabet • Bozulmuş glukoz toleransı • İnsülin direnci	Aşağıdakilerden en az ikisi: • Hipertansiyon (kan basıncı > 130/85 mmHg) • Dislipidemi (trigliserid düzeyi > 150 mg/dl veya HDL düzeyi erkekte < 40 mg/dl, kadında < 50 mg/dl) • Abdominal obezite (BDİ > 30 kg/m² veya bel çevresi erkekte > 94 cm, kadında > 80 cm)

MetS, insülin direnci temelinde ortaya çıkan ve klinik tablosunda glukoz intoleransı veya diabetes mellitus (DM), abdominal obezite, hipertansiyon, hiperlipidemi ile karakterize; proinflamatuvar ve protrombotik öğeleri bulunduran ve prematüre aterosklerozun yer aldığı artmış kardiyovasküler hastalık riski oluşturan bir patolojidir (Üçler, 2014). Hareketsiz yaşam tarzı ve beslenme alışkanlıklarının değişmesiyle birlikte tüm dünyada MetS'ten etkilenen insan sayısı hızlı bir şekilde artış göstermektedir. MetS prevalansı yaş ile birlikte artmaktadır. 20-29 yaş grubunda %6,7, 60-69 yaş grubunda ise %43,5 olarak görülmektedir (Arslan ve ark., 2009). Türkiye'de 2013 yılında yapılan TEKHARF (Türk Erişkinlerde Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri) çalışmasına göre 40 yaş ve üzerinde MetS prevalansı % 53'tür (Onat ve ark., 2013).

MetS oluşumunda hem insülin direnci hem de abdominal obezite önemli faktörler olarak düşünülmektedir. Etnik gruplara göre değişmekle birlikte genetik, fiziksel hareketsizlik, yaşlanma, proinflamasyon ve hormonal değişiklikler de MetS oluşumuna yol açabilmektedir. Yaşam şeklini değiştirerek insülin direncine neden olan faktörlerin kontrol altına alınması ve kilo kaybının sağlanması, MetS için en uygun tedavi yöntemidir (Arslan ve ark., 2009).

Visseral yağlanmaya bağlı abdominal obezite, insülin direnci, dislipidemi ve hipertansiyonun yanı sıra moleküler düzeyde adipokinler (sitokinler, kimokinler) ve leptin ekspresyonundaki düzensizlikler de MetS'e eşlik etmektedir. Adipokin ve leptinde meydana gelen düzensizlikler, hipotalamusta immün yanıtı ve inflamasyonu değiştirerek MetS'in başlamasına ve gelişimine neden olur. MetS'te görülen endotel hücre fonksiyonunun bozulması, esansiyel yağ asidi metabolizmasında anormallikler ve anormal insülin ve leptin sinyaliyle birlikte lipid medyatörlerde meydana gelen değişiklikler, MetS ve felç, depresyon, AD gibi nörolojik bozukluklar arasında bir köprü olduğunu düşündürmektedir (Farooqui ve ark., 2012).

MetS'de beyinde meydana gelen değişikliklerin nedenlerinden biri, hipokampusta bulunan bir glukokortikoid reseptörünün azalmasıyla ilişkili olarak,

hipotalamus-hipofiz-adrenal (HPA) aksında meydana gelen bozulmalardır. Glukokortikoidler, hipokampuste insülin direncine neden olur ve HPA aksında meydana gelen bozulmalar sonucu oluşan yaşlanma, duygudurum bozuklukları ve özellikle Tip 2 diyabet olmak üzere metabolik hastalıklar gibi çeşitli patofizyolojik durumlarla sonuçlanır.

MetS'li kişilerde inmeyle birlikte morbidite ve mortalite riski oldukça yüksektir. Kortikal nöronlarda insülin direncinin gelişmesiyle birlikte dolaşımdaki insülin ve insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1) aracılığıyla nöroproteksiyonun azaldığı gösterilmiştir. Bununla birlikte insülin sinyal yolağında bozulma ve insülin direncinin oluşmasında ER stresi de oldukça büyük rol oynamaktadır. Ayrıca nöronlarda gelişen ER stresi, son yıllarda dünyada önemli bir sağlık sorunu haline gelen, nörodejeneratif hastalıklara yol açmaktadır. Bu doktora tezi çalışmasında, MetS modeli oluşturulmuş sıçanların kortikal nöronlarında ER stresinin varlığı ve insülinin ER stresi üzerine etkilerini göstermek üzere ER stresine ilişkili belirteçlerin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1.Kullanılan Hayvanlar ve Dokuların Eldesi

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 24.02.16 tarih ve 2016-5-52 karar numaralı onayı sonrasında T.C. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün 16L0230006 proje numarası ile desteklenmiştir.

Çalışmamızda, olası cinsiyet farkına bağlı hormonal etkileri tartışma dışı tutmak için sadece erkek, başlangıç ağırlıkları 180-200 g arasında değişen 2 aylık Wistar türü sıçanlar kullanılmıştır. Ankara Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edilen sıçanlar her kafeste 3 adet olacak şekilde, su ve yem kısıtlaması olmaksızın, standart deney hayvanları barınma koşullarında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı'nda bulunan deney hayvanları barınma ünitesinde tutulmuştur. Çalışmamızda deney hayvanları 3 gruba ayrılmıştır:

Kontrol (n=10), MetS (n=10) ve MetS+İnsülin (n=10). Çalışmada kullanılan deney hayvanlarından

- Kontrol grubu standart sıçan yemi ve çeşme suyu ile beslenirken,
- MetS (metabolik sendrom) ve MetS+İnsülin grupları, MetS deney modelinin oluşturulması için, standart sıçan yemine ek olarak %32 (935 mM) süktroz içeren çeşme suyu ile beslenmiştir (Vasanji ve ark., 2006).

Aguilera ve arkadaşlarının 2004 yılında yayınladıkları çalışmalarında yüksek karbonhidrat içerikli diyetler ile beslenme sonucunda vücut ağırlıkları ve açlık kan şekerlerindeki değişimlerin 12. haftadan sonra ortaya çıktıklarını göstermişlerdir. Bu nedenle çalışmamızda MetS ve MetS+İnsülin grupları 20 hafta boyunca süktroz ile beslenmiştir.

2.2. Sıçanlarda MetS Deney Modelinin Oluşumunun Doğrulanması

Dünya Sağlık Örgütü ve Uluslararası Diyabet Fedarasyonu'na göre bozulmuş glukoz toleransı ve insülin direnci, arteriyal kan basıncında artış, serum trigliserit ve insülin seviyesinde artış veya serum HDL düzeyindeki azalmalar insanlarda metabolik sendrom tanı kriterleri arasında gösterilmektedir. Bu kriterlerden en az üç tanesine sahip olmak metabolik sendrom tanısı için yeterli görülmektedir. Bu nedenle deney hayvanlarında metabolik sendrom oluşumunu tespit etmek amacıyla açlık kan şekeri ölçümleri, oral glukoz tolerans testi (OGTT), vücut ağırlıkları, serum insülin değerleri ve arteriyal kan basınçları ölçülmüştür.

2.2.1. Açlık Kan Şekeri Ölçümü

Bir gece öncesinden aç bırakılan deney hayvanlarının kuyruklarından alınan kan örnekleri Accu-check glukoz ölçüm cihazıyla ölçülmüştür.

2.2.2. Kan Basıncı Ölçümü

Deney hayvanlarında MetS deney modelinde hemodinamik parametrelerin etkilenme düzeyleri, “tail cuff” yöntemi ile kuyruktan kan basıncı ölçülerek (NIBP200-A noninvaziv tansiyon ölçüm aleti, BIOPAC) değerlendirilmiştir. Bunun için 32°C'lik kabin içine alınan sıçanların kuyrukları kabin dışına küçük bir aralıktan çıkarılmış ve kuyruklarına tail cuff sensörü takılmıştır. Yaklaşık 1 saat boyunca ortama alışmaları ve kan basınçlarının normale dönmesi için beklendikten sonra arteriyal kan basınçları ölçülmüştür.

2.2.3. OGTT ile Oral Glukoz Toleransının Ölçülmesi

Bir gece öncesinden aç bırakılan deney hayvanlarına gavaj yoluyla 1g/kg miktarında glukoz verilmiştir. Glukoz verilmeden önce (0. dakika (dk.)) ve glukoz yüklemesinden sonraki ilk 15., 30., 60. ve 120. dk.larda Accu-check glukoz ölçüm cihazıyla, hayvanların kuyruk uçları kesilerek toplanan kan örneklerinde glukoz ölçümü gerçekleştirilmiştir.

2.2.4. Kan İnsülin Seviyesinin Belirlenmesi

Serum insülin düzeyleri Elabscience marka E-EL-R2466 katalog numaralı Rat INS (Insulin) ELISA Kiti kullanılarak ölçülmüştür. Diseksiyon öncesinde deney hayvanlarından alınan kan örnekleri oda sıcaklığında 2 saat süresince pıhtılaşmaya bırakılmıştır. Bu süre sonunda 1000 g'de 15 dk santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatantlar inceleme gerçekleştirilene kadar saklanmak üzere -80°C'ye kaldırılmıştır.

Serum örneklerindeki insülinin belirlenmesi için gerekli standartların hazırlanması için ELISA kiti içerisinde bulunan Standard Working Solution, Reference Standard&Sample Diluent içerisinde çözülmüş ve ardından 6 defa 1:1 oranında dilüe edilmiştir. Her bir dilüsyon sonrasında azalan konsantrasyonlarda (200 ng/mL, 100 ng/mL, 50 ng/mL, 25 ng/mL, 12,5 ng/mL, 6,25 ng/mL, 3,13 ng/mL) standart çözeltileri elde edilmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki çözeltiler protein miktarının belirlenmesinde standart olarak kullanılırken, Reference Standard&Sample Diluent kör (sıfır) değeri olarak kabul edilmiştir. Protein standartları, Reference Standard&Sample Diluent ve serum örneklerinden 100 µl alınarak ELISA mkro-plaklarının kuyucuklarına eklenmiş ve 37°C'de 90 dk. inkübe edilmiştir. Süre sonunda kuyucuklardaki sıvı uzaklaştırılmış ve kuyucuklara 100 µl Biotinylated Detection Ab eklenerek 37°C'de 60 dk. inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında kuyucuklardaki sıvı uzaklaştırılmış ve tüm kuyucuklar

yıkama tamponu ile 3 defa yıkanmıştır. Yıkama sonrasında kuyucuklardaki sıvı iyice uzaklaştırılıp her kuyucuğa 100 µl HRP Conjugate eklenerek 37°C’de 30 dk. inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kuyucuklar yıkama tamponu ile 5 defa yıkanmıştır. Yıkama sonrasında kuyucuklara 90 µl Substrate Reagent eklenerek 37°C’de, karanlıkta 15 dk. inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda kuyucuklara 50 µl Stop Solution eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Kuyucuklarda oluşan renk değişimi sonrasında ELISA mikro-plağı 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Standartların absorbans değerlerine göre serumdaki insülin miktarları hesaplanmıştır.

Deney hayvanlarında insülin direncinin gelişimi, ELISA testi sonucu elde edilen insülin değeri ile açlık kan glukoz değerleri kullanılarak, HOMA-IR (homeostasis model assessment – insülin resistance) testi ile değerlendirilmiştir ($HOMA-IR = \text{Açlık kan glukozu (mM/L)} \times \text{Açlık insülin değeri (mU/I)} / 22,5$).

2.3. MetS+İnsülin Grubuna İnsülin Enjeksiyonu

Metabolik sendrom deney modelinin oluşumunun doğrulanması sonrasında MetS+İnsülin grubundaki sıçanlara 15 gün süreyle 3IU/gün dozunda subkutan olarak protamin insülin uygulanmıştır.

2.4. Işık Mikroskopik (IM) İncelemeler İçin Yapılan Çalışmalar

Tüm gruplara ait hayvanlar yüksek doz ksilazin/ketamin anestezisi altında sakrifiye edilerek beyinleri çıkarılmıştır. Çıkarılan beyinler medyan düzlem dikkate alınarak sağ ve sol hemisferlere bölünmüştür ve daha sonra her iki hemisferde de frontal loblar ayrılmıştır. İncelemelerin standart bir şekilde gerçekleşmesi için sol hemisfere ait frontal korteks örnekleri Western blotlama deneylerinde kullanılmak üzere -80°C’ye kaldırılmıştır. Sağ hemisferlerden elde edilen frontal lob örnekleri ise

rutin histolojik ve immünohistokimyasal incelemeler için %10'luk tamponlu formalin solüsyonuna alınarak 24-48 süreyle fikse edilmiştir. Fikse olan beyin dokularının takip işlemleri aşağıdaki protokole göre yapılmıştır.

2.4.1. %10'luk Tamponlu Formalin İçin Takip Protokolü

Dereceli alkoller ile gerçekleştirilen dehidratasyon işleminden sonra ksilen ile şeffaflaştırılan dokular 60°C'lik etüvde 1:1 ksilol:parafin ile 1 saat, sıvı parafin içerisinde 3 saat inkübe edilmiştir. Sıvı parafinden çıkarılan beyin dokuları sert parafin bloklara gömülmüştür. Elde edilen parafin bloklar kesit alınana kadar buzdolabının alt rafında (+4°C) bekletilmiştir. Kesit alma işlemine başlamadan önce -18°C'ye alınan bloklardan Leica RM 2125RT model sliding mikrotom ile 4 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Sıcak su banyosundan lam üzerine alınan kesitler deparafinizasyon amacıyla 1 saat 60°C'lik etüvde bekletilmiştir. Histolojik boyamaya hazır hale getirilen doku kesitlerinde genel doku morfolojisini görmek amacıyla Hematoksilin-Eozin ve Krezil Viyole boyaları uygulanmıştır.

2.4.2. Hematoksilin-Eozin (HE) Boyama Protokolü

- Ksilen ile deparafinizasyon
- %100, %96 ve %75 etanol serisi ile hidratasyon
- Suda yıkama
- Hematoksilin solüsyonu, 1 dk.
- Suda yıkama
- Eozin solüsyonu, 1 dk.
- Suda yıkama
- %75, %96 ve %100 etanol serisi ile dehidratasyon
- Ksilen ile şeffaflandırma
- Entellan ile kapama

2.4.3. Krezil Viyole Boyama Protokolü

- Ksilen ile deparafinizasyon
- %100, %96 ve %75 etanol serisi ile hidratasyon
- Suda yıkama
- %0,1 Krezil Viyole Solüsyonu, 30 dk., 60°C
- Distile suda yıkama
- %96 ve %100 etanol serisi ile dehidratasyon
- Ksilen ile şeffaflandırma
- Entellan ile kapama

2.4.4. İmmünohistokimya ve İmmünofluoresan İncelemeleri İçin Yapılan Çalışmalar

Rutin takip işlemlerinden sonra sert parafin bloklara gömülen frontal lob örneklerinden 4 µm kalınlığında alınan kesitler poli-L-lizin kaplanmış lamalar üzerine alınarak gece boyunca 60°C'lik etüvde deparafinize edilmiştir. PERK, ATF6α, GRP78, GSK3α/β, pro-caspase 12, p-IRE1α ve Caspase 3 antikoları için immünohistokimyasal işaretleme gerçekleştirilirken IRE1α ve EDEM antikoları için immünofluoresan işaretleme gerçekleştirilmiştir. Ayrıca frontal kortekste bulunan nöronlarda apoptozu incelemek amacıyla TUNEL boyama protokolü uygulanmıştır.

2.4.4.1.İmmünohistokimya İşaretleme Protokolü

4 µm'lik Poly-L-lizin kaplı lamlara alınan kesitler 60°C'lik etüvde gece boyunca deparafinize edilmiştir. Deparafinizasyondan sonra dereceli alkollerden (%100, %96 ve %75) geçirilerek suya alınmıştır. Sitrat buffer ile antiijenik maskelenmenin engellenmesi işlemi düdüklü tencere ile gerçekleştirildikten sonra kesitler PBS (phosphate buffered saline) ile 3x5 dk. yıkanmıştır. Kesitler, endojen

peroksidaz aktivitesinin engellenmesi için hidrojen peroksit blok solüsyonunda (TA-060-HP, UltraVision LP Detection System HRP Polymer & DAB Plus Chromogen, ThermoScientific) oda ısısında 10 dk. inkübe edilmiş ve PBS ile 3x5 dk. yıkanmıştır. Daha sonra kesitler, immünolojik olmayan reaksiyonları durdurmak için Ultra “V” Block solüsyonunda (TA-060-UB, UltraVision LP Detection System HRP Polymer & DAB Plus Chromogen, ThermoScientific) oda ısısında 5 dk. inkübe edilmiştir. Kesitler ER stresine ilişkili olarak anti-ATF6 α (sc-166659, SantaCruzBiotech), anti-GRP78 (sc-1050, SantaCruzBiotech), anti-GSK-3 α/β (sc-7291, SantaCruzBiotech), anti-PERK (sc-377400, SantaCruzBiotech), anti-phospho-IRE1 (ab-48187, ABCAM), anti-pro-caspase 12 (ab-8118, ABCAM) antikorları ile apoptoz ile ilişkili olarak da Cleaved Caspase-3 (#9661, CellSignaling) antikoruna ile +4°C’de gece boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda 3x5 dk. PBS ile yıkanan kesitlerden anti-GRP78 ile boyananlar Biotinli Rabbit Anti-Goat sekonder antikor ile (BA-5000, Vector Labs) 37°C’de 60 dk. inkübe edilirken diğer kesitler oda ısısında 10 dk. Primary Antibody Enhancer (TL-060-PB, UltraVision LP Detection System HRP Polymer & DAB Plus Chromogen, ThermoScientific) solüsyonunda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 3x5 dk. PBS ile yıkanan kesitlerden anti-GRP78 ile boyananlar Streptavidin-Peroxidase (TS-125-HR, Lab Vision Ready-To-Use Streptavidin Peroxidase, ThermoScientific) solüsyonunda oda ısısında 10 dk. inkübe edilirken, diğer kesitler HRP Polymer (TL-060-PH, UltraVision LP Detection System HRP Polymer & DAB Plus Chromogen, ThermoScientific) solüsyonunda oda ısısında 15 dk. inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası tüm kesitler 3x5 dk. PBS ile yıkanmış ve daha sonra 3,3’-diaminobenzidine (DAB) kromojen (UltraVision LP Detection System HRP Polymer & DAB Plus Chromogen, ThermoScientific) ile 3 dk. inkübe edilmiştir. Hematoksilin ile çekirdek boyaması gerçekleştirilerek ve gerçekleştirilmeyerek, kesitler dereceli alkollerden ve ksilolden geçirildikten sonra entellan ile kapatılmıştır. Boyanan preparatlar, Zeiss Axio Scope A1 marka ışık ve flüoresan mikroskopuyla incelenmiş ve fotoğraflanmıştır. Elde edilen görüntüler, ImageJ dijital görüntü analiz programının IHC Profiler eklentisi ile analiz edilmiştir (Varghese ve ark., 2014).

2.4.4.2. TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick and labeling) ile Apoptotik Hücreleri İşaretleme Protokolü

Deney gruplarında apoptotik hücreleri değerlendirmek için TUNEL (In Situ Cell Death Detection Kit, POD, 11684817910 ROCHE) yöntemi uygulanmıştır. 4 µm'lik Poly-L-lizin kaplı lamlara alınan kesitler 60°C'lik etüvde gece boyunca deparafinize edilmiş ve deparafinizasyondan sonra dereceli alkollerden (%100, %96 ve %75) geçirilerek suya alınmıştır. Sitrat buffer ile antijenik maskelenmenin engellenmesi işlemi düdüklü tencere ile gerçekleştirildikten sonra kesitler PBS (phosphate buffered saline) ile 3x5 dk. yıkanmıştır. Kesitler, endojen peroksidaz aktivitesinin engellenmesi için hidrojen peroksit blok solüsyonunda (TA-060-HP, UltraVision LP Detection System HRP Polymer & DAB Plus Chromogen, ThermoScientific) oda ısısında 10 dk. inkübe edilmiş ve PBS ile 3x5 dk. yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonrasında kesitler 900 µl boya solüsyonu ve 100 µl enzim solüsyonunun karıştırılmasıyla elde edilen TUNEL solüsyonunda 37°C'de 60 dk. inkübe edilmiş ve inkübasyon sonrası PBS ile 3x5 dk. yıkanmıştır. Daha sonra Converter-POD solüsyonunda 37°C'de 30 dk. inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrası tüm kesitler 3x5 dk. PBS ile yıkanmış ve daha sonra 3,3'-diaminobenzidine (DAB) kromojen (UltraVision LP Detection System HRP Polymer & DAB Plus Chromogen, ThermoScientific) ile 3 dk. inkübe edilmiştir. Hematoksilin ile çekirdek boyaması gerçekleştirilerek ve gerçekleştirilmeyerek, kesitler dereceli alkollerden ve ksilolden geçirildikten sonra entellan ile kapatılmıştır. Boyanan preparatlar, Zeiss Axio Scope A1 marka ışık ve flüoresan mikroskopuyla incelenmiş ve fotoğraflanmıştır. Elde edilen görüntüler, ImageJ dijital görüntü analiz programının IHC Profiler eklentisi ile analiz edilmiştir (Varghese ve ark., 2014).

2.4.4.3.İmmünofluoresan İşaretleme Protokolü

4 µm'lik Poly-L-lizin kaplı lamlara alınan kesitler 60°C'lik etüvde gece boyunca deparafinize edilmiştir. Deparafinizasyondan sonra dereceli alkollerden (%100, %96 ve %75) geçirilerek suya alınmıştır. Sitrat buffer ile antijenik

maskelenmenin engellenmesi işlemi düdüklü tencere ile gerçekleştirildikten sonra kesitler PBS (phosphate buffered saline) ile 3x5 dk. yıkanmıştır. Kesitler, endojen peroksidaz aktivitesinin engellenmesi için hidrojen peroksit blok solüsyonunda (TA-060-HP, UltraVision LP Detection System HRP Polymer & DAB Plus Chromogen, ThermoScientific) oda ısısında 10 dk. inkübe edilmiş ve PBS ile 3x5 dk. yıkanmıştır. Daha sonra kesitler, immünolojik olmayan reaksiyonları durdurmak için Ultra “V” Block solüsyonunda (TA-060-UB, UltraVision LP Detection System HRP Polymer & DAB Plus Chromogen, ThermoScientific) oda ısısında 5 dk. inkübe edilmiştir. Kesitler ER stresiyle ilişkili olarak anti-IRE1 α (sc-390960, SantaCruzBiotech) ve anti-EDEM (sc-377394, SantaCruzBiotech) antikorları ile +4°C’de gece boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda 3x5 dk. PBS ile yıkanan kesitler FITC-konjuge Goat Anti-Mouse sekonder antikoru (Fluorescein (FITC)-AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG, 115-095-166, Jackson ImmunoResearch) ile karanlıkta 37°C’de 60 dk. inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 3x5 dk. PBS ile yıkanan kesitler Hoechst (H6024, SigmaAldrich) içeren 1:1 PBS-gliserollü kapatma medyumuyla kapatılarak Zeiss Axio Scope A1 marka ışık ve flüoresan mikroskopuyla incelenmiş ve fotoğraflanmıştır. Elde edilen görüntüler, ImageJ dijital görüntü analiz programı ile analiz edilmiştir.

2.5. Western Blotlama İçin Yapılan Çalışmalar

Sıçanlardan elde edilen beyin dokuları sıvı nitrojen yardımıyla seramik havan içerisinde dövülerek mekanik olarak parçalanmıştır. Her örnekten eşit miktarda doku tartılarak homojenizasyon tampon çözeltisi (20 mM pH = 7,4’lük Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 100 mM proteaz inhibitörü, 1 mM Na₃VO₄, 20 mM NaF, 1 mM EGTA, 0,4 mM PMSF, 0,02 mM NP-40 tergitol, 0,02 mM ve 0,01 mM sodyum deoksikolat) içerisinde önce ultraturaks kullanılarak mekanik parçalama ve sonrasında ise +4°C’de 10000 rpm’de 10 dk. santrifüj yöntemiyle proteinlerin homojenizasyonu gerçekleştirilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında elde edilen süpernatantlar yeni hazırlanan ependorf tüplerine alınmış ve tüm çalışmalar bu kısımda gerçekleştirilmiştir.

Western blotlama protokolüne başlamadan önce elde edilen tüm süpernatantlarda Pierce Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay Kit (23225, ThermoScientific) ile toplam protein miktarları belirlenmiştir.

2.5.1. Toplam Protein Miktarının Belirlenmesi

1000 mg/ml BSA (Bovine Serum Albumin) çözeltisi Tissue Extraction Buffer içinde çözülmüş ve ardından 7 defa 1:1 oranında dilüe edilmiştir. Her bir dilüsyon sonrasında azalan konsantrasyonlarda (1000 mg/ml, 500 mg/ml, 250 mg/ml, 125 mg/ml, 62,5 mg/ml, 31,25 mg/ml, 15,625 mg/ml, 7,8125 mg/ml) BSA çözeltileri elde edilmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki BSA çözeltileri protein miktarının belirlenmesinde standart olarak kullanılırken, Tissue Extraction Buffer kör (sıfır) değeri olarak kabul edilmiştir. BSA standartları, protein örnekleri ve Tissue Extraction Buffer, 200 µl BCA solüsyonu içerisinde 100 kat dilüe edilmiş ve 96 kuyucuklu kültür kabına aktarılmıştır. 37°C’de 30 dk. inkübasyon sonrasında BCA solüsyonda spektrofotometrik olarak renk değişimleri 562 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Standartların absorbans değerlerine göre protein örneklerindeki toplam protein miktarları hesaplanmıştır.

2.5.2. Proteinlerin Jel Elektrophorez ile Ayırıştırılması

Jel dökme standına kalın ve ince camlar yerleştirilmiştir ve iki cam arasında oluşturulan 1 mm’lik boşluğa ayırıştırma jeli dökülmüştür.

Ayırıştırma jeli:

- pH 8,8 Tris HCl çözeltisi 2,532 ml
- 37,5:1 Acrylamide:Bis Solüsyonu 2,5 ml
- dH₂O 4,763 ml
- SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) 100 µl

- TEMED (Tetramethylethylenediamine) 5 µl
- APS (Ammonium Per Sulphate) 100 µl

Ayrışma jeli katılaştıktan sonra üzerine toplama jeli dökülüp jel tırağı ile 10 adet kuyucuk oluşturulmuştur ve jelin katılaşması beklenmiştir.

Toplama jeli:

- pH 6,8 Tris HCl çözeltisi 0,5 ml
- 37,5:1 Acrylamide:Bis Solüsyonu 0,657 ml
- dH₂O 2,760 ml
- SDS 39 µl
- TEMED 4 µl
- APS 39 µl

Her bir protein örneği Laemmli tamponuyla 1:1 oranında karıştırılmış ve 3 boyutlu yapılarını kaybederek jel üzerinde kolay hareket edebilmeleri için 5 dk. 90°C’de inkübe edilmiştir. Toplama jeli katılaştıktan sonra jel, elektroforez tankına konulmuş ve tank elektroforez çözeltisi ile doldurulmuştur.

Elektroforez Çözeltisi:

- Tris 15 g
- Glisin 72 g
- SDS 5 g
- dH₂O 1000 ml

4 µl protein ladder (NZYColour Protein Marker II, MB09002, NZYtech) ile her bir kuyucuğa 30 µg protein gelecek şekilde hesaplamaları yapılan protein örnekleri kuyucuklara yüklenmiştir. Güç kaynağı elektroforez tankına bağlanıp 120 V’a ayarlanarak çalıştırılmıştır. Proteinler jelin en alt ucuna kadar yürüdükten sonra elektroforez işlemi sonlandırılmıştır.

2.5.3. İmmünotblama

PVDF (Polyvinylidene fluoride) membran ve transfer kağıtları blotlama solüsyonu içine alınmıştır.

Blotlama solüsyonu:

- 5X Transfer Buffer (1704273, Trans-Blot® Turbo™ RTA Midi PVDF Transfer Kit) 20 ml
- Methanol 20 ml
- dH₂O 60 ml

Elektroforez sonrasında jel ve camlar blotlama solüsyonu içerisinde hafifçe sallandıktan sonra ince cam yavaşça kalın camdan ayrılmış ve toplama jeli jilet ile kesilmiştir. Trans-Blot Turbo (Bio-Rad, 170-4155) cihazının kasetinin alt kısmı üzerine sırasıyla transfer kağıdı, PVDF membran, jel ve transfer kağıdı yerleştirilmiş ve kaset kapatılıp sistem kilitlenmiştir. İmmünotblama, Trans-Blot Turbo cihazında 30 dk. 1,3 A ve 25 V'ta gerçekleştirilmiştir. Transfer aşamasından sonra membranlar TBS-T (Tris-tamponlu salin, %0,1 Tween 20) solüsyonuna alınmıştır ve takip eden tüm inkübasyonlar cam kaplar içerisinde sallayıcı üstünde gerçekleştirilmiştir.

TBS-T Solüsyonu:

- 100 ml TBS 10X (pH: 8,8)
- 1 ml Tween 20
- 900 ml dH₂O

TBS-T solüsyonu yıkama solüsyonu olarak kullanılmıştır. Aynı zamanda 100 ml TBS-T içinde 3 g BSA çözölmüş ve bu solüsyon hem bloklama solüsyonu olarak hem de işaretleme sırasında kullanılacak antikorların dilüenti olarak kullanılmıştır. Membran, bloklanma için %3 BSA solüsyonu içerisinde oda sıcaklığında, sallayıcı üzerinde hafif düzeyde sallanarak 60 dk. boyunca inkübe edilmiştir. Bloklama

sonrasında membran, +4°C’de primer antikor çözeltisi içerisinde gece boyunca sallayıcı üstünde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında membranlar 3x10 dk. boyunca TBS-T solüsyonu ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra membranlar peroksidaz işaretli sekonder antikor ile oda ısısında 1 saat inkübe edilmiş ve inkübasyon sonrasında TBS-T solüsyonu ile 3x10 dk. yıkanmıştır. Takip eden işlemler karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir.

Membranlar kemilüminesan substrat (WesternBright™ ECL Chemiluminescent HRP Substrate, Advansta, K-12045-D50) ile 5 dk. inkübe edildikten sonra kurutulup hiperfilm kaset içerisine aktarılmıştır. Hiperfilm kaset içerisine membranın üzerine gelecek şekilde film (CARESTREAM MXBE Film Blue-Sensitive, 771 0783) yerleştirilmiştir. 1-5 dk. süresince kemilüminesan ışımının membrandan filme geçişi sağlanmıştır ve film sırasıyla developer, fiksatif ve sudan geçirilmiştir. Film üzerinde protein ladder ve deney grupları asetat kalem ile işaretlenmiştir.

Yapılan Western blotlama deneylerinde anti-ATF6 α (sc-166659, SantaCruzBiotech), cleaved Caspase-3 (#9661, CellSignaling), anti-EDEM (sc-377394, SantaCruzBiotech), anti-GRP78 (sc-1050, SantaCruzBiotech), anti-GSK-3 α/β (sc-7291, SantaCruzBiotech), anti-IRE1 α (sc-390960, SantaCruzBiotech), anti-PERK (sc-377400, SantaCruzBiotech), anti-p-PERK (sc-32577, SantaCruzBiotech), anti-phospho-IRE1 (ab-48187, ABCAM), anti-pro-caspase 12 (ab-8118, ABCAM) primer antikorları ile Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody (#7076, CellSignaling), Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (#7074, CellSignaling) ve Rabbit Anti-Goat IgG-HRP (sc-2768, SantaCruzBiotech) sekonder antikorları kullanılmıştır.

Protein düzeylerinin normalizasyonu, deney grupları ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermeyen β -aktin (sc-47778, SantaCruzBiotech) antikoruna ile gerçekleştirilmiştir. Bunun için membranlar Strip Buffer ile 15 dk. süreyle inkübe edildikten sonra 3x15 dk. TBS-T ile yıkanmış ve β -aktin antikoruyla tekrardan işaretlenmiştir.

Strip Buffer (pH: 2-2.20):

- SDS 2 g
- Glycine 7,5 g
- dH₂O 1000 ml

Elde edilen protein bant görüntüleri GelDoc-It görüntüleme sistemi ile görüntülenmiş ve dansitometrik olarak analiz edilmiştir.

2.6.İstatistiksel Analiz

Çalışmanın tüm istatistiksel analizleri IBM SPSS 22 paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

İmmünohistokimyasal incelemeler ve Western blotlama deneyleri sonucunda elde edilen verilerden normal dağılım gösteren veriler için One-Way Anova testi ile gruplar arasında fark olup olmadığı değerlendirilmiş ve daha sonra farkın hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek için Tukey Post-hoc çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. Normal dağılım göstermeyen veriler için Kruskal Wallis Testi uygulanmıştır. $p < 0,05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1.Genel Değerlendirme Bulguları

Bu tez çalışmasında 3 grupta toplam 30 adet deney hayvanı kullanılmıştır. Kullanılan deney hayvanları, başlangıç ağırlıkları 180-200 g arasında değişmekte olan 2 aylık Wistar türü erkek sıçanlardır. Deney süresince herhangi bir hayvan kaybı yaşanmamıştır.

20 haftalık deney süreci sonunda kontrol grubunda vücut ağırlığı $176,3 \pm 22,93$ iken MetS grubunda bu değer $311,3 \pm 29,06$ 'dır ve bu değer istatistiksel olarak anlamlıdır ($p = 0,0033$). Kontrol ve MetS grupları arasında açlık kan glukoz düzeyi kontrol grubunda $87 \pm 1,38$ iken MetS grubunda $115,4 \pm 4,11$ 'dir ve bu değer istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,001$) (Çizelge 2.1.).

3.2.Sıçanlarda Deneysel MetS Oluşturulmasının Doğrulanması

20 hafta boyunca %32 oranında sükrözlu çeşme suyu ile beslenen Wistar türü sıçanlarda MetS deney modelinin oluşumunun doğrulanması için deney hayvanlarında açlık kan glukozu, insülin, insülin direnç gelişimi ve arteriyal kan basınçları ölçülmüştür. Kontrol grubu hayvanlarında serum insülin seviyesi $28,58 \pm 3,12$ iken yüksek sükröz içerikli diyet ile beslenen sıçanlarda $89,57 \pm 2,42$ 'dir ve bu değer istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,001$). Deney hayvanlarında insülin direncini göstermek için HOMA-IR index hesabı yapılmıştır. Kontrol grubu hayvanlarında HOMA-IR değeri $93,52 \pm 9,67$ iken yüksek sükröz içerikli diyet ile beslenen sıçanlarda bu değer $325,78 \pm 27,41$ 'dir (Çizelge 2.1.).

Çizelge 2.1. Kontrol ve MetS gruplarına ait genel parametreler.

	Kontrol (Ort±SEM)	MetS (Ort±SEM)	p değeri
Vücut Ağırlığı (g)	176,3 ± 22,93	311,3 ± 29,06	= 0,0033*
Açlık Kan Glukozu (mg/dl)	87 ± 1,38	115,4 ± 4,11	≤ 0,0001*
Serum İnsülin Düzeyi (ng/ml)	28,58 ± 3,12	89,57 ± 2,42	≤ 0,0001*
HOMA-IR	93,52 ± 9,67	325,8 ± 27,41	≤ 0,0001*
Sistolik basınç (mmHg)	119 ± 1,97	170,7 ± 4,96	≤ 0,0001*
Diyastolik basınç (mmHg)	74,89 ± 0,54	104,2 ± 6,2	= 0,0002 *
OGTT	6,71 ± 4,45	6,29 ± 7,04	= 0,0211*

* p< 0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmektedir.

3.3.MetS Oluşturulan Sıçanlara İnsülin Uygulanmasının Değerlendirilmesi

15 gün boyunca 3 IU/gün dozunda subkutan olarak insülin uygulanan deney hayvanlarında insülinin etkisini görmek için açlık kan glukozu, insülin, insülin direnç gelişimi ve arteriyal kan basınçları ölçülmüştür. MetS grubu hayvanlarında serum insülin seviyesi $89,57 \pm 2,42$ iken insülin uygulanan deney hayvanlarında bu değer $43,01 \pm 9,49$ 'dur ve bu değer istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,005$). İnsülin uygulanan deney hayvanlarında insülin direnci HOMA-IR indeksine göre hesaplanmıştır. MetS grubundaki hayvanlarda HOMA-IR değeri $325,78 \pm 27,41$ iken MetS+İnsülin grubunda bu değer $127,22 \pm 25,21$ 'dir ve bu değer istatistiksel olarak anlamlıdır ($p = 0,0002$) (Çizelge 2.2.).

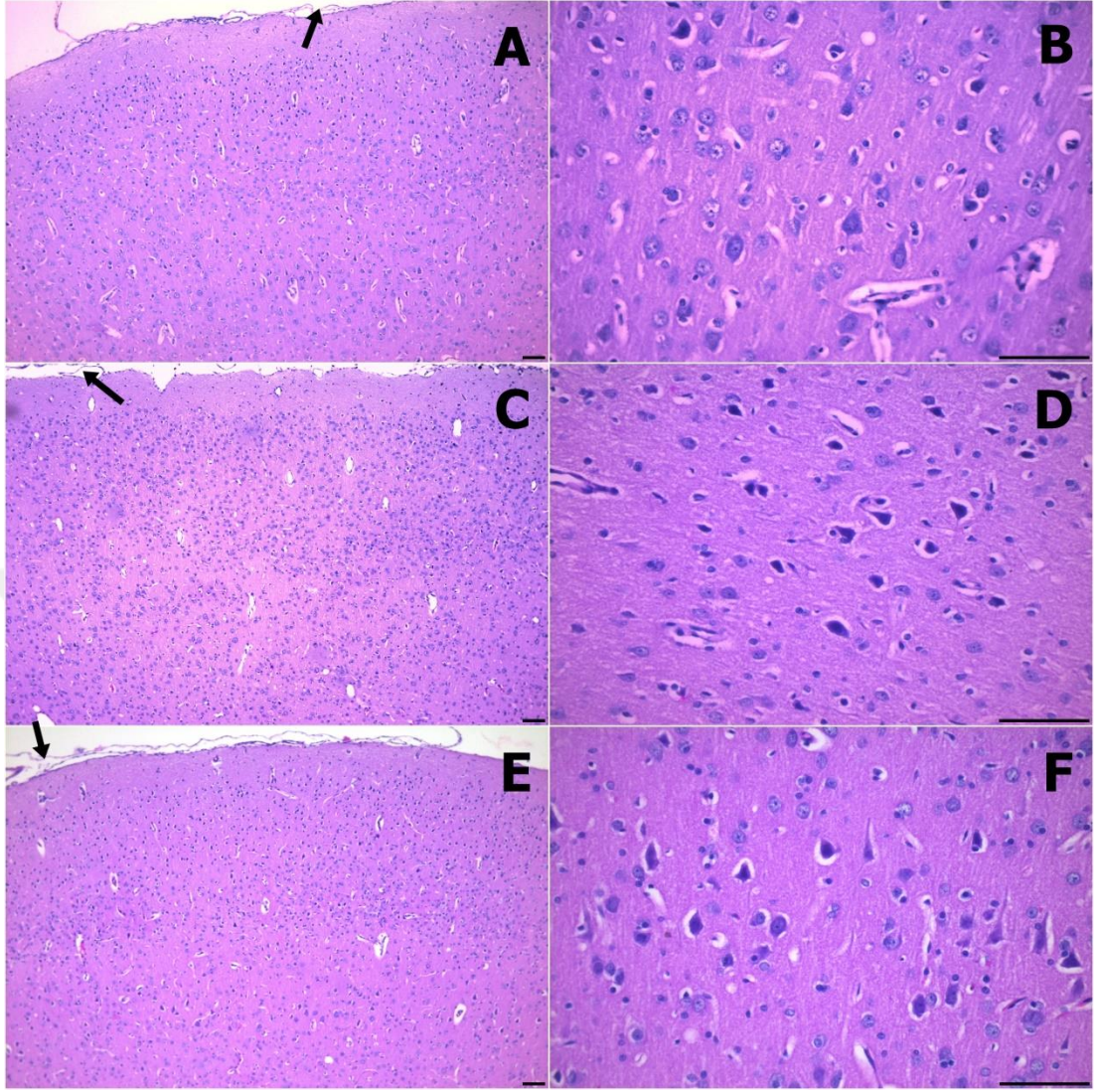
Çizelge 2.2. MetS ve MetS+İnsülin gruplarına ait genel parametreler.

	MetS (Ort±SEM)	MetS+İnsülin (Ort±SEM)	p değeri
Vücut Ağırlığı (g)	311,3 ± 29,06	262,6 ± 28,2	= 0,2521
Açlık Kan Glukozu (mg/dl)	115,4 ± 4,11	69,43 ± 2,51	≤ 0,0001*
Serum İnsülin Düzeyi (ng/ml)	89,57 ± 2,42	43,01 ± 9,49	= 0,0005*
HOMA-IR	325,8 ± 27,41	127,2 ± 25,21	= 0,0002*
Sistolik basınç (mmHg)	170,7 ± 4,96	186,6 ± 3,33	= 0,0509
Diyastolik basınç (mmHg)	104,2 ± 6,2	104,1 ± 10,14	= 0,7094
OGTT	6,29 ± 7,04	20 ± 4,19	= 0,1201

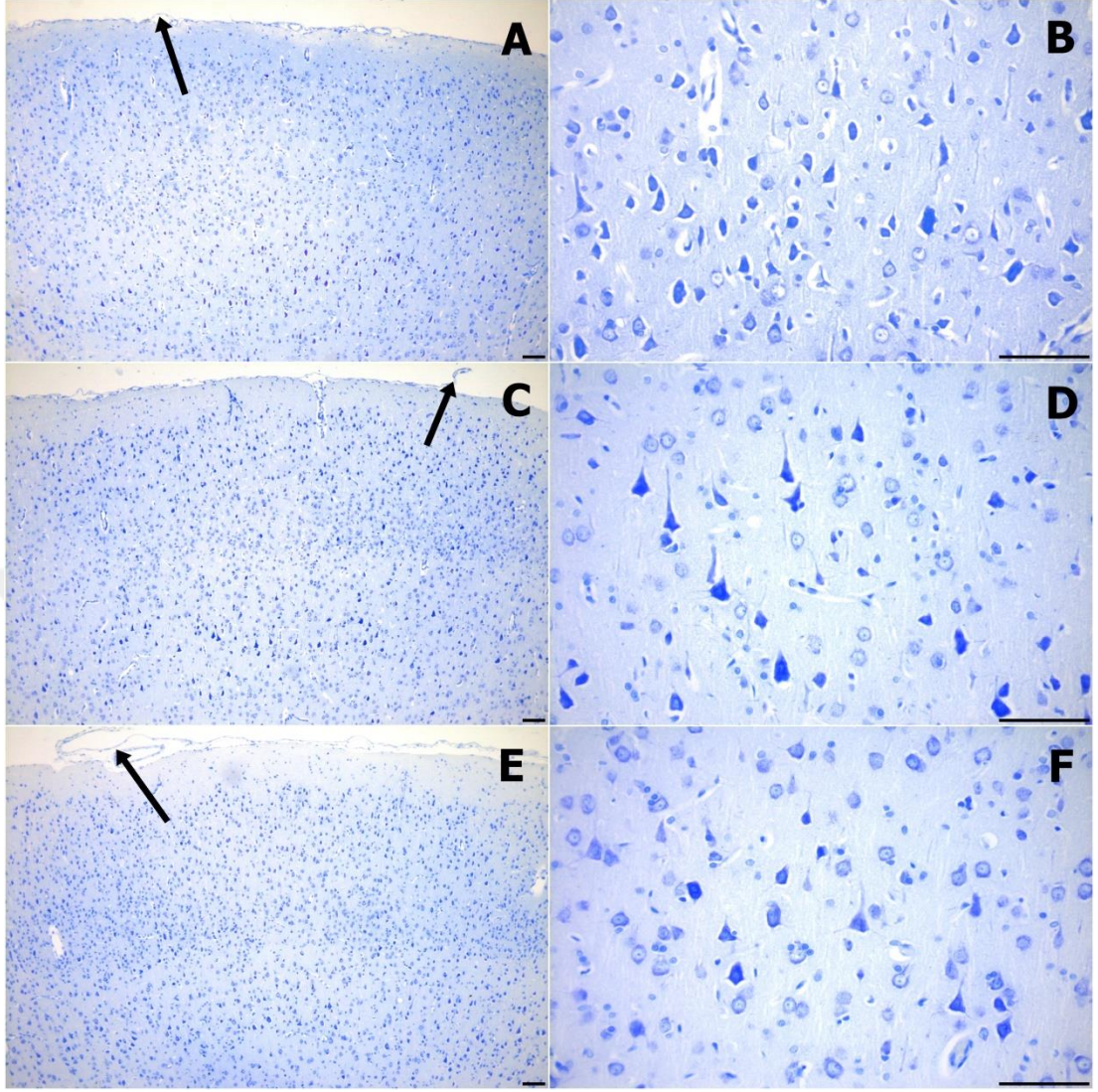
* p< 0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmektedir.

3.4.İşık Mikroskobik Değerlendirme Bulguları

Kontrol ve deney gruplarından alınan prefrontal korteks örneklerinden koronal yönde alınan kesitler Hematoksilin-Eozin ve Krezil Viyole boyaları ile boyandıktan sonra, genel doku morfolojisini görmek için aynı bölgeler incelenmiştir. Düşük ve yüksek büyütmelerde gerçekleştirilen incelemelerde gruplara ait kesitlerde pia mater yapısı ile prefrontal kortekste yer alan nöronların boyanma özelliklerinin normal olduğu görülmüştür (Şekil 2.1.). Bütün gruplarda büyük büyütmede yapılan incelemelerde Hematoksilin-Eozin ile boyanan kesitlerde piramidal nöronlarda merkezi yerleşimli ökaryotik nükleuslar ve büyük nükleoluslar görülmüştür. Krezil viyole ile boyanmış kesitlerde yapılan incelemelerde ise nükleusun etrafında GER kümelerinden oluşan Nissl cisimciklerinin benzer miktarda ve yerleşimde oldukları izlenmiştir (Şekil 2.2.).



Şekil 2.1. Kontrol ve deney gruplarına ait Hematoksilin-Eozin ile boyanmış kesitlerde prefrontal korteksin genel görünümü. A) ve B) Kontrol grubu, C) ve D) MetS grubu, E) ve F) MetS+İnsülin grubu. Ok: Pia mater. Boya: Hematoksilin-Eozin. Bar: 100 μ m.

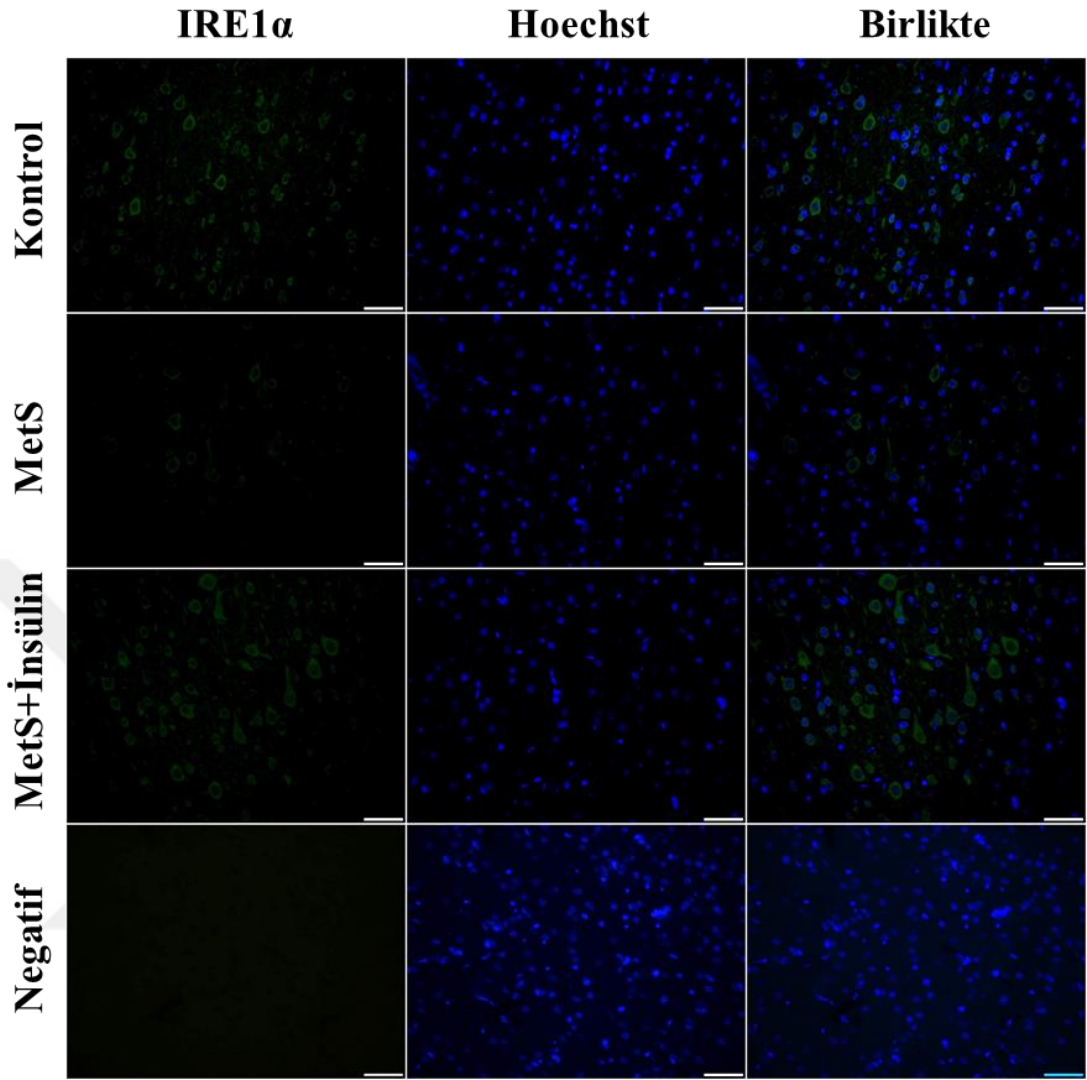


Şekil 2.2. Kontrol ve deney gruplarına ait Krezil Viyole ile boyanmış kesitlerde prefrontal korteksin genel görünümü. A) ve B) Kontrol grubu, C) ve D) MetS grubu, E) ve F) MetS+İnsülin grubu. Ok: Pia mater. Boya: Krezil Viyole. Bar: 100 μ m.

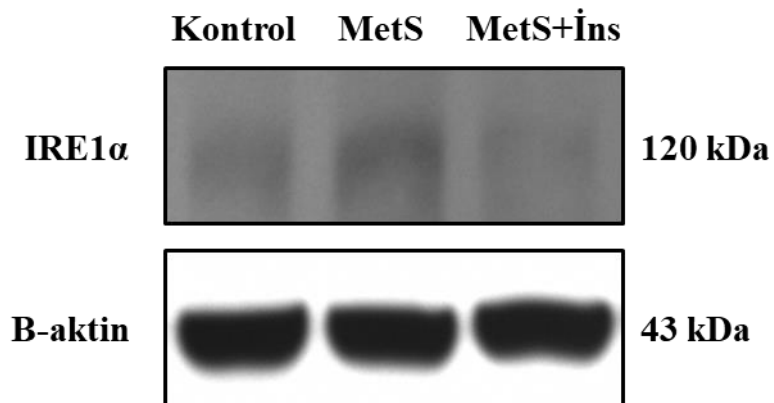
3.5.ER Stresiyle İlişkili Belirteçlerin İmmünohistokimya, İmmünofluoresan ve Western Blotlama Bulguları

3.5.1. IRE1 α Bulguları

Kontrol ve deney grubuna ait kesitlerde IRE1 α immünoreaktivitesine bakıldığında, kontrol grubu ve MetS+İnsülin grubuna ait örneklerde IRE1 α immünoreaktivitesinin daha yoğun olduğu görünmüştür (Şekil 2.3. ve 2.4.). Yapılan istatistiksel analiz sonucunda gruplar arasında anlamlı fark izlenmemiştir ($p = 0,075$) (Çizelge 2.3.).



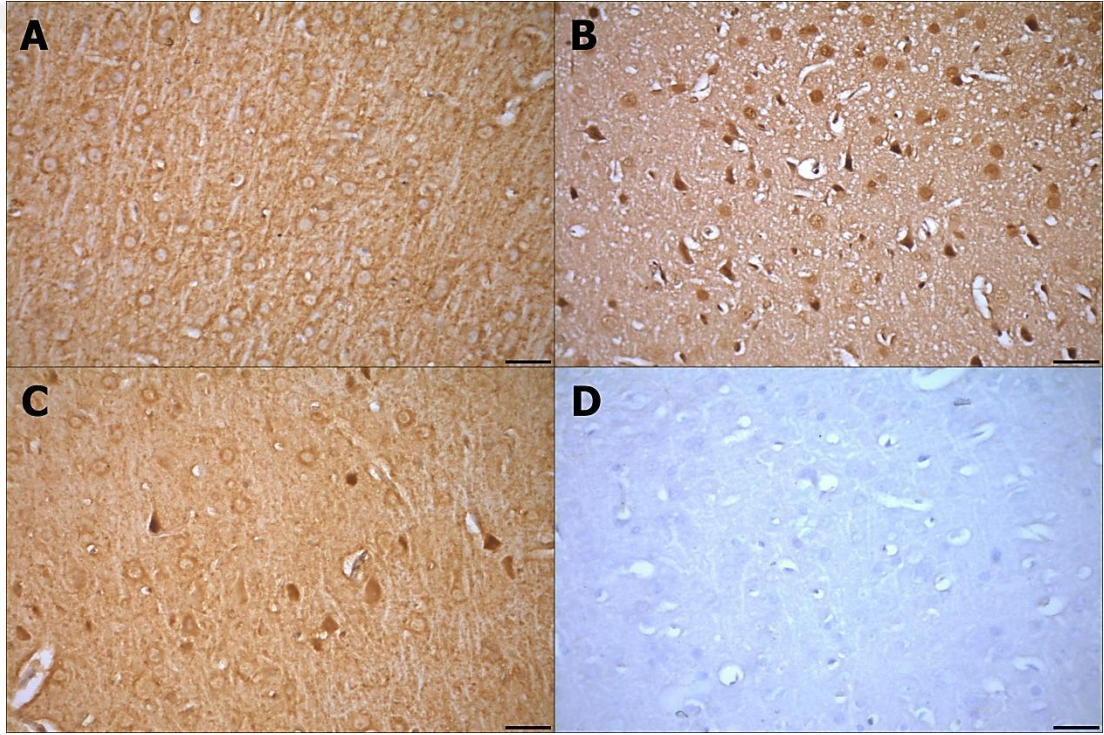
Şekil 2.3. Kontrol ve deney gruplarına ait kesitlerde IRE1 α ekspresyonları. Kontrol ve MetS+İnsülin gruplarında yoğun IRE1 α ekspresyonu görülürken, MetS grubunda IRE1 α ekspresyonlarının daha az yoğunlukta oldukları görülmektedir. Bar: 50 μ m.



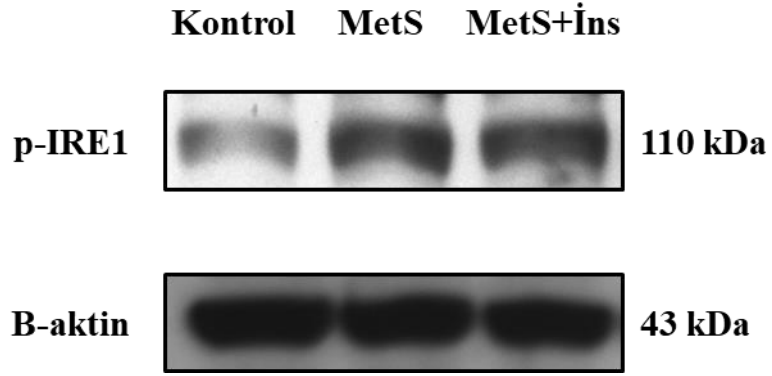
Şekil 2.4. Kontrol ve deney gruplarından alınan prefrontal korteks örneklerinde IRE1 α proteininin miktarı (Western blot).

3.5.2. p-IRE1 Bulguları

Kontrol ve deney grubuna ait kesitlerde p-IRE1 immünoreaktivitesine bakıldığında, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MetS ve MetS+İnsülin gruplarında orta ve yoğun şiddette boyanmış piramidal nöronlar izlenmiştir. MetS ve MetS+İnsülin grupları arasında piramidal nöronların benzer boyanma özellikleri gösterdiği görülmüştür (Şekil 2.5. ve 2.6.). Yapılan istatistiksel analiz sonucunda kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki immünoreaktivite artışının anlamlı olduğu görülmüştür ($p = 0,002$) (Çizelge 2.4.).



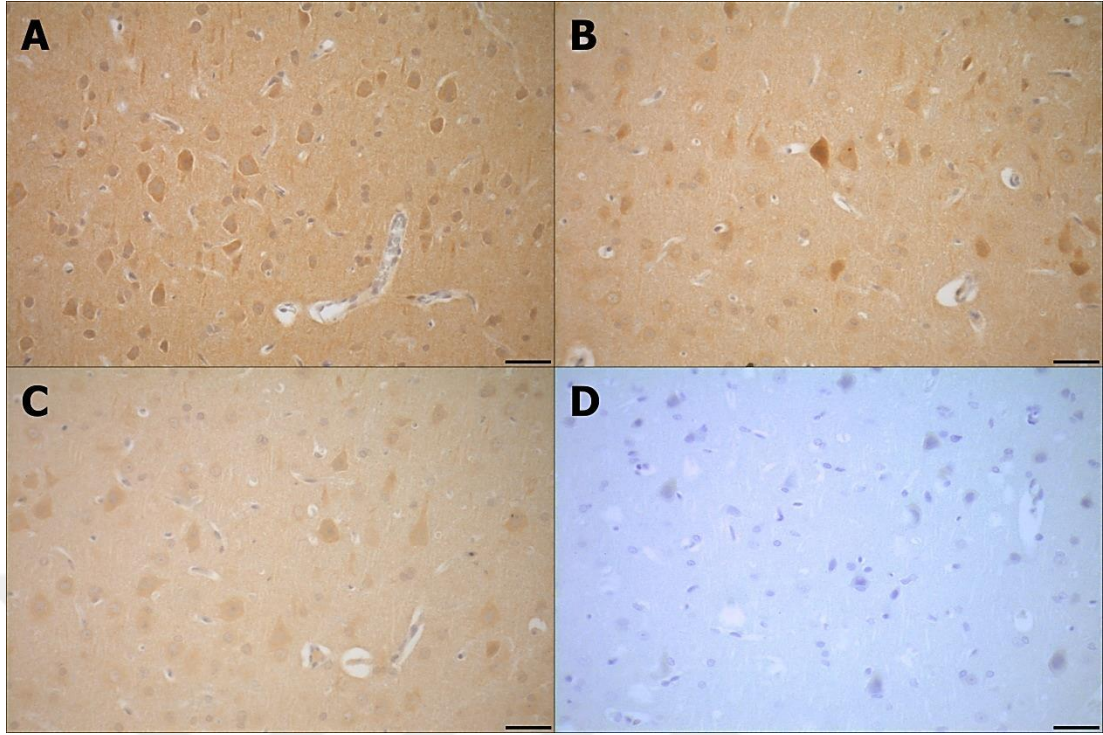
Şekil 2.5. Kontrol ve deney gruplarına ait kesitlerde p-IRE1 ekspresyonları. A) Kontrol grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda p-IRE1 ekspresyonuna rastlanmamıştır. B) MetS grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda orta ve yoğun şiddette p-IRE1 ekspresyonu izlenmektedir. C) MetS+İnsülin grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda orta şiddette p-IRE1 ekspresyonu izlenmektedir. D) p-IRE1 primer antikorunun negatif işaretlenmesi. Bar: 50 μm .



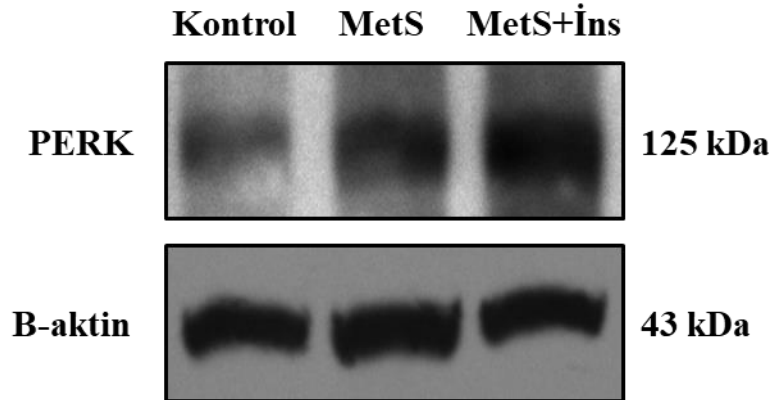
Şekil 2.6. Kontrol ve deney gruplarından alınan prefrontal korteks örneklerinde p-IRE1 proteininin miktarı (Western blot).

3.5.3. PERK Bulguları

Kontrol ve deney grubuna ait kesitlerde PERK immünoreaktivitesine bakıldığında, kontrol grubunda bulunan piramidal nöronların deney gruplarına oranla daha yoğun işaretlendikleri görülmüştür. Kontrol grubunda bulunan piramidal nöronlarda yoğun olarak kuvvetli işaretlenme izlenirken deney gruplarında bulunan piramidal nöronlarda PERK ekspresyonlarının daha az olduğu izlenmiştir (Şekil 2.7. ve 2.8.). Ancak yapılan istatistiksel analiz sonucunda gruplar arasında anlamlı fark gözlenmemiştir ($p = 0,075$) (Çizelge 2.3.).



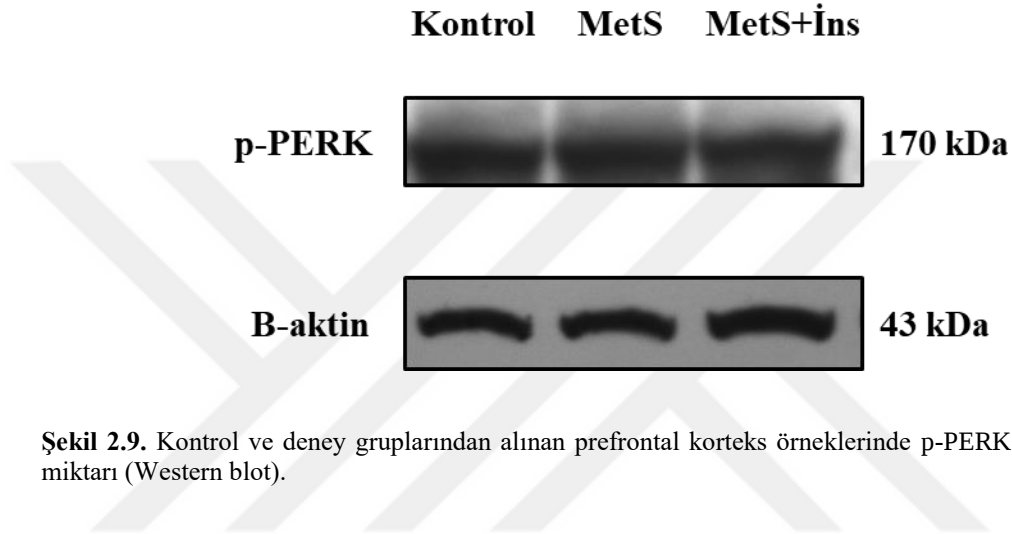
Şekil 2.7. Kontrol ve deney gruplarına ait kesitlerde PERK ekspresyonları. A) Kontrol grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda orta ve kuvvetli şekilde PERK ekspresyonu gözlenmektedir. B) MetS grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda zayıf ve orta şiddette PERK ekspresyonu gözlenmektedir. C) MetS+İnsülin grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda zayıf ve orta şiddette PERK ekspresyonu gözlenmektedir. D) PERK primer antikorunun negatif işaretlenmesi. Bar: 50 μ m.



Şekil 2.8. Kontrol ve deney gruplarından alınan prefrontal korteks örneklerinde PERK proteininin miktarı (Western blot).

3.5.4. p-PERK Bulguları

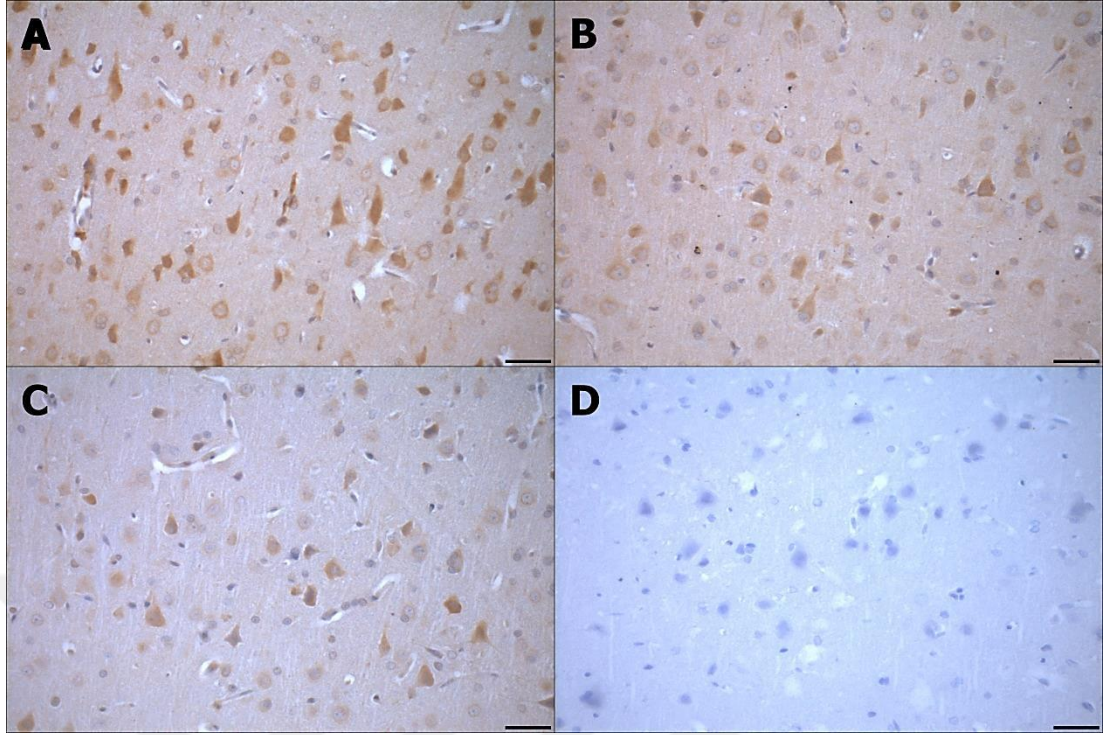
Kontrol ve deney grubuna ait prefrontal korteks örneklerinde p-PERK proteini Western blotlama analizi ile incelenmiştir. Elde edilen bant görüntülerinin istatistiksel olarak incelenmesi sonucunda gruplar arasında anlamlı fark gözlemlenmemiştir ($p = 6937$) (Şekil 2.9.) (Çizelge 2.4.).



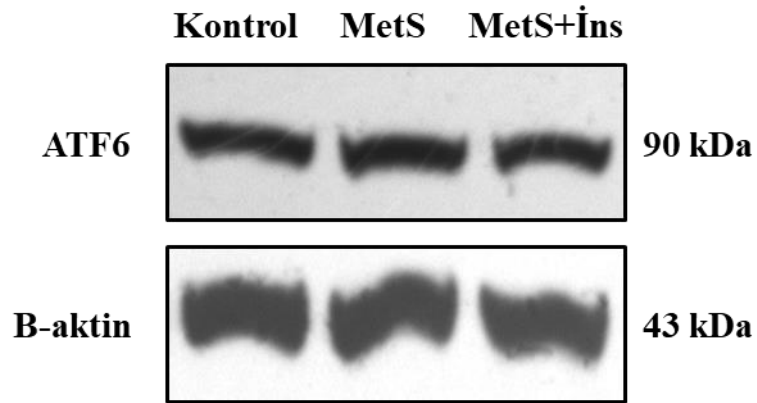
Şekil 2.9. Kontrol ve deney gruplarından alınan prefrontal korteks örneklerinde p-PERK proteininin miktarı (Western blot).

3.5.5. ATF6 Bulguları

Kontrol ve deney gruplarına ait kesitlerde MetS ve MetS+İnsülin grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında piramidal nöronların zayıf ve orta şiddette işaretlendikleri ve ATF6 immünoreaktivitelerinin azaldığı görülmüştür (Şekil 2.10. ve 2.11.). Yapılan istatistiksel analiz sonucunda kontrol grubu ile MetS+İnsülin grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmüştür ($p = 0,037$) (Çizelge 2.3.).



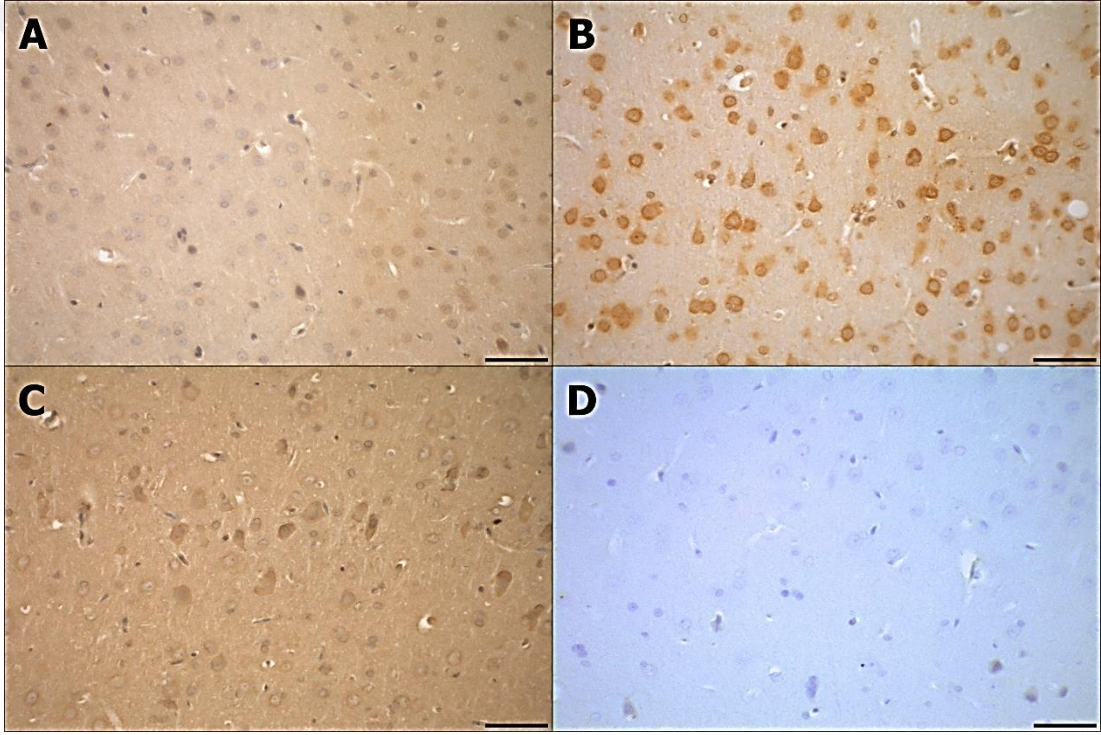
Şekil 2.10. Kontrol ve deney gruplarına ait kesitlerde ATF6 ekspresyonları. A) Kontrol grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda orta ve kuvvetli şiddette değişen ATF6 ekspresyonları izlenmektedir. B) MetS grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda zayıf ve orta şiddette değişen ATF6 ekspresyonları izlenmektedir. C) MetS+İnsülin grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda zayıf ve orta şiddette değişen ATF6 ekspresyonları izlenmektedir. D) ATF6 primer antikorunun negatif işaretlenmesi. Bar: 50 µm.



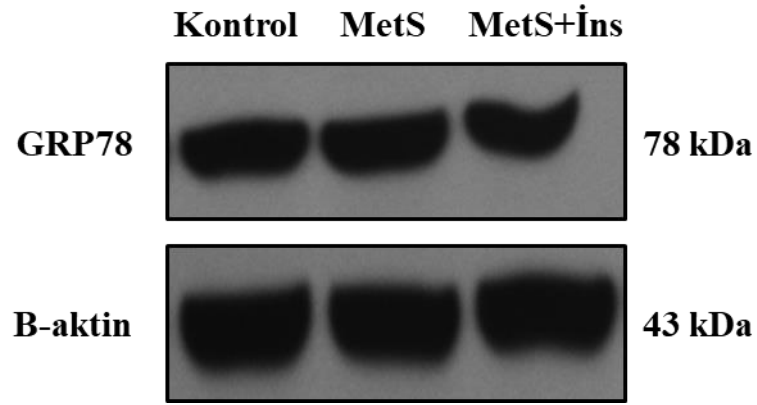
Şekil 2.11. Kontrol ve deney gruplarından alınan prefrontal korteks örneklerinde ATF6 proteininin miktarı (Western blot).

3.5.6. GRP78 Bulguları

Kontrol ve deney gruplarına ait kesitlerde GRP78 immünoreaktivitesi, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MetS ve MetS+İnsülin gruplarında bulunan piramidal nöronlarda GRP78 ekspresyonlarının arttığı görülmüştür (Şekil 2.12.-2.13.). Yapılan istatistiksel analiz sonucunda kontrol grubu ile MetS grubu arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamakla birlikte MetS ve MetS+İnsülin grubu arasındaki azalmış immünoreaktivite istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p = 0,016$) (Çizelge 2.4.).



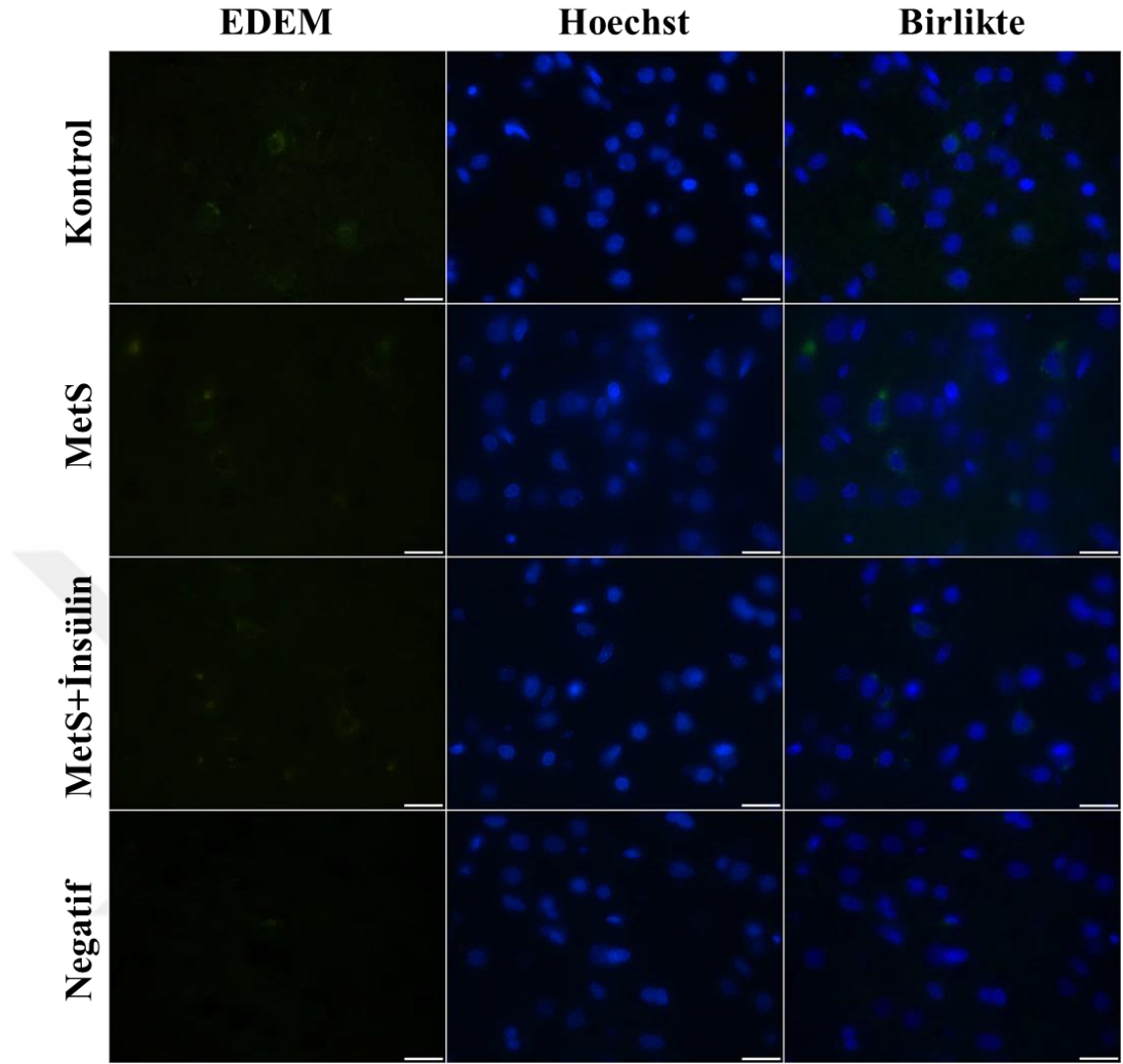
Şekil 2.12. Kontrol ve deney gruplarına ait kesitlerde GRP78 ekspresyonları. A) Kontrol grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda GRP78 ekspresyonu izlenmemektedir. B) MetS grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda kuvvetli şiddetle GRP78 ekspresyonu görülmektedir. C) MetS+İnsülin grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda zayıf ve orta şiddetle GRP78 ekspresyonu görülmektedir. D) GRP78 primer antikorunun negatif işaretlenmesi. Bar: 50 μ m.



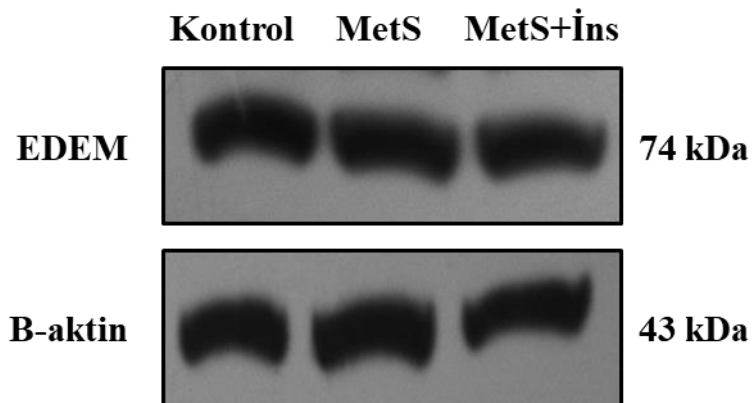
Şekil 2.13. Kontrol ve deney gruplarından alınan prefrontal korteks örneklerinde GRP78 proteininin miktarı (Western blot).

3.5.7. EDEM Bulguları

Kontrol ve deney gruplarına ait kesitlerde EDEM immünoaktivitesi kontrol grubunda bulunan piramidal nöronlarda zayıf şiddette izlenirken, MetS ve MetS+İnsülin gruplarında oldukça kuvvetli şiddette görülmüştür (2.14.-2.15.). MetS ile MetS+İnsülin grupları arasındaki immünoaktivite karşılaştırıldığında, MetS+İnsülin grubunda EDEM ekspresyonlarının azalması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p = 0,000$) (Çizelge 2.3.).



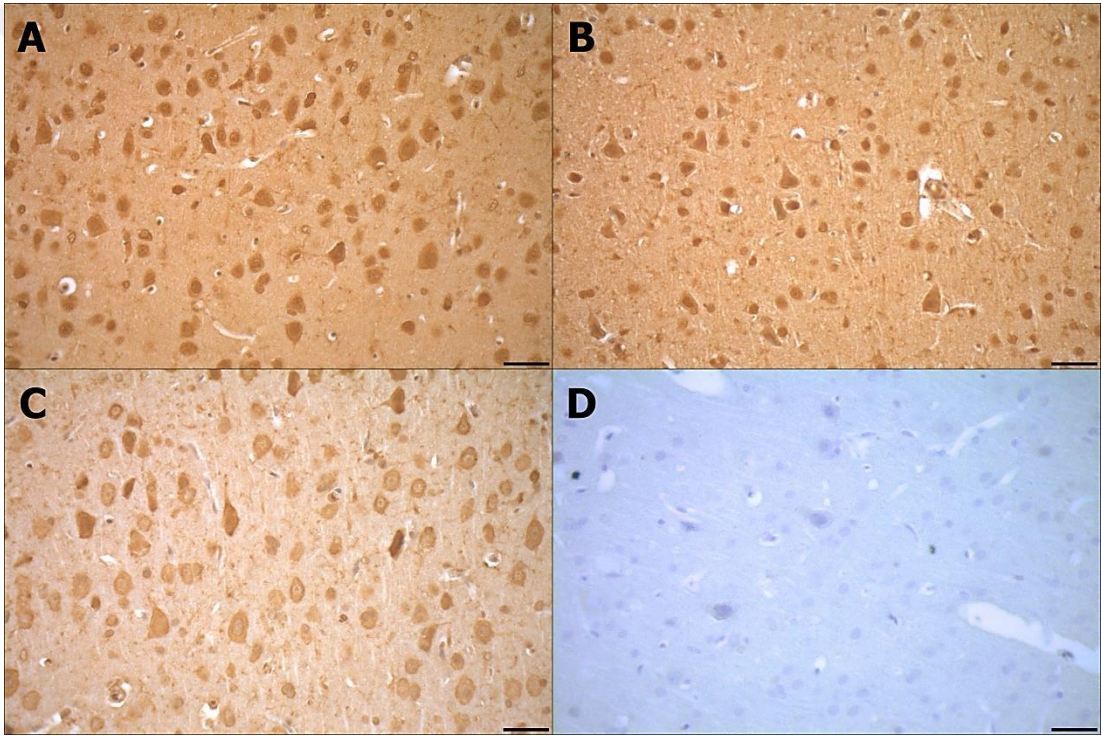
Şekil 2.14. Kontrol ve deney gruplarına ait kesitlerde EDEM ekspresyonları. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MetS ve MetS+İnsülin gruplarında yoğun EDEM ekspresyonu görülmektedir. Bar: 50 µm.



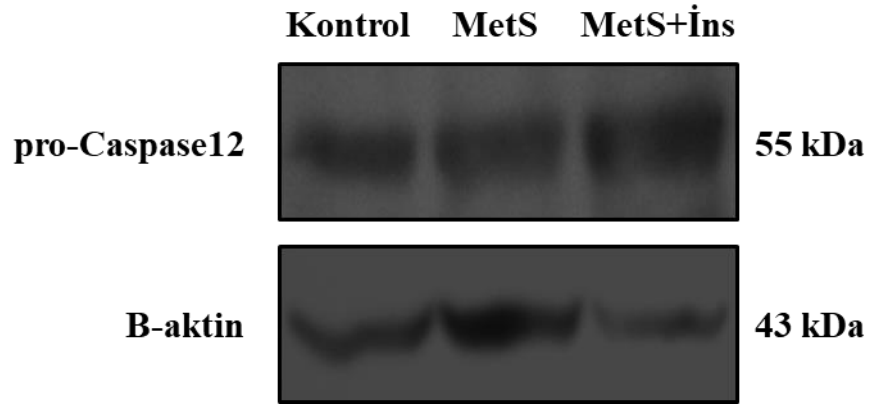
Şekil 2.15. Kontrol ve deney gruplarından alınan prefrontal korteks örneklerinde EDEM proteininin miktarı (Western blot).

3.5.8. Pro-Caspase 12 Bulguları

Kontrol ve deney grubuna ait kesitlerde pro-Caspase12 immünoreaktivitesi incelendiğinde, kontrol grubundaki piramidal nöronlarının deney gruplarına oranla daha yoğun boyandıkları görülmüştür. Kontrol grubunda bulunan piramidal nöronlarda kuvvetli işaretlenme yoğun olarak izlenirken deney gruplarında bulunan piramidal nöronlarda pro-Caspase12 ekspresyonlarının daha az olduğu izlenmiştir (Şekil 2.16.-2.17.). Ancak yapılan istatistiksel analiz sonucunda gruplar arasında anlamlı fark gözlenmemiştir ($p = 0,997$) (Çizelge 2.4.).



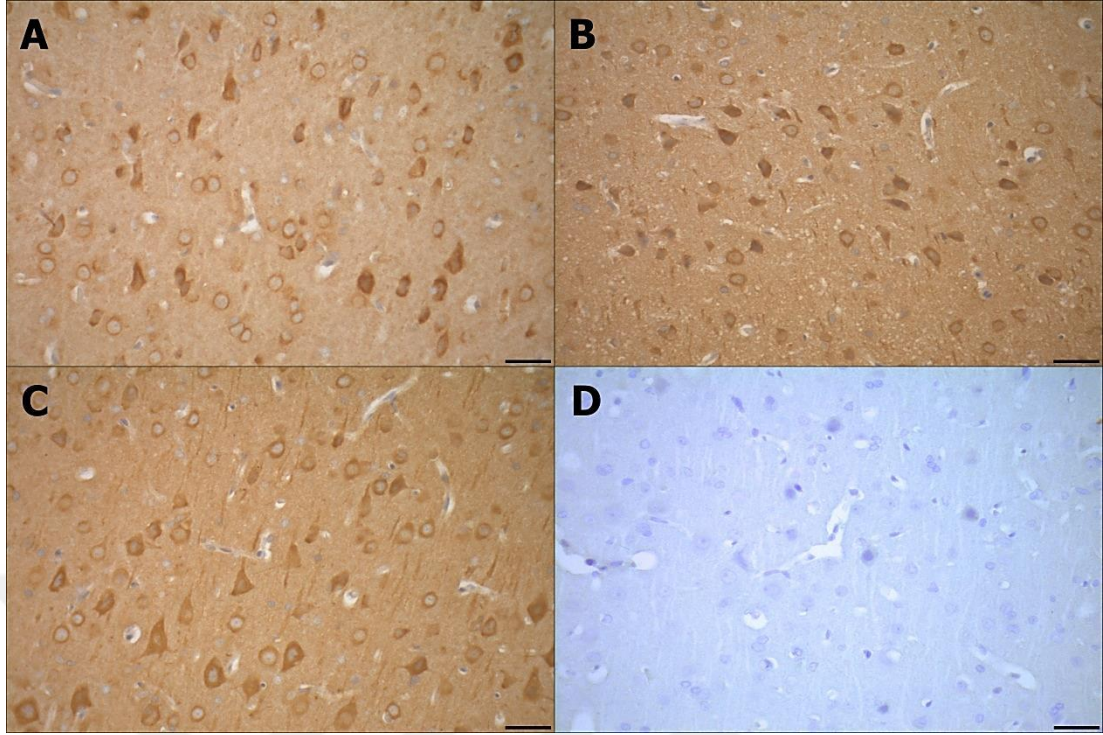
Şekil 2.16. Kontrol ve deney gruplarına ait kesitlerde pro-Caspase 12 ekspresyonları. A) Kontrol grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda kuvvetli şiddette pro-Caspase 12 ekspresyonu izlenmektedir. B) MetS grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda orta ve kuvvetli şiddette pro-Caspase 12 ekspresyonu izlenmektedir. C) MetS+İnsülin grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda orta ve kuvvetli şiddette pro-Caspase 12 ekspresyonu izlenmektedir. D) pro-Caspase 12 primer antikorunun negatif işaretlenmesi. Bar: 50 μ m.



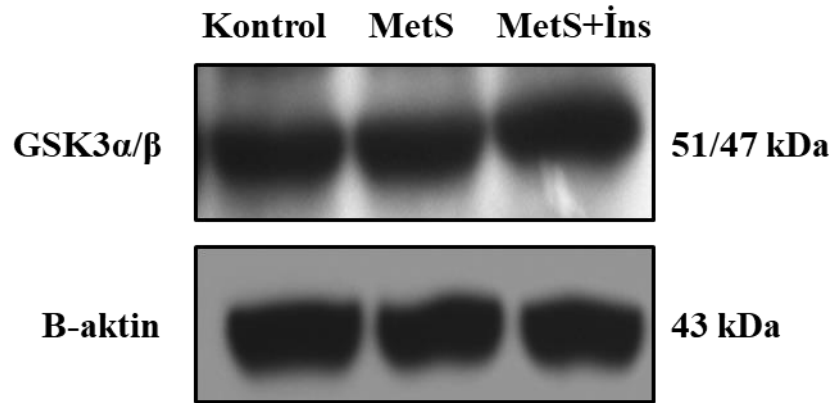
Şekil 2.17. Kontrol ve deney gruplarından alınan prefrontal korteks örneklerinde pro-Caspase 12 proteininin miktarı (Western blot).

3.5.9. GSK3 α/β Bulguları

Kontrol ve deney grubuna ait kesitlerde GSK3 α/β immünoreaktivitesine bakıldığında, tüm gruplar arasında piramidal nöronların benzer şekilde zayıf ve orta şiddette GSK3 α/β ekspresyonu gösterdikleri izlenmiştir (Şekil 2.18.-2.19.). Yapılan istatistiksel analiz sonucunda gruplar arasında anlamlı fark gözlenmemiştir ($p = 0,428$) (Çizelge 2.4.).



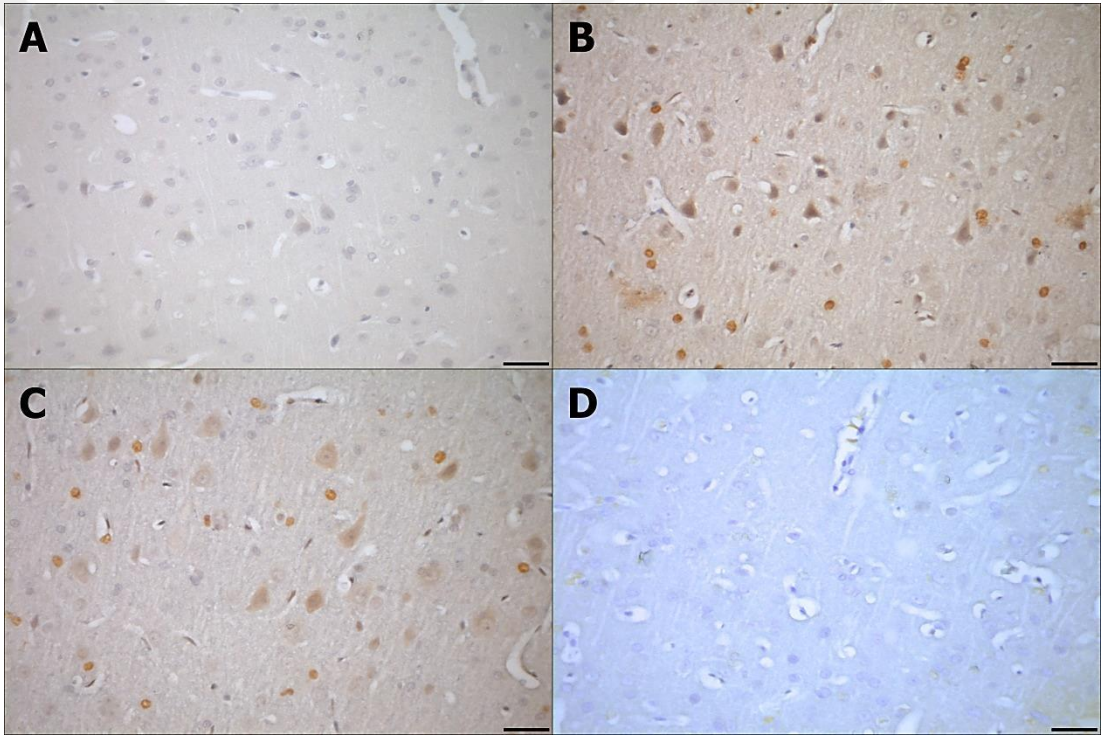
Şekil 2.18. Kontrol ve deney gruplarına ait kesitlerde GSK3 α/β ekspresyonları. A) Kontrol grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda zayıf ve orta şiddette GSK3 α/β ekspresyonu izlenmektedir. B) MetS grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda zayıf ve orta şiddette GSK3 α/β ekspresyonu izlenmektedir. C) MetS+İnsülin grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda zayıf ve orta şiddette GSK3 α/β ekspresyonu izlenmektedir. D) GSK3 α/β primer antikorunun negatif işaretlenmesi. Bar: 50 μ m.



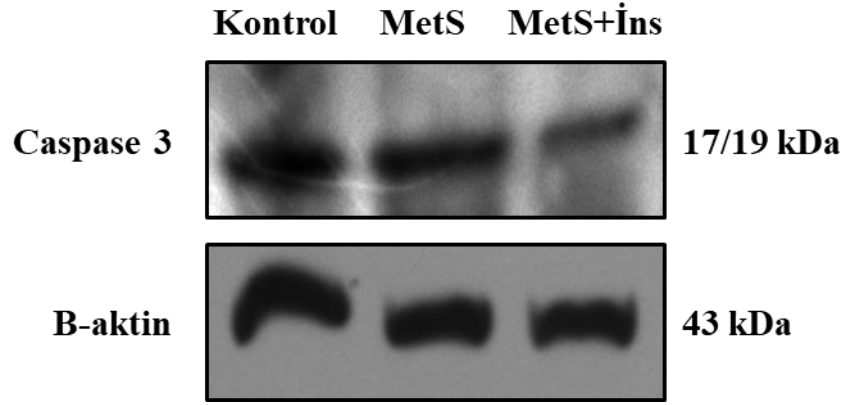
Şekil 2.19. Kontrol ve deney gruplarından alınan prefrontal korteks örneklerinde GSK3 α/β proteininin miktarı (Western blot).

3.5.10. Caspase 3 Bulguları

Kontrol ve deney gruplarına ait kesitlerde Caspase 3 immünoreaktivitesine bakıldığında, kontrol grubunda bulunan piramidal nöronlarda az miktarda oldukça zayıf olarak izlenen immünoreaktivitenin MetS ve MetS+İnsülin gruplarında daha fazla sayıda nöronda orta ve kuvvetli şiddette olduğu ve bulguların istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (Şekil 2.20.-2.21.). MetS ile MetS grupları arasındaki immünoreaktivite karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmemiştir ($p = 0,001$) (Çizelge 2.4.).



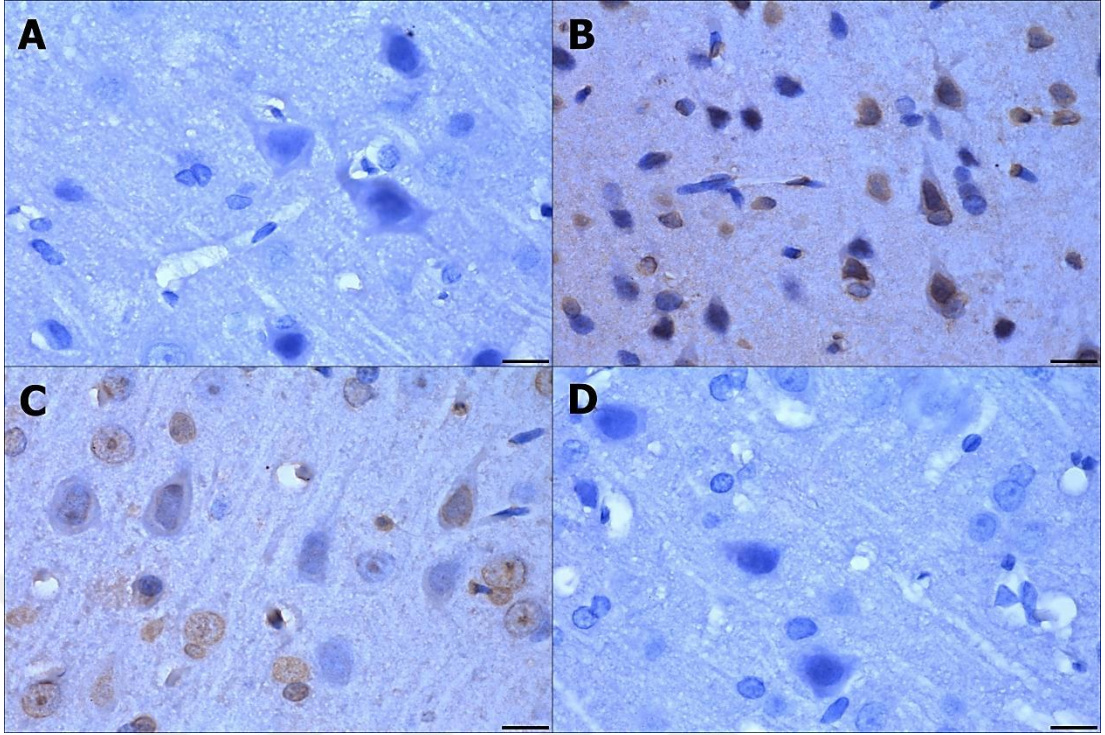
Şekil 2.20. Kontrol ve deney gruplarına ait kesitlerde Caspase 3 ekspresyonları. A) Kontrol grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda Caspase3 ekspresyonuna rastlanılmamıştır. B) MetS grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda zayıf ve orta şiddette Caspase3 ekspresyonu izlenmektedir. C) MetS+İnsülin grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda zayıf ve orta şiddette Caspase3 ekspresyonu izlenmektedir. D) Caspase3 primer antikorunun negatif işaretlenmesi. Bar: 50 μ m.



Şekil 2.21. Kontrol ve deney gruplarından alınan prefrontal korteks örneklerinde Caspase 3 proteininin miktarı (Western blot).

3.5.11. TUNEL Bulguları

Kontrol ve deney grubuna ait kesitlerde TUNEL immünoreaktivitesine bakıldığında, kontrol grubunda TUNEL pozitif hücreler izlenmezken, MetS ve MetS+İnsülin gruplarındaki piramidal nöronların benzer şekilde zayıf şiddette TUNEL pozitivitesi gösterdikleri izlenmiştir (Şekil 2.22.-2.23.). Yapılan istatistiksel analiz sonucunda gruplar arasında anlamlı fark gözlenmemiştir ($p = 0,189$) (Çizelge 2.4.).



Şekil 2.22. Kontrol ve deney gruplarına ait kesitlerde TUNEL pozitifitesi. A) Kontrol grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda TUNEL pozitifitesine rastlanılmamıştır. B) MetS grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda zayıf şiddette TUNEL pozitifitesi izlenmektedir. C) MetS+İnsülin grubuna ait prefrontal kortekste piramidal nöronlarda zayıf şiddette TUNEL pozitifitesi izlenmektedir. D) TUNEL'in negatif boyanması. Bar: 20 µm.

3.6.İstatistiksel Bulgular

İmmünohistakimyasal görüntülerin analizleri sonucunda elde edilen verilerden normal dağılım gösteren veriler için Tukey Post-hoc çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır (Çizelge 2.3.). Normal dağılım göstermeyen veriler için Kruskal Wallis Testi uygulanmıştır (Çizelge 2.4.). $p<0,05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Çizelge 2.3. Normal dağılım gösteren verilerin istatistiksel olarak karşılaştırılması.

	Kontrol Grubu (ortalama $\pm$ standart sapma)	MetS Grubu (ortalama $\pm$ standart sapma)	MetS+İnsülin Grubu (ortalama $\pm$ standart sapma)	p Değeri
IRE1 α	1,5143 $\pm$ 0,34	1,0286 $\pm$ 0,21	1,3714 $\pm$ 0,52	0,075
PERK	1,5143 $\pm$ 0,34	1,0286 $\pm$ 0,21	1,3714 $\pm$ 0,52	0,075
ATF6	1,4571 $\pm$ 0,36	1,1714 $\pm$ 0,14	1,0571 $\pm$ 0,27	0,037*
EDEM	0,1714 $\pm$ 0,14	2,2286 $\pm$ 0,51	1,7143 $\pm$ 0,32	0,000*
Pro-Caspase12	1,8571 $\pm$ 0,81	1,8286 $\pm$ 0,78	1,8286 $\pm$ 0,69	0,997

* $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmektedir.

Çizelge 2.4. Normal dağılım göstermeyen verilerin istatistiksel olarak karşılaştırılması.

	Kontrol Grubu (medyan (min-max))	MetS Grubu (medyan (min- max))	MetS+İnsülin Grubu (medyan (min- max))	p Değeri
p-IRE1	1,20 (1,20-1,80)	2,40 (1,40-3,00)	2,00 (1,60-2,20)	0,002*
p-PERK	0,95 (0,78-1,24)	1,29 (0,86-1,35)	1,34 (0,78-1,39)	0,694
GRP78	0,20 (0,00-1,20)	1,00 (0,20-1,80)	0,20 (0,00-1,40)	0,016*
GSK3 α/β	1,60 (0,80-1,80)	2,00 (1,40-2,00)	1,60 (1,00-2,00)	0,428
Caspase3	0,00 (0,00-0,20)	0,40 (0,20-1,40)	0,40 (0,20-0,60)	0,001*
TUNEL	0,25 (0,00-1,00)	0,25 (0,00-1,25)	0,00 (0,00-0,25)	0,189

* $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmektedir.

4. TARTIŞMA

MetS, ortak genetik ve çevresel ortamlarda gelişen, obezite, hiperinsülinemi, hiperlipidemi ve hipertansiyon ile karakterize olan, tip 2 diyabet için ciddi risk faktörü oluşturan bir patolojidir (Hanson ve ark., 2002). MetS oluşumunda bilinen en genel etki vücuda alınan enerjinin harcanan enerjiden oranca fazla olmasıdır. Bu bilgi ışığında fiziksel aktivite eksikliği ile dengesiz ve aşırı beslenme birlikte insülin direncine yol açarak MetS oluşumuna zemin hazırlamaktadır (Meigs ve ark., 2002). Hareketsiz yaşam tarzı ve beslenme alışkanlıklarının değişmesiyle birlikte tüm dünyada MetS'ten etkilenen insan sayısı hızlı bir şekilde artış göstermektedir. MetS prevalansı yaş ile birlikte artmaktadır. 20-29 yaş grubunda %6,7, 60-69 yaş grubunda ise %43,5 olarak görülmektedir (Arslan ve ark., 2009). Türkiye'de 2013 yılında yapılan TEKHARF çalışmasına göre 40 yaş ve üzerinde MetS prevalansı % 53'tür (Onat ve ark., 2013).

Literatürde genetik, farmakolojik ve özel diyetlerle oluşturulan çok sayıda MetS deney modeli bulunmaktadır (Wong ve ark., 2016). Ancak, klinikte rastlanan MetS etiyolojisine en yakın deneysel MetS hayvan modeli, yüksek karbonhidratlı diyetle beslenme sonucunda oluşmaktadır (Panchal ve ark., 2011). Bu nedenle MetS'li sıçan kortikal nöronlarında ER stres belirteçlerini araştırmayı planladığımız bu çalışmamızda, 20 hafta boyunca %32 oranında süktroz içeren çeşme suyu ile beslenen sıçanlarda MetS deney modelinin oluşumunu doğrulamayı amaçladık. %32 oranında süktroz içeren çeşme suyu ile beslenen sıçanların vücut ağırlığı, açlık kan glukozu, arteriyel kan basıncı, serum insülin seviyelerinin ölçülmesi sonucunda deney hayvanlarında bu değerlerin, normal çeşme suyu ile beslenen deney hayvanlarına oranla artmasıyla birlikte MetS deney modelinin oluşumunu doğruladık.

MetS oluşumunda hem insülin direnci hem de abdominal obezite önemli faktörler olarak düşünülmektedir. İnsülin direnci, dolaşımda insülin bulunmasına rağmen biyolojik etkilerini gösterememesi olarak tanımlanmaktadır. İnsülin

direncinin temelinde özellikle dokuların insülin aracılı glukoz kullanımının azalması ve karaciğerde glukoz sentezinin artmasıyla birlikte ortaya çıkan metabolik bozukluk rol oynamaktadır.

Klinikte çeşitli durumlarda kan şekerini normale getirmek, olası komplikasyonları önlemek ve önlenemeyecek düzeyde komplikasyonlar oluşmuşsa ilerlemeyi durdurmak için hastalara egzojen insülin verilebilmektedir. Tip 1 diyabeti olan kişilerin egzojen insüline, Tip 2 diyabetli kişilerden daha duyarlı olduğu bilinmektedir (Ulu ve Yüksel, 2015). Bu bilgilere dayanarak MetS+İnsülin grubumuzdaki MetS gelişmiş sıçanlara, 15 gün süreyle 3 IU/gün dozunda subkutan olarak egzojen insülin uygulaması gerçekleştirdik. Sıçanlara uyguladığımız egzojen insülinin MetS deney modeli üzerindeki etkilerini görmek için vücut ağırlığı, açlık kan glukozu, arteriyal kan basıncı, serum insülin seviyelerinin ölçümünü gerçekleştirdik. Elde ettiğimiz değerler sonucunda egzojen insülinin MetS deney modelinde açlık kan glukozu, serum insülin seviyeleri ve HOMA-IR değerleri üzerinde azaltıcı etkisi olduğunu gördük.

Hiperglisemi ve bozulmuş glukoz toleransı, insulin direnci ve stres aktivasyonunun oluşmasında rol oynayan en önemli faktörlerdir. Bununla birlikte strese yönelik cevap oluşumunda endoplazmik retikulum önemli rol oynamaktadır. Hücrelerde protein sentezi ve katlanması ER’de meydana gelir. ER’nin en önemli görevlerinden biri proteinlerin doğru katlanıp katlanmadığının kontrolü ve yanlış katlanmış proteinlerin düzeltilmesi veya düzeltilemiyorsa yıkılarak ortadan kaldırılmasıdır. Çeşitli fizyolojik ve patolojik durumlarda ER fonksiyon kapasitesi aşılmalıdır ve sonuçta ER lümeninde katlanmamış ve/veya yanlış katlanmış proteinler birikerek ER stresi ortaya çıkmaktadır (Schroder ve Kaufman, 2005). ER stresinin oluşması ile hücrede homeostazın yeniden sağlanması ve stresten en az hasarla kurtulabilmesi için katlanmamış protein yanıtı (KPY) aktif hale gelir. KPY’nın asıl fonksiyonu hücrenin sağkalımını sağlamaktır. Sağkalımı sağlamak için, ER lümeninde biriken katlanmamış ve/veya yanlış katlanmış proteinlerin doğru bir şekilde katlanmasını sağlamak üzere ER kapasitesini ve protein katlanmasında rol oynayan şaperonların sentezini artırır. Yanlış katlanan proteinlerin düzeltilememesi

sonucunda bu proteinler, ER yükünü azaltmak için, yıkılmak üzere übikütün-proteazom sistemine gönderilir. Bu koşullara rağmen adaptasyonunu sağlayamayan hücreler apoptoza gönderilerek çevredeki diğer hücrelere zarar vermesi önlenir (Sano ve Reed, 2013). KPY, ER membranında bulunan stres sensörleri ve gen ekspresyonlarını yeniden düzenleyen ya da pro-apoptotik yolağı indükleyen transkripsiyon faktörlerinden oluşmaktadır (Hetz ve Saxena, 2017). KPY'nin başlatılmasında, ER membranında bulunan 3 temel tip-1 transmembran proteini rol oynamaktadır: IRE1 α , PERK ve ATF6.

Güncel çalışmalardan elde edilen bulgulara MetS'de ER stresinin aktif hale geldiği gösterilmiştir. Hipotalamusta meydana gelen ER stresi, leptin/insülin sinyalinde direnç ve inflamasyona yol açmaktadır. Yağ dokusunda oluşan ER stresi adipokininlerin sentezine neden olan inflamasyonu kolaylaştırırken, hepatik ER stresi insülin direncinin oluşumu ve gelişimine neden olmaktadır. ER stresi otofajiyi aktifleştirirken, otofaji de ER stresinin artmasına yol açabilmektedir. ER stresi ve ilişkili olduğu bu hücresel durumlar, insülin sinyalizasyonunu tehlikeye atarak MetS oluşumu ve gelişimine katkıda bulunmaktadır.

Bununla birlikte diyabet ve nörodejeneratif hastalıklar, KPY'nin ortaya çıktığı patolojik durumlardır. Tip 1 ve Tip 2 diyabette ER stresi, insülin sinyal mekanizmasının bozulmasına yol açmaktadır. Özellikle pankreastaki β -hücrelerinde proinsülin sentezi sırasında PERK-eIF2 α sinyal yolağının ER'de sentezle ilişkili mekanizmalar üzerinde etkili olduğu görülmüştür (Kadowaki ve Nishitoh, 2013).

Prefrontal korteks, frontal lobun üst kısmını kaplayan serebral korteks bölgesidir. Dikkatin sürdürülmesi, yazılan sözcüklerin tanınması, çalışan bellek, konuşma kabiliyeti, planlama ve kontrol etme gibi birçok bilişsel fonksiyonda prefrontal kortekste bulunan bölgeler rol oynamaktadır (Teffer ve Semendeferi, 2012).

Bu tez çalışmasındaki asıl amacımız prefrontal kortekste bulunan kortikal nöronlarda ER stresi ile MetS arasındaki etkileşimin ve egzogen insülinin bu etkileşim üzerindeki etkilerinin ortaya konulmasıdır. ER stres belirteçleri ile gerçekleştirdiğimiz immünohistokimya ve Western blotlama deneyleri sonucunda gruplar arasında ATF6, EDEM, pIRE1 α , GRP78 ve apoptozla ilişkili olarak da Caspase 3 aktivasyonunda istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür.

GRP78, normal koşullarda IRE1 α , PERK ve ATF6 proteinlerinin ER lümenine bakan yüzleri ile fiziksel etkileşim halindedir ve inaktiftir. ER stresi geliştiğinde, stres düzenleyici yolları aktive etmek üzere IRE1 α , PERK ve ATF6 ile fiziksel etkileşimi ortadan kalkar ve ER lümeninde katlanmamış proteinlere bağlanır (Zhu ve Lee, 2015). GRP78 aktivitesindeki artış ER stresinin en belirgin göstergesidir. Çalışmamızda MetS ve MetS+İnsülin gruplarındaki GRP78 ekspresyonlarının kontrol grubuna oranla daha yüksek olduğu görülmüş fakat bu oran istatistiksel olarak anlamlı görülmemiştir. İnsülin uygulanan grupta, MetS grubuna oranla, GRP78 ekspresyonlarında azalma görülmüş ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu veriler egzogen insülinin ER stres oluşumunun azaltılmasında rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

ATF6, ER lümeninde katlanmamış ve/veya yanlış katlanmış proteinlerin ERAD yoluyla yıkılmasında rol oynayan genler ve protein katlanmasında rol oynayan şaperonların ekspresyonlarını indüklemektedir (Walter ve Ron, 2011). Çalışmamızda MetS ve MetS+İnsülin grubunda bulunan piramidal nöronlarda ATF6 ekspresyonunun azaldığı görülmüştür. Özellikle kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MetS+İnsülin grubundaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. MetS+İnsülin grubundaki azalmanın, ATF6 ile XBP1'in beraber düzenledikleri genler ve ERAD gibi süreçler üzerinde etkili genlerin düzenlenmesi konusunda çeşitli sonuçlara yol açacağı düşünülmektedir (Credle ve ark., 2015).

EDEM, ER lümeninde artmış olan katlanmamış ve/veya hatalı katlanmış proteinleri tanıyarak ER lümeninden retrotranslokasyon ile sitozole çıkarılmasında

ve ERAD yolağı ile ortadan kaldırılmasında rol oynamaktadır. Çalışmamızda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MetS ve MetS+İnsülin gruplarında EDEM ekspresyonlarındaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. MetS ve MetS+İnsülin grubunda EDEM ekspresyonlarında meydana gelen artış, bu gruplarda olası hücre içi protein birikimini önlemek üzere ERAD yolağının aktifleştüğünü düşündürmektedir.

p-IRE1 α , ER membranında bulunan IRE1 α 'nın ER stresi sonucunda aktivasyonu ile dimerleşme ve otofosforilasyon göstermesiyle oluşur ve sitoplazmada bulunan endoribonükleaz bölgesi ile XBP1 transkripsiyon faktörünün eksprese olmasını sağlar (Walter ve Ron, 2011). Aktif hale gelen XBP1, protein katlama ve kontrol mekanizmalarını ve ERAD sistemini aktifleştiren çeşitli genlerin ekspresyonlarını indükleyerek sağkalımı sağlar. Çalışmamızda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MetS ve MetS+İnsülin gruplarında p-IRE1 α ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı artmış ekspresyon gözlemlenmiştir. MetS ve MetS+İnsülin gruplarındaki p-IRE1 α artışının, bu gruplarda kronik ER stresine karşı seçici hassasiyet sağlayabileceği düşünülmektedir (Lee ve ark., 2012).

Caspase 3, kaspaz aktivasyon kaskadında apoptozun birincil uygulayıcısıdır. ER stresi varlığında, ER membranında bulunan Caspase-12 tarafından parçalanır ve hücrenin apoptozunu indükler (Liu ve ark., 2013). Caspase 3 hücrede apoptozun erken aşamasını, TUNEL ise apoptozun son aşamasında DNA kırıklarını göstermektedir. Çalışmamızda kontrol grubu ve deney grupları arasında pro-Caspase12 ekspresyonları açısından anlamlı bir fark ortaya çıkmamıştır. Fakat Caspase 3 ile yapılan incelemelerde MetS ve MetS+İnsülin gruplarında Caspase 3 aktivasyonun arttığı görülmüştür. TUNEL işaretlemeleri açısından ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir. Elde edilen sonuçlar, MetS ve MetS+İnsülin gruplarında ER stresinden bağımsız olarak Caspase 3'ün aktif hale geldiğini fakat nöronal apoptozun gruplar arasında anlamlı seviyelerde olmadığını düşündürmektedir.

Çalışmamızdan elde ettiğimiz bilgiler ışığında, insülin direnci ile gelişen MetS’de ER stres yollarından IRE1 α , PERK ve ATF6 ve ERAD yolağıyla ilişkili olarak EDEM farklı seviyelerde etkilenmektedir ve egzojen insülinin ER stresinin azaltılması üzerine anlamlı etkisinin olmadığı görülmüştür. Gelecekte prefrontal kortekste yer alan nöronlarda ER stresıyla ilişkili olarak daha ayrıntılı çalışmaların yapılması ve bu çalışmaların davranış testleriyle desteklenmesi, ER stresinin prefrontal korteks fonksiyonları üzerindeki etkilerini ortaya koymak açısından yararlı olacaktır.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Prefrontal kortekste bulunan kortikal nöronlarda ER stresi ve MetS arasındaki etkileşimin ve ekzojen insülin uygulamasının bu etkileşim üzerindeki etkilerinin ortaya konulmasını amaçladığımız çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar şu şekildedir;

- 20 hafta boyunca %32 oranında sükröz içeren çeşme suyu ile beslenen sıçanlarda MetS deney modelinin oluşumu insülin direnci, glukoz intoleransı, hipertansiyon ve hiperglisemi oluşumunun tespit edilmesiyle doğrulandı.
- MetS+İnsülin grubunda bulunan deney hayvanlarına 15 gün boyunca 3 IU/gün dozunda subkutan olarak insülin uygulandı ve bu deney hayvanlarında insülin direnci, glukoz intoleransı, hipertansiyon ve hiperglisemi değerlerinin azalması sonucunda insülin uygulamasının MetS'in biyokimyasal süreçlerinde düzelmelere yol açtığı görüldü.
- Çalışmamızda MetS ve MetS+İnsülin grubunda bulunan piramidal nöronlarda ATF6 ekspresyonunun azaldığı; özellikle kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MetS+İnsülin grubundaki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu.
- Çalışmamızda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MetS ve MetS+İnsülin grupları arasındaki GRP78 ekspresyonlarındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. MetS grubu ile karşılaştırıldığında MetS+İnsülin grubunda GRP78 ekspresyonlarındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı görüldü.
- Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MetS ve MetS+İnsülin gruplarında EDEM ekspresyonlarındaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu.
- Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MetS ve MetS+İnsülin gruplarında pIRE1 α ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu görüldü.

- Çalışmamızda kontrol grubu ve deney grupları arasında Caspase 3 ile yapılan incelemelerde MetS ve MetS+İnsülin gruplarında Caspase 3 aktivasyonun arttığı izlendi.

ER stresinin, insülin sinyal yolağının düzenlenmesinde fizyolojik ve fizyopatolojik rol oynadığı ve bu düzenlenmeyle birlikte MetS oluşumunda etkili olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışma prefrontal kortekste bulunan kortikal nöronlarda ER stresi ve MetS üzerine gerçekleştirilen ilk çalışmadır. Bu yönüyle çalışmamızdan elde edilen bulgular, ER stresi ve MetS arasındaki ilişkinin ortaya koyulması açısından öncü bir çalışma niteliği taşımaktadır. Bu ilişkinin ortaya konmasında, gelecekte beynin farklı bölgelerinde yapılacak çalışmaların faydalı olacağı sonucuna vardık.

ÖZET

Metabolik sendromlu sıçan kortikal nöronlarında endoplazmik retikulum stresiyle ilgili faktörlerin araştırılması

Metabolik sendrom (MetS), insülin direnci temelinde ortaya çıkan ve klinik tablosunda glukoz intoleransı veya tip 2 diyabet, abdominal obezite, hipertansiyon, hiperlipidemi ile karakterize; proinflamatuvar ve protrombotik öğeleri bulunduran ve prematüre aterosklerozun yer aldığı artmış kardiyovasküler hastalık riski oluşturan bir patolojidir. MetS'in en önemli parametrelerinden birisi insülin direncidir. Endoplazmik retikulumun (ER) normal fonksiyonunun bozulması sonucu ER stresi ortaya çıkmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar insülin sinyal yolağının düzenlenmesinde ER stresinin önemli bir rol oynadığını göstermektedir. ER stresinin metabolik hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar ve kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli patolojik koşulları tetiklediği bilinmektedir. Bu nedenle çalışmamızda, MetS modeli oluşturulmuş sıçanların kortikal nöronlarında ER stresinin varlığını ve egzogen insülinin ER stresi üzerine etkilerini göstermek üzere ER stresiyle ilişkili belirteçlerin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda 3 grup içinde toplam 30 adet 2 aylık Wistar albino erkek sıçan kullanılmıştır. Kontrol grubunda yer alan sıçanlar (n=10) standart sıçan yemi ve çeşme suyu ile beslenirken, MetS (n=10) ve MetS+İnsülin (n=10) grupları standart sıçan yemine ek olarak %32 sükröz içeren çeşme suyu ile 20 hafta boyunca beslenmiştir. 20 haftalık süre sonucunda MetS ve MetS+İnsülin gruplarında MetS deney modelinin oluşumu bozulmuş glukoz toleransı, insülin direnci, arteriyel kan basıncında artış ve serum insülin seviyesinde artış sonucunda doğrulanmıştır. MetS deney modelinin oluşumu doğrulandıktan sonra MetS+İnsülin grubundaki deney hayvanlarına 15 gün boyunca 3 IU/gün dozunda subkutan insülin uygulanmıştır. Bu sürenin sonunda deney hayvanları kurban edilerek beyinleri çıkarılmıştır. Çıkarılan beyinlerde sol hemisfere ait prefrontal korteks bölgesi Western blotlama deneylerinde kullanılırken sağ hemisfere ait prefrontal korteks bölgesi ışık mikroskopik incelemeler için kullanılmıştır. Deney hayvanlarından elde edilen beyin dokularında ER stres belirteçlerinden IRE1 α , p-IRE1, PERK, p-PERK, ATF6, GRP78, GSK3 α/β ve pro-Caspase 12 ile apoptoz belirteçlerinden Caspase 3 ve TUNEL için incelemeler gerçekleştirilmiştir. İncelemeler sonucunda elde edilen veriler IBM SPSS 22 programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Hematoksilin-Eozin ve Krezil Viyole boyamaları ile gerçekleştirilen genel doku incelemelerinde gruplar arasında belirgin farklılıklar görülmemiştir. İmmünohistokimyasal işaretlemeler ve Western blotlama deneylerinden elde edilen bulgulara kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MetS ve MetS+İnsülin gruplarında ATF6 ekspresyonundaki azalma ile EDEM, p-IRE1, GRP78 ve Caspase 3 protein ekspresyonlarındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu çalışmanın sonuçları, kortikal nöronlarda ER stresi ve MetS arasındaki ilişkinin ortaya konulması açısından önemli bilgiler sunmaktadır.

Anahtar sözcükler: apoptoz, ER stresi, insülin direnci, kortikal nöron, metabolik sendrom

SUMMARY

Investigation of endoplasmic reticulum stress markers at cortical neurons of rats with metabolic syndrome

Metabolic syndrome (MetS) emerges with the basis of insulin resistance and characterized by glucose intolerance or type 2 diabetes, abdominal obesity, hypertension, hyperlipidemia at the clinical profile; it contains proinflammatory and prothrombotic items and it's defined as a pathology that increased risk of cardiovascular disease involving premature atherosclerosis. One of the most important parameters of MetS is the insulin resistance. Disturbance of the normal function of the endoplasmic reticulum (ER) causes ER stress. Recent studies show that ER stress plays an important role in the regulation of the insulin signaling pathway. It is known that ER stress triggers various pathological conditions such as metabolic diseases, neurodegenerative diseases and cardiovascular diseases. Therefore, we aimed to investigate the presence of ER stress in cortical neurons of the MetS modeled rats and the effects of exogenous insulin on ER stress with the markers related to ER stress.

In this study 2 month old and a total number of 30 Wistar albino male rats in 3 groups were used. While rats in the control group (n = 10) were fed with standard rat diet and tap water, the groups of MetS (n = 10) and MetS + Insulin (n = 10) were fed with standard tap water containing 32% sucrose in addition to the standard rat diet for 20 weeks. At the end of the 20 weeks period, the formation of the MetS experimental model in the MetS and MetS + Insulin groups was confirmed with the results of impaired glucose tolerance, insulin resistance, increased arterial blood pressure and serum insulin levels. Once the formation of the MetS test model was confirmed, subcutaneous insulin was administered to the MetS + Insulin group animals at a dose of 3 IU /day for 15 days. At the end of this period, the animals were sacrificed and their brains removed. The brains' prefrontal cortex region of the left hemisphere was used in Western blotting experiments whereas the prefrontal cortex region of the right hemisphere was used for light microscopic investigations. The ER stress markers IRE1 α , p-IRE1, PERK, p-PERK, ATF6, GRP78, GSK3 α / β ; and pro-Caspase 12 and apoptosis markers Caspase 3 and TUNEL assays applied on the brains obtained from the experimental animals. The datas obtained with the results of the analyzes were statistically evaluated using the IBM SPSS 22 program.

There were no significant differences between the groups with the hematoxylin-eosin and Cresyl's violet staining. When compared with the control group, the increase in EDEM, p-IRE1, GRP78 and Caspase 3 protein expressions and the decrease in ATF6 expression in the MetS and MetS + insulin groups was found to be statistically significant with the results obtained from immunohistochemical markers and Western blotting experiments. The results of this study provide important information about the relationship between ER stress in cortical neurons and MetS.

Keywords: apopitosis, cortical neuron, ER stress, insülin resistance, metabolic syndrome

KAYNAKLAR

- AGUILERA, A. A., DIAZ, G. H., BARCELATA, M. L., GUERRERO, O. A. & ROS, R. M. 2004. Effects of fish oil on hypertension, plasma lipids, and tumor necrosis factor-alpha in rats with sucrose-induced metabolic syndrome. *J Nutr Biochem*, 15, 350-7.
- ANKEN, E. V. & SITIA, R. 2016. *The Endoplasmic Reticulum*, Elsevier.
- ARSLAN, M., ATMACA, A., AYVAZ, G., BAŞKAL, N., BEYHAN, Z., BOLU, E., CAN, S., ÇORAKÇI, A., DAĞDELEN, S., DEMİRAĞ, N. G., DEMİRER, A. N., ERBAŞ, T., GÜRSOY, A., GÜLLÜ, S., İLGİN, Ş. D., KARAKOÇ, A., KULAKSIZOĞLU, M., ŞAHİN, M., TANACI, N., TÖRÜNER, F., TÜTÜNCÜ, N. B., ÜÇKAYA, G., YETKİN, İ. & YILMAZ, M. 2009. Metabolik Sendrom Kılavuzu. In: DERNEĞİ, T. E. V. M. (ed.). Ankara: Tuna Matbaacılık San ve Tic. A.Ş.
- AŞAN, E. & DAĞDEVİREN, A. 2012. *Moleküler Histoloji Hücre*, Ankara, Atlas Kitapçılık.
- BAŞAKLAR, A. C. 2011. *Langman Medikal Embriyoloji*, Ankara, Palme Yayıncılık.
- BERNALES, S., MCDONALD, K. L. & WALTER, P. 2006. Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLoS Biol*, 4, e423.
- BRAVO, R., PARRA, V., GATICA, D., RODRIGUEZ, A. E., TORREALBA, N., PAREDES, F., WANG, Z. V., ZORZANO, A., HILL, J. A., JAIMOVICH, E., QUEST, A. F. & LAVANDERO, S. 2013. Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration. *Int Rev Cell Mol Biol*, 301, 215-90.
- BRODSKY, J. L. 2012. Cleaning up: ER-associated degradation to the rescue. *Cell*, 151, 1163-7.
- BRODSKY, J. L. & SKACH, W. R. 2011. Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum: Recent lessons from yeast and mammalian cell systems. *Curr Opin Cell Biol*, 23, 464-75.
- CLAPHAM, D. E. 2007. Calcium signaling. *Cell*, 131, 1047-58.
- COELHO, D. S. & DOMINGOS, P. M. 2014. Physiological roles of regulated Ire1 dependent decay. *Front Genet*, 5, 76.
- CORNIER, M. A., DABELEA, D., HERNANDEZ, T. L., LINDSTROM, R. C., STEIG, A. J., STOB, N. R., VAN PELT, R. E., WANG, H. & ECKEL, R. H. 2008. The metabolic syndrome. *Endocr Rev*, 29, 777-822.
- CREDLE, J. J., FORCELLI, P. A., DELANNOY, M., OAKS, A. W., PERMAUL, E., BERRY, D. L., DUKA, V., WILLS, J. & SIDHU, A. 2015. alpha-Synuclein-mediated inhibition of ATF6 processing into COPII vesicles disrupts UPR signaling in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 76, 112-25.
- ELLGAARD, L. & HELENIUS, A. 2003. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 181-91.

- EROSCHENKO, V. P. 2013. *diFiore's Atlas of Histology with Functional Correlations*, Lippincott Williams & Wilkins.
- FAGONE, P. & JACKOWSKI, S. 2009. Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function. *J Lipid Res*, 50 Suppl, S311-6.
- FAROOQUI, A. A., FAROOQUI, T., PANZA, F. & FRISARDI, V. 2012. Metabolic syndrome as a risk factor for neurological disorders. *Cell Mol Life Sci*, 69, 741-62.
- FUSTER, J. M. 2008. Chapter 2 - Anatomy of the Prefrontal Cortex. *The Prefrontal Cortex (Fourth Edition)*. San Diego: Academic Press.
- GILMORE, R., BLOBEL, G. & WALTER, P. 1982. Protein translocation across the endoplasmic reticulum. I. Detection in the microsomal membrane of a receptor for the signal recognition particle. *J Cell Biol*, 95, 463-9.
- HANSON, R. L., IMPERATORE, G., BENNETT, P. H. & KNOWLER, W. C. 2002. Components of the "metabolic syndrome" and incidence of type 2 diabetes. *Diabetes*, 51, 3120-7.
- HETZ, C., CHEVET, E. & OAKES, S. A. 2015. Proteostasis control by the unfolded protein response. *Nat Cell Biol*, 17, 829-38.
- HETZ, C. & MOLLEREAU, B. 2014. Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*, 15, 233-49.
- HETZ, C. & SAXENA, S. 2017. ER stress and the unfolded protein response in neurodegeneration. *Nat Rev Neurol*, 13, 477-491.
- HEUSON-STIENNON, J. A., WANSON, J. C. & DROCHMANS, P. 1972. Isolation and characterization of the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *J Cell Biol*, 55, 471-88.
- HOTAMISLIGIL, G. S. 2010. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell*, 140, 900-17.
- HÜRDAĞ, C. 2016. *BRS Hücre Biyolojisi ve Histoloji*, İstanbul Tıp Kitabevi.
- İREZ, T. & ERKAN, M. 2016. *BRS Embriyoloji*, İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi.
- KADOWAKI, H. & NISHITOH, H. 2013. Signaling pathways from the endoplasmic reticulum and their roles in disease. *Genes (Basel)*, 4, 306-33.
- LEE, H., NOH, J. Y., OH, Y., KIM, Y., CHANG, J. W., CHUNG, C. W., LEE, S. T., KIM, M., RYU, H. & JUNG, Y. K. 2012. IRE1 plays an essential role in ER stress-mediated aggregation of mutant huntingtin via the inhibition of autophagy flux. *Hum Mol Genet*, 21, 101-14.
- LIU, D., ZHANG, M. & YIN, H. 2013. Signaling pathways involved in endoplasmic reticulum stress-induced neuronal apoptosis. *Int J Neurosci*, 123, 155-62.
- LIU, Y. & CHANG, A. 2008. Heat shock response relieves ER stress. *EMBO J*, 27, 1049-59.
- MEIGS, J. B., NATHAN, D. M., D'AGOSTINO, R. B., SR., WILSON, P. W. & FRAMINGHAM OFFSPRING, S. 2002. Fasting and postchallenge glycemia and cardiovascular disease risk: the Framingham Offspring Study. *Diabetes Care*, 25, 1845-50.
- MEISINGER, C., KOLETZKO, B. & HEINRICH, J. 2006. Metabolic syndrome: older than usually assumed, but still too young to die. *Clin Chem*, 52, 897-8; author reply 898-9.

- MEUSSER, B., HIRSCH, C., JAROSCH, E. & SOMMER, T. 2005. ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol*, 7, 766-72.
- MILLER, E. K., FREEDMAN, D. J. & WALLIS, J. D. 2002. The prefrontal cortex: categories, concepts and cognition. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 357, 1123-36.
- MÜFTÜOĞLU, S., KAYMAZ, F. & ATILLA, P. 2009. *Netter Temel Histoloji*, Ankara, Güneş Tıp Kaitapevi.
- NAKAGAWA, T., ZHU, H., MORISHIMA, N., LI, E., XU, J., YANKNER, B. A. & YUAN, J. 2000. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*, 403, 98-103.
- O'NEILL, S. & O'DRISCOLL, L. 2015. Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. *Obes Rev*, 16, 1-12.
- OGEN-SHTERN, N., BEN DAVID, T. & LEDERKREMER, G. Z. 2016. Protein aggregation and ER stress. *Brain Res*, 1648, 658-666.
- ONAT, A., YUKSEL, M., KOROGU, B., GUMRUKCUOGLU, H. A., AYDIN, M., CAKMAK, H. A., KARAGOZ, A. & CAN, G. 2013. [Turkish Adult Risk Factor Study survey 2012: overall and coronary mortality and trends in the prevalence of metabolic syndrome]. *Turk Kardiyol Dern Ars*, 41, 373-8.
- OZCAN, L. & TABAS, I. 2012. Role of endoplasmic reticulum stress in metabolic disease and other disorders. *Annu Rev Med*, 63, 317-28.
- PANCHAL, S. K., POUDYAL, H., IYER, A., NAZER, R., ALAM, M. A., DIWAN, V., KAUTER, K., SERNIA, C., CAMPBELL, F., WARD, L., GOBE, G., FENNING, A. & BROWN, L. 2011. High-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, 57, 611-24.
- REAVEN, G. M. 1988. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, 37, 1595-607.
- REMONDELLI, P. & RENNA, M. 2017. The Endoplasmic Reticulum Unfolded Protein Response in Neurodegenerative Disorders and Its Potential Therapeutic Significance. *Front Mol Neurosci*, 10, 187.
- ROSS, M. H. & PAWLINA, W. 2011. *Histology: A Text and Atlas : with Correlated Cell and Molecular Biology*, Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health.
- RUGGIANO, A., FORESTI, O. & CARVALHO, P. 2014. Quality control: ER-associated degradation: protein quality control and beyond. *J Cell Biol*, 204, 869-79.
- SANO, R. & REED, J. C. 2013. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, 1833, 3460-70.
- SCHRODER, M. & KAUFMAN, R. J. 2005. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res*, 569, 29-63.
- SCHWARZ, D. S. & BLOWER, M. D. 2016. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol Life Sci*, 73, 79-94.

- SHAH, S. Z., ZHAO, D., KHAN, S. H. & YANG, L. 2015. Unfolded Protein Response Pathways in Neurodegenerative Diseases. *J Mol Neurosci*, 57, 529-37.
- STOLZ, A. & WOLF, D. H. 2010. Endoplasmic reticulum associated protein degradation: a chaperone assisted journey to hell. *Biochim Biophys Acta*, 1803, 694-705.
- TEFFER, K. & SEMENDEFERI, K. 2012. Human prefrontal cortex: evolution, development, and pathology. *Prog Brain Res*, 195, 191-218.
- THIBAUT, G. & NG, D. T. 2012. The endoplasmic reticulum-associated degradation pathways of budding yeast. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4.
- ULU, M. S. & YÜKSEL, Ş. 2015. İnsülin Direnci. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 16, 238-243.
- ÜÇLER, R. 2014. Metabolik Sendrom. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 12, 153-157.
- VARGHESE, F., BUKHARI, A. B., MALHOTRA, R. & DE, A. 2014. IHC Profiler: an open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. *PLoS One*, 9, e96801.
- VASANJI, Z., CANTOR, E. J., JURIC, D., MOYEN, M. & NETTICADAN, T. 2006. Alterations in cardiac contractile performance and sarcoplasmic reticulum function in sucrose-fed rats is associated with insulin resistance. *Am J Physiol Cell Physiol*, 291, C772-80.
- VEMBAR, S. S. & BRODSKY, J. L. 2008. One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 944-57.
- VOELTZ, G. K. & PRINZ, W. A. 2007. Sheets, ribbons and tubules - how organelles get their shape. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 258-64.
- VOELTZ, G. K., PRINZ, W. A., SHIBATA, Y., RIST, J. M. & RAPOPORT, T. A. 2006. A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum. *Cell*, 124, 573-86.
- WALTER, P. & RON, D. 2011. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, 334, 1081-6.
- WANG, M. & KAUFMAN, R. J. 2016. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature*, 529, 326-35.
- WEST, M., ZUREK, N., HOENGER, A. & VOELTZ, G. K. 2011. A 3D analysis of yeast ER structure reveals how ER domains are organized by membrane curvature. *J Cell Biol*, 193, 333-46.
- WONG, S. K., CHIN, K. Y., SUHAIMI, F. H., FAIRUS, A. & IMA-NIRWANA, S. 2016. Animal models of metabolic syndrome: a review. *Nutr Metab (Lond)*, 13, 65.
- YOSHIDA, H. 2007. ER stress and diseases. *FEBS J*, 274, 630-58.
- ZHU, G. & LEE, A. S. 2015. Role of the unfolded protein response, GRP78 and GRP94 in organ homeostasis. *J Cell Physiol*, 230, 1413-20.

EKLER

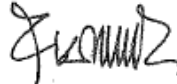
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARAR ÖRNEĞİ

TOPLANTI TARİHİ : 24/02/2016
TOPLANTI NO : 2016-5
DOSYA NO : 2016-45
KARAR NO : 2016-5-52

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Belgin Can'ın yaptığı, araştırmacı olarak Prof.Dr.Belma Turan, Yrd.Doç.Dr.Deniz Billur, Yrd.Doç.Dr.Hilal Göktürk, Arş.Gör.Pınar Bayram, Arş.Gör.Ayşegül Toy Durak, Arş.Gör.Yusuf Olgar ve Uzm.Bio.Şule Kızıl'ın katıldığı "Metabolik Sendromlu Sıçan Kortikal Nöronlarında Endoplazmik Retikulum Stresiyle İlgili Faktörlerin Araştırılması" başlıklı araştırma projesinin içeriği Kurulumuzca incelenmiş olup, söz konusu çalışmanın Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre aşağıda belirtilen kapsamda yapılmasına oy birliğiyle karar verilmiştir.

Hayvan Türü : Sıçan
Hayvan Sayısı : 30
Geçerlilik Süresi : 01/06/2016-/01/12/2017

ASLININ AYNIYDIR
24/02/2016



Prof.Dr.M.Taner KARAOĞLU
A.Ü. HADYЕК Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

I - Bireysel Bilgiler:

Adı	Şule
Soyadı	KIZIL
Doğum yeri ve tarihi	Ankara, 11.09.1988
Medeni Durumu	Bekâr
İletişim adresi ve telefonu	Aktepe Mh. 951. Cd. 1003. Sk. Ökten Apt. 4/2 Keçiören/Ankara, 05548658644

II - Eğitim:

2014-	Doktora, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı (Tıp) (Tez Başlığı: Metabolik Sendromlu Sıçan Kortikal Nöronlarında Endoplazmik Retikulum Stresiyle İlgili Faktörlerin Araştırılması)
2011-2014	Yüksek Lisans, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı (Tıp) (Tez Başlığı: Tekrarlayan Gebelik Kaybı Olgularında Endometriyal Reseptivitede Adezyon ve Anti-Adezyon Moleküller ile Transkripsiyon Moleküllerinin Araştırılması)
2006-2010	Lisans, Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü
Yabancı Dil	İngilizce (YÖKDİL-2017: 82,5)

III - Ünvanları:

2014-

Uzman Biyolog

IV - Mesleki Deneyim:

V - Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar:

2014

Türk Histoloji Embriyoloji Derneği

VI – Bilimsel İlgi Alanları:

Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler:

- B Ozturk, O Ozer, ZE Durak, D Billur, S Kizil, I Durak, HS Ozturk. High cholesterol diet leads to oxidant load and peroxidation in the rabbit kidney tissue. Bratisl Lek Listy. 2016;117(4):235-41.
- M Ozgur Taskapilioglu, Deniz Billur, Sule Kizil, Ozlem Taskapilioglu, Gokhan Ocakoglu, Sevim Aydin, Ahmet Bekar, Agahan Unlu: Targeting apoptosis through Foxp1, and N-cadherin with glatiramer acetate in chick embryos during neural tube development. Date Accepted: Jun 18, 2015. DOI: 10.5137/1019-5149.JTN.14518-15.3.
- EN Okatan, S Kizil, H Gokturk, B Can, B Turan. High-carbohydrate diet-induced myocardial remodelling in rats. CurrResCardiol 2015;2(1), 5-10
- Ozkavukcu S, Ibis E, Kizil S, Isbacar S, Aydos K. A laboratory modification to testicular sperm preparation technique improves spermatogenic cell yield. Asian J Androl. 2014 Jul 1. doi: 10.4103/1008-682X.132468

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler

- Effects of human umbilical cord mesenchymal stromal cells on third degree skin burn wound healing in rats. Ozgur Cinar, Mina Ardic, Sule Kizil, Alp Can. The International Society for Stem Cell Research (ISSCR 2017) Annual Meeting, June, 14-17, 2017, Boston, USA. Poster Sunumu.
- Histopathological evaluation of desferrioxamine effect on fat graft viability. Bahadır Çelik, Deniz Billur, Pınar Bayram, Hilal Nakkaş, Şule Kızıl, Belgin Can, Kutlu Sevin. 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (IHC 2017), May, 18-21, 2017, Antalya, Turkey. Poster Sunumu.
- Immunohistochemical analysis of the antifibrotic effect of pirfenidone on epidural fibrosis in the post-laminectomy rat model. Deniz Billur, Yahya Güvenç, Mesut Emre Yaman, Yaşar Öztürk, Pınar Bayram, Şule Kızıl, Sevim Aydın, Erkan Kaptanoğlu. 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (IHC 2017), May, 18-21, 2017, Antalya, Turkey. Poster Sunumu.
- Structural effects of microneedling and topical retinol palmitate on burn wounds. Elçin S.Alpat, Burak Kaya, Hilal Nakkaş, Pınar Bayram, Şule Kızıl, Belgin Can, Serdar Mehmet Gültan. 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (IHC 2017), May, 18-21, 2017, Antalya, Turkey. Sözlü Sunum.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

- Deneysel tip 1 Diabetes Mellitus'ta antrenmanın akciğerler üzerindeki etkisi. Göktuğ Ömercioğlu, Ali Doğan Dursun, Metin Baştuğ, Şule Kızıl, Pınar Bayram, Hakan Fıçıcılar, Belgin Can, Hümeysra Çolaker, Yakup Tatar. Türkiye Solunum Araştırmaları Derneği 38. Ulusal Kongresi (Solunum 2016), 15-19 Ekim 2016, İzmir. Sözlü Sunum.

- Microanatomic examination of histological sections taken from silicone plastinates. Geneci F, Ocak M, Uzuner MN, Bayram P, Kızıl Ş, Billur D, Sargon MF. 17. Ulusal Anatomi Kongresi, 5-9 Eylül 2016, Eskişehir. Sözlü Sunum.
- Hiperkolesterolemik diyet etkisinde tavşan aort duvarında histopatolojik ve ultrastrüktürel değişikliklerin gösterilmesi. Özkan Özer, Deniz Billur, Şule Kızıl, Pınar Bayram, Masoud Afshani, Nurten Türközkan, H. Serdar Öztürk. 6th International Scientific Conference of Iranian Academicians in Turkey, 26 Mayıs 2016, Ankara. Poster Sunumu.
- An overview to trauma from subfornical organ window. Deniz Billur, Nurullah Edebalı, Pınar Bayram, Şule Kızıl, Hilal Göktürk, Belgin Can, Bektaş Açıkgöz. 14. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 26-29 Mayıs 2016, Ankara. Poster Sunumu.
- Plantago major'un hiperkolesterolemik diyetle ateroskleroz oluşturulan tavşanlarda ateroskleroz ve aterosklerotik risk faktörleri üzerine etkileri. Özkan Özer, Deniz Billur, Şule Kızıl, Pınar Bayram, Masoud Afshani, Nurten Türközkan, Hasan Serdar Öztürk. XIII. Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 30 Nisan - 3 Mayıs 2016, İzmir. Poster Sunumu.
- Kıkırdak hasarlarında geometrik şeklin iyileşmeye etkisinin histolojik olarak incelenmesi. Savaş Serel, Şule Kızıl, Hilal Göktürk, Cem Çerkez, Servet Elçin Alpat, Polat Yiğit, Belgin Can. XIII. Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 30 Nisan - 3 Mayıs 2016, İzmir. Poster Sunumu.
- Kan sinir bariyeri: Sıçan siyatik sinirinde histolojik yöntemlerle gösterilmesi. Deniz Billur, Pınar Bayram, Şule Kızıl, Sevim Aydın, Belgin Can. 13. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 30 Nisan-03 Mayıs 2015, Konya. Poster Sunumu.
- Tekrarlayan gebelik kaybı olgularında endometriyal reseptivitede adezyon ve anti-adezyon moleküller ile transkripsiyon moleküllerinin araştırılması. Şule Kızıl, Deniz Billur, Berfu Demir, Belgin Can, Burcu Sağlam Ada, Berna Dilbaz, Sevim Aydın. XII. Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 27-30 Mayıs 2014, Ankara. Sözlü Sunum.
- Kan testis bariyerinin bozulması spermatogenezi etkiler mi? Sevim Aydın, Deniz Billur, Sinan Özkavukçu, Ferda Topal Çelikkan, Şule Kızıl, Kaan

Aydos, Esra Erdemli. XII. Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 27-30 Mayıs 2014, Ankara. Poster Sunumu.

- Pre-diyabet oluşturulmuş sıçanlarda kardiyomiyositlerin ışık mikroskopunda değerlendirilmesi. Göktürk H, Kızıl Ş, Okatan EN, Can B, Turan B. XII. Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 27-30 Mayıs 2014, Ankara. Poster Sunumu.
- Sıçanlarda periferik sinir travması sonrası perinöral hücrelerin immünohistokimyasal ve ultrastrüktürel olarak incelenmesi. Deniz Billur, Pınar Bayram, Şule Kızıl, Sevim Aydın, Belgin Can. XII. Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 27-30 Mayıs 2014, Ankara. Poster Sunumu.
- TESE materyalinde ince-yapı özellikleri, sperm varlığı ile apoptozis ilişkisi. D. Billur, Ş Kızıl, S. Özkavukçu, F. Topal Çelikkan, E. Erdemli, K. Aydos, S. Aydın. 21. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, 28-31 Mayıs 2013, Mersin. Poster Sunumu.
- Yüksek karbonhidrat diyeti etkisinin sıçan kalbi ince-yapı bulguları ile gösterilmesi. Göktürk H, Kızıl Ş, Okatan EN, Can B, Turan B. 21. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, 28-31 Mayıs 2013, Mersin. Poster Sunumu.
- Travmatik spinalkord hasarı sonrası etanercept uygulamasının beyaz madde akson yapısına etkisi. O.Evirgen, D.Billur, N.Hayırlı, E.R. Yılmaz, A.E. Hastürk, Z.Gülhan, Ş.Kızıl, D.Gökmen Öztuna. 21. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, 28-31 Mayıs 2013, Mersin. Poster Sunumu.

Diğer yayınlar

- “Spermatozoonun Ovosite Nasıl Tutunduğu Bulundu!” Özgür Çınar, Şule Kızıl. Kök Hücre Bülteni, Sayı 1 (Haziran-Temmuz 2014)
- “Tıbbi Histoloji-Embriyoloji Uygulama Kılavuzu” Akademisyen Tıp Kitapevi Ankara, 2014. Editör: Prof. Dr. Canan Akbay

VII – Bilimsel Etkinlikler

Aldığı burslar

- TÜBİTAK 1001 Proje Bursu (Fertil ve İnfertil Hastaların Spermatozoonlarında Fosfolipaz-C-Zeta İçeriğinin Karşılaştırmalı Olarak Değerlendirilmesi (Proje No: 213S019, 2013-2016)

Ödüller

- Best Poster award in First Prize. Histopathological evaluation of desferrioxamine effect on fat graft viability. Bahadır Çelik, Deniz Billur, Pınar Bayram, Hilal Nakkaş, Şule Kızıl, Belgin Can, Kutlu Sevin. 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (ICHC 2017), May, 18-21, 2017, Antalya, Turkey.

Projeler

- Metabolik Sendromlu Sıçan Kortikal Nöronlarında Endoplazmik Retikulum Stresiyle İlgili Faktörlerin Araştırılması, AÜ BAP (Proje No: 16L0230006, 2016-), Araştırmacı
- Metabolik Sendromlu Sıçanlarda Hipokampusun Nörogenezine Etkili Faktörlerin İncelenmesi, AÜ BAP (Proje No: 16L0230007, 2016-), Araştırmacı
- Lokal Mezenkimal Kök Hücre Uygulamasının Yanık Tedavisindeki Etkinliğinin Araştırılması, TÜBİTAK (Proje No: 214S423, 2015-2016), Araştırmacı
- Fertil ve İnfertil Hastaların Spermatozoonlarında Fosfolipaz-C-Zeta İçeriğinin Karşılaştırmalı Olarak Değerlendirilmesi (Proje No: 213S019, 2013-2016), Bursiyer

- Tekrarlayan Gebelik Kaybı Olgularında Endometriyal Reseptivitede Adezyon ve Anti-Adezyon Moleküller ile Transkripsiyon Moleküllerinin Araştırılması, AÜ BAP (Proje No: 13L3330011, 2013-2014), Araştırmacı
- TESE Materyalinde Kan Testis Bariyeri Bütünlüğünün İnfertiliteye Etkisi, AÜ BAP (Proje No: 12B3330030, 2012-2014), Araştırmacı

VIII – Diğer Bilgiler:

Katılınan Kongre, Sempozyum, Çalıştay ve Kurslar:

Kongre ve Sempozyum:

- 23. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, 19-21 Mayıs 2017, Antalya, Türkiye
- 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (ICHC 2017), May, 18-21, 2017, Antalya, Turkey.
- 14. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 26-29 Mayıs 2016, Ankara
- XIII. Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 30 Nisan - 3 Mayıs 2016, İzmir
- THED Lisansüstü Eğitim Çalıştayı, 2-3 Ekim 2015, Ankara
- 13. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 30 Nisan-03 Mayıs 2015, Konya
- 6. Ulusal Lenfoma-Myeloma Kongresi, 09-12 Nisan 2015, Antalya
- XII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 27-30 Mayıs 2014, Ankara
- 5. Ulusal Lenfoma-Myeloma Kongresi, 24-27 Nisan 2014, Antalya
- Multidisipliner Araştırma Eğitimi Günleri, 8-9 Mart 2014, Ankara
- 21. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, 28-31 Mayıs 2013, Mersin
- GABİMAK- Gölbaşı, 24 Kasım 2012, Ankara
- XI. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 16-19 Mayıs 2012, Denizli
- 20. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, 25-28 Ekim 2011, Antalya
- 1st International Conference/Workshop on Stem Cell Research and Applications, 7-9 Ekim 2011, Kayseri
- TÜRKKÖK I. Kök Hücre Öğrenci Sempozyumu, 23 Eylül 2011, Ankara
- 4. Moleküler Biyoteknoloji Bahar Okulu, 2009, Ankara

Kurslar:

- Beyin Dokusunda Şeffaflaştırma (Clarity) için Kompakt Organ Elektroforez Sistemi Kullanımı ve İmmünohistokimyasal Boyama Kursu, 01-03 Şubat 2017, Denizli
- Sıçan Beyninde Stereotaksik Girişim Ve Tanımlayıcı Diseksiyon Kursu, 26 Mayıs 2016, Ankara
- Laboİstatistik: Temel Laboratuvar Bilimleri İçin Biyoİstatistik Kursu, 23-24 Mayıs 2015, Ankara
- TÜBA, Güncel İyi Üretim Uygulamalarında (cGMP) Hücresel Tedavi Ürünleri Kalite Standartları Kursu, 10 Nisan 2015, Antalya
- Hücre Ölümüne Biyoinformatik Yaklaşım Kursu, 12-13 Şubat 2015, İzmir
- Hacettepe Yazım Çalıştayı, 1-2 Ekim 2014, Ankara
- Sağlık Bilimlerinde Bilimsel Proje Hazırlama Eğitimi Kursu: THED-Ankara-2014
- Pipet Seçimi ve Pipetleme Kursu, 28 Mayıs 2014, Ankara
- Histoloji ve Embriyoloji Alanında Yapılan Araştırmalarda Biyoistatistiksel Çözümler, 26 Mayıs 2014, Ankara
- Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası Eğitim Programı, 31 Mart-9 Nisan 2014, Ankara
- TÜBA-1. Kök Hücre Üretiminde Yeni Teknikler Kursu, 25-26 Nisan 2014, Antalya
- Mikroskopi, Görüntüleme ve Stereoloji Kursu, 14-15 Ocak 2012, Ankara
- II. TÜBA Kök Hücre Kursu ve VI. Kök Hücre Sempozyumu, 25-26 Haziran 2011, Ankara