

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**LİNAGLİPTİNİN İNSÜLİN İLE KOMBİNE
TEDAVİSİNİN TIP 1 DİYABETİK FARE
OVARYUMUNDAKİ KATLANMAMIŞ PROTEİN
CEVABINA OLAN ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Aslı OKAN OFLAMAZ

DOKTORA TEZİ

2021-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

LİNAGLİPTİNİN İNSÜLİN İLE KOMBİNE
TEDAVİSİNİN TIP 1 DİYABETİK FARE
OVARYUMUNDAKİ KATLANMAMIŞ PROTEİN
CEVABINA OLAN ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Aslı OKAN OFLAMAZ

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Necdet DEMİR

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2019-4810 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2021-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Histoloji ve Embriyoloji Programında doktora tezi olarak kabul edilmiştir. .../...../.....

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Necdet DEMİR
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Çiler ÇELİK ÖZENCİ
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Mehmet ŞİMŞEK
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Züleyha DOĞANYİĞİT
Yozgat Bozok Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Aylin YABA UÇAR
Yeditepe Üniversitesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Melike CENGİZ

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Aslı OKAN OFLAMAZ

İmza

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Necdet DEMİR

İmza

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora eğitimim süresince her konuda yardımlarını eksik etmeyen, cesaretle ve kararlılıkla ilerlemememde her zaman yanımda olan sayın danışman hocam Prof. Dr. Necdet DEMİR'e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Doktora tez projemdeki deneylerin başarılı bir şekilde gerçekleşmesinde hem maddi hem de manevi yardımlarını eksik etmeyen, çalışma disiplinini örnek aldığım değerli hocam Doç. Dr. Züleyha DOĞANYİĞİT'e teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Akdeniz Üniversitesinde geçirdiğim 5 yıl süresince, çalışmalarımam hem bilimsel hem de manevi katkılarda bulunan Dr. Berna Sözen, Dr. Bikem Soygür ve Dr. Esmâ Kırımlıoğlu'na,

Yozgat Bozok Üniversitesi Tıp Fakültesinde olduğum süre içerisinde gerekli yazışmaların sürdürülmesinde yardım ve desteğini esirgemeyen Arş. Gör. Ertan KATIRCI ve Feride Quliyeva'ya,

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın tüm değerli öğretim üyelerine, araştırma görevlilerine ve çalışanlarına,

Yardımlarından dolayı Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün değerli çalışanlarına,

Tez çalışmalarım süresince bana gösterdikleri anlayış ve destek için eşime ve tatlı kızıma,

Hayal ve hedeflerimi gerçekleştirmemde her zaman yanımda olan, koşulsuzca sevgilerini, yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen annem ve babama en içten saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: Hipoglisemi riskini artırmadan kan şekerini düşürücü etkileri ve yüksek antioksidan aktivitesi olan linagliptinin, insülin ile birlikte kullanımının tip 1 diyabetik fare ovaryumlarında endoplazmik retikulum (ER) stresi ilişkili yanıtta rol oynayan protein ve genlerin ekspresyon düzeylerini nasıl etkilediğini incelemeyi amaçladık.

Yöntem: Çalışmamızda; 6 haftalık 84 adet Balb/C ırkı dişi fare kullanılarak her grupta 12 adet fare olacak şekilde yedi grup oluşturuldu: Kontrol grubu, Çözgen grubu, Diyabetes mellitus (DM)+İnsülin grubu, DM+Linagliptin grubu, DM+Linagliptin+İnsülin grubu, DM+TUDCA grubu, DM+TUDCA+İnsülin grubu. Deney süresince fare vücut ağırlıkları kaydedildi ve deney sonunda ovaryum ağırlığı indeksleri belirlendi. Sağlıklı folikül sayımı yapılarak ovaryal folikül rezervi belirlendi. Kan serum örneklerinde DPP-4 aktivitesi ölçümü ve ovaryum örneklerinde oksidatif stres belirteçlerinden MDA seviyesi ve NOX1 aktivitesi ELISA yöntemi ile ölçüldü. Ovaryum örneklerinde ATF6, ATF4, kaspaz 12, cleaved kaspaz 3, XBP1 ve JNK1/2 protein ifadeleri immunohistokimya ve western blot yöntemleriyle belirlendi. qRT-PCR yöntemiyle *Grp78/BiP* ve pro- apoptotik *Chop/Ddit3* genlerinin seviyeleri belirlendi.

Bulgular: Linagliptin ve insülinin birlikte kullanımı oksidatif stres seviyelerini azaltmada daha etkindi. En az atretik folikül sayısı DM+Linagliptin+İnsülin grubunda gözlemlendi. Linagliptin ve insülinin birlikte kullanımını sonrasında incelenen proteinlerin ifadelerinde azalma meydana geldi. Ayrıca *Grp78/BiP* gen düzeyinde gruplar arasında fark bulunmazken, DM+Linagliptin+İnsülin grubu *Chop/Ddit3* mRNA seviyesini azaltmada ve pro-apoptotik süreci inhibe etmede daha başarılıydı.

Sonuç: Çalışmamızda, linagliptin ve insülin kombinasyonunun tip 1 diyabetik fare ovaryumlarında ER stresi ilişkili apoptotik proteinlerin ve genlerin ekspresyon düzeylerini azaltmada etkin rol oynadığı görüldü. Çalışmamızın diyabete bağlı gelişen ovaryan başarısızlıkların tedavisinde kullanılabilecek yeni yaklaşımlara katkıda bulunacağına inanmaktayız.

Anahtar Kelimeler: Diyabet, endoplazmik retikulum, stres, ovaryum, fare.

ABSTRACT

Objective: We aimed to examine how the use of linagliptin, which has blood glucose-lowering effects and high antioxidant activity without increasing the risk of hypoglycemia, together with insulin affects the expression levels of proteins and genes that play a role in the endoplasmic reticulum stress-related response in type 1 diabetic mouse ovaries.

Method: In our study, using 84 Balb/C breed female mice at 6 weeks of age, seven groups were formed with 12 mice in each group: Control group, Vehicle group, Diabetes+Insulin group, Diabetes+Linagliptin group, Diabetes+Linagliptin+Insulin group, Diabetes+TUDCA group, Diabetes+TUDCA+Insulin group. Body weight and ovarian index were determined. Ovarian follicle reserve was determined by counting healthy follicles. DPP-4 activity was measured in blood serum samples, and MDA level and NOX1 activity, which are oxidative stress markers in ovarian samples, were measured by ELISA method. ATF6, ATF4, caspase 12, cleaved caspase 3, XBP1 and JNK1/2 protein expressions in ovarian samples were determined by immunohistochemistry and western blot methods. The level of *Grp78/BiP* and pro-apoptotic *Chop/Ddit3* genes were determined by qRT-PCR method.

Results: The combined use of linagliptin and insulin was more effective in reducing oxidative stress levels and lowering blood sugar. The least number of atretic follicles was observed in the DM+Linagliptin+Insulin group. The expression of the studied proteins decreased after the combined use of linagliptin and insulin. In addition, there was no difference between the groups at the *Grp78/BiP* gene level, the DM+Linagliptin+Insulin group was more successful in reducing the *Chop/Ddit3* mRNA level and inhibiting the pro-apoptotic process.

Conclusion: In our study, it was observed that the combination of linagliptin and insulin played an active role in reducing the expression levels of ER stress-related apoptotic proteins and genes in type 1 diabetic mouse ovaries. We believe that our study will contribute to new approaches that can be used in the treatment of ovarian failure due to diabetes.

Key words: Diabetes, endoplasmic reticulum, stress, ovary, mouse.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Dişi Üreme Sistemi	3
2.1.1. Ovaryumlar	3
2.1.2. Ovaryum Folikülleri	5
2.1.3. Ovulasyon	9
2.1.4. Korpus Luteum	10
2.1.5. Korpus Albicans	11
2.1.6. Atrezi	11
2.2. Endoplazmik Retikulum Stresi	12
2.3. Katlanmamış Protein Cevabı (Unfolded Protein Response, UPR)	15
2.4. ER Stresi Tarafından İndüklenen Üç Ana Kanonik Apoptoz Yolağı	17
2.4.1. CHOP Sinyal Yolağı	17
2.4.2. JNK Sinyal Yolağı	17
2.4.3. Kaspaz 12 Sinyal Yolağı	18

2.5.	Katlanmamış Protein Cevabı ve İlişkili Hastalıklar	19
2.5.1.	UPR ve Ovaryum	19
2.6.	Tip 1 DM	21
2.6.1.	Tip 1 DM ve Yeni Tedavi Hedefleri	21
2.6.2.	Linagliptin	24
3. GEREÇ ve YÖNTEM		
3.1.	Deney Hayvanları	26
3.2.	Tip 1 Diyabetik Fare Üretimi	28
3.3.	Gelişim Takpileri	28
3.4.	Dokuların Toplanması	28
3.5.	ELISA Yöntemi	29
3.6.	Rutin Parafin Takibi	29
3.7.	Foliküllerin Histolojik Değerlendirilmesi	30
3.8.	İmmünohistokimyasal Değerlendirme	31
3.9.	Western Blot Analizi	33
3.9.1.	Lizat Hazırlama	35
3.9.2.	SDS-PAGE Western Blot Protokolü	35
3.10.	Kantitatif Real Time PCR Analizi	37
3.10.1.	Total RNA İzolasyonu	37
3.10.2.	Komplementer DNA (cDNA) Eldesi	38
3.10.3	Kantitatif Real Time PCR Uygulama Basamakları	39

3.11.	İstatistiksel Değerlendirme	40
4.	BULGULAR	41
4.1.	Gelişim Takipleri	41
4.1.1.	Vücut Ağırlığı Bulguları	41
4.1.2.	Kan Glikoz Bulguları	41
4.1.3.	Ovaryum Ağırlığı İndeksi Bulguları	42
4.2.	ELISA Bulguları	43
4.3.	Histolojik Bulgular	44
4.4.	İmmünohistokimyasal Bulgular	47
4.4.1.	ATF4 İmmün Boyaması	47
4.4.2.	ATF6 İmmün Boyaması	47
4.4.3.	p-JNK1+JNK2 İmmün Boyaması	48
4.4.4.	Kaspaz 12 İmmün Boyaması	49
4.4.5.	Cleaved Kaspaz 3 İmmün Boyaması	50
4.4.6.	XBP1 İmmün Boyaması	51
4.5.	Western Blot Analizi Bulguları	52
4.5.1.	ATF4 Protein İfadesi	52
4.5.2.	ATF6 Protein İfadesi	53
4.5.3.	Total ve Fosforile JNK1+JNK2 Protein İfadesi	53
4.5.4.	Kaspaz 12 Protein İfadesi	55
4.5.5.	Kaspaz 3 Protein İfadesi	55
4.5.6.	XBP1 Protein İfadesi	56

4.6.	qRT-PCR Bulguları	57
4.6.1.	<i>Grp78/BiP</i> ve <i>Chop/Ddit3</i> Gen İfadesi	57
5.	TARTIŞMA	60
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	68
	KAYNAKLAR	69
	ÖZGEÇMİŞ	85

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 3.1.	Alt jel (Ayrıştırıcı jel) hazırlanış formülü.	32
Tablo 3.2.	Western blot yönteminde kullanılan primer antikorlar ve dilüsyon oranları.	37
Tablo 3.3.	cDNA eldesinde kullanılan reaktantlar.	39
Tablo 3.4.	qRT-PCR uygulamasında kullanılan karışım içerikleri.	39
Tablo 3.5.	qRT-PCR tekniğinde kullanılan primerlerin dizilimleri.	39
Tablo 4.1.	Deney gruplarındaki farelerin deney boyunca kaydedilen vücut ağırlıklarının ortalama \pm standart sapma değerleri.	41

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Dişi üreme sistemi.	3
Şekil 2.2.	İnsan ve farede dişi üreme sistemi karşılaştırılması.	4
Şekil 2.3.	Fare ovaryumunun histolojik görüntüsü.	4
Şekil 2.4.	Ovaryum boyunca geçen bir kesitin şematik çizimi.	6
Şekil 2.5.	Fare ovaryumunun primordiyal folikülleri.	7
Şekil 2.6.	Erken primer folikülün ve geç primer folikülün fotomikrografı.	8
Şekil 2.7.	Sekonder folikülün fotomikrografı.	8
Şekil 2.8.	Graaf (Olgun) folikülü.	9
Şekil 2.9.	Korpus luteumun fotomikrografı.	11
Şekil 2.10.	Korpus albicansın fotomikrografı.	11
Şekil 2.11.	Atretik foliküllerin fotomikrografı.	12
Şekil 2.12.	ER stresine karşı tanımlanan dört farklı yanıt.	14
Şekil 2.13.	Katlanmamış protein cevabı sinyali yolağı.	15
Şekil 2.14.	Kaspaz 12 ve ER stresi aracılı apoptotik yolağı gösteren şema.	19
Şekil 2.15.	UPR ve ilişkili hastalıklar.	20
Şekil 2.16.	Membrana bağlı DPP-4 ve çözümlenmiş DPP-4.	24
Şekil 2.17.	İnkretin temelli DPP-4 inhibitörlerinin eylem mekanizması.	24
Şekil 3.1.	Deney modeli ve deney grupları.	26
Şekil 4.1.	Deney gruplarındaki farelerin kan glikoz değerlerinin karşılaştırılması.	42

Şekil 4.2.	Ovaryum ağırlığı indeksi.	42
Şekil 4.3.	Ovaryum MDA ve NOX1 seviyeleri.	43
Şekil 4.4.	Deney gruplarına ait kan serum örneklerinde DPP-4 değerleri.	44
Şekil 4.5.	Ovaryum dokularının hematoksilen eozin boyama görüntüleri.	45
Şekil 4.6.	Tüm gelişim aşamalarındaki (primordiyal, primer, sekonder, antral ve atretik) foliküllerin sayısı.	46
Şekil 4.7.	Ovaryumlarda ATF4 immün boyama görüntüleri.	47
Şekil 4.8.	Ovaryumlarda ATF6 immün boyama görüntüleri.	48
Şekil 4.9.	Ovaryumlarda p-JNK1+JNK2 immün boyama görüntüleri.	49
Şekil 4.10.	Ovaryumlarda kaspaz 12 immün boyama görüntüleri.	50
Şekil 4.11.	Ovaryumlarda cleaved kaspaz 3 immün boyama görüntüleri.	51
Şekil 4.12.	Ovaryumlarda XBP1 immün boyama görüntüleri.	53
Şekil 4.13.	Ovaryum örneklerinin ATF4 protein band görüntüleri.	53
Şekil 4.14.	Ovaryum örneklerinin ATF6 protein band görüntüleri.	54
Şekil 4.15.	Ovaryum örneklerinin total ve fosforile JNK1+JNK2 protein band görüntüleri	54
Şekil 4.16.	Ovaryum örneklerinin total ve cleaved kaspaz 12 protein band görüntüleri	55
Şekil 4.17.	Ovaryum örneklerinin total ve cleaved kaspaz 3 protein band görüntüleri	56
Şekil 4.18.	Ovaryum örneklerinin XBP1 protein band görüntüleri	57
Şekil 4.19.	Ovaryum örneklerinde Grp78/BiP ve Chop/Ddit3 gen ekspresyon düzeylerinin qRT-PCR yöntemi ile karşılaştırılması.	58

SİMGELER ve KISALTMALAR

APS	: Amonyum Persulfat
ASK1	: Apoptoz sinyal düzenleyici kinaz 1
ATF4	: Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 4
ATF6	: Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 6
Bcl-2	: B hücreleri lenfoma 2
Ca ⁺²	: Kalsiyum
CHOP	: C/EBP Homolog Protein
dH ₂ O	: Distile Su
DPP-4	: Dipeptidil Peptidaz- 4
eIF2 α	: Ökaryotik Translasyon Başlatma Faktörü 2 α
ER	: Endoplazmik Retikulum
ERAD	: Endoplazmik Retikulum ile İlişkili Protein Bozunma
FSH	: Folikül Uyarıcı Hormon
GADD153	: Büyüme Durdurma ve DNA Hasarı İndüklenebilir Gen 153
GH	: Granuloza Hücreleri
GIP	: Glikoz Bağımlı İnsülinotropik Peptidi
GLP-1	: Glukagon Benzer Peptidi 1
GRP78	: Glikozla Düzenlenen Protein 78
GTP	: Guanozin Trifosfat
IRE1	: İnositol Gerektiren Enzim 1
JNK	: Jun N-terminal Kinaz
LH	: Lüteinleştirici Hormon
MDA	: Malondialdehid
Met-tRNA _i	: Methionie Transfer RNA

NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PKOS	: Polikistik Over Sendromu
PERK	: Protein Kinaz RNA Benzeri ER Kinaz
PVDF	: Polyvinylidene Fluoride
ROS	: Aşırı Reaktif Oksijen Türleri (Reactive Oxygen Species)
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
STAT3	: Transkripsiyon 3'ün Sinyal Transdüseri ve Aktivatörü
STZ	: Streptozotosin
T1DM	: Tip 1 Diabetes Mellitus
TBS	: Tris Tamponlu Tuz (Tris Buffered Saline)
TEMED	: N, N, N', N'- Tetrametil Etilendiamin
TRAF2	: TNF Reseptörü ile İlişkili Faktör 2
TUDCA	: Tauroursodeoksikolik Asit
UPR	: Katlanmamış Protein Cevabı (Unfolded Protein Response)
XBP1s	: Eklenmiş X Kutusu Bağlayıcı Protein 1
XBP1u	: Eklenmemiş X Kutusu Bağlayıcı Protein 1

1. GİRİŞ

Endoplazmik retikulum (ER) stresi, oksidatif stres ile yakından ilişkili lokal bir faktördür (Cao and Kaufman, 2014; Hasnain ve ark., 2016). ER’de protein katlama talebini artıran veya ER’nin protein katlama kapasitesini azaltan oksidatif stres ve iltihaplanma dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik ve patolojik koşulların neden olabileceği katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi nedeniyle ortaya çıkar. ER stresi, topluca katlanmamış protein yanıtı (Unfolded protein response, UPR) olarak adlandırılan çok çeşitli hücreSEL fonksiyonları etkileyen ve stres adaptasyonunda birincil rol oynayan, stres çözülemediğinde ise etkilenen hücrelerde apoptozu indükleyen birkaç sinyal iletim dönüştürücülerinin aktivasyonu ile sonuçlanır (Walter ve Ron, 2011; Ozcan ve Tabas, 2012).

UPR’ye üç kanonik sensör protein aracılık eder: inositol gerektiren enzim 1 (IRE1), protein kinaz RNA benzeri ER kinaz (PERK) ve aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6). Bunlar transmembran proteinlerdir ve stresli olmayan koşullar altında ER şaperonu olan glikozla düzenlenen protein 78 (GRP78)’e bağlanırlar. ER stresi oluştuğunda GRP78’den ayrılarak aktif hale geçerler. Aktif IRE1 α , eklenmemiş X kutusu bağlayıcı protein 1’in (XBP1u) küçük bir intronunu çıkarır ve eklenmiş XBP1 ile sonuçlanır (XBP1s). Bu arada, PERK, aktive edici transkripsiyon faktörü 4 (ATF4)’ün transkripsiyonunu indükleyerek ER protein aşırı yüklenmesini azaltmak için ökaryotik translasyon başlatma faktörü 2 α ’yı (eIF2 α) fosforile eder. ATF6 aktivasyonu, C/EBP homolog protein (CHOP) ve GRP78’in transkripsiyonunu indükler. Artan GRP78, p-eIF2 α , p-IRE1 α , XBP1s, ATF4 ve CHOP, ER stresi veya UPR aktivasyonunun belirteçleri olarak yaygın olarak kullanılır (Maurel ve ark., 2014; Wang ve Kaufman, 2016).

ER stresi ve UPR aktivasyonu, insan hastalıklarının, özellikle nörodejeneratif hastalıkların, diyabetin ve kanserin gelişiminde ve patogeneğinde önemli rol oynar (Oakes ve Papa, 2015). Son çalışmalar, ER stresinin ovaryum hücrelerinde meydana geldiğini, oosit olgunlaşmasını, folikül oluşumunu ve ovulasyonu etkilediğini göstermiştir (Lin ve ark., 2012b; Park ve ark., 2013; Harada ve ark., 2015). ER stresinin ve UPR’nin ovaryan fizyolojisindeki işlevlerine ek olarak, ovaryan

hiperstimülasyon sendromu (Takahashi ve ark., 2016), polikistik over sendromu (Takahashi ve ark., 2017), over kanseri (Hu ve ark., 2017) ve tip 1 diyabet mellitus (T1DM) ile ilişkili ovaryan patolojisinde (Okan ve ark., 2021) rolleri vardır.

T1DM'li kadınlarda merkezi hipogonadizm nedeni ile sıklıkla amenore ve infertilite görülmektedir. İnsülin tedavisinin yoğunlaştırılması ve gelişmiş metabolik kontrol ile bu problemler azalsa da devam etmektedir (Thong ve ark., 2020). Dolayısıyla, T1DM'li kadınlar için yeni ve yardımcı tedavilerin değerlendirilmesi gerekmektedir.

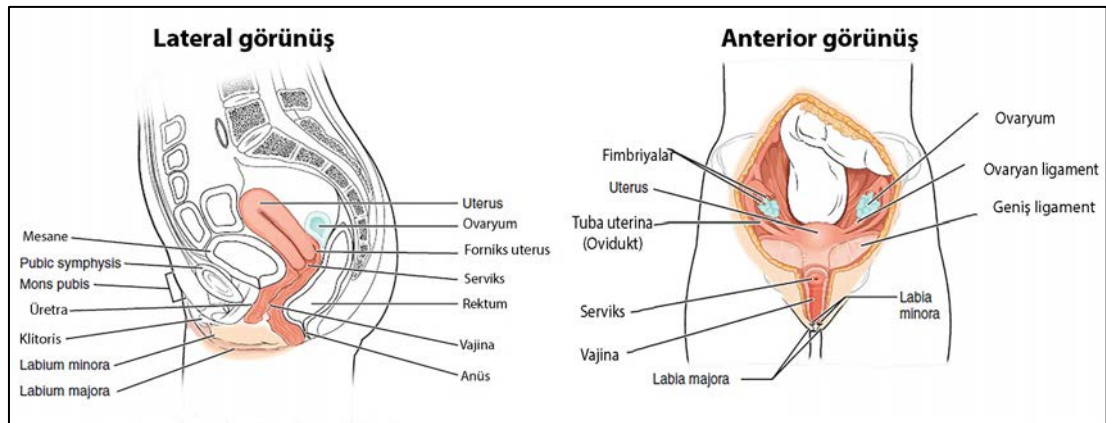
Tedavi hedeflerine ulaşmak için, insüline tamamlayıcı olan ilaçların kullanıldığı kombinasyon terapisi uygun olabilir. Dipeptidil peptidaz-4 (DPP-4) inhibitörleri (vildagliptin, linagliptin, saksagliptin, alogliptin ve dutogliptin) (Deacon ve Holst, 2013), hiperglisemi tedavisi için yeni bir ilaç sınıfıdır. Linagliptinin diğer iki DPP-4 inhibitöründe (sitagliptin ve vildagliptin) olmayan glikozdaki herhangi bir düşüşten bağımsız olarak nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz aktivitesi ve malondialdehid (MDA) seviyeleri incelenerek antioksidan aktivite gösterdiği kanıtlanmıştır (Kroller-Schon ve ark., 2012; Salheen ve ark., 2015a). Özellikle, hiperglisemi ER stresine paralel olarak oksidatif strese de neden olur (Mooradian ve Haas, 2011; Basha ve ark., 2012). Dolayısıyla, linagliptin ER stresi sonucu oluşan reaktif oksijen türlerinin üretimini azaltarak hiperglisemik koşullar altında kalan ovaryumun apoptozdan kaçınmalarını sağlayabilir.

Çalışmamızda hipoglisemi riskini artırmadan kan şekeri düşürücü etkileri ve yüksek antioksidan aktivitesi olduğu bilinen linagliptinin, insülin ile birlikte uygulanmasının T1DM fare ovaryumlarında ER stresi ilişkili yanıtta rol oynayan proteinlerin ve genlerin ekspresyon düzeylerini nasıl etkilediğini incelemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Dişi Üreme Sistemi

Dişi üreme sistemi; iç üreme organlarından (iki ovaryum, iki tuba uterina, uterus, serviks ve vajina) ve dış genital yapılardan (klitoris, labiya majora ve labiya minora) oluşur (Gartner ve Hiatt, 2007) (Şekil 2.1). Dişi iç üreme organları pelviste yer alırken; dış genital yapılar ise perineumun vulva olarak bilinen ön bölgede yer alır (Ross ve Pawlina, 2013).



Şekil 2.1. Dişi üreme sistemi (<https://courses.lumenlearning.com/suny-ap2/chapter/anatomy-and-physiology-of-the-female-reproductive-system/>, Erişim tarihi 20 Aralık 2021).

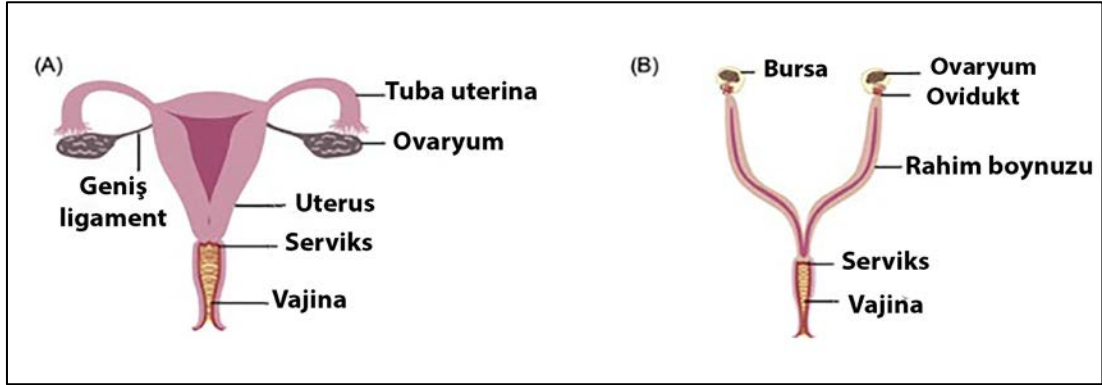
Dişi üreme sistemi; östrojen ve progesteron gibi cinsiyet hormonlarının salgılanmasından, oositin gelişiminden, fallop tüplerinde fertilizasyon için uygun alanın sağlanmasından, uterusu embriyonun taşınmasından ve implantasyonundan, ayrıca gebelik boyunca fetüsün gelişiminden ve yeni doğanın beslenmesinden sorumludur (Eroschenko, 2013).

2.1.1. Ovaryumlar

İnsanda pelvis içinde yer alan ovaryumların her biri yaklaşık 14 gr ağırlığında, 3 cm uzunluğunda, 1,5 ile 2 cm genişliğinde ve 1 cm kalınlığında badem şekilli gövdelerdir. Ovaryumlar, kan damarlarını ovaryumlara taşıyan peritonun özel bir kıvrımı olan mezovaryum adı verilen bir bağlantıyla uterusun geniş ligamentine asılır (Gartner ve Hiatt, 2007).

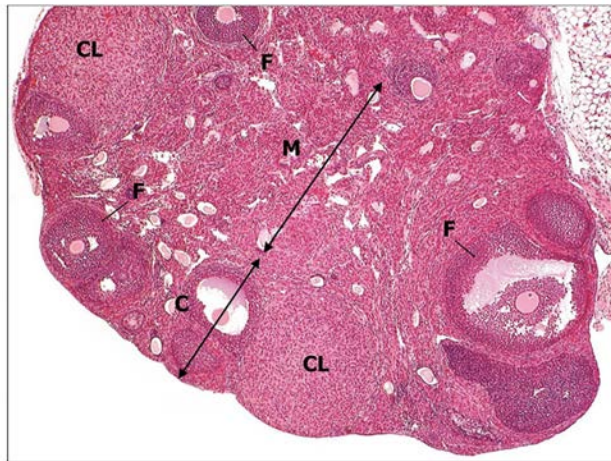
Biyolojik sistemleri insanlara çok benzer olan farelerin ovaryumları, böbreklerin nispeten kaudalinde ve genellikle çevresi yağla kaplıdır. İnsandan farklı olarak kemirgen türlerde ovaryum ve oviduktun ucu ovaryan bursa adı verilen ince bir

membranla çevrilidir. Ovidukt epitel katlanması, özellikle ampulla bölgesinde minimal (örneğin farelerde) veya çok kapsamlı (örneğin kadınlarda) olabilir (Vue ve ark., 2018). Şekil 2.2’de gösterildiği üzere insanda uterus tipi basit uterus (tek bölmeli) iken, farelerde uterus dublektir (iki bölümlü) (Spencer, 2014).



Şekil 2.2. İnsan (A) ve farede (B) dişi üreme sistemini karşılaştırılması (Vue ve ark., 2018).

Ovaryumları örten ve germinal epitel adı verilen yüzey epiteli, modifiye edilmiş bir peritondur. Bu epitelin hemen altında zayıf damarlanmış, yoğun ve düzensiz kollajen bağ doku kapsülü olan tunika albuginea bulunur. Her bir ovaryum, dış kısmında çeşitli gelişim aşamalarında olan ovaryum foliküllerini barındıran hücresel kortekse ve iç kısmında bol miktarda damarlanma gösteren fibroelastik bağ dokusundan oluşan medullaya bölünmüştür (Şekil 2.3). Bununla birlikte, histolojik olarak, korteks ve medulla arasındaki bölünme belirsizdir (Gartner ve Hiatt, 2007).



Şekil 2.3. Fare ovaryumunun histolojik görüntüsü. Korteks (C), çeşitli olgunlaşma aşamalarında çok sayıda gelişen folikül (F) ve korpus luteum (CL) içerir. Medulla (M), lenfatik sinirler ve çok sayıda kan damarı içerir (<https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/43754782.pdf>, Erişim tarihi 22 Kasım 2021).

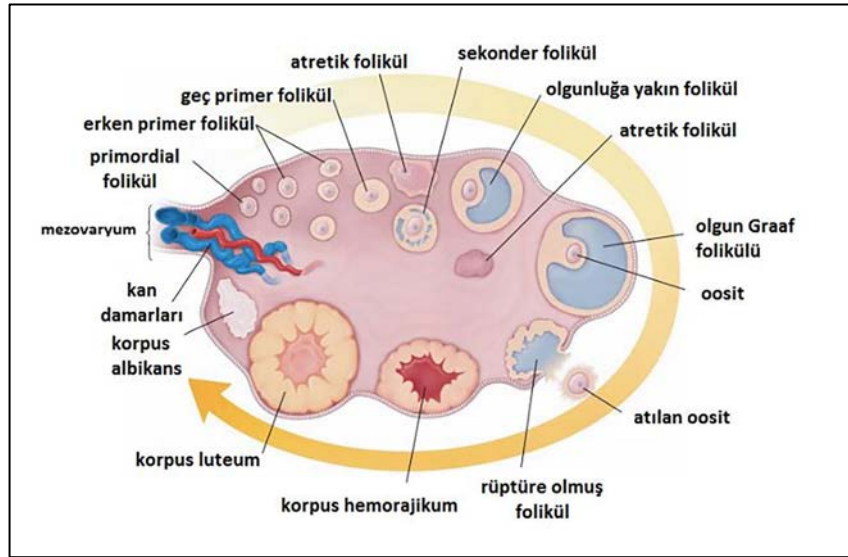
Ovaryum, üreme işlevi (döllenme için olgun oositlerin farklılaşması ve salınmasından sorumlu) ve endokrin işlevi (östrojen, progesteron ve androjen gibi eşey hormonlarının sentezi ve salgılanmasından sorumlu) olmak üzere iki role sahiptir. Foliküller, memeli ovaryumlarının temel işlevsel birimleridir ve en içteki tek oositin, onu çevreleyen granuloza hücrelerinden (GH), teka interna ve teka eksterna hücrelerinin dış katmanlarından oluşur. Primordiyal foliküllerin bir rezerv havuzundan büyüme yoluna alınmasından başlayarak, foliküller dört ana aşamada gerçekleşir: primer, sekonder, antral ve preovulatuvar (Monniaux ve ark., 2014).

2.1.2. Ovaryum Folikülleri

Ovaryum folikülleri stromal doku ile çevrilir ve bir primer oosit ve bununla ilişkili tek bir küresel katman veya oosit etrafında birkaç eş merkezli katman halinde düzenlenmiş foliküler hücrelerden (granuloza hücrelerinden) oluşur. Folikülün büyümesine bağlı olarak iki foliküler gelişim aşaması vardır (Şekil 2.4). Ayrıca aşamalar oosit ve foliküler hücrelerin gelişimine göre kategorize edilir:

- Büyümeyen veya primordiyal foliküller
- Büyüyen foliküller
 - o Tek katmanlı (unilaminar) ve çok katmanlı (multilaminar) primer foliküller
 - o Sekonder (antral) foliküller
 - o Graaf (olgun) foliküller

Primer foliküllerin gelişimi folikül uyarıcı hormon (FSH)'dan bağımsızdır; bunun yerine, foliküler hücrelerin farklılaşması ve proliferasyonu, muhtemelen ovaryumdaki foliküler hücreler tarafından salgılanan, henüz karakterize edilmemiş lokal faktörler tarafından tetiklenir. Ancak sekonder ve sonraki foliküller FSH'nin etkisi altındadır. Foliküler gelişim genellikle tek bir oositin salınmasıyla (ovulasyon) sonuçlanır (Gartner ve Hiatt, 2007).

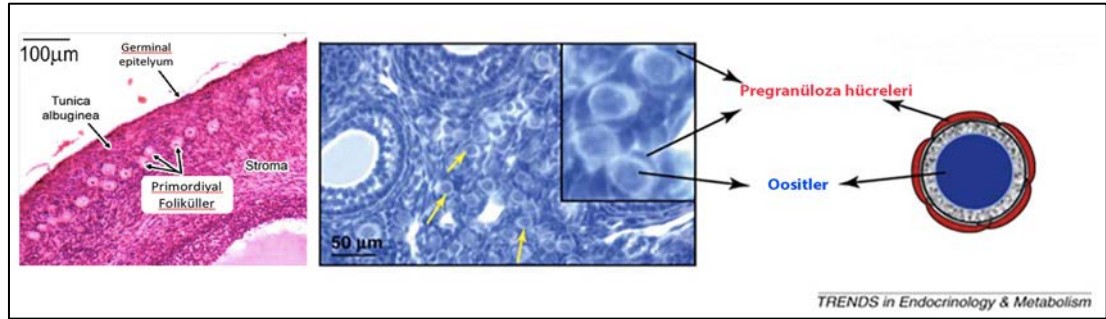


Şekil 2.4. Ovaryum boyunca geçen bir kesitin şematik çizimi. Bu çizim erken primer folikülden olgun (Graaf) foliküle kadar foliküler gelişimin aşamalarını göstermektedir. Foliküllerin olgunlaşması ok yönünde gerçekleşir (Ross ve Pawlina, 2013).

Primordiyal Foliküller: Dişinin üreme ömrü boyunca, ovaryumda uykuda olan primordiyal folikül havuzu, gelişen tüm foliküllerin ve döllenabilir oositlerin kaynağı olarak hizmet eder (McGee ve Hsueh, 2000). Her primordiyal folikülün üç olası gelişim kaderi vardır: (i) sessiz kalmak (yani üreme dönemi boyunca çeşitli süreler boyunca uykuda hayatta kalmak); (ii) büyüyen folikül havuzuna aktive olmak, bunu ya foliküler gelişimin daha sonraki aşamasında atrezi ya da ovulasyon izler; (iii) doğrudan uyku durumundan ölüme maruz kalmak, dişi üreme yaşlanmasına katkıda bulunmak (McGee ve Hsueh, 2000; Broekmans ve ark., 2007; Hansen ve ark., 2008).

Her bir primordiyal folikül, birkaç yassı pregranüloza hücresiyle çevrili olgunlaşmamış bir oositten oluşur (Şekil 2.5) ve çoğunlukla overin dış kortikal bölgelerinde bulunur. Memelilerde, primordiyal folikül havuzunun boyutu ve kalıcılığı üreme yaşamının uzunluğunu belirler (Broekmans ve ark., 2007). İnsanlarda, fetal gelişim sırasında foliküler oluşum zamanından menopoza sırasında primordiyal foliküllerin tükenmesine (yaklaşık 51 yıl) kadar, belirli bir primordiyal folikül popülasyonu uyku durumunda hayatta kalır (McGee ve Hsueh, 2000). İnsanların aksine, farelerde primordiyal foliküller doğumdan hemen sonra, pregranüloza hücreleri germ hücre kistlerini istila ettiğinde ve oogonya'yı primordiyal foliküllerle kapladığında oluşur (McNatty ve ark., 2000). Tüm oogonia, primordiyal foliküller içinde yer almaz ve bazıları folikül oluşumu sırasında apoptoza uğrar. Folikül oluşumu

doğum sonrası 7. gün civarında tamamlanır ve primordiyal foliküller oluştuğunda senkronize bir folikül aktivasyon dalgası gerçekleşir. Bu aktivasyon sırasında oositlerin hacmi büyük ölçüde artar ve oositleri çevreleyen yassı pregranuloza hücreleri farklılaşır ve küboidal granuloza hücrelerine dönüşür. Bununla birlikte primordiyal foliküllerin çoğu uykuda olan foliküller olarak korunur (Wassarman ve Albertini, 1994).



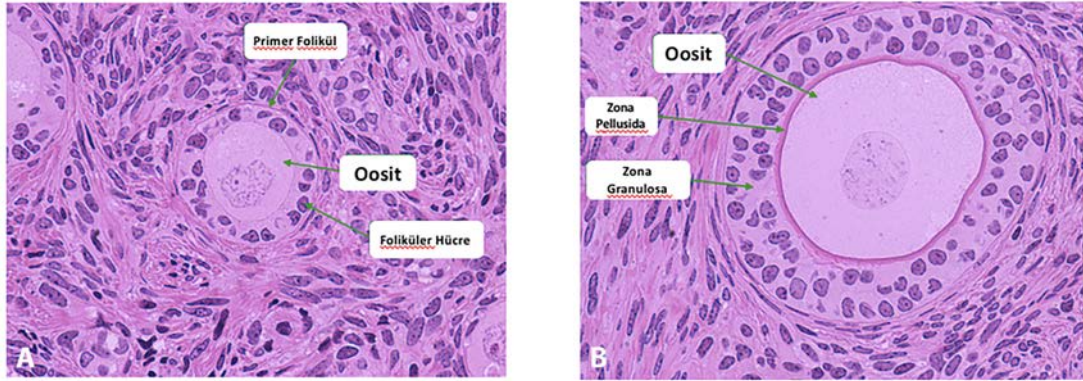
Şekil 2.5. Fare ovaryumunun primordiyal folikülleri

(https://histology.leeds.ac.uk/female/FRS_ovarian_fol.php, Erişim tarihi 22 Kasım 2021; (Reddy ve ark., 2010).

Primer Foliküller: Primordiyal foliküllerin primer foliküllere gelişimi primer oositin, foliküler hücrelerin ve çevredeki stromal dokudaki değişikliklerin bir sonucu olarak ayırt edilir. Primer oosit, germinal vezikül olarak da adlandırılan genişlemiş bir çekirdek ile birlikte büyür. Ribozomlarla zengin granüllü endoplazmik retikulum, birkaç Golgi kompleksi, bol miktarda serbest ribozomlar ve sayısız mitokondri hücre içinde dağılmış durumdadır. Foliküler hücreler şekil olarak küboidal hale gelir. Oositi çevreleyen tek bir foliküler hücre tabakası olduğu sürece, foliküle tek katlı (unilaminar) ya da erken primer folikül denir (Gartner ve Hiatt, 2007) (Şekil 2.6.A).

Foliküler hücreler çoğaldığında ve katmanlaştığında primer oositin etrafında birkaç hücre tabakası oluştuğunda, bu foliküle çok katmanlı (multilaminar) ya da geç primer folikül denir ve bu foliküler hücreler artık granuloza hücreleri olarak adlandırılırlar (Şekil 2.6.B). Primer oositler tarafından salgılanan sinyal molekülü aktivin nedeniyle granuloza hücreleri proliferatif aktivite gösterirler (Gartner ve Hiatt, 2007). Bu aşamada oositi çevreleyen foliküler hücrelerden ayıran şekilsiz bir madde (Zona pellusida) ortaya çıkar. Stromal hücreler multilaminar primer folikül etrafında düzenlenmeye başlar, çoğunlukla zengin bir şekilde vaskularize edilmiş hücresel

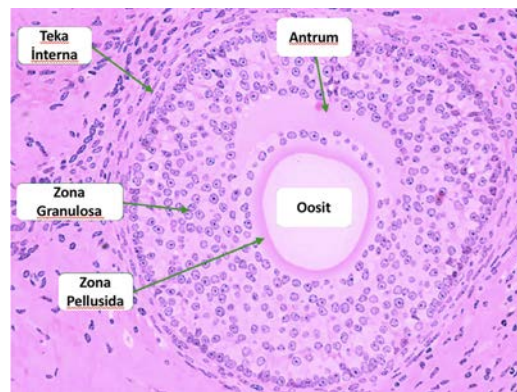
tabakadan oluşan bir iç teka internayı ve çoğunlukla fibröz bağ dokusundan oluşan dış teka eksternayı oluşturur.



Şekil 2.6. Erken primer folikülün (A) ve geç primer folikülün (B) fotomikrografı (medcell.med.yale.edu/histology/ovary_follicle.php, Erişim tarihi 22 Kasım 2021).

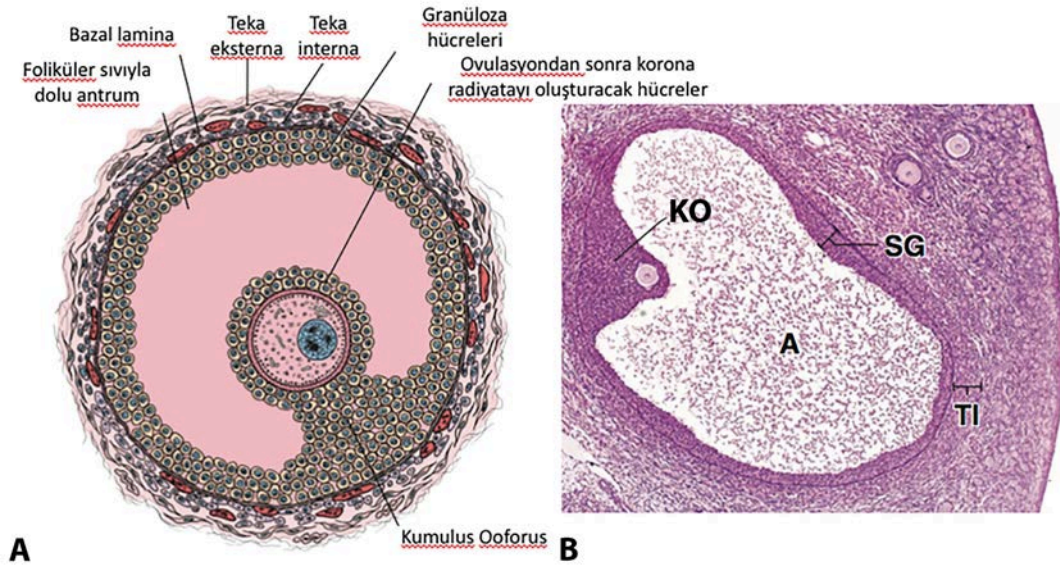
Teka internayı oluşturan hücreler, hücre zarlarında LH reseptörlerine sahiptir ve bu hücreler, steroid üreten hücrelerin ultra yapısal özelliklerini alır. Sitoplazmaları çok sayıda yağ damlası biriktirir ve bol miktarda düz endoplazmik retikuluma sahiptir. Bu teka hücrelerinden üretilen erkek eşey hormonu androstenedion, granulosa hücrelerinde aromataz enzimi tarafından östrojen estradiyole dönüştürülür. Granulosa hücreleri teka internadan kalın bazal lamina ile ayrılır (Gartner ve Hiatt, 2007).

Sekonder (Antral) Foliküller: Stratum granulozum 6-12 hücre tabakası kalınlığına ulaştığında, granuloza hücrelerinin arasında sıvı dolu boşluklar belirir. Likör folikülü adı verilen hyaluronan ve proteoglikandan zengin sıvı granuloza hücreleri arasında birikmeye başlar ve sonunda antrum adı verilen hilal şeklinde tek bir boşluk oluşur (Gartner ve Hiatt, 2007; Ross ve Pawlina, 2013).



Şekil 2.7. Sekonder folikülün fotomikrografı (medcell.med.yale.edu/histology/ovary_follicle.php, Erişim tarihi 22 Kasım 2021).

Graaf (Olgun) Foliküller: Granüloza hücrelerinin sürekli çoğalması ve likör folikülünün sürekli oluşumu, ovulasyon sırasında çapı 2,5 cm'ye kadar ulaşabilen Graaf (olgun) bir folikül oluşumuyla sonuçlanır. Graaf folikülü, ovaryum yüzeyinde neredeyse ovaryum kadar büyük şeffaf bir şişkinlik olarak görülebilir. Folikül duvarının foliküler hücreleri membrana granüloza'yı oluşturur. Likör foliküllerinin sürekli oluşumu, primer oosit, korona radiyata ve ilişkili foliküller hücrelerden oluşan kumulus ooforusun likör foliküllerinde (Şekil 2.8) serbestçe yüzmesi için onun tabanından ayrılmasına neden olur (Gartner ve Hiatt, 2007).



Şekil 2.8. Graaf (olgun) folikülü. A. Kumulus ooforusun içine gömülü oositi içeren geniş antrumlu matür folikülün şematik çizimi. B. Graaf (olgun) folikülün fotomikrografı. A: Antrum; CO: Kumulus ooforus; SG: Stratum granülozum; Tİ: Teka interna (Ross ve Pawlina, 2013).

2.1.3. Ovulasyon

Sekonder oositin, Graaf folikülünden atılma işlemi ovulasyon olarak bilinir. Ovulasyon zamanında lüteinleştirici hormon (LH) seviyelerindeki artış ovaryumlara kan akışının artmasına neden olur ve teka eksterna içindeki kılcak damarlar plazma sızdırmaya başlar ve ödemle sonuçlanır. Ek olarak LH artışı ile şu olaylar gerçekleşir:

- 1) Mayoz indükleyen madde salınır.
- 2) Mayozu indükleyen maddenin etkisi altında Graaf folikülünün primer oositi ilk mayotik bölünmesini tamamlar, sekonder oosit ve birinci kutup cismi olarak iki yavru hücre oluşur.

- 3) Yeni oluşan sekonder oosit, ikinci mayotik bölünmeye girer ve metafazda duraklar.
- 4) Granüloza hücreleri tarafından sürekli oluşturulan proteoglikanların ve hyaluronik asidin varlığı suyu çeker, böylece hem Graaf folikülünün boyutunda hem de membrana granülozanın gevşemesinde daha da büyük artış olur.
- 5) Ovulasyondan hemen önce, Graaf folikülünün tunika albuginaya baskı yaptığı ovaryum yüzeyinde kan akışı kaybolur.
- 6) Stigma adı verilen incelen ve beyazlaşan avasküler bölge üzerindeki bağ dokusu, tıpkı Graaf folikülünün stigma ile temas eden duvarı gibi dejenere olur ve periton boşluğu ile Graaf folikülünün antrumu arasında bir açıklık oluşur.
- 7) Bu açıklıktan sekonder oosit, ona bağlı foliküler hücreler ve likör foliküllerinin bir kısmı ovaryumdan yavaşça salınarak ovulasyon gerçekleşir.
- 8) Graaf folikülünün kalıntıları korpus hemorajikuma ve ardından korpus luteuma dönüştürülür.

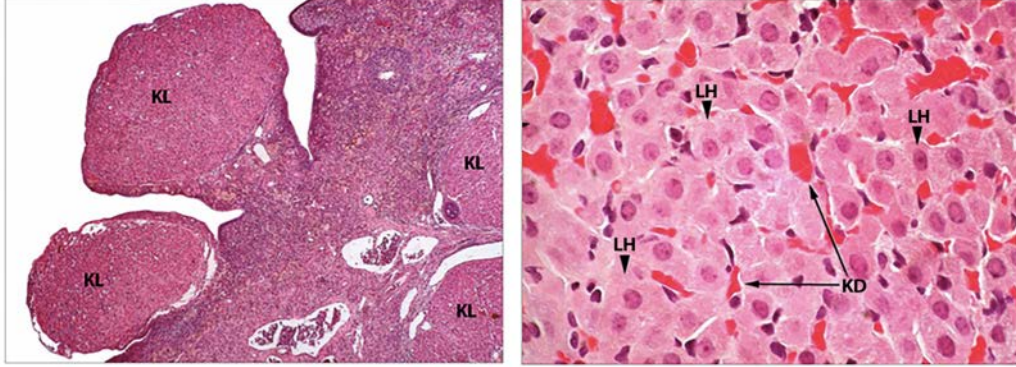
Ovaryum üzerine baskı yapan oviduktun distal fimbrial ucu, sekonder oosit ve folikül hücreleri ovaryumun infundibulumuna süpürür, buradan oositin döllenebileceği ampullaya doğru ilerlerler. Eğer sekonder oosit yaklaşık 24 saat içinde döllenmezse, sekonder oosit dejenere olur ve fagositoza uğrar (Gartner ve Hiatt, 2007).

2.1.4. Korpus Luteum

Sekonder oosit ve bununla ilişkili hücreler ovule olduktan sonra Graaf folikülünün geri kalan kısmı çöker ve katlanır. Bazı yırtılmış kan damarları foliküler kaviteye kan sızdırır ve korpus hemorajikum adı verilen merkezi bir pıhtı oluşur. Pıhtı fagositler tarafından uzaklaştırıldıkça, devam eden yüksek LH seviyeleri korpus hemorajikumu korpus luteum olarak bilinen geçici bir yapıya dönüştürür. Oluşan bu vaskülarize yapı, granüloza lutein hücrelerinden (modifiye granüloza hücreleri) ve teka lutein hücrelerinden (modifiye teka interna hücreleri) oluşur (Gartner ve Hiatt, 2007).

Granüloza lutein ve teka lutein hücreleri tarafından salgılanan progesteron ve östrojenler, sırasıyla LH ve FSH sekresyonunu inhibe eder. FSH'nin olmaması yeni foliküllerin gelişimini engeller, böylece ikinci bir ovulasyon önlenir. Gebelik oluşmazsa LH'nin yokluğu menstruasyonun korpus luteumunun dejenerasyonuna yol açar. Gebelik oluşursa, plasenta tarafından salgılanan insan koryonik gonadotropini 3 ay boyunca korpus luteumu korur. Gebeliğin korpus luteumu olarak adlandırılır ve

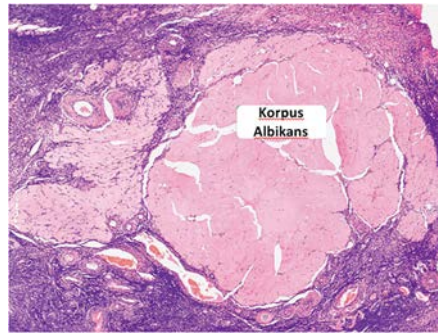
gebeliğin idamesi için gerekli hormonları salgılamaya devam eder (Gartner ve Hiatt, 2007).



Şekil 2.9. Korpus luteumun fotomikrografı. Korpus luteumu oluşturan luteal hücreler (LH) dolgun ve poligonaldır; büyük çekirdekler ve orta miktarda eozinofilik sitoplazma içerirler. Çok fazla kan damarının (KD) olması geçici bir endokrin bez olan işleviyle uyumludur (<https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/43754782.pdf>, Erişim tarihi 22 Kasım 2021).

2.1.5. Korpus Albicans

Gebelik gerçekleşmezse menstruasyonun korpus luteumu (ve ayrıca gebeliğin) fibroblastlar tarafından istila edilir, fibrotik hale gelir ve işlev görmez. Kalıntıları luteoliz olarak bilinen bir süreç olan otolize uğrar ve makrofajlar tarafından fagosite edilir. Korpus albicans olarak bilinen yerinde oluşan lifli bağ dokusu yeniden emilmeden önce bir süre varlığını sürdürür (Gartner ve Hiatt, 2007).



Şekil 2.10. Korpus albicansın fotomikrografı (medcell.med.yale.edu/histology/ovary_follicle.php, Erişim tarihi 22 Kasım 2021).

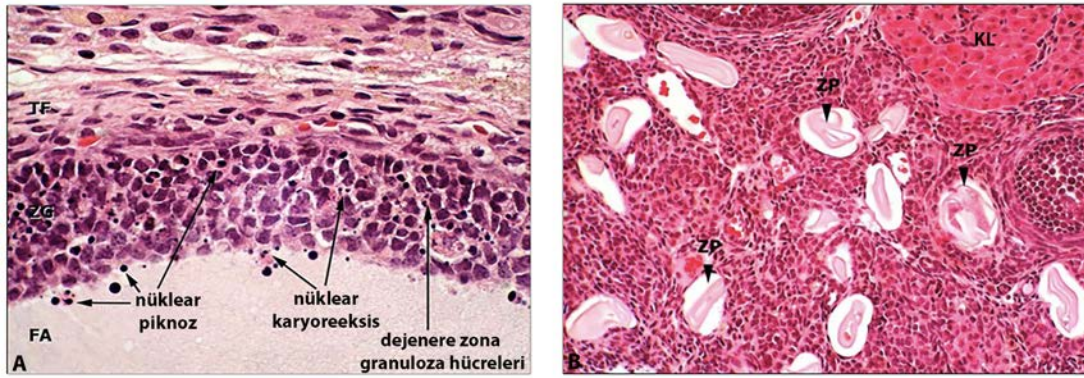
2.1.6. Atrezi

Ovaryumlar çeşitli gelişim aşamalarında birçok folikül içerir. Çoğu folikül olgun aşamaya ulaşmadan önce dejenere olur, ancak her menstrüel döngü sırasında birden

fazla Graaf folikülü gelişir. Bununla birlikte, tek bir olgun folikül parçalandığında, sekonder oositi ve ilişkili hücrelerini serbest bıraktığında, kalan olgunlaşan foliküller ovaryan foliküler atrezi adı verilen süreç ile dejenerasyona uğrar (Ross ve Pawlina, 2013) ve makrofajlar tarafından atretik foliküller fagosite edilir. Bu nedenle her menstrüal döngüde sadece tek bir folikül ovule olur (Gartner ve Hiatt, 2007).

Günümüzde atrezinin, diğer foliküllerin programlanmış ölümü sayesinde az sayıda folikülün gelişimlerini sürdürmek üzere stimüle edildiği bir mekanizma olduğu düşünülmektedir. Böylece folikül, maturasyonunun herhangi bir evresinde atreziye uğrayabilir. Folikül olgunlaşmaya doğru ilerledikçe bu süreç karmaşıklaşır (Ross ve Pawlina, 2013).

Atretik foliküller; camsı membran denilen kalın, kıvrılmış membranöz materyal, değişikliğe uğramış zona pellusida, dejenere olmuş oosit, folikül hücrelerinin kalıntıları ve istila eden makrofajlar ile karakterizedir (Kierszenbaum, 2006; Ross ve Pawlina, 2013).



Şekil 2.11. Atretik foliküllerin fotomikrografi. A. Dejenere (atretik) Graaf folikülde piknotik çekirdekler ve karyoreektik nükleer artıklar dejenere zona granuloza (ZG) boyunca dağılmıştır. B. Değişikliğe uğramış zona pellusida (ZP) (<https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/43754782.pdf>, Erişim tarihi 22 Kasım 2021).

2.2. Endoplazmik Retikulum Stresi

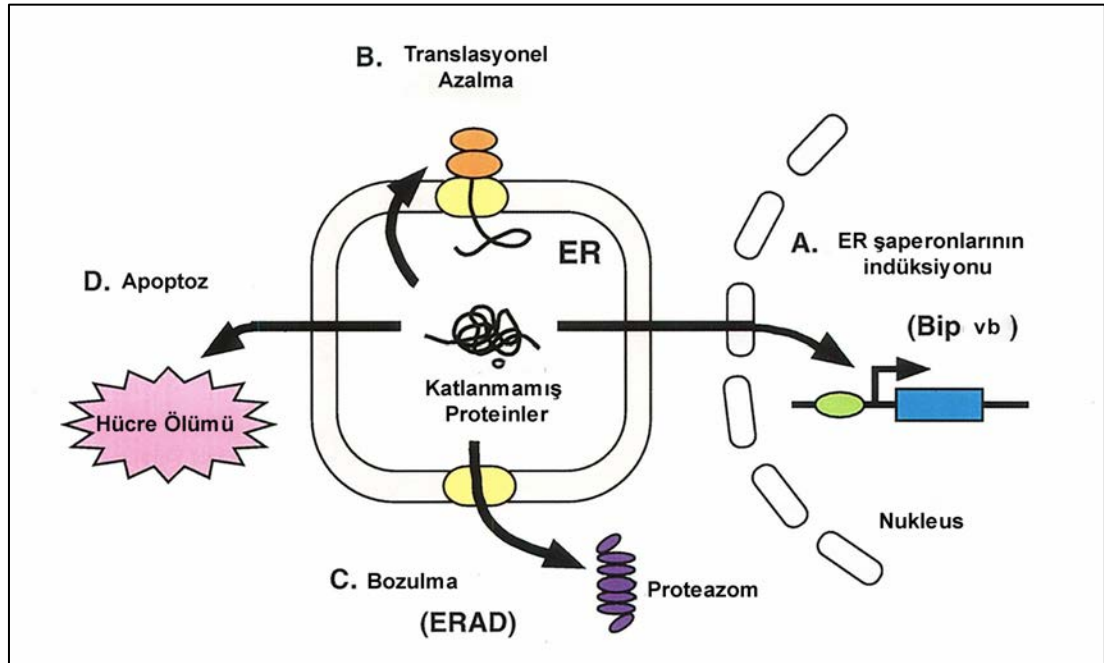
Ökaryotik hücrelerin sitoplazmasında yer alan ER, düzleştirilmiş kese ağından ve nükleer membranla devam eden dallı membranöz tübüllerden (Porter ve ark., 1945) oluşmaktadır. 1952 yılında ER yapısını ilk gözlemleyen Porter ve Kallman adlı iki araştırmacı 'ER' terimini bilim dünyasına kazandırmışlardır (Porter ve Kallman, 1952). ER gelişiminin, nükleer zarfın tomurcuklanmasından ya da plazma

membranının invajinasyonundan kaynaklandığı varsayılmaktadır (Wischnitzer, 1974). Toplam hücre zarı hacminin % 15 ile % 60'ını oluşturan ER, evrimsel olarak belirlenmiş bir hücresel organel olup sentez, katlama ve modifikasyonu kontrol eder (Kaufman, 2004). ER, hücre içi kalsiyumun (Ca^{2+}) depolandığı bir kompartımandır ve çeşitli hücresel organeller arasında Ca^{2+} dengesinin düzenlenmesinde ve sürdürülmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Krebs ve ark., 2015). Ayrıca; ER, diğer organeller içinde gerekli olan membran lipidlerinin çoğunu üreterek hücre yapısına ve işlevine önemli katkıda bulunur (Gao ve Goodman, 2015).

Basit, doğrusal polipeptit zincirler olarak sentezlenen proteinler nihai yapısal ve fonksiyonel benzersiz üç boyutlu konformasyonlarına kavuşmadan önce karmaşık glikozilasyon ve katlanma süreçlerinden geçerler. ER'de sentezlenen tüm proteinler, hücre dışı yapılara ve fonksiyonlara katkıda bulunan salgı proteinlerinden, hücre içi ve hücre dışı ortamları köprüleyen plazma membran proteinlerinden ve ER fonksiyonlarını modüle eden ER lümenal proteinlerinden oluşur. Sitoplazma ile karşılaştırıldığında, ER lümeni çok daha yüksek bir oksidatif kapasite sergiler ve daha yüksek Ca^{2+} seviyeleri içerir. Bu ekstra oksidatif ve hiperkalsemik ER ortamı protein sentezi ve katlanması sırasında çok önemli rol oynar (Kaufman ve ark., 2002). Çünkü protein katlanması enerjiye bağımlı bir süreçtir ve glikoz yoksunluğu varlığında yanlış katlanma/ glikozilasyon meydana gelebilir (Scriven ve ark., 2009). ER lümeninde yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinlerin birikmesi ER homeostazını bozabilir ve ER stresi olarak adlandırılan bir durumu aktif hale getirebilir (Zhang ve ark., 2012b).

ER stresi koşulları altında hayatta kalabilmek için hücrelerde, ER stresine karşı en az dört işlevsel farklı yanıt tanımlanmıştır (Şekil 2.12). Bunlardan ilki, ER refakatçi proteinlerini kodlayan genlerin yukarı düzenlenmesini sağlayarak protein katlama aktivitesini arttırmak ve protein birikimini önlemektir (Araki ve ark., 2003). ER'deki protein katlanması, GRP78 ve GRP94 gibi ER şaperon proteinleri ve protein disülfür izomeraz gibi enzimler tarafından kolaylaşır. Bu proteinler, promotörlerinde, cis-etkili ER stres yanıt faktöründe veya katlanmamış protein cevabı faktöründe bir ortak diziyi paylaşır. Üç farklı ER membranda yer alan IRE1, PERK ve ATF6 transmembran proteinleri, ER'de meydana gelen protein katlanmasındaki hataya yanıt olarak ER'den çekirdeğe stres sinyalleri iletirler (Araki ve ark., 2003).

İkinci yanıt, yeni protein yükünü azaltmak ve katlanmamış proteinlerin daha fazla birikmesini önlemek için translasyonu azaltmaktır. Bu olgu, eIF2 α fosforilasyon yolu ile translasyon başlatma seviyesinde meydana gelir (Araki ve ark., 2003). Faktör eIF2, mRNA translasyonunda genel olarak hız sınırlayıcı bir adım olarak kabul edilen adımın korunmasında merkezi bir rol oynar. Bu adımda, eIF2, Guanozin trifosfat (GTP) ve Methionine Transfer RNA (Met-tRNA_i)'yı bağlar ve Met-tRNA_i'yi 40S ribozomal alt birimine aktarır. Başlatma sürecinin sonunda eIF2'ye bağlı GTP, GDP'ye hidrolize edilir ve eIF2-GDP kompleksi ribozomdan serbest bırakılır. GTP için eIF2'ye bağlı GDP'nin değişimi, Met-tRNA'nın bağlanması için bir ön koşuldur ve ikinci bir başlatma faktörü olan eIF2B tarafından düzenlenir. Muhtemelen mRNA translasyonunun düzenlenmesi için en iyi karakterize edilmiş mekanizma olarak, eIF2'nin en küçük veya alfa alt biriminin fosforilasyonu, eIF2'yi bir eIF2B substratından rekabetçi bir inhibitör haline dönüştürür. Bu nedenle eIF2 α 'nın fosforilasyonu eIF2, GTP, Met-tRNA_i kompleksinin oluşumunu etkili bir şekilde önler ve global protein sentezini inhibe eder (Kimball, 1999).



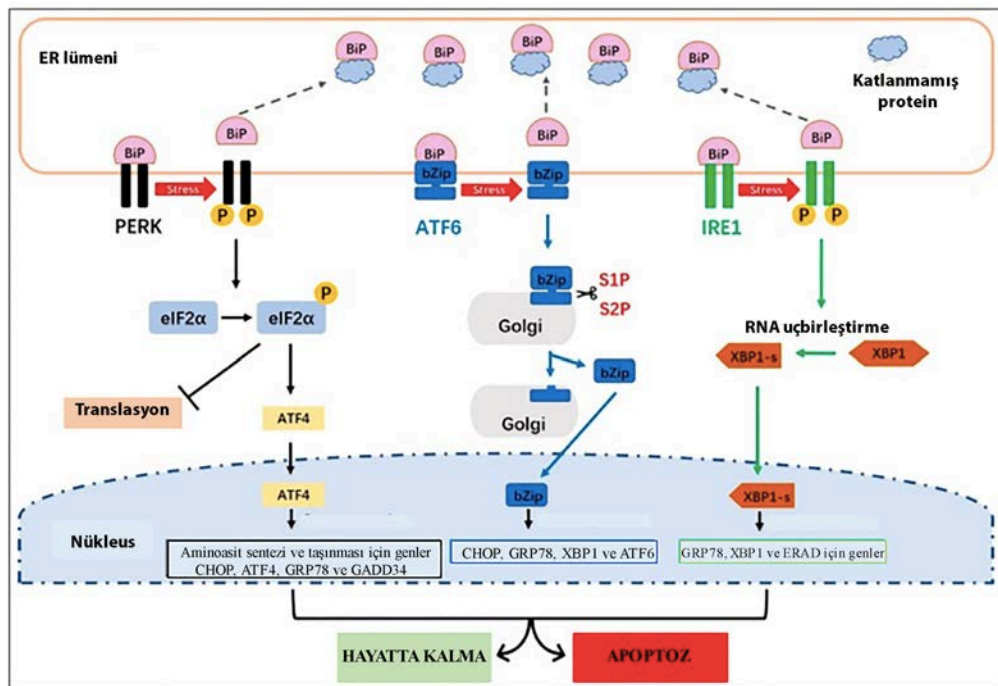
Şekil 2.12. ER stresine karşı tanımlanan dört farklı yanıt (Araki ve ark., 2003).

Üçüncü yanıt, ER'de yanlış katlanmış proteinlerin ER ile ilişkili bozunma aracılığı ile bozulmasıdır. ER'de yeniden katlanmayan yanlış katlanmış proteinler, ER kalite kontrol sistemi tarafından tespit edilebilir, ER'den sitozole geri taşınabilir ve 26S proteozomu tarafından parçalanabilir (Araki ve ark., 2003).

Dördüncü yanıt, şiddetli ve uzun süreli ER stresi, ER işlevlerini büyük ölçüde bozduğunda ortaya çıkan apoptozdur. Apoptoz, sadece organizmanın bütünlüğünü tehdit eden hücrelerin uzaklaştırılması için değil, uygun gelişme ve farklılaşma için de gereklidir (Araki ve ark., 2003).

2.3. Katlanmamış Protein Cevabı (Unfolded Protein Response, UPR)

Katlanmamış protein cevabı sinyal yolağı, ER lümenini sitoplazma ve nükleusa bağlayarak, bir hücrenin stres ile başa çıkma kapasitesini artırır. Özellikle plazma hücreleri ve pankreas hücreleri gibi özelleşmiş salgı hücrelerinde, ER kısmı, oldukça fazla miktarda bulunan refakatçi protein yardımı gerektiren kısmen katlanmamış olarak bulunan protein yükünü telafi etmek için önemli ölçüde genişler. Şekil 2.13’de gösterildiği üzere stres altında olmayan hücrelerde GRP78, üç yerleşik ER membran proteininin (UPR sinyal dönüştürücüleri) luminal alanına bağlanır. Bunlar: PERK, ATF6 ve IRE1’dir (Lee ve Ozcan, 2014). GRP78’in katlanmamış ve/veya yanlış katlanmış proteinlere olan yüksek bağlanma afinitesi, stres koşullarında normalde bağlı oldukları UPR sinyali dönüştürücü proteinlerinden ayrılmalarını teşvik eder. Bu ayrışma ile birlikte ER’de GRP78’e bağlanan katlanmamış/yanlış katlanmış proteinler endoplazmik retikulum ile ilişkili protein bozunma (ERAD) kompleksine ve proteozom aracılı parçalanmaya sokulur. Bu durum hücreyi ER stresi ile indüklenen hücresel fonksiyon bozukluğu ve apoptoza karşı korunmasını sağlar (Lee, 2005).



Şekil 2.13. Katlanmamış protein cevabı sinyal yolağı (Lin ve ark., 2019).

Eş zamanlı olarak ATF6, PERK ve IRE1 α ; GRP78'den ayrıldıktan sonra, aktif hale geçen üç UPR sinyal kaskatı şu şekildedir:

1. PERK Sinyal Yolağı; GRP78'e bağlanan ve ER lümeninde bulunan bir ER transmembran sensör proteindir. ER stresi altında PERK, GRP78'i serbest bırakır ve fosfo-eIF2 α 'nın dimerizasyonunu ve fosforilasyonunu tetikleyerek protein sentezininin inhibisyonuna yol açar (Osowski ve Urano, 2011). eIF2 α 'nın fosforilasyonunun ER'deki yeni proteinlerin sentezini azaltmada, ER stresini hafifletmede ve ER homeostazını geri kazanmada önemli olduğu düşünülmektedir (Harding ve ark., 2000). Ayrıca, PERK-fosfo-eIF2 α sinyali UPR aracılı gen ekspresyonunun anahtarı olan ATF4'ü aktif hale geçirir. ATF4'ün transkripsiyonel aktivitesi hem hücrenin hayatta kalmasını sağlayan hem de hücre ölümüne neden olan programları indükleyebilir. Hafif ER stresi altında ATF4; stres tepkilerinde, aminoasit metabolizmasında ve protein salgılanmasında rol oynayan genleri tetikleyerek hücrenin hayatta kalmasını sağlarken (Harding ve ark., 2003), uzun süreli stres altında, PERK sinyali ATF4 ve CHOP'u artırarak hücre apoptozunu destekler (Han ve ark., 2013).

2. ATF6 Sinyal Yolağı, bir ER tip II transmembran proteindir; bZip ve DNA transkripsiyonel aktivasyon alanlarını içeren bir N- terminal sitoplazmik bölge ve ER lümenine maruz kalan bir C- terminal bölgesi içerir (Shen ve ark., 2004). ATF6'nın iki memeli homoloğu vardır: ATF6 α ve ATF6 β (Yoshida ve ark., 2001). Normal koşullar altında ATF6, ER'de GRP78 ile ilişkilidir. Stres altında ise GRP78'den ayrılır ve Golgi aygıtına yer değiştirir, burada site 1 proteaz ve site 2 proteaz tarafından aktif forma bölünür (Şekil 2.13). Daha sonra aktif transkripsiyon faktörü olarak çekirdeğe taşınır (Ye ve ark., 2000). ATF6'nın önemli hedef genleri arasında GRP78, XBP1 ve CHOP yer alır (Shen ve ark., 2004).

3. IRE1 Sinyal Yolağı, evrimsel olarak en korunmuş ER stresi dönüştürücüsü olarak IRE1 α , sitozolik bölgesinde serin treonin kinaz ve endoribonükleaz alanları içerir. Diğer transmembran proteinlerde olduğu gibi normal koşullar altında IRE1, GRP78 ile etkileşim halinde aktif olmayan bir formda kalır. Stres durumunda özellikle GRP78'in ayrılması sonunda IRE1 α sitoplazmaya salınır ve her yerde ifade edilen XBP1u mRNA'sından 26 nükleotit uzaklaştırılarak XBP1s oluşmasını katalizleyen aktif bir endonükleaz olur (Şekil 2.13). XBP1s genellikle UPR'nin IRE1 kolunun

indüksiyonu için uygun bir belirteç olarak kabul edilir, çünkü XBP1 yalnızca stres koşulları altında eklenir (Abraham ve ark., 2012). XBP1s'ler ER şaperonlarının, özellikle GRP78 seviyelerinin artmasına neden olur ve böylece ER homeostazını koruyan bir transkripsiyon faktörü olarak işlev görür (Lee, 2005). Bununla birlikte, ER stresine neden olan birincil uyarıcı, uzun veya şiddetli ise öncelikle apoptoz ile hücre ölümü indüklenir (Heath-Engel ve ark., 2008).

2.4. ER Stresi Tarafından İndüklenen Üç Ana Kanonik Apoptoz Yolağı

UPR sinyali, ER homeostazının restorasyonu ve normal ER işlevinin sürdürülmesi için son derece önemlidir. Yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinleri ER lümeninde biriktiğinde, bu ER stres kaynağını iyileştirmek için UPR sinyali aktif hale gelir. Bununla birlikte, yanlış katlanmış ya da katlanmamış protein birikimi kalıcıysa ve stres giderilmezse apoptoz, CHOP, Jun N-terminal kinaz (JNK) (Szegezdi ve ark., 2006) ve kaspaz 12'nin aktivasyonu ile indüklenir (Szegezdi ve ark., 2003).

2.4.1. CHOP Sinyal Yolağı

Büyüme durması ve DNA hasarı indüklenebilir gen 153 (GADD153) olarak tanımlanan CHOP, DNA hasarına cevap veren bir faktör olarak tanımlanmıştır. Şiddetli veya uzun süreli ER stres koşulları altında, UPR'nin üç kolu da CHOP transkripsiyonunu indükleyebilir; bununla birlikte PERK- eIF2 α - ATF4 yolunun, CHOP protein ekspresyonunun yukarı düzenlenmesinde gerekli olduğu gösterilmiştir. GRP78, ATF4'ü tetiklemek için PERK'den serbest kalarak, CHOP ifadesinin yukarı düzenlenmesine neden olur (Szegezdi ve ark., 2006).

ER stresinin neden olduğu apoptozda CHOP'un rolü beklenen sıklıkta doğan ve fenotipik olarak normal görünen *Chop*^{-/-} farelerde gösterilmiştir. Bu çalışma *Chop*^{-/-} fare embriyonik fibroblastlarında, CHOP eksikliğinin ER stresine kaynaklı apoptoz kısmi direnç sağladığını ortaya koymuştur (Zinszner ve ark., 1998).

2.4.2. JNK Sinyal Yolağı

ER stresindeki ikinci apoptotik yol, JNK yolunun aktivasyonudur. JNK'lar, gen ekspresyonunu düzenleyen ve strese yanıt olarak apoptoz ve hayatta kalma arasındaki seçimi belirlemeye katılan sinyal iletim proteinleri ailesini oluşturur. Etkinleştirilmiş IRE1, TNF reseptörü ile ilişkili faktör 2 (TRAF2) ve Apoptoz sinyal düzenleyici kinaz 1 (ASK1)'e bağlanır ve JNK aktivasyonuna yol açan IRE1- TRAF2- ASK1

kompleksinin oluşumuyla sonuçlanır (Urano ve ark., 2000). JNK birçok B hücreli lenfoma 2 (Bcl-2) aile üyelerini fosforiller, sitokrom c salınımını, kaspaz aktivasyonunu ve apoptozu teşvik eder (Cao ve Kaufman, 2012).

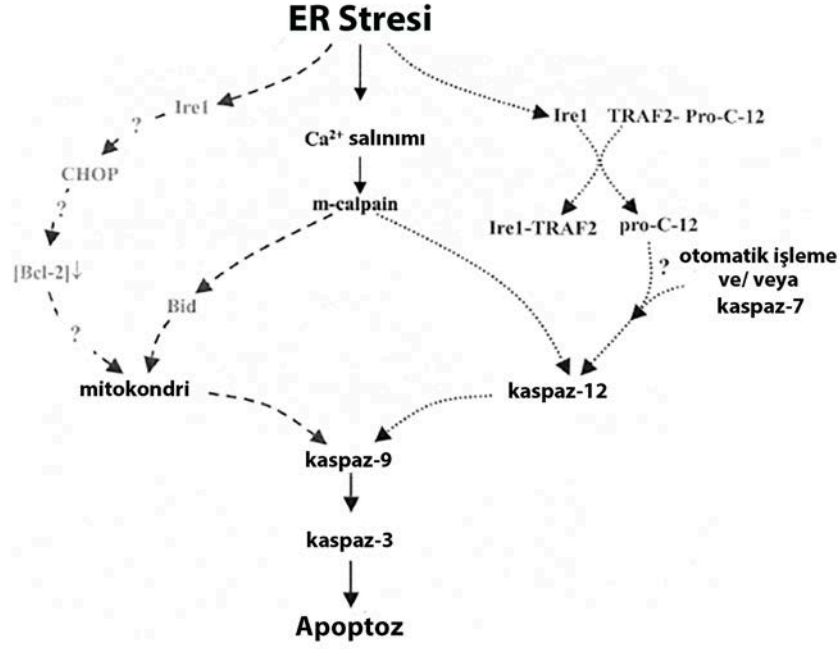
İnsan JNK'leri *jnk1*, *jnk2* ve *jnk3* olmak üzere üç gen tarafından kodlanmıştır (Gupta ve ark., 1996). Karşılık gelen murin genleri de tanımlanmıştır (Kyriakis ve ark., 1994). JNK1 ve JNK2, birçok dokuda yaygın olarak ifade edilirken, JNK3 tercihen nöronal dokularda ifade edilir. JNK'nin fizyolojik fonksiyonları genetik analiz ile incelenmiştir. *Jnk1^{-/-}*, *jnk2^{-/-}* ve *jnk3^{-/-}* tek mutant farelerde genel bir anormallik gözlenmemiştir. Normal farelere kıyasla *jnk3^{-/-}* farelerin hipokampusünde eksitoksisite kaynaklı apoptozun olmadığı belirtilmiştir (Yang ve ark., 1997). *Jnk1/jnk3* ve *jnk2/jnk3* eksikliği olan farelerin normal olarak geliştiği gözlenirken; *jnk1/jnk2* eksik farelerin embriyonik olarak ölümcül olduğu ve beyin dokularında apoptozda ciddi düzensizliklerin olduğu belirtilmiştir (Kuan ve ark., 1999).

2.4.3. Kaspaz 12 Sinyal Yolağı

Kaspaz 12, ER stresinin neden olduğu apoptozun temel bir aracısı olduğu önerilmiştir (Szegezdi ve ark., 2003). Kaspaz 12 yalnızca kemirgenlerde ifade edilir; insan homologu evrim sırasında çeşitli mutasyonlarla susturulmuştur. *Kaspaz 12^{-/-}* fare embriyonik fibroblast hücrelerinin, özellikle ER stres indükleyen ajanlara karşı kısmi direnç sergilediğinin gösterilmesi (Nakagawa ve ark., 2000) kaspaz 12'nin ER stresi kaynaklı apoptozda önemli bir rol üstlendiğini düşündürmektedir.

Kaspaz 12, ER stresi tarafından aktif hale getirilir, ancak görünüşe göre ölüm reseptörü aracılı veya mitokondri hedefli apoptotik sinyaller tarafından etkinleştirilmez. Kaspaz 12 aktivasyon mekanizmasını araştıran son çalışmalar birkaç model önermektedir. Pro- kaspaz 12 adaptör molekülü TRAF2 aracılığıyla IRE1 α ile etkileşime girebilir. ER stresi nedeniyle pro- kaspaz 12, TRAF2 homodimerizasyonundan salınır ve otomatik işlemeye girer (Şekil 2.14) (Yoneda ve ark., 2001). Pro-kaspaz 12 aktivasyonunun bir başka önerilen mekanizması, ER stresi sırasında ER'den salınan Ca⁺²'nin m-kalpain'i aktif hale getirmesi ve m- kalpainin sitozolden ER'ye yer değiştirmesi ile kaspaz 12'nin pro alanını ayırmasıdır (Nakagawa ve Yuan, 2000). Önerilen bu mekanizmanın yanı sıra, kaspaz 12'nin kaspaz 7 (Rao ve ark., 2001)'nin aktivasyonu ile aktif hale geçtiği bildirilmiştir (Şekil 2.14). Aktif hale geçen kaspaz

12, ER'den sitozole doğru yer değiştirir. Burada pro- kaspaz 9'u doğrudan böler ve bu da efektör kaspaz 3'ü etkinleştirir (Morishima ve ark., 2002).



Şekil 2.14. Kaspaz 12 ve ER stresi aracılı apoptotik yolağı gösteren şema (Szegezdi ve ark., 2003).

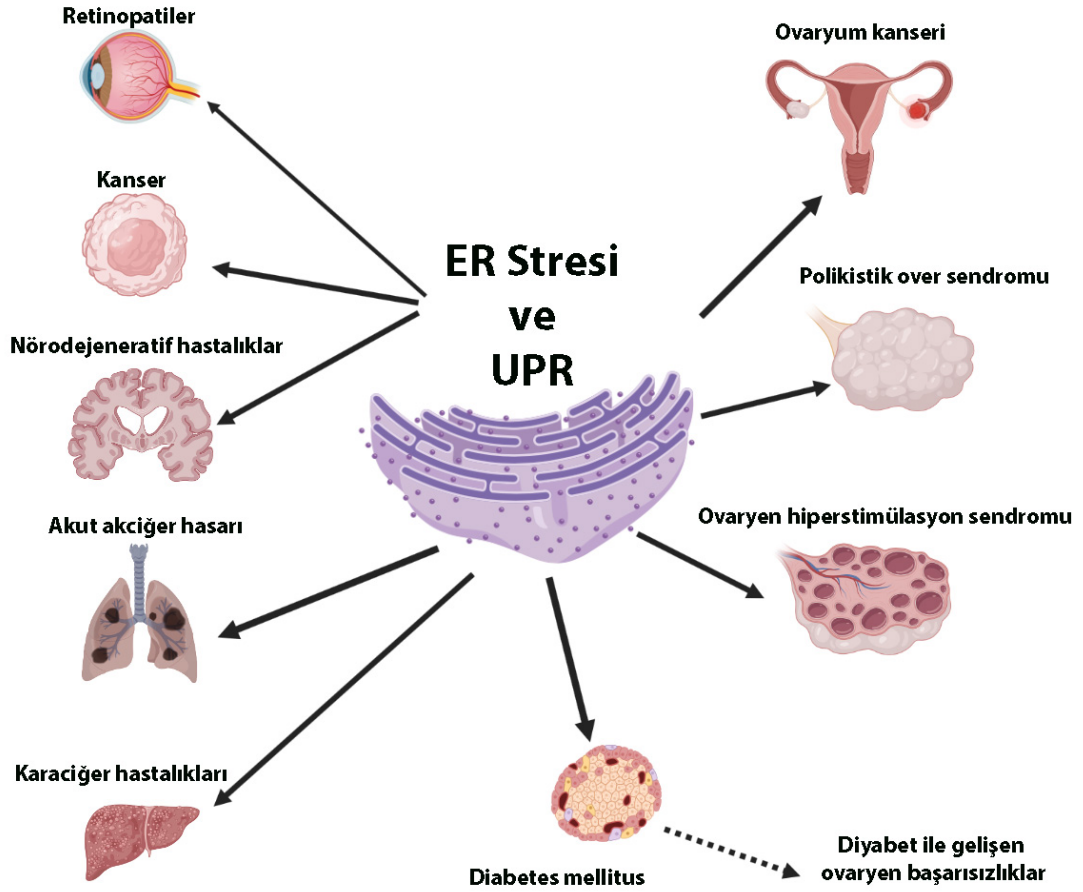
2.5. Katlanmamış Protein Cevabı ve İlişkili Hastalıklar

UPR, geçici ve hafif ER stresi koşulları altında hayatta kalmayı teşvik edebilir veya tersine, ER stresi uzun ve şiddetli ise apoptoz sinyal moleküllerini aktif hale geçirerek hücre ölümünü teşvik edebilir. Şiddetli ER stresi altında hücre ölümü, organizmaları yanlış katlanmış proteinlere maruz kalmalarından, diabetes mellitus (Back ve ark., 2012), retinopatiler (Rana ve ark., 2014) ve akut akciğer hasarı (Hu ve ark., 2015) gibi birçok yaygın hastalıklardan koruyabilir ya da bu duruma hücre ölümünü indükleyen şiddetli ER stresi de neden olabilir.

2.5.1. UPR ve Ovaryum

Ovaryum, fertilizasyon için olgun oositlerin farklılaşmasından ve salınmasından sorumlu üreme ile ilgili işlevlerin yanı sıra östrojen, progesteron ve androjen gibi cinsiyet hormonlarının sentezlenmesinden ve salgılanmasından sorumlu endokrin işleve sahiptir. Memeli ovaryumunda asıl fonksiyonel kısım foliküllerdir ve en içte tek oositten, oositi çevreleyen granuloza hücrelerinden ve teka interna hücrelerinin dış tabakalarından ve teka eksterna hücrelerinden meydana gelir. Primordiyal foliküllerin seçilimiyle başlayan folikül gelişimi başlıca dört evrede gerçekleşir: Primer, sekonder,

antral ve preovulatar evre (McGee ve Hsueh, 2000; Monniaux ve ark., 2014) . Foliküler büyüme, oosit boyutundaki artış ile birlikte oositi çevreleyen GH'lerinin çoğalması aracılığı ile gerçekleşir. Sekonder folikül aşamasından sonra, oosit büyümesi ve GH proliferasyon hızı giderek artabilir ve bu durum hipoksik duruma neden olabilir (Monniaux ve ark., 1997; Monniaux ve ark., 2016). Bu tür lokal koşullar, ER stresini ve UPR sinyalini indükleyen yanlış katlanmış ya da katlanmamış protein birikimine neden olan ER'nin işlev bozukluğuna yol açabilir (Harada ve ark., 2015). Endokrin ve parakrin kontrolü altında, aynı anda büyüyen bir grup foliküllerin arasından bir folikül seçilir ve diğer foliküller, foliküler atreziye uğrar (Scaramuzzi ve ark., 2011), bu durum ER stresi tarafından indüklenebilir (Lin ve ark., 2012b). Korpus luteum ovulatar folikülü çevreleyen folikül hücreleri tarafından gelişir ve progesteronun başlıca sentezlendiği ve salgılandığı yerdir. Bazı çalışmalar, UPR ve progesteron sentezi arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir (Park ve ark., 2013). ER stresinin ve UPR sinyalinin ovaryan fizyolojisindeki işlevlerine ek olarak, ovaryan hipersitimülasyon sendromu (Takahashi ve ark., 2016), polikistik over sendromu (Takahashi ve ark., 2017), over kanseri (Hu ve ark., 2017) ve T1DM (Okan ve ark., 2021) ile gelişen ovaryan patolojisinde de rolleri vardır.



Şekil 2.15. UPR ve ilişkili hastalıklar (Huang ve ark., 2017).

2.6. Tip 1 DM

Üreme bozukluğu T1DM kadınlarda oldukça yaygındır ve bu kadınların %40'ı yaşamları boyunca menstrual döngü veya üreme bozukluklarına sahip olacağı öngörülmektedir (Codner ve ark., 2012). Ayrıca subfertilite, iyi bilinen gebelik komplikasyonları ve erken menopoz T1DM ile ilişkilendirilmiştir (Dorman ve ark., 2001; Sjoberg ve ark., 2013). Son yirmi yılda insülin tedavisinin yoğunlaşması bu sorunların bazılarını iyileştirmiş gibi görünmektedir (Codner ve ark., 2012) ancak T1DM'li kadınların üreme sağlığı hala belirsizliğini korumaktadır (Escobar-Morreale ve Roldan-Martin, 2016). Özellikle insülin verilmesinin ardından, tedavinin yoğunlaşmasını takiben menstrual bozukluklar azalmış olsa da bu anormallikler var olmaya devam etmektedir. Oligomenore ve artan siklus uzunluğu tip 1 diyabet gruplarında gözlenen en yaygın adet döngüsü anormallikleridir. Menstrüel disfonksiyonun gözlenme oranının T1DM'li ergenlerde (%20-80 oranında), T1DM'li yetişkin kadınlara (%20-40 oranına) göre daha yaygın olduğu bildirilmiştir (Thong ve ark., 2020).

İnsülin, insülin direnci ve hiperglisemi (Codner ve ark., 2012; Nandi ve Poretsky, 2013) hem tip 1 hem de tip 2 diyabette ovaryum disfonksiyonuna katkıda bulunabilir. Ovaryum granüloza, teka ve stromal kısımlarda insülin reseptörlerini ifade eder. İnsülin bu reseptörlere ve ovaryan insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1) reseptörlerine (Poretsky ve ark., 1984) bağlanır ve ko-gonadotropin olarak bilinen bir etkiyle FSH ve LH ovaryan stimülasyonunu taklit eder. *İn vitro* çalışmalar, insülinin, granüloza ve teka hücreleri tarafından androjen, östrojen ve progesteron üretimini artırmak için bu reseptörleri uyarabildiğini göstermiştir (Ibanez ve ark., 2004; Codner ve ark., 2013). Ayrıca kronik hiperglisemi, potansiyel olarak glikasyon son ürünleri ve reseptörleri yoluyla, T1DM'de folikülogenezi olumsuz şekilde değiştirebilir ve ovaryum fonksiyonunu bozabilir (Codner ve ark., 2012).

2.6.1. Tip 1 DM ve Yeni Tedavi Hedefleri

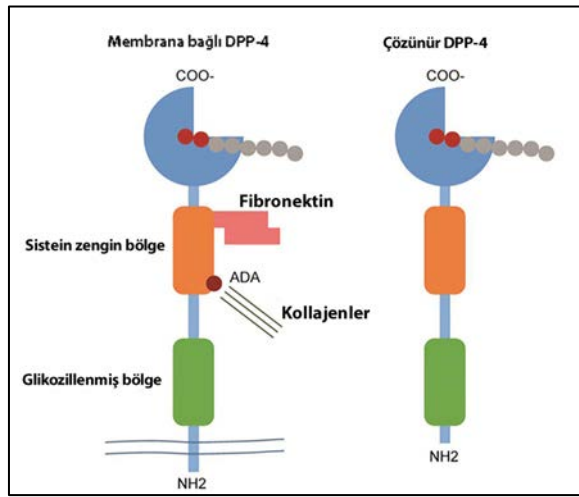
Diyabet milyonlarca kadını ve ailesini etkileyen bir hastalıktır. Uluslararası Diyabet Federasyonu, 2017 yılında diyabetle yaşayan dünya genelinde yaklaşık 199 milyon kadının olduğunu tespit etmiştir ve bu sayının 2040 yılında muhtemelen 313 milyona çıkacağı tahmin edilmektedir. (<https://www.diabetesatlas.org/upload/resources/previous/files/7/IDF%20Diabetes%20Atlas%207th.pdf>, Erişim tarihi: 23 Kasım 2021). Üreme yaşındaki diyabetik kadınlarda gecikmiş menarş, oligomenore ve amenore olmak üzere menstrüal düzensizlikler (Kjaer ve ark., 1992) ve azalmış over rezervi (Kim ve ark., 2016) görülmektedir. Ağırıklı olarak T1DM, gecikmiş oosit maturasyonuna, artmış granüloza/kumulus hücrelerinin apoptozuna (Chang ve ark., 2005) ve bozulmuş hücrel metabolizmaya (Colton ve ark., 2002) neden olarak kadın üreme işlevini olumsuz etkilemektedir. T1DM, pankreatik adacıklarda insülin üreten beta (β) hücrelerinin seçici ve ilerleyen yıkımından kaynaklanan otoimmün aracılı bir hastalıktır (Atkinson ve Eisenbarth, 2001). T1DM hastalığında glikoz kontrolünün insülin tedavisi ile yapılması önerilmektedir. Ancak çoğu hastada, insülin enjeksiyonu yapıyor olmasına rağmen beklenen optimal glikozillenmiş hemoglobin seviyelerine ulaşamamıştır. T1DM'de yoğun glikoz kontrolü hem mikrovasküler hem de makrovasküler komplikasyonları önemli derecede azaltmaktadır. Fakat sıklıkla artan hipoglisemi riski, kilo artışı, yüksek insülin dozları ve sık sık tekrarlanan enjeksiyonlar gibi (Guo ve ark., 2016) istenmeyen olumsuz etkilere neden olmaktadır. T1DM'yi yenmek için immünoterapi, adacık nakli ve kök hücre/öncü hücre transplantasyonu

gibi yeni tedaviler kullanılmaktadır. Ancak, bu uygulamaların dayanıklı etkinliğinin olmaması, ciddi yan etkilerinin olması (örneğin, sitokin salınımı sendromu ve geçici Epstein-Barr viral enfeksiyonu), immünsüpresyon, ve donörlerin azlığı gibi çok sayıda defekt T1DM'li hastalardaki uygulamalarını sınırlandırmaktadır (Pozzilli ve ark., 2015). İnsülindeki ve uygulamadaki gelişmelere rağmen, T1DM'li hastaların çoğu optimal glikoz kontrolüne erişmede zorluk yaşamaya devam etmektedir (Livingstone ve ark., 2017). Dolayısıyla, T1DM'li hastalar için yeni ve yardımcı tedavilerin değerlendirilmesi gerekmektedir (Livingstone ve ark., 2017).

Tedavi hedeflerine ulaşmak için, insüline tamamlayıcı olan ilaçların kullanıldığı kombinasyon terapisi uygun olabilir. DPP-4 inhibitörleri tip 2 diyabet için lisanslanmış yeni oral- glikoz düşürücü ilaç tiplerinden biridir ve ilk olarak içlerinden sitagliptin 2006 yılında ABD'de onaylanmıştır (Inzucchi ve ark., 2015). Vildagliptin, linagliptin, saksagliptin, alogliptin ve dutogliptin bu sınıfa ait diğer üyelerdir (Deacon ve Holst, 2013). Gliptinler olarak da tanımlanan DPP-4 inhibitörleri, kilo alımı veya hipoglisemi için düşük risk taşıyan ve ılımlı glisemik etkinliğe sahip olan oral yoldan verilen ilaçlardır (Inzucchi ve ark., 2015). T1DM'li hastalar normal olmayan yükselmiş glukagon sekresyonuna sahiptir ve insülin tedavisine bir DPP-4 inhibitörünün eklenmesi bu tür hastalarda glisemik kontrolü ve insülin talebini azaltabilir ve rezidüel endojen insülin sekresyonu olan hastalarda insülin sekresyonunu artırabilir (Frandsen ve ark., 2016). Dolayısıyla DPP-4 inhibitörlerinin tedaviye eklenmesi T1DM'li hastaları için umut vadetmektedir.

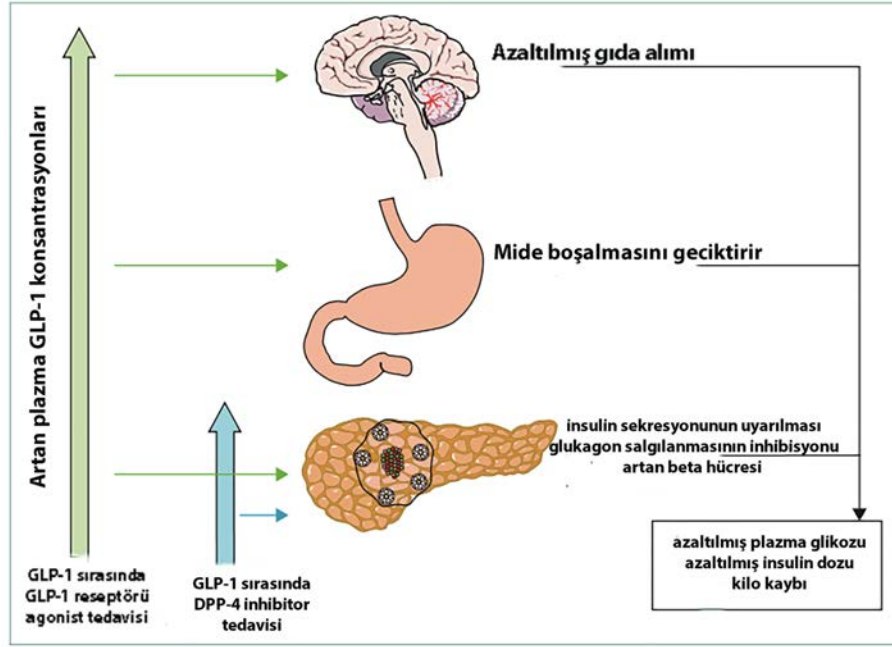
CD26 olarak da bilinen DPP-4, glikoz homeostazında kritik role sahip çok fonksiyonlu bir transmembran glikoproteinidir (Drucker, 2007). Yapısal olarak, monomerik DPP-4 kısa hücre içi N-terminali kuyruğu, hidrofobik transmembran segmenti ve C terminalinde katalitik alan, sistein açısından zengin bir bölge ve glikozile bir bölge içeren hücre dışı bölümden oluşur. Transmembran formuna ek olarak, DPP-4 biraz daha küçük çözümlü forma sahiptir. Çözümlü formunda, membran bağlı formunda olan hücre içi ve transmembran bölgeler bulunmazken, hücre dışı bölüm ve katalik domeyine sahiptir (Şekil 2.16) (Lambeir ve ark., 2003). Membran bağlı DPP-4, immün hücreler ve vasküler endotel hücreler dahil olmak üzere bir dizi farklı doku ve hücre tipinde birçok organda bulunan yaygın bir proteindir (Lambeir ve ark., 2003; Klemann ve ark., 2016). DPP-4'ün derideki, özofagustaki, ince barsaktaki, meme ve

ovaryumdaki lenfatik damarlar tarafından spesifik olarak ifade edildiğini kanıtlanmıştır (Shin ve ark., 2008). Çözünür DPP-4, kanda ve diğer vücut sıvılarında bulunur (Lambeir ve ark., 2003; Klemann ve ark., 2016). Serin proteaz enzim olan DPP-4, inkretin hormonları olan glukagon benzeri peptit 1 (GLP-1) ve glikoz bağımlı insülinotropik peptidi (GIP) etkisiz hale getirir. Yemek alımından sonra bağırsaktan salınan GLP-1 ve GIP, pankreatik β hücrelerinden glikoz bağımlı insülin sekresyonunun artırılması, α -hücrelerinden aşırı glukagon salgılanmasının baskılanması ve diğer çeşitli biyoaktiviteler aracılığıyla metabolik homeostazın sağlanmasında işlev görürler (Osawa ve ark., 2016).



Şekil 2.16. Membrana bağlı DPP-4 ve çözünür DPP-4 (Lambeir ve ark., 2003; Kanasaki, 2018).

DPP-4 inhibitörleri, endojen GLP-1 konsantrasyonunu iki veya üç defa artırır, glikoz bağımlı insülin sekresyonunun ve glukagon inhibisyonunun yoğunluğunu artırır. Ayrıca, hipoglisemi riskini artırmadan ve kilo alımını indüklemeden kan glikoz seviyesini düşürücü etkileri (Şekil 2.17) vardır (Madsbad ve ark., 2008; Deacon, 2011; Karagiannis ve ark., 2012).



Şekil 2.17. İnkretin temelli DPP-4 inhibitörlerinin eylem mekanizması (Lambeir ve ark., 2003; Frandsen ve ark., 2016).

2.6.2. Linagliptin

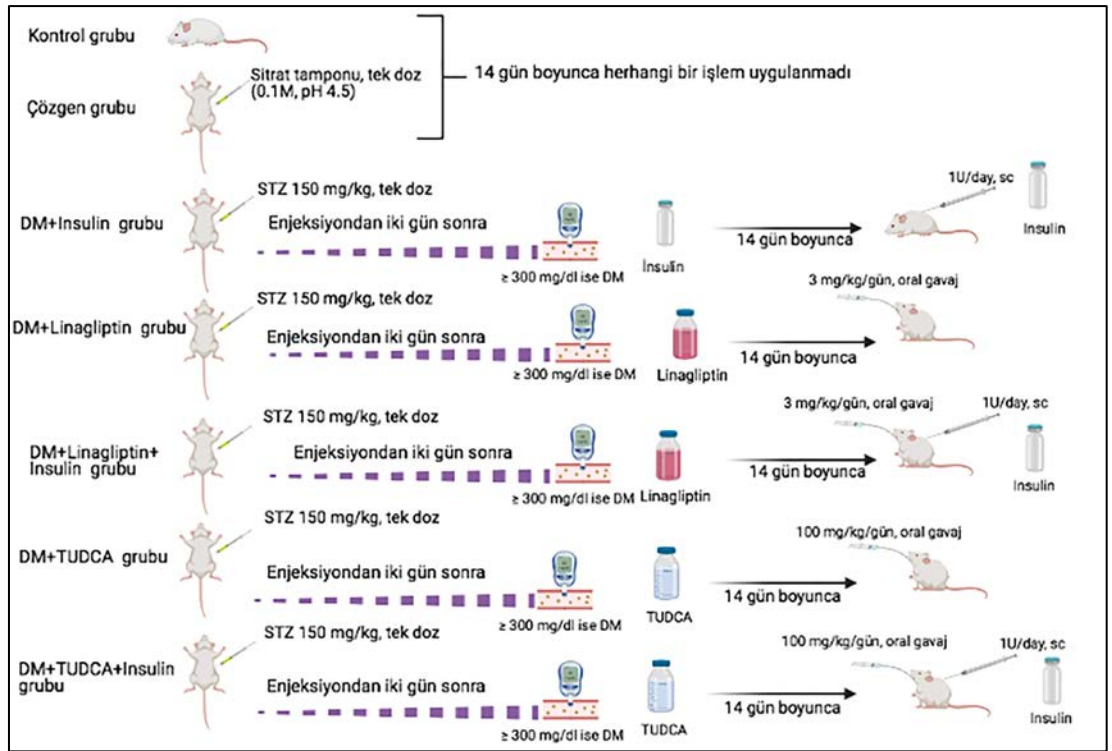
Serum DPP-4 aktivitesinin T1DM’li Japon hastalarda anlamlı derecede yükseldiği belirtilmiş ve bu enzimin tip 1 diyabet hastalığındaki patofizyolojik önemine dikkat çekilmiştir (Osawa ve ark., 2016). Önceki araştırmalar, DPP-4 inhibitörlerinin hayvan modellerinde β -hücre hayatta kalımını artırarak glikoz toleransını iyileştirdiğini kanıtlamışlardır (Pospisilik ve ark., 2003a; Pospisilik ve ark., 2003b). T1DM modelinde β pankreatik hücreler nekroz tarafından parçalandığı için, glikozu düşürmek için insülin salınımını artırmak mümkün değildir (Salheen ve ark., 2015a). Streptozotosin (STZ) ile indüklenmiş T1DM’li sıçanlara DPP-4 inhibitörü linagliptin (2mg/kg, günlük oral gavaj yöntemi ile) uygulandığında mezenterik arterlerdeki vasküler oksidatif stresin azaldığı ve endotele bağlı gevşemenin iyileştiği belirtilmiştir (Salheen ve ark., 2015a). Yüksek glikoz ile indüklenen ER stresi, diyabetli hastalarda gözlenen endotelial hücre disfonksiyonunun çeşitli yönleriyle yakından ilişkilidir. Diyabet, retinopati, ve nefropati gibi mikrovasküler komplikasyonların yanı sıra iskemi ve periferik vasküler hastalık gibi makrovasküler bulgularla ilişkilidir (Basha ve ark., 2012). Buna ek olarak; linagliptinin diğer iki DPP-4 inhibitörde (sitagliptin ve vildagliptin) olmayan glikozdaki herhangi bir düşüşten bağımsız olarak antioksidan aktivite gösterdiği kanıtlanmıştır (Kroller-Schon ve ark., 2012; Salheen ve ark., 2015a). Özellikle, hiperglisemi ER stresine paralel olarak oksidatif strese de neden

olur ve her iki yol da aşırı reaktif oksijen türlerinin (Reactive oxygen species, ROS) üretimine ve aşağı yönde patolojik etkilere katkıda bulunur (Mooradian ve Haas, 2011; Basha ve ark., 2012). Yapılan bir çalışmada, STZ ile indüklenen T1DM modelinde ATF4'ün aracılık ettiği 'transkripsiyon 3'ün sinyal transdüseri ve aktivatörü' (STAT3) aktivasyonunun inflamasyon ve vasküler sızıntıdan sorumlu anahtar bir yolak olduğu gösterilmiştir (Chen ve ark., 2012b). Dolayısıyla, linagliptin ER stresi sonucu oluşan ROS üretimini de azaltarak hiperglisemik koşullar altında kalan ovaryum ve ovaryan foliküllerin apoptozdan kaçınmalarını sağlayabilir. Üreme yaşındaki T1DM'li kadınlarda polikistik over sendromun (PKOS) görülme sıklığı artar (Escobar-Morreale ve Roldan-Martin, 2016). DPP-4 inhibitörleri β hücre işlevini iyileştirebildiği ve insülin dirençliliğini azaltabildiği için PKOS tedavisinde de kullanılmaktadır (Jensterle ve ark., 2017). Özellikle linagliptinin PKOS patogenezinde önemli bir rol oynayabilen büyüme faktörleri, antioksidan savunma mekanizmaları ve inflamatuvar kaskadı üzerinde bir etkiye sahip olduğu kanıtlanmıştır (Kabel ve ark., 2017). Bütün bu bilgilerden yola çıkarak, biz bu çalışmamızda insülin bağımlı diyabet fare modelinde linagliptinin insülin ile kombine tedavisi ile ovaryumdaki ER stresi ile indüklenen patolojilerin iyileşeceğini düşünmekteyiz.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Tüm prosedürler, Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı A.Ş. tarafından onaylanan (KOBAY D.H.L. A.Ş. Kayıt No: 542) ‘Laboratuvar hayvanlarının bakımı ve kullanımına ilişkin kurumsal yönergeler’ uygun olarak gerçekleştirildi. 6 haftalık 84 adet Balb/C ırkı dişi fareler Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı A.Ş.’den temin edildi ve çalışma boyunca bu üniteye barındırıldı. Deney grupları şemada gösterildiği şekilde oluşturuldu:



Şekil 3.1. Deney modeli ve deney grupları.

1.Grup: Kontrol grubu (n=12); dişi farelere herhangi bir işlem yapılmadı.

2.Grup: Çözgen grubu (n=12): STZ'nin çözgen maddesi olan sodyum sitrat tamponu (N5, Tri-Natrium citrate 5,5 hidrat, MERCK) 100 µl (0.1M, pH 4.5) intraperitoneal (ip) olarak tek sefer uygulandı.

3.Grup: STZ indüklenmiş diyabet + İnsülin tedavi grubu (n=12); STZ (S0130, Sigma Aldrich) ip olarak tek doz 150 mg/kg/vücut ağırlığı uygulandı (Li ve ark., 2018). Kan glikoz değeri 48 saat sonra 300 mg/dl'den yüksek çıkan (Tesch ve Allen,

2007) diyabetik kabul edilen farelere 1U/gün insülin subkutanöz (sc) olarak enjekte edildi. Günlük ölçümler sırasında farelerin kan glikoz değeri 200 mg/dl'nin altına düştüğü zaman insülin tedavisi durduruldu (Tian ve ark., 2010).

4.Grup: STZ indüklenmiş diyabet + Linagliptin tedavi grubu (n=12); STZ ip olarak tek doz 150 mg/kg/vücut ağırlığı uygulandı (Li ve ark., 2018). Diyabet indüksiyonundan iki gün sonra diyabetik kabul edilen farelere linagliptin (3 mg/kg/gün, Boehringer Ingelheim Tic. A.Ş., Trajenta) iki hafta boyunca oral gavaj yöntemi ile verildi. Uygulanan doz daha önceki çalışmalar göz önüne alınarak belirlendi (Koibuchi ve ark., 2014).

5.Grup: STZ indüklenmiş diyabet + Linagliptin + İnsülin tedavi grubu (n=12); STZ ip olarak tek doz 150 mg/kg/vücut ağırlığı uygulandı (Li ve ark., 2018). Diyabetik kabul edilen farelere linagliptin (3 mg/kg/gün) iki hafta boyunca oral gavaj yöntemi ile verildi. Kan glikoz değeri 300 mg/dl'den yüksek çıkan (Tesch ve Allen, 2007) farelere 1U/gün insülin sc olarak enjekte edildi. Günlük ölçümler sırasında farelerin kan glikoz değeri 200 mg/dl'nin altına düştüğü zaman insülin tedavisi durduruldu (Tian ve ark., 2010).

6.Grup: STZ indüklenmiş diyabet + TUDCA tedavi grubu (n=12); STZ ip olarak tek doz 150 mg/kg/vücut ağırlığı uygulandı (Li ve ark., 2018). Diyabetik kabul edilen farelere Tauroursodeoksikolik asit (TUDCA) (100 mg/kg/gün, Merck, 580549) oral gavaj yöntemi ile iki hafta boyunca verildi (Cheang ve ark., 2017). TUDCA'nın hem glikoz homeostazı üzerine yararlı bir etkisi vardır (Vettorazzi ve ark., 2017) hem de TUDCA, ER stresini azaltan bir kimyasal şaperondur (Park ve Ozcan, 2013). Bu nedenle linagliptinin ER stresi ve diyabet ile olan ilişkisini değerlendirmek açısından pozitif kontrol olarak önem taşımaktadır.

7.Grup: STZ indüklenmiş diyabet + TUDCA + İnsülin tedavi grubu (n=12); STZ ip olarak tek doz 150 mg/kg/vücut ağırlığı uygulandı (Li ve ark., 2018). Diyabetik kabul edilen farelere TUDCA (100 mg/kg/gün) oral gavaj yöntemi ile iki hafta boyunca verildi (Cheang ve ark., 2017). Kan glikoz değeri 300 mg/dl'den yüksek çıkan (Tesch ve Allen, 2007) farelere 1U/gün insülin sc olarak enjekte edildi. Günlük ölçümler sırasında farelerin kan glikoz değeri 200 mg/dl'nin altına düştüğü zaman insülin tedavisi durduruldu (Tian ve ark., 2010).

3.2. Tip 1 Diyabetik Fare Üretimi

STZ ile indüklenmiş T1DM fare modeli, *in vivo* olarak potansiyel hipoglisemik ilaçların incelenmesinde yaygın şekilde kullanılır (Wu ve Huan, 2008; Ghoul ve ark., 2012). Kimyasal olarak indüklenen T1DM modellerinde, endojen β hücrelerinin yüksek bir yüzdesi tahrip olur ve bu nedenle, hiperglisemiye ve kilo kaybına yol açan az miktarda endojen insülin üretimi vardır (Dufrane ve ark., 2006). STZ, *Streptomyces achromogenes* tarafından sentezlenen bir antibiyotiktir. İntraperitoneal ya da intravenöz olarak uygulandıktan sonra Glut-2 taşıyıcısı yardımıyla pankreatik β hücrelerine girer ve DNA alkilasyonuna neden olur (Szkudelski, 2001). Çalışmamızda, T1DM 6 haftalık dişi farelerde taze hazırlanan 100 μ l sodyum sitrat tamponunda (0.1 M sitrat, pH 4.5) çözölen STZ 150 mg/kg dozda ip olarak enjekte edildi (Li ve ark., 2018). Enjeksiyondan 48 saat sonra diyabet modelinin takibi için dişi farelerin kuyruk veninden alınan kanda glukometre ile glikoz değeri belirlendi. Kan glikoz değeri ≥ 300 mg/dl olan fareler diyabetik kabul edildi (Tesch ve Allen, 2007).

3.3. Gelişim Takipleri

Kontrol, diyabetik ve tedavi grupları arasındaki gelişim farklılıklarını tespit etmek amacıyla deney boyunca incelenen gruplardaki farelerin vücut ağırlığı ölçümleri deneyin başlangıcında, ilk birinci haftanın sonunda ve deney bitiminde kaydedildi.

3.4. Dokuların Toplanması

Deneklere STZ enjeksiyonunu takiben 2. hafta sonunda servikal dislokasyon ile ötenazi yapıldı ve ovaryumlar çıkartıldı. Ovaryum indeksini belirlemek için overlerin ağırlığı kaydedildi. Çalışmada analizler için yeterli sayıda ve miktarda ovaryum dokusu elde edebilmek için iki set deney düzeneği oluşturuldu. Birinci set deney düzeneğinde 6 hayvan için sol ovaryumlara ait histolojik kesitlerde folikül sayımı yapıldı ve kalan kesitlerde immünohistokimyasal boyama metodu ile incelenen proteinlerin lokalizasyonu ve ekspresyon seviyeleri belirlendi. Çıkartılan sağ ovaryumlarda western blot analizi ile incelenen proteinlerin ekspresyon seviyeleri belirlendi. Oluşturulan ikinci set deneyde ise 6 hayvan için sol ovaryumlara ait doku kesitlerinde ELISA yöntemi ile oksidatif stres ile ilişkili belirteçlerden MDA ve NOX1 seviyeleri doku düzeyinde belirlendi ve çıkartılan sağ ovaryumlarda *Grp78*, *Chop* ve *beta aktin* gen ekspresyonu mRNA düzeyinde miktarsal olarak değerlendirildi.

3.5. ELISA Yöntemi

Farelerden alınan kan serum örneklerinde DPP-4 aktivitesi ölçümü (Picokine™ ELISA, MBS176503) ve farelerden alınan ovaryum örneklerinde ELISA yöntemi yardımıyla oksidatif stres ilişkili doku hasarının önemli belirteçlerinden (Kroller-Schon ve ark., 2012; Salheen ve ark., 2015a; Yayla ve ark., 2018) MDA seviyesi (Bioassay Technology Laboratory, E0625Mo) ve NADPH oksidaz izoformlarından NOX1 aktivitesi (Bioassay Technology Laboratory, E1539Mo) BMG LABTECH Spectrostar Nano cihazı ile ölçüldü. Oksidatif stres türlerinden NOX1 literatürde sıçan ovaryum iskemi reperfüzyon çalışmalarında dokudaki oksidatif hasarı göstermede kullanıldığı için seçilmiştir (Yayla ve ark., 2018). MDA ve NOX1 için alınan ticari kitte belirtilen uygulama basamakları şöyledir:

- 1) Tüm reaktifler, standart solüsyonları ve numuneler kitte belirtilen talimatlara göre hazırlandı.
- 2) Deney için gereken şeritler çerçevelere yerleştirildi.
- 3) Hazırlanan standart karışımlar 50 µl olacak şekilde standart kuyulara eklendi. Standart solüsyonlar biotinlenmiş antikor içerdiği için bir daha standart kuyularına antikor eklenmedi.
- 4) Numune kuyularına 40 µl numune eklendi ve ardından numune kuyularına 10 µl incelenecek olan antikor (anti-NOX1, anti-MDA) eklendi. Ardından numune ve standart kuyularına 50 µl streptavidin-HRP eklendi. İyice karıştırıldı. Plakanın üstü mühürleyici ile kapatıldı. 60 dakika 37 °C'de inkübasyona bırakıldı.
- 5) Plakanın üstü açıldı ve plaka 5 defa yıkama tamponu ile yıkandı. Her yıkama için 30 saniye ile 1 dakika arasında en az 0.35 ml yıkama tamponu ile iyice ıslatıldı. Yıkama sonunda plaka ters çevrilerek kurutma kağıdına fazla solüsyonlar akıtıldı ve kuyular temizlendi.
- 6) Sırasıyla 50 µl substrat solüsyonu A ve 50 µl substrat solüsyonu B her bir kuyucuğa eklendi. Plaka yeni bir mühürleyici ile kapatılarak 10 dakika 37 °C'de karanlıkta inkübe edildi.

- 7) 50 µl durdurma solüsyonu her bir kuyucuğa eklendi. Kuyucuklardaki mavi boya sarı renge döndü.
- 8) Durdurma solüsyonu ekledikten sonra 10 dakika içinde 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropilaka okuyucu kullanılarak hemen her kuyunun optik yoğunluğu (OD Değeri) belirlendi.

3.6. Rutin Parafin Takibi

Deney gruplarındaki ovaryan histolojiyi incelemek için yapılan rutin parafin doku takibi işlem basamakları şu şekildedir:

- Alınan sol ovaryum dokusu Bouin fiksatifine alınarak + 4 °C'de 6 saat tespit edildi.
- Çeşme suyunda yıkamayı takiben (3 saat), sudan kurtarma işlemini gerçekleştirmek için dokular %70, %80, %90'lık artan alkol serilerinin her birinde 24 saat ve %100'lük alkolde 3 saat tutuldu.
- Ksilol içerisinde bir dakika bekletilerek şeffaflaştırılan dokular 58 °C'lik etüvde, üç kez 1'er saat parafinize edildi. Üçüncü saatin sonunda dokular temiz parafin içinde uygun oryantasyonda gömüldü.
- Ovaryum örneklerinden, rotari mikrotom kullanılarak 5 µm kalınlığında alınan seri kesitler hematoksilin eozin boyanmalar için normal lama, immünohistokimya analizleri için poli-L-lizinle kaplı lamaların üzerine alındı.

3.7. Foliküllerin Histolojik Değerlendirilmesi

Oluşturulan deney gruplarındaki farelerin gruplar arasındaki ovaryan folikül rezervinin değerlendirilmesi için tüm gelişim aşamalarındaki foliküllerin sayımı yapıldı. Bu parametre ile diyabet ile indüklenen ER stresinin ve uygulanan tedavilerin ovaryan rezerv üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Her gruptan en az 3 farklı dişiye ait 3 ovaryumun seri kesitleri (5 µm kalınlıkta) alınıp, hematoksilin eozin ile boyandıktan sonra, serinin her 5.kesitinde sağlıklı oosit içeren foliküllerin sayımı yapıldı (Guzeloglu-Kayisli ve ark., 2012). Morfolojik olarak sağlıklı olduğu belirlenen foliküllerin sınıflandırılması şu şekilde gerçekleştirildi (Guzeloglu-Kayisli ve ark., 2012);

- Primordiyal folikül: Yassı folikül hücrelerle çevrelenmiş folikül
- Primer folikül: Tek tabaka kübik granuloza hücreleri ile çevrelenmiş folikül
- Sekonder folikül: Antral boşluğa sahip olmayan, 2 veya 3 tabaka kübik granuloza hücreleri ile çevrelenmiş folikül
- Erken antral folikül: Antral boşluk oluşturmaya başlamış, 4 veya daha fazla kübik granuloza hücreleri ile çevrelenmiş folikül
- Antral folikül: Açıkça ayırt edilebilen foliküler antrum boşluğuna sahip folikül

3.8. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Deney gruplarından alınan ovaryum dokusunun parafin kesitlerinde ER stresi ilişkili UPR sinyalinde apoptozu indükleyen anti-ATF4, anti-aktif kaspaz 12, anti-aktif kaspaz 3, anti-XBP1, anti-fosfo JNK, anti-ATF6 proteinleri için immünohistokimyasal boyama gerçekleştirildi. Her bir antikorun ifade seviyeleri her bir foliküler evre (primer, sekonder, erken antral ve antral folikül) için ayrı ayrı değerlendirildi. Uygulanan basamaklar şu şekildedir:

- Preparatlar, 67 °C'lik etüvde gece boyu bekletilerek kesitteki dokuların lam yüzeyine iyi bir şekilde yayılması sağlandı.
- Daha sonra, preparatlar 10'ar dakika ksilol I ve ksilol II solüsyonlarından geçirildi.
- Preparatlar, azalan alkol serilerinde (%100, %90, %80, %70 etanolde) 5'er dakika bekletildi. Son olarak preparatlar 5 dakika distile suda bırakıldı.
- Antijenik maskelenmenin ortadan kaldırılması için kesitler 0.01 M sitrik asit içinde 665 watta ayarlı mikrodalga fırında 2x5'er dakika kaynatıldı.
- Preparatlar soğuması için sitrik asit solüsyonu içerisinde 20 dakika boyunca oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı.

- Kesitlerin çevresi hidrofobik kalemle çizildikten sonra 3x5'er dakika fosfat tamponlu tuz çözeltisinden (PBS; pH: 7.2-7.4) geçirildi.
- Bir sonraki basamakta dokulardaki alkalen fosfataz aktivitesini ortadan kaldırmak için kesitler metanolle hazırlanmış %3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda 15 dakika boyunca inkübe edildi.
- Kesitler PBS ile 3x5'er dakika yıkandıktan sonra spesifik olmayan immunoglobulin bağlanmalarını önlemek amacıyla UV bloklama solüsyonu ile 7 dakika işleme tutuldu.
- Bloklama solüsyonu uzaklaştırılarak kesitler primer antikorları ile + 4°C'de gece boyu inkübe edildi. Her immünohistokimya boyanmasında kesitlerden birisi negatif kontrol için kullanıldı ve buraya primer antikor yerine PBS damlatıldı.
- Süre sonunda, preparatların üzerindeki primer antikor damlaları döküldü ve PBS'de 2x10' ar dakika yıkandı. Daha sonra kesitlerin üzerine biotinile edilmiş sekonder antikor solüsyonu damlatıldı. 37 °C'ye ayarlanmış etüvde 30 dakika inkübe edildi.
- Sekonder antikor aşamasından sonra PBS içinde 3x5'er dakika yıkandı.
- Daha sonra preparatlardaki kesitlere streptavidin solüsyonu damlatıldı. 37 °C'ye ayarlanmış etüvde 30 dakika inkübe edildi.
- Bu aşamadan sonra PBS içinde 3x5'er dakika yıkandı. Sonrasında kesitlerin üzerine DAB damlatıldı ve reaksiyon gelişimi ışık mikroskobu altında kontrol edildi. Reaksiyon gelişimi yeterli düzeye ulaştığında, preparatlar PBS içine alınarak reaksiyon durduruldu.
- Son olarak preparatlar artan alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi ve ksilolden geçirildikten sonra entellan damlatılarak lamelle kapatıldı. Kapatılan preparatlar Olympus BX53 ışık mikroskobu altında incelendi ve görüntülendi. İmmunoreaktivite seviyeleri Image J Version 1.46 (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland) programı ile belirlendi.

3.9. Western Blot Analizi

Deney gruplarına ait ovaryum dokularındaki anti-ATF4, anti-aktif kaspaz 12, anti-aktif kaspaz 3, anti-XBP1, anti-fosfo JNK1+ JNK2, total JNK1+ JNK2 ve anti-ATF6 proteinlerinin semikantitatif değerlendirilmesi için western blot analizi yapıldı. Kullanılan solüsyonlar aşağıda belirtilmiştir:

4Xtris-HCL/SDS, pH 8.8: 18,15 gr tris (hidroksimetil)-aminometan (Tris) (# 37190.02; SERVA), 40 ml bidistile su içerisinde çözüldü pH 8.8'e ayarlandı. Ardından bidistile su ile toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı. Son olarak 0,4 gr sodyum dodesil sülfat (SDS) (# 8.17034.1000; Merck) eklendi.

4Xtris-HCl/SDS, pH 6.8: 6,05 gr Tris, 40 ml distile su içerisinde çözüldü. pH 6.8'e ayarlandı. Ardından bidistile su ile toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı. Son olarak 0,4 gr SDS eklendi.

%10'luk Amonyum-persülfat (APS): 0,1 gr toz APS (# 13375.01; SERVA), 1 ml distile su içerisinde çözüldü.

N, N, N', N' -Tetramethylethylenediamine (TEMED): (# 8.08742.0250; Sigma Aldrich)

%30 akrilamid-bisakrilamid solüsyonu: (#10688.01, SERVA)

Alt jel – Ayrıştırıcı Jel:

Tablo 3.1. Alt jel (Ayrıştırıcı Jel) hazırlanış formülü.

Solüsyonlar	%8'lik	%10'luk	%15'lik Tris-HCl Jel
%30 Akrilamid-bisakrilamid	4 ml	5 ml	7,5 ml
4X Tris-HCl/SDS, pH:8.8	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml
dH ₂ O	7,25 ml	6,25 ml	3,75 ml

Yukarıda verilen solüsyonlar 15 ml'lik falkon tüpünde karıştırıldı ve pipetleyerek karışım homojenize edildi. Daha sonra polimerizasyon sağlayacak olan 50 µl %10'luk APS ve 10 µl TEMED solüsyonları eklendi. Birkaç kez pipetaj yapıldıktan sonra jel karışımı 2 cam plaka arasına döküldü. Yaklaşık 45 dakika oda ısısında donmaya bırakıldı.

Üst jel- Toplayıcı Jel: 650 µl %30 akrilamid-bisakrilamid, 1250 µl 4X tris-HCl/SDS (pH: 6.8) ve 3050 µl bidistile su 15 ml'lik falkon tüpünde karıştırıldı ve pipetaj yapılarak karışım homojenize edildi. Daha sonra polimerasyonu sağlayacak olan 25 µl %10'luk APS ve 5 µl TEMED solüsyonları eklendi. Birkaç kez pipetaj yapıldı ve jel karışımı 2 cam plaka arasına döküldü. Ardından uygun genişlikteki tarak jel içerisine yerleştirildi.

5X Elektroforez Yürütme Solüsyonu: 9 gr tris, 43,2 gr glisin (# 1.04201.1000; Merck) ve 3 gr SDS 600 ml dH₂O içerisinde çözüldü. pH:8.3-8.6'da olacak şekilde ayarlandı. 1X elektroforez yürütme solüsyonu için 5X stok solüsyondan 140 ml alındı ve 560 ml dH₂O ile 700 ml'ye tamamlandı.

Transfer Tampon Solüsyonu (Blotting Buffer): 3 gr tris ve 14.3 gr glisin 800 ml dH₂O içerisinde çözüldü. pH 7.8-8 arasında olacak şekilde ayarlandı. Solüsyona daha sonra 200 ml metanol (# TK.120320.05001; TEKKİM) eklendi. -20 °C'de soğutulularak kullanıldı.

Tris Tamponlu Tuz (Tris Buffered Saline-TBS) 10X Stok Solüsyonu: 60,55 gr Tris ve 87,66 gr NaCl (# TK.170540.01002; TEKKİM) 800 ml distile su içerisinde çözüldü. pH: 7.4'e ayarlandı. Toplam hacim 1000 ml olacak şekilde distile su ile tamamlandı.

1X TBS- Tween 20 (TBS-T) Solüsyonu: 100 ml 10X TBS solüsyonuna 900 ml distile su eklenerek 1X TBS hazırlandı. Daha sonra 1 litre 1X TBS'e 1 ml Tween 20 (#8.22184.0500; Merck) eklenerek TBS-T çalışma solüsyonu hazırlandı.

Bloklama Solüsyonu: %5'lik süt tozu: 5 gr süt tozu (# 42590.01; SERVA) 100 ml TBS-T içerisinde çözülerek hazırlandı.

Chemiluminescent solüsyonu: (#34080; Thermo Scientific) Luminol/geliştirici solüsyon ve sabitleme solüsyonu 1:1 oranında karıştırılarak hazırlandı.

Geliştirme Solüsyonu: (#116.0001; KONIX) 700 ml distile suyun içine D1 şişesinden 250 ml, D2 ve D3 şişelerinden 25'er ml solüsyon eklenerek toplamda 1 litrelik geliştirme solüsyonu hazırlandı.

Sabitleme (Fiksatif) Solüsyonu: (#116.0001; KONIX) 700 ml distile suyun içine F1 şişesinden 250 ml ve F2 şişesinden 50 ml solüsyon eklenerek sabitleme solüsyonu hazırlandı.

3.9.1. Lizat Hazırlama

Deney gruplarına ait ovaryum örneklerinden lizat hazırlamada uygulanan basamaklar şu şekildedir:

- Ovaryum örnekleri -80°C saklama koşullarından alınıp köpük içindeki buza yerleştirildi.
- Boş bir ependorf kullanılarak ependorfun darası alındı. Ependorfa alınan örnekler tek tek tartıldı ve miktarlar not edildi. Örnekler bistüri yardımıyla parçalandı.
- Yaklaşık 0,02 gr iki ovaryum örneği bir araya getirilerek 300 µl Lizis tamponu (# 89900, Thermo Fisher Scientific) ve 3 µl proteinaz inhibitör kokteyli (PİK) (# 78440, Thermo Fisher Scientific) koyuldu. Eklemeler yapıldıktan sonra ependorflar vortekslendi.
- Sonikatör 3x10 sn şeklinde aralarda 1 dakika ara olacak şekilde kullanıldı ve +4 °C’de 45dk bekletildi.
- +4°C’de 15000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi. Supernatantlar pipet yardımıyla üzerinde numunelerin bilgilerinin yazılı olduğu ependorflara alınarak lizatlar oluşturuldu. Hazırlanan lizatlar -20°C’de saklandı.
- BCA protein test kiti (# 23225; Thermo Fisher Scientific) yardımı ile protein miktarları belirlendi.

3.9.2. SDS-PAGE Western Blot Protokolü

Protein miktarları dH₂O, örnek ve laemmlı buffer (Sample Buffer 2X, Laemmlı electrophoresis Reagent, Sigma, Katalog No: S-3401) oranları ile eşitlenen örnekler 5 dakika 95°C’de kaynatıldı. Çalışılacak olan proteinlerin ve internal kontrol olarak kullanılan beta aktin proteininin kilo dalton ağırlıkları dikkate alınarak uygun yüzdelerde jeller hazırlandı. Anti-ATF4, anti-ATF6, anti-JNK1+JNK2 (fosfo T183+Y185), anti-JNK1+JNK2 (total) ve anti-XBP1 için %10’luk jel döküldü. Anti-aktif kaspaz 3 için %15’lik jel ve anti-kaspaz 12 için %8’lik poliakrilamid jel hazırlandı. Her kuyucuğa 20 µl örnek, protein miktarları eşit olacak şekilde yüklenerek Protean Tetra Cell, Mini Trans Blot Modül (#165-8033; Biorad) tankının içine yerleştirildi. 1X elektroforez yürütme solüsyonu eklenerek, tank güç kaynağına

bağlandı. Proteinler güç kaynağı aracılığı ile 80 Voltta yaklaşık 30 dakika, sonrasında 100 Voltta 90-120 dakika elektroforez edildi.

Elektroforezin ardından jeldeki proteinleri Polyvinylidene Fluoride (PVDF) membrana (#88520; Thermo Fisher Scientific) aktarmak için immunoblotlama yapıldı. Bu aşamada PVDF membran, üstte ve altta ikişer adet filtre kağıdı ve birer adet sünger olacak şekilde sandviç biçiminde hazırlandı. Jelde yürütülen proteinler, hazırlanan sandviçte PVDF membranın üzerine alınarak tekrar mini protean III sistemindeki tank içerisine alındı. Protean Tetra Cell, Mini Trans Blot Modül tankına transfer tampon solüsyonu eklenerek 32 voltta +4°C'de gece boyu proteinlerin membrana transfer olması gerçekleştirildi.

Proteinlerin PVDF transferinden sonra, membran oda ısısında TBS-T ile yıkama yapıldı. Ardından membran 1 saat oda ısısında TBS-T ile hazırlanan %5'lik yağsız süt tozu ile blokladı. Membranlar, anti-ATF4, anti-aktif kaspaz 12, anti-aktif kaspaz 3, anti-XBP1, anti-JNK1+ JNK2 (fosfo T183+Y185), anti-JNK1+ JNK2 ve anti-ATF6 antikoları ile +4°C'de gece boyu, beta aktin primer antikoru ile oda sıcaklığında 2 saat karıştırıcı üzerinde inkübe edildi (Tablo 3.2). İnkübasyon sonrasında TBS-T ile 3 kez 10 dakika yıkandı. Membranlar, HRP-konjuge anti-tavşan IgG (Vector) sekonder antikoruyla (Abcam, ab6721) oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında TBS-T ile tekrar 3 kez 10 dakika yıkama yapıldı. Membranlar SuperSignal Chemiluminisans (CL)-HRP substrat sistemi (Thermo Fisher Scientific, 32106) ile 5 dakika inkübe edildikten sonra karanlık oda içerisinde filme (Amersham Hyperfilm TM ECL 18X24 cm) aktarıldı. Görüntüleme amacıyla film, geliştirici ve tespit solüsyonlarından geçirildi ve distile su ile yıkayıp kurutuldu.

Tablo 3.2. Western Blot yönteminde kullanılan primer antikolar ve dilüsyon oranları.

Antikor	Katalog Numarası	Dilüsyon Oranı
ATF4	ab216839, Abcam	1:500
Aktif Kaspaz 12	Ab62484, Abcam	1:1000
Aktif Kaspaz 3	9664S, Cell Signaling	1:750
XBP1s	ab216839, Abcam	1:500
JNK1+JNK2	ab112501, Abcam	1:1000
JNK1+ JNK2 (fosfo T183+ Y185)	ab131499, Abcam	1:500
ATF6	ab203119, Abcam	1:3000

3.10. Kantitatif Real Time RT-PCR Analizi

3.10.1. Total RNA İzolasyonu

Her bir deney grubuna ait 6 fareden alınan sağ ovaryum örneklerinden total RNA izolasyonu RNAqueous- Micro (Micro Scale RNA Isolation Kit) kiti kullanılarak aşağıda belirtilen basamaklarla gerçekleştirildi.

- 1) Ovaryumlar, steril 0.5 ml'lik tüplere alındı ve üzerine 300 µl lizis solüsyonu konulup, RNA izolasyon işlemine kadar -80 °C'de saklandı.
- 2) RNA izolasyonu için -80 °C'de saklanan örnekler çözüldükten sonra pipet ucuyla önce mekanik parçalanma gerçekleştirildi. Sonra vorteksle karışması sağlanarak homojen bir solüsyon elde edildi.
- 3) Ayrı bir ependorf tüpe bu solüsyondan 100 µl alındı ve üzerine 50 µl etanol (920.026; ISOLAB chemicals) konuldu ve vorteksle iyice karıştırıldı.
- 4) Lizat ile etanol karışımı belirli bir por çapına sahip filtre içeren tüpe mikropipet ile konuldu, 1300 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi. Böylece karışımdaki RNA'ların filtreye tutunması sağlandı.
- 5) Mikropipetle yıkama solüsyonu-1'den 180 µl çekilip, filtrenin üzerine konuldu ve tüpler 13000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi.
- 6) Yıkama solüsyonu- 2'den çekilen 180 µl ile filtre tekrar yıkandı ve tüpler 13000 rpm'de 30 sn saniye santrifüj edildi. Bu işlem bir kez daha tekrarlandı.
- 7) Filtre ilk tüpten alınıp, ayırma tüpüne yerleştirildi. + 4°C'de saklanan ve kullanım öncesi 75°C'ye ısıtılan ayırma solüsyonundan 7 µl alınıp, filtrenin tam merkezine gelecek şekilde konuldu. Tüplerin kapağı kapatılıp, oda ısısında 1 dakika bekletildikten sonra; 13000 rpm hızda 1 dakika santrifüj edildi. Aynı işlem tekrarlandı. Böylece RNA'ların mikro ayırma tüpünün dibine toplanması sağlandı.
- 8) Ayırma tüpünün dibinde toplanan ve RNA'yı içeren yaklaşık 13 µl'lik kısım steril 0.2 ml'lik tüplere alındı.

- 9) İzole edilen total RNA örneklerinden genomik DNA'nın uzaklaştırılması için bu karışımın hacminin %10'u kadar 10x DNaz I tamponu (1.3 µl) ve 1 µl 10x DNaz I kondu ve 35 dakika 37 °C'de inkübe edildi.
- 10) Total hacimin %10'u DNaz I inaktivasyon solüsyonu eklendi. 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Kısa bir süre vortekslendi. Tekrar 1 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve 1300 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
- 11) Santrifüj sonrası RNA'yı içeren süpernatantlar, yeni steril 0.2 µl'lik tüplere alındı.

3.10.2. Komplementer DNA (cDNA) Eldesi

cDNA eldesinde Ambion RETROscript (Ambion, AM1710) kiti kullanıldı. Uygulanan basamaklar aşağıda sıralanmıştır:

- 1) Ovaryumlardan elde edilen total RNA içeren tüplere 2 µl random dekamer eklendi.
- 2) RNA ve random dekamer karışımı, 85°C'de 3 dakika inkübe edilerek, sekonder RNA kıvrımlarının açılması sağlandı.
- 3) Her bir tüpe, homojen ve eşit miktarda reaksiyon karışımı ekleyebilmek amacıyla bir ana karışım hazırlandı. Elde edilen karışımdan her bir tüpe 8 µl konuldu (Tablo 3.3).
- 4) Daha sonra, her bir tüpe 8 µl ana karışımdan eklenerek, 44°C'de, 60 dakika inkübe edildi. Ardından 92 °C'de 10 dakika bekletildi.
- 5) Bu aşamalardan sonra elde edilen cDNA'lar, qRT-PCR'de kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

Tablo 3.3. cDNA eldesinde kullanılan reaktantlar.

Reaktantlar	Hacim (µl)	Son Konsantrasyon
10X RT Tamponu	2	1X
dNTP mix	4	0.5 mM/ her bir dNTP
RNaz inhibitörü	1	10 unit/ 20 µl reaksiyon karışımında
MMVL- geri transkriptaz	1	100 unit/20 µl reaksiyon karışımında
Toplam	8	

3.10.3. Kantitatif Real Time PCR Uygulama Basamakları

Çalışmada her hücrede sabit miktarda eksprese olduğu bilinen *Beta aktin* gen ekspresyonu temel alınarak, deney gruplarından elde edilen ovaryumlardaki *Bip/Grp78* ve *Ddit3/Chop* genlerinin görel kantitatif ekspresyon düzeyleri belirlendi. Kantitatif real-time PCR uygulama basamakları aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

- 1) Aşağıdaki çizelgede belirtilen reaktantlar konularak reaksiyon karışımı oluşturuldu.

Tablo 3.4. qRT-PCR uygulamasında kullanılan karışım içerikleri.

Karışım İçeriği	Hacim (µl)
2x SybrGreen Süper Karışım	12,5
Primer F	0,5
Primer R	0,5
Nükleaz İçermeyen Su	10,5
cDNA	1
Toplam	25

- 2) *GRP78*, *CHOP* ve *beta aktin* genleri için gerçek zamanlı PCR uygulaması üç kuyucuklu (triplicate) olarak gerçekleştirildi. Gerçek zamanlı PCR aşamasında kullanılan primerler, Tablo 3.5’de verildi.

Tablo 3.5. qRT-PCR tekniğinde kullanılan primerlerin dizilimleri.

Genin adı	İleri primer (F)	Geri primer (R)	PCR ürün büyüklüğü (bp)
<i>Grp78/</i> <i>Bip</i>	‘GAGGTGGGCAAACCAAGACATT’	‘TCGCTGGGCATCATTGAAGTAAG’	146
<i>Ddit3/</i> <i>Chop</i>	‘TCTTGACCCTGCGTCCCTAG’	‘TGGGCACTGACCACTCTGTTT’	172
<i>Aktin</i>	‘TGCGTGACATCAAAGAGAAG’	‘CGGATGTCAACGTCACACTT’	244

- 3) *Grp78*, *Chop* ve *beta aktin* genleri için hazırlanmış örnekler kantitatif gerçek zamanlı PCR aletinde (Bio-Rad, iCycler QDetection System, Hercules, CA, ABD) analiz edildi.

Amplifikasyon, 30 siklusta gerçekleştirildi. Başlangıç denatürasyonu: 95 °C'de 5 dakika; 30 siklus: 92 °C'de 30 saniye, 65 °C'de 20 saniye, 72 °C'de 1 dakika olarak uygulandı. Örnekler analiz sonucunda, oluşturulan standart aralığında ve referans DNA ile kantitatif real-time PCR aletinde okundu ve software programı yardımıyla belirlendi. Ortaya çıkan eşik değeri siklusunda ve diğer sikluslarda *Grp78*, *Chop* ve *Beta aktin* gen ekspresyon düzeyi miktarsal olarak belirlendi. Bu yöntemde; her bir örnek için ayrı ayrı olarak, test edilen genin Ct değeri ile endojen kontrol olarak kullanılan rRNA'nın verdiği Ct değerleri birbirinden çıkarılarak Δ Ct değerleri belirlendi.

3.11. İstatistiksel Değerlendirme

İmmünohistokimya, ELISA ve western blot analizleri ile elde edilen sonuçların değerlendirilmesi için Image J programı (Versiyon 1.46, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland) kullanıldı. Bu sonuçlardan elde edilen veriler ve qRT- PCR analizleri sonucunda her bir örnek için ayrı ayrı test edilen genin Δ Ct değerlerinin istatistiksel hesaplamaları Graphpad Prism 6.0 yazılım paketi (San Diego, CA) kullanılarak One Way ANOVA testi ve çoklu karşılaştırmalar için post-hoc TUKEY testi ile değerlendirildi. $P < 0.05$; istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Gelişim Takipleri

4.1.1. Vücut Ağırlığı Bulguları

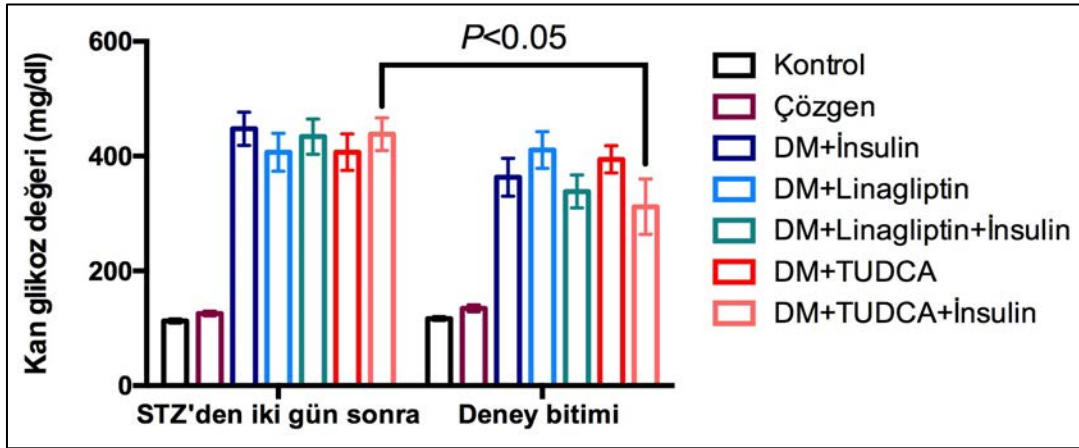
Deney grupları arasındaki gelişim farklılıklarını tespit etmek amacıyla farelerin deneyin başladığı gün, bir hafta sonra ve deneyin bittiği gün vücut ağırlıkları kaydedildi ve istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Verilerin dağılımına göre (Tablo 4.1) istatistiksel olarak Ki-kare testi uygulandı. Kontrol ve çözgen gruplarının vücut ağırlıklarında daha çok artma eğilimi varken, diğer deney gruplarında kilo alım hızının azalmış olduğu gözlemlendi. Fakat istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edildi ($P>0.05$).

Tablo 4.1. Deney gruplarındaki farelerin deney boyunca kaydedilen vücut ağırlıklarının ortalama \pm standart sapma değerleri.

Gruplar	Ağırlık (g)		
	0.hafta	1.hafta	2.hafta
Kontrol	21,35 \pm 0,71	24,69 \pm 0,93	27 \pm 1,04
Çözgen	21,74 \pm 1,41	25,5 \pm 1,66	28,5 \pm 2,11
DM+ İnsülin	22,87 \pm 1,71	23,92 \pm 1,39	23,75 \pm 2,13
DM+ Linagliptin	21,15 \pm 1,22	22,18 \pm 1,67	23 \pm 2,29
DM+ Linagliptin+ İnsülin	23,12 \pm 1,17	23,15 \pm 1,93	24,5 \pm 2,06
DM+ TUDCA	22,2 \pm 1,51	22,2 \pm 1,53	20,5 \pm 2,74
DM+ TUDCA+ İnsülin	21,8 \pm 1,92	22,54 \pm 1,44	23,82 \pm 2,56

4.1.2. Kan Glikoz Bulguları

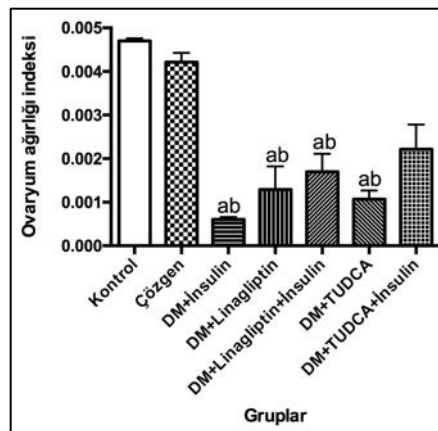
STZ enjeksiyonundan iki gün sonra ve deney bitiminde glukometre yardımıyla farelerin kuyruk veninden ölçülen kan glikoz değerleri kontrol ve çözgen gruplarında değişme göstermezken, diğer tüm gruplarda 300 mg/dl'nin üstünde gözlenmiştir. Deneyin başladığı gün ile deneyin bittiği gün ölçülen kan glikoz değerlerinde anlamlı azalma sadece TUDCA+ İnsülin grubunda belirlendi (Şekil 4.1; $P<0.05$).



Şekil 4.1. Deney gruplarındaki farelerin kan glikoz değerlerinin karşılaştırılması. Histogram grafiğinde gösterilen veriler ort \pm SEM olarak ifade edilir. İki yönlü varyans analizi ve Sidak'ın çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır ($P<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı olduğunu ifade etmektedir).

4.1.3. Ovaryum Ağırlığı İndeksi Bulguları

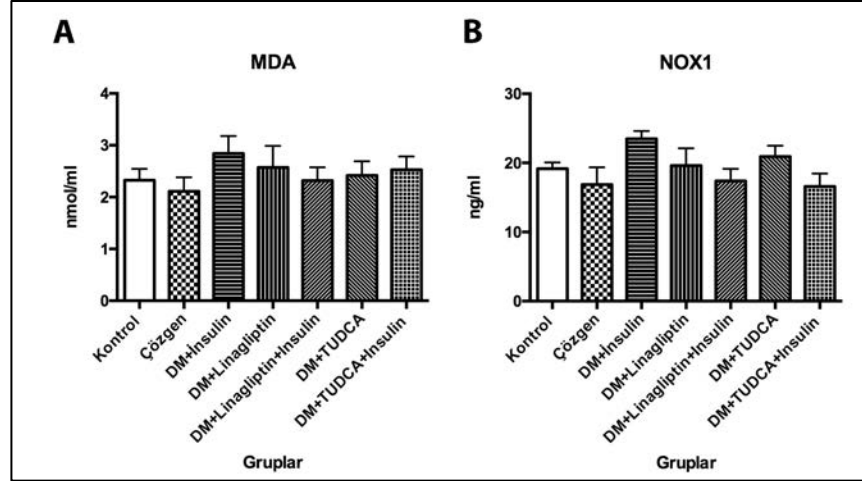
Deney sonunda gruplar arasındaki ovaryum ağırlığı indeksini belirlemek için farelerden çıkartılan ovaryum dokularının ağırlıkları ölçüldü ve vücut ağırlıkları ölçümüne bölündü (ovaryum ağırlığı indeksi= ovaryum ağırlığı/vücut ağırlığı). Elde edilen ölçümlere göre TUDCA+ İnsülin grubu dışında ovaryum ağırlığı indeksi diğer tüm gruplarda kontrol ve çözgen gruplarına kıyasla anlamlı olarak azalmıştır ($P<0.05$). Linagliptin ve insülinin birlikte uygulandığı grup ile, sadece linagliptin uygulanan grup karşılaştırıldığında ovaryum ağırlığı indeksinde istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte hafif bir artış olduğu görüldü (Şekil 4.2; $P>0.05$).



Şekil 4.2. Ovaryum ağırlığı indeksi. Histogram grafiğinde gösterilen veriler ort. \pm SEM olarak ifade edilir. Tek yönlü ANOVA varyans analizi ve TUKEY'in çoklu karşılaştırma testi uygulandı (a $P<0.05$ kontrol grubundan farklı olduğunu; b $P<0.05$ çözgen grubundan farklı olduğunu ifade etmektedir).

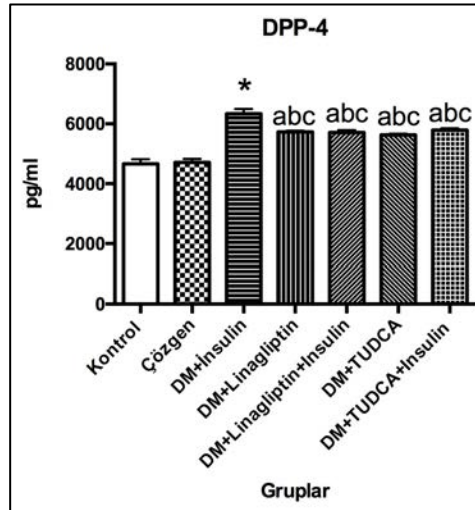
4.2. ELISA Bulguları

Homojenizatları hazırlanan farelerden alınan sol ovaryumlarda MDA ve NOX1 seviyeleri ve kan serum örneklerinde DPP-4 aktivitesi ölçümü ELISA yöntemi ile incelendi. Şekil 4.3’de gösterildiği gibi, MDA ve NOX1 değerleri DM+ İnsülin gruplarında arttı. Linagliptin uygulanan gruplarda ise bu değerlerin azaldığı gözlemlendi. Fakat hem MDA ($P=0.4826$) hem de NOX1 ($P=0.2129$) açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edildi ($P>0.05$).



Şekil 4.3. Ovaryum MDA ve NOX1 seviyeleri. A) MDA ve B) NOX1 histogram grafiklerinde gösterilen veriler ort. \pm SEM olarak ifade edilir. Tek yönlü ANOVA varyans analizi ve Tukey’in çoklu karşılaştırma testi uygulandı. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edildi ($P>0.05$).

Şekil 4.4’de gösterildiği üzere, DM+ İnsülin grubunda DPP-4 değeri diğer tüm gruplardan daha yüksekti ($P<0.05$). Hem Linagliptin hem de TUDCA uygulamalarının bu gruplara ait kan serumlarındaki DPP-4 değerlerini azaltmada etkin olduğu görüldü ($P<0.05$).

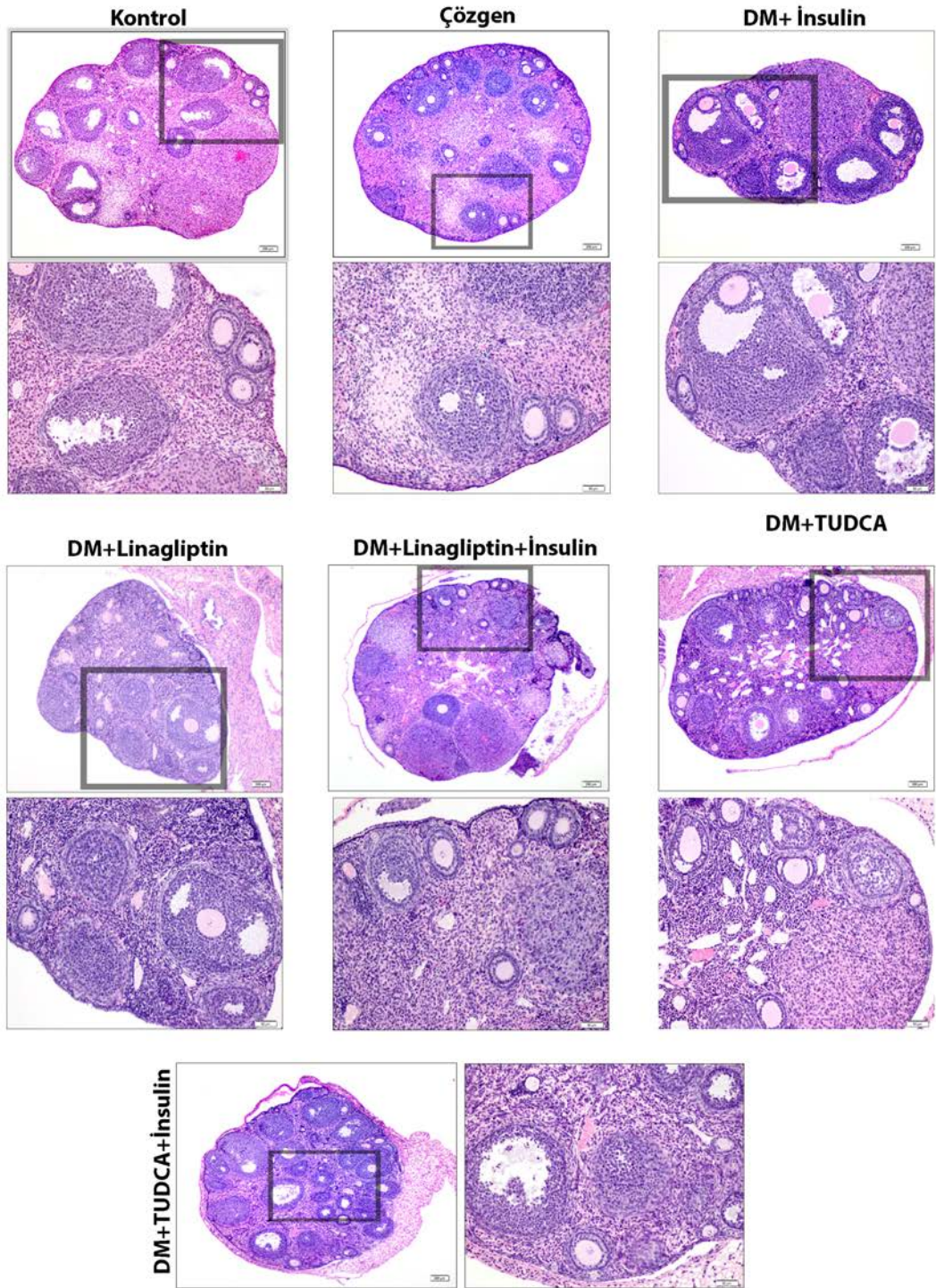


Şekil 4.4. Deney gruplarına ait kan serum örneklerinde DPP-4 değerleri. Histogram grafiğinde gösterilen veriler ort. \pm SEM olarak ifade edilir. Tek yönlü ANOVA varyans analizi ve Tukey'in çoklu karşılaştırma testi uygulandı. * $P<0.05$ istatistiksel olarak diğer deney gruplarından farklı olduğunu temsil etmektedir. a $P<0.05$ kontrol grubundan farklı olduğunu, b $P<0.05$ çözgen grubundan farklı olduğunu, c $P<0.05$ DM+ İnsülin grubundan farklı olduğunu temsil etmektedir.

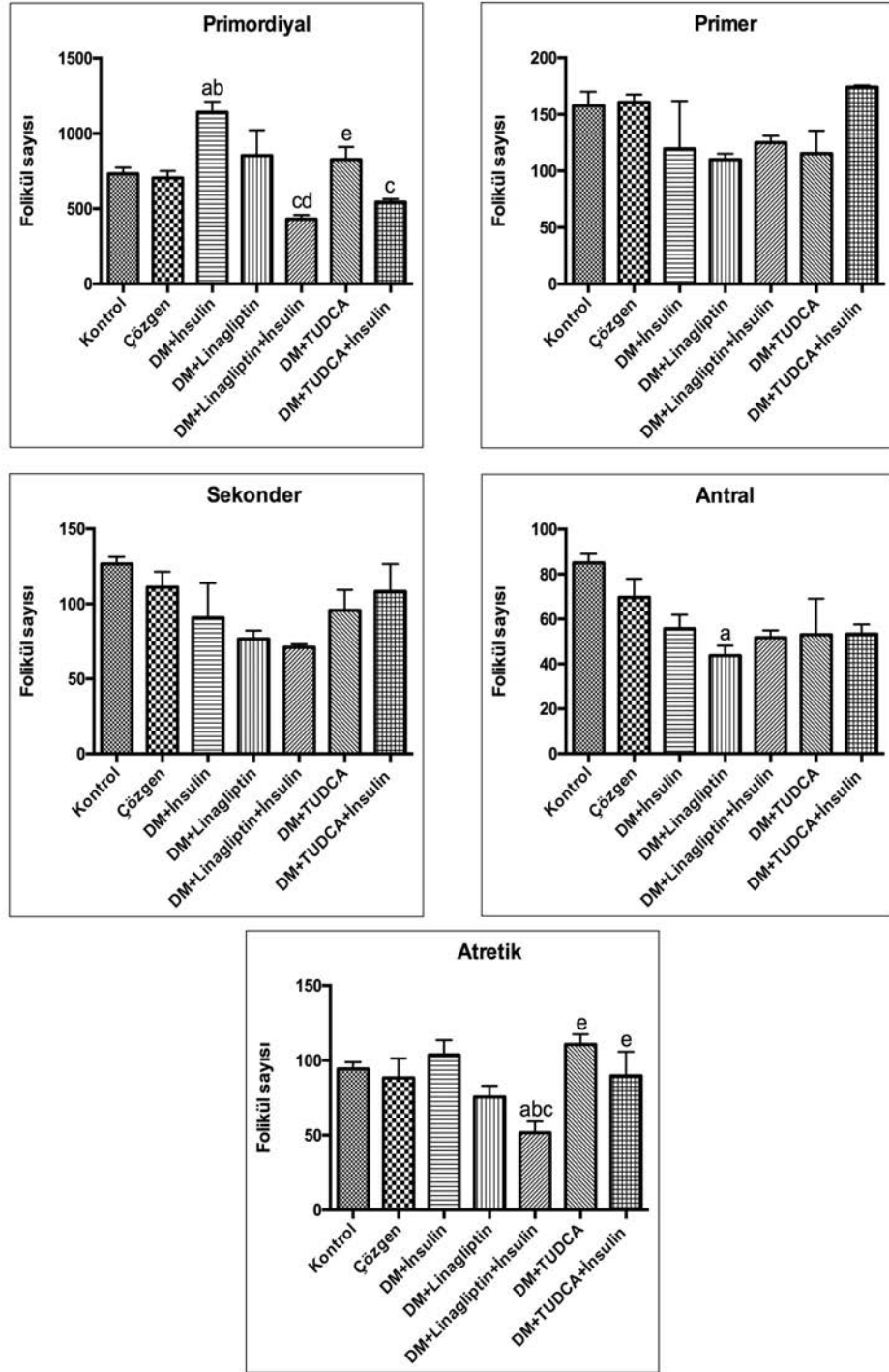
4.3. Histolojik Bulgular

Oluşturulan deney gruplarındaki farelerin gruplar arasındaki ovarial folikül rezervlerinin değerlendirilmesi için alınan seri kesitlerin hematoksilin-eozin boyanması gerçekleştirildi. Işık mikroskopu altında değerlendirildi ve görüntülendi (Şekil 4.5).

Şekil 4.6' de gösterildiği üzere üzere DM+ İnsülin grubunda primordiyal folikül sayısı kontrol, çözgen, DM+ Linagliptin+ İnsülin ve DM+ TUDCA+ İnsülin gruplarına göre arttı ($P<0.05$). Hem linagliptin hem de insülin uygulanan gruplarda gözlenen primordiyal folikül sayısı, sadece linagliptin uygulanan gruplara göre azaldı ($P<0.05$). Primer ve sekonder folikül sayıları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edildi. DM+ Linagliptin grubunda gözlenen antral folikül sayısı kontrol grubuna göre azaldı ($P<0.05$). Diğer gruplarda anlamlı bir farklılık olmadığı gözlemlendi. DM+ Linagliptin+ İnsülin grubunda atretik folikül sayısı kontrol, çözgen ve DM+ İnsülin gruplarına göre azaldı ($P<0.05$). Hem TUDCA hem de insülin uygulanan gruplarda sadece TUDCA uygulanan gruplara göre anlamlı bir azalma olduğu görüldü ($P<0.05$).



Şekil 4.5. Deneş gruplarına ait ovaryum dokularının hematoksilen eozin boyama görüntüleri. Total ovaryum görüntüsüne ait büyütme 4X, bar =200 μm , işaretlenen alanın büyütölmüş haline ait büyütme 20X, bar =50 μm .

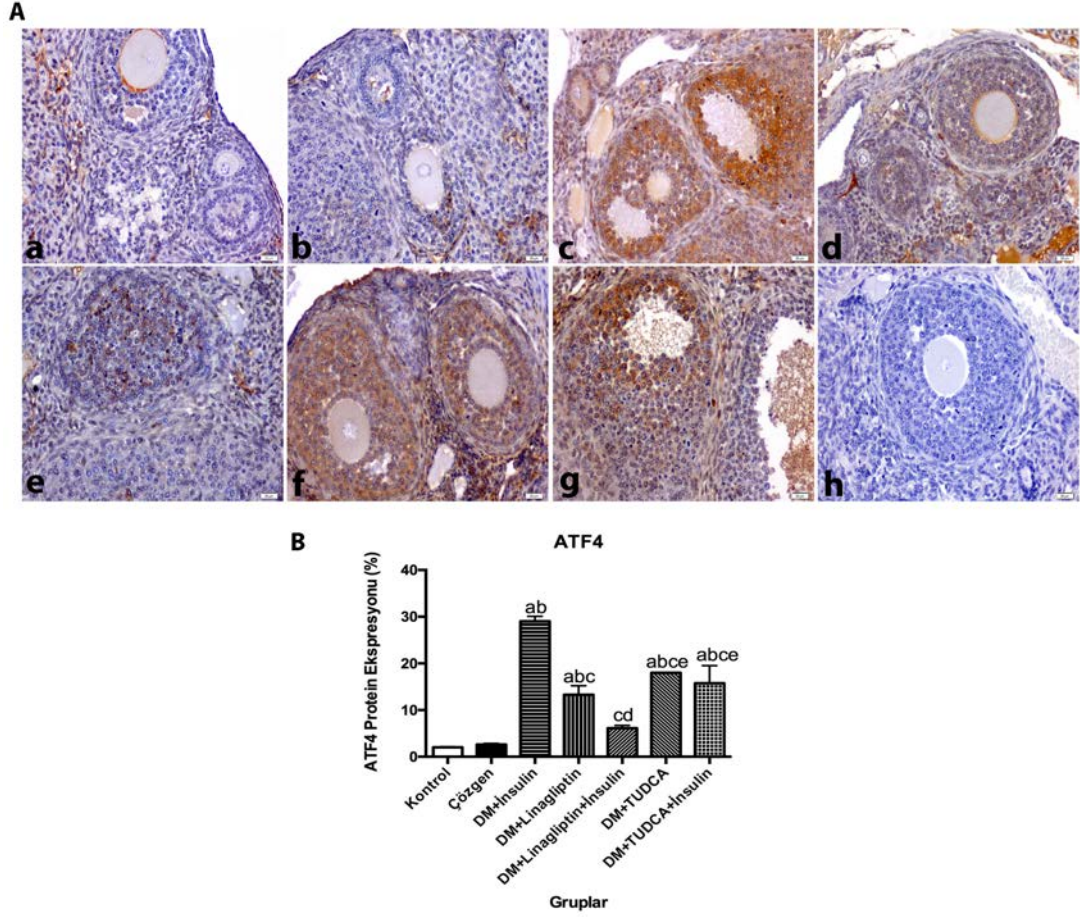


Şekil 4.6. Tüm gelişim aşamalarındaki (primordiyal, primeri sekonder, antral ve atretik) foliküllerin sayısı. Histogram grafiklerinde gösterilen veriler ort. \pm SEM olarak ifade edilir. Tek yönlü varyans analizi ve Tukey'in çoklu karşılaştırma testi uygulandı (a $P < 0.05$ kontrol grubundan farklı olduğunu; b $P < 0.05$ çözgen grubundan farklı olduğunu; c $P < 0.05$ DM+ İnsülin grubundan farklı olduğunu; d $P < 0.05$ DM+ Linagliptin grubundan farklı olduğunu; e $P < 0.05$ DM+ Linagliptin+ İnsülin grubundan farklı olduğunu; f $P < 0.05$ DM+ TUDCA grubundan farklı olduğunu göstermektedir).

4.4. İmmünohistokimyasal Bulgular

4.4.1. ATF4 İmmün Boyaması

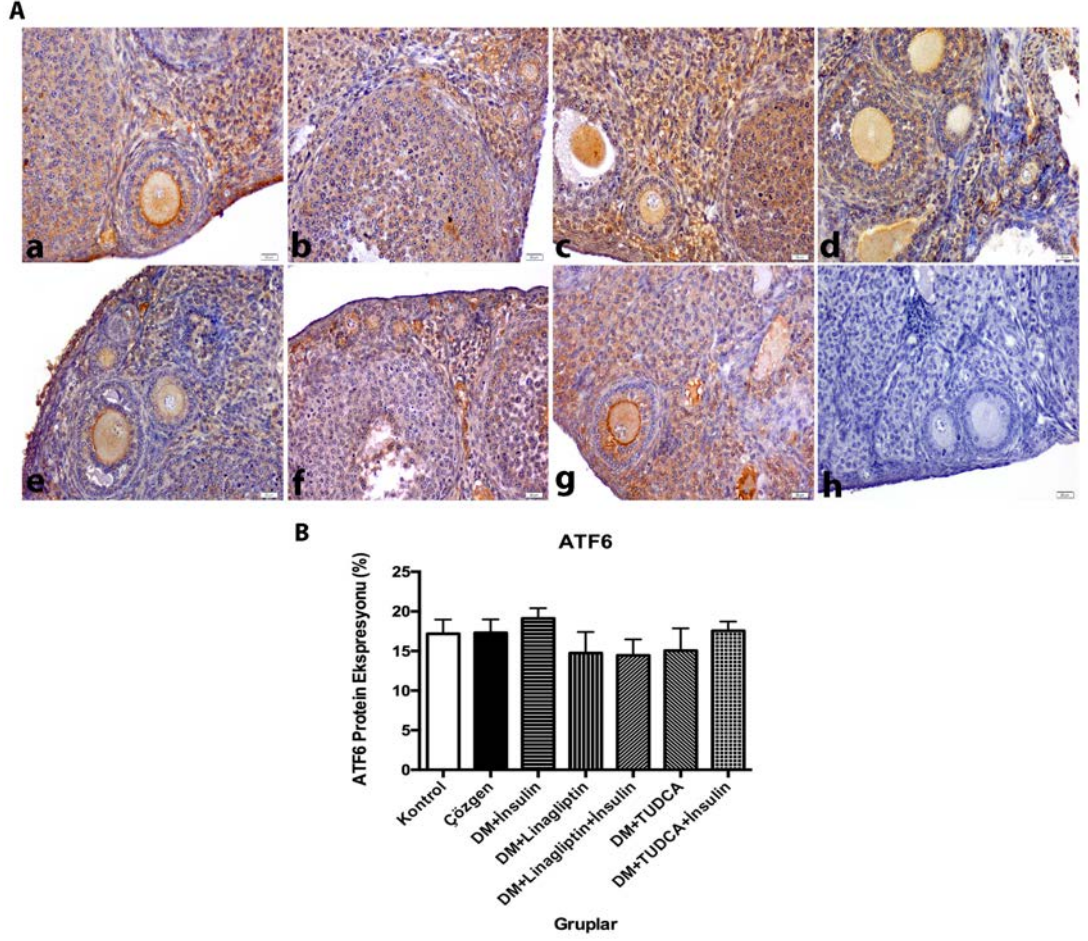
DM+ İnsülin grubunda ATF4 ifadesi tüm gruplara göre arttı. Linagliptin ve Linagliptin+ İnsülin uygulanan gruplarda ATF4 ifadesinin azaldığı gözlemlendi. Bu azalışın TUDCA uygulanan gruplara göre daha fazla olduğu tespit edildi (Şekil 4.7; $P<0.05$).



Şekil 4.7. Ovaryumlarda ATF4 immün boyama görüntüleri. A) Kontrol grubu (a), Çözgen grubu (b), DM+ İnsülin grubu (c), DM+ Linagliptin grubu (d), DM+ Linagliptin+ İnsülin grubu (e), DM+ TUDCA grubu (f), DM+ TUDCA+ İnsülin grubu (g), Negatif kontrol (h). B) Histogram grafiğinde gösterilen veriler ort \pm SEM olarak ifade edilir. Tek yönlü varyans analizi ve Tukey'in çoklu karşılaştırma testi uygulandı. a $P<0.05$ kontrol grubundan farklı olduğunu, b $P<0.05$ çözgen grubundan farklı olduğunu, c $P<0.05$ DM+ İnsülin grubundan farklı olduğunu, d $P<0.05$ DM+ Linagliptin grubundan farklı olduğunu, e $P<0.05$ DM+ Linagliptin+ İnsülin grubundan farklı olduğunu temsil etmektedir.

4.4.2. ATF6 İmmün Boyaması

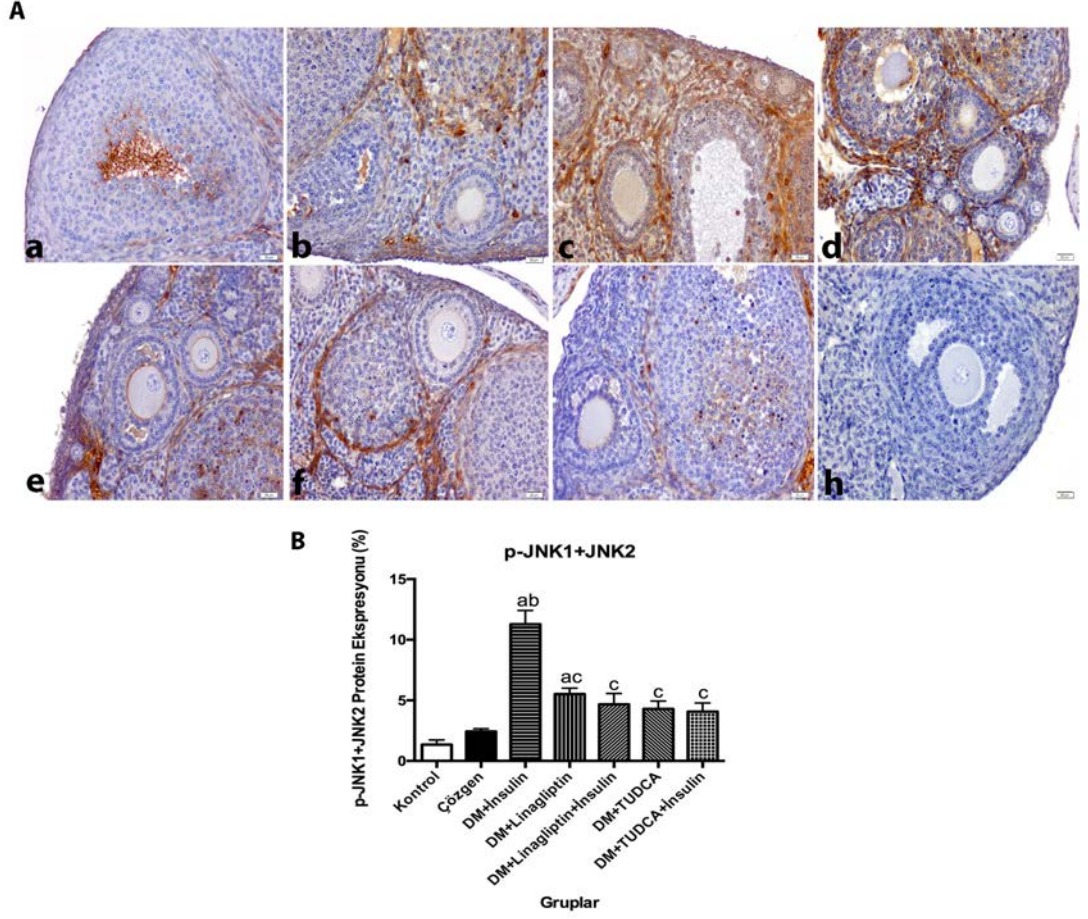
ATF6 ifadesi açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Ovaryumlarda ATF6 immün boyama görüntüleri. A) Kontrol grubu (a), Çözgen grubu (b), DM+ İnsülin grubu (c), DM+ Linagliptin grubu (d), DM+ Linagliptin+ İnsülin grubu (e), DM+ TUDCA grubu (f), DM+ TUDCA+ İnsülin grubu (g), Negatif kontrol (h). B) Histogram grafiğinde gösterilen veriler $\text{ort} \pm \text{SEM}$ olarak ifade edilir. Tek yönlü varyans analizi ve Tukey'in çoklu karşılaştırma testi uygulandı.

4.4.3. p-JNK1+JNK2 İmmün Boyaması

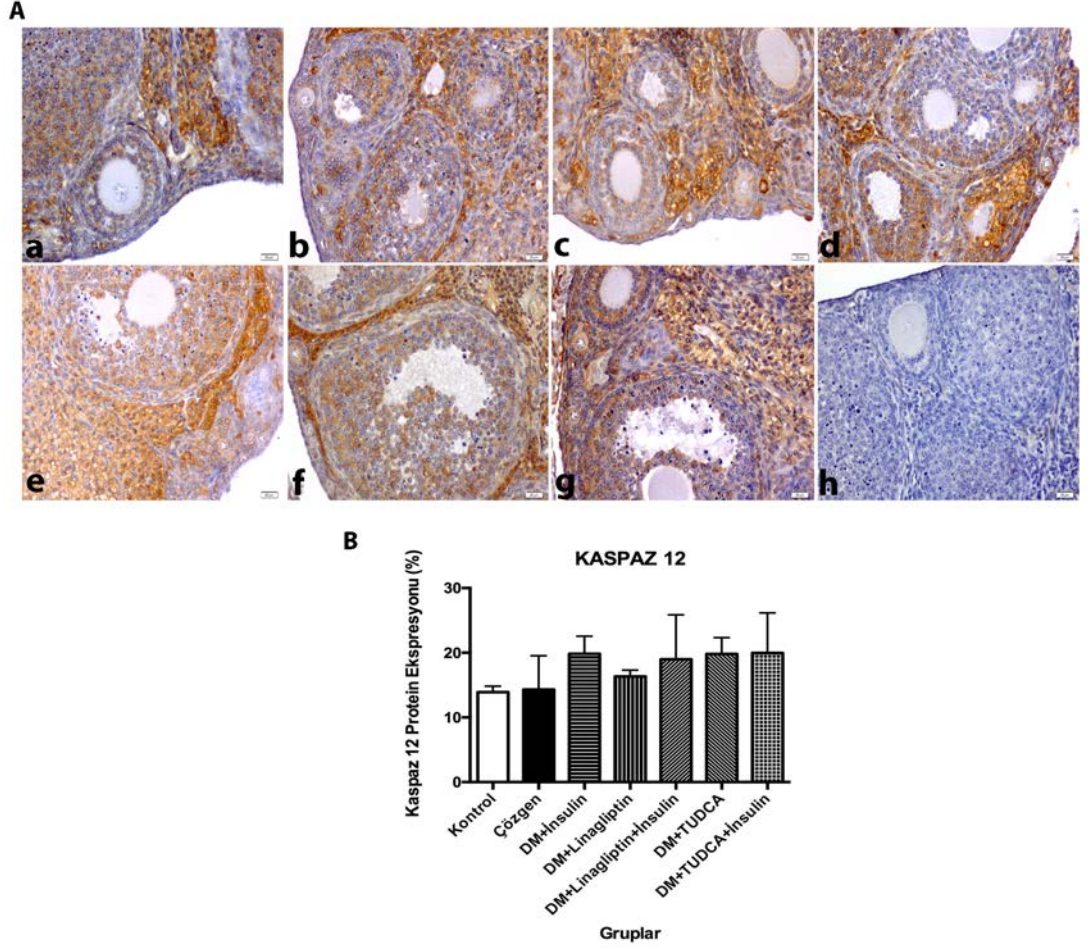
p-JNK1+JNK2 ifadesi DM+ İnsülin grubunda diğer gruplara göre anlamlı derecede arttı ($P < 0.05$). Linagliptin ve TUDCA uygulanan tüm gruplarda p-JNK1+JNK2 ifadesinde DM+ İnsülin grubuna göre anlamlı bir azalma olduğu tespit edildi (Şekil 4.9; $P < 0.05$).



Şekil 4.9. Ovaryumlarda p-JNK1+JNK2 immün boyama görüntüleri. A) Kontrol grubu (a), Çözgen grubu (b), DM+ İnsülin grubu (c), DM+ Linagliptin grubu (d), DM+ Linagliptin+ İnsülin grubu (e), DM+ TUDCA grubu (f), DM+ TUDCA+ İnsülin grubu (g), Negatif kontrol (h). B) Histogram grafiğinde gösterilen veriler ort \pm SEM olarak ifade edilir. Tek yönlü varyans analizi ve Tukey'in çoklu karşılaştırma testi uygulandı. a $P<0.05$ kontrol grubundan farklı olduğunu, b $P<0.05$ çözgen grubundan farklı olduğunu, c $P<0.05$ DM+İnsülin grubundan farklı olduğunu temsil etmektedir.

4.4.4. Kaspaz 12 İmmün Boyaması

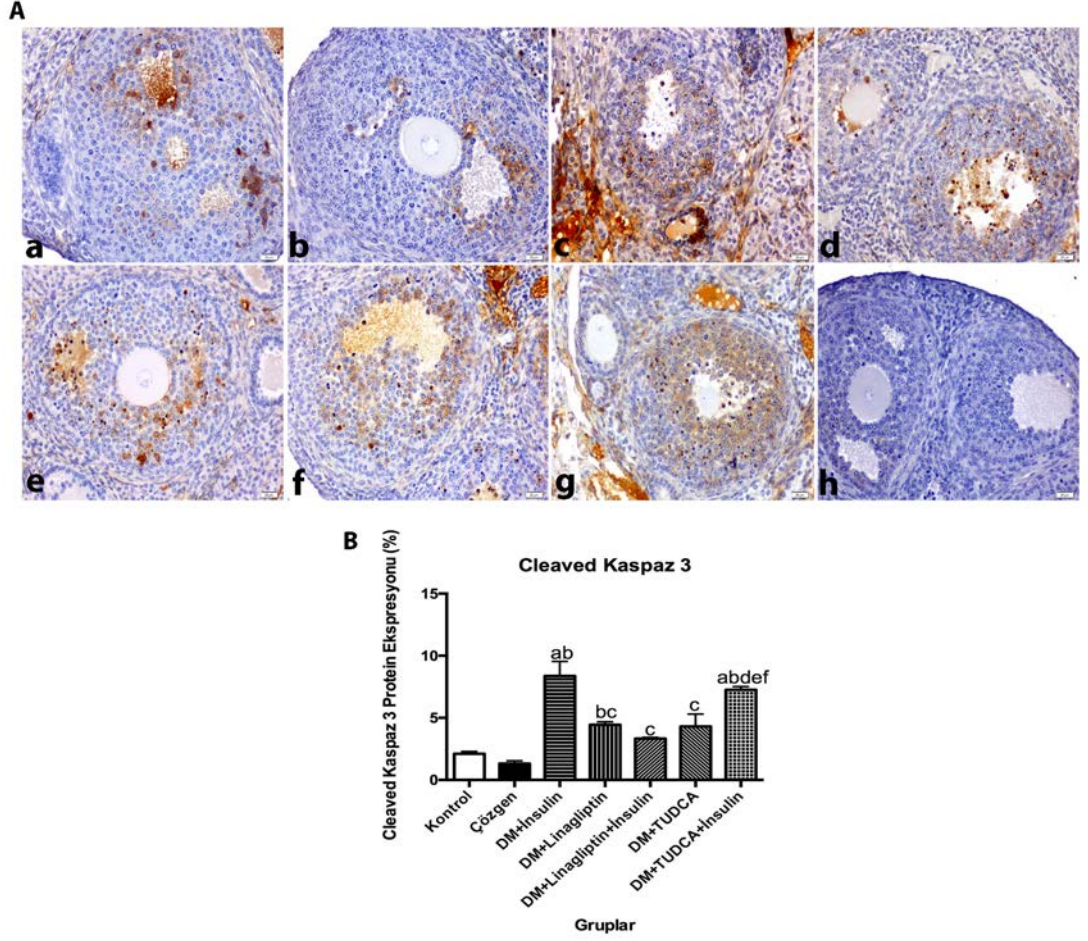
Kaspaz 12 ifadesi açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olmadığı tespit edildi (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Ovaryumlarda Kaspaz 12 immün boyama görüntüleri. A) Kontrol grubu (a), Çözgen grubu (b), DM+ İnsülin grubu (c), DM+ Linagliptin grubu (d), DM+ Linagliptin+ İnsülin grubu (e), DM+ TUDCA grubu (f), DM+ TUDCA+ İnsülin grubu (g), Negatif kontrol (h). B) Histogram grafiğinde gösterilen veriler ort \pm SEM olarak ifade edilir. Tek yönlü varyans analizi ve Tukey'in çoklu karşılaştırma testi uygulandı.

4.4.5. Cleaved Kaspaz 3 İmmün Boyaması

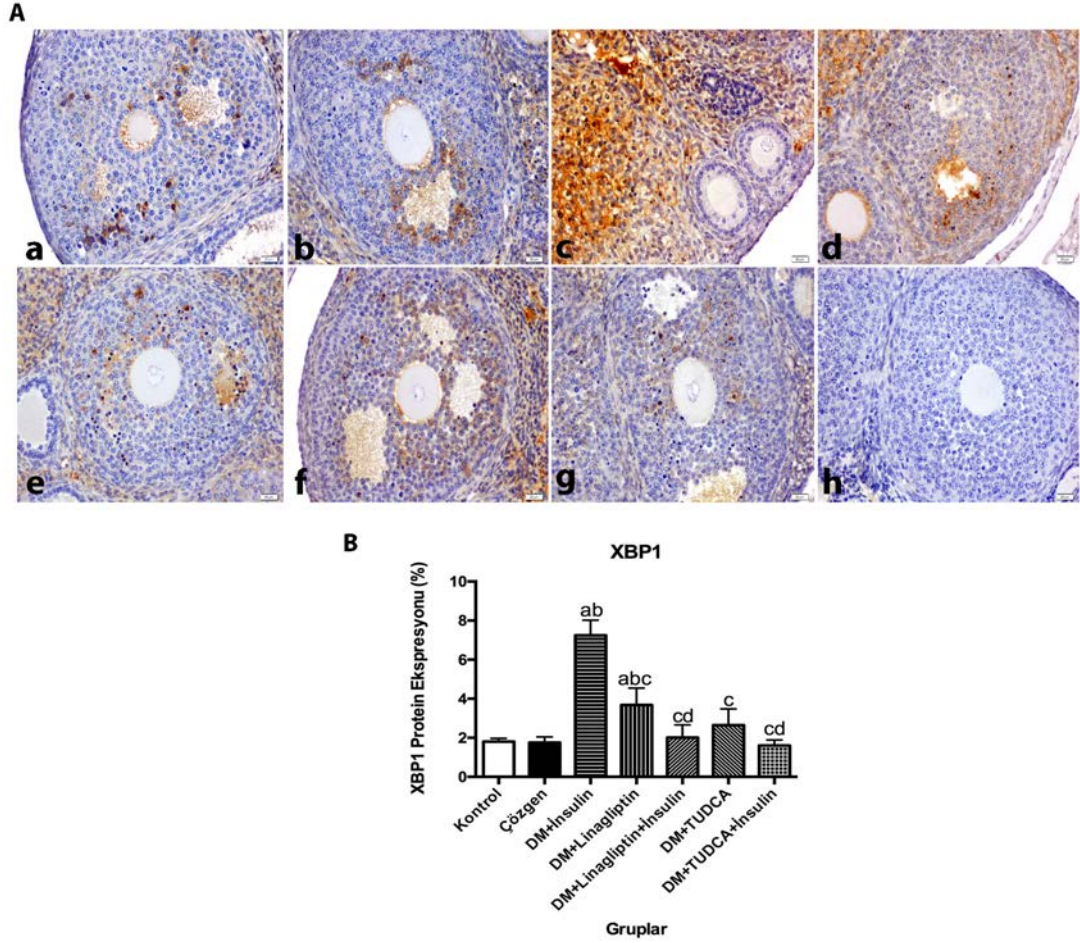
Cleaved kaspaz 3 ifadesi DM+ İnsülin ve DM+ TUDCA+ İnsülin gruplarında kontrol ve çözgen gruplarına kıyasla arttı ($P < 0.05$). Linagliptin uygulanan her iki grupta cleaved kaspaz 3 ifadesi DM+ İnsülin grubuna göre azaldı (Şekil 4.11; $P < 0.05$).



Şekil 4.11. Ovaryumlarda cleaved kaspaz 3 immün boyama görüntüleri. A) Kontrol grubu (a), Çözgen grubu (b), DM+ İnsülin grubu (c), DM+ Linagliptin grubu (d), DM+ Linagliptin+ İnsülin grubu (e), DM+ TUDCA grubu (f), DM+ TUDCA+ İnsülin grubu (g), Negatif kontrol (h). B) Histogram grafiğinde gösterilen veriler ort \pm SEM olarak ifade edilir. Tek yönlü varyans analizi ve Tukey'in çoklu karşılaştırma testi uygulandı.

4.4.6. XBP1 İmmün Boyaması

XBP1 ifadesi DM+ İnsülin grubu ovaryumlarında diğer gruplara kıyasla arttı ($P < 0.05$). DM+ Linagliptin grubunda XBP1 ifadesi kontrol ve çözgen gruplarına göre arttı ($P < 0.05$). DM+ Linagliptin+ İnsülin ve DM+ TUDCA+ İnsülin gruplarında XBP1 ifadesi DM+ Linagliptin grubuna göre azaldı (Şekil 4.12; $P < 0.05$).

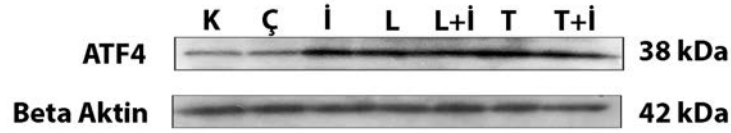
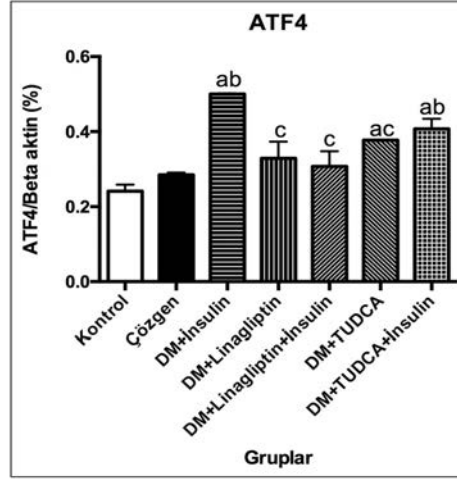


Şekil 4.12. Ovaryumlarda XBP1 immün boyama görüntüleri. A) Kontrol grubu (a), Çözgen grubu (b), DM+ İnsülin grubu (c), DM+ Linagliptin grubu (d), DM+ Linagliptin+ İnsülin grubu (e), DM+TUDCA grubu (f), DM+ TUDCA+ İnsülin grubu (g), Negatif kontrol (h). B) Histogram grafiğinde gösterilen veriler ort \pm SEM olarak ifade edilir. Tek yönlü varyans analizi ve Tukey'in çoklu karşılaştırma testi uygulandı. a $P<0.05$ kontrol grubundan farklı olduğunu, b $P<0.05$ çözgen grubundan farklı olduğunu, c $P<0.05$ DM+ İnsülin grubundan farklı olduğunu ve d $P<0.05$ DM+ Linagliptin grubundan farklı olduğunu temsil etmektedir.

4.5. Western Blot Analizi Bulguları

4.5.1. ATF4 Protein İfadesi

ATF4 protein ekspresyonu DM+ İnsülin grubunda anlamlı olarak arttı ($P<0.05$). Linagliptin uygulanan gruplarda bu ifadede azalma görüldü ($P=0.0004$). DM+TUDCA+İnsülin grubu DM+ İnsülin grubuyla ATF4 ekspresyonu açısından istatistiksel olarak benzerlik gösterdiği belirlendi (Şekil 4.13).



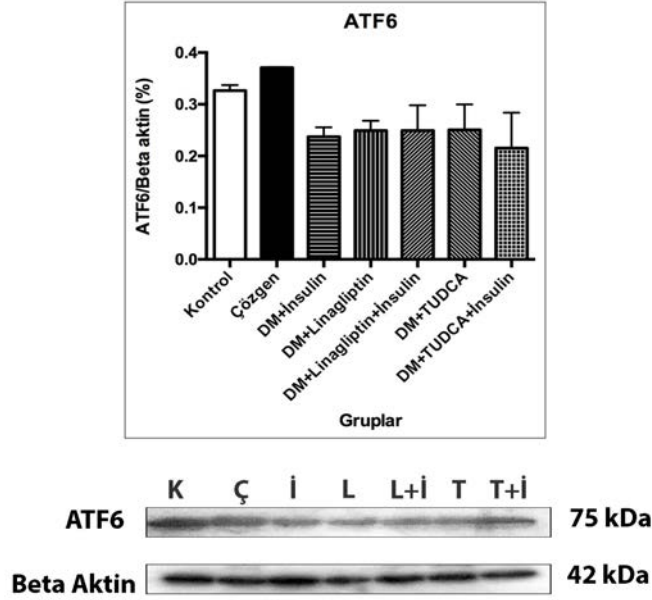
Şekil 4.13. Ovaryum örneklerinin ATF4 protein band görüntüleri. Histogram grafiğinde gösterilen veriler ort \pm SEM olarak ifade edilir. Tek yönlü varyans analizi ve Tukey'in çoklu karşılaştırma testi uygulandı. a $P<0.05$ kontrol grubundan farklı olduğunu, b $P<0.05$ çözgen grubundan farklı olduğunu, c $P<0.05$ DM+ İnsülin grubundan farklı olduğunu temsil etmektedir.

4.5.2. ATF6 Protein İfadesi

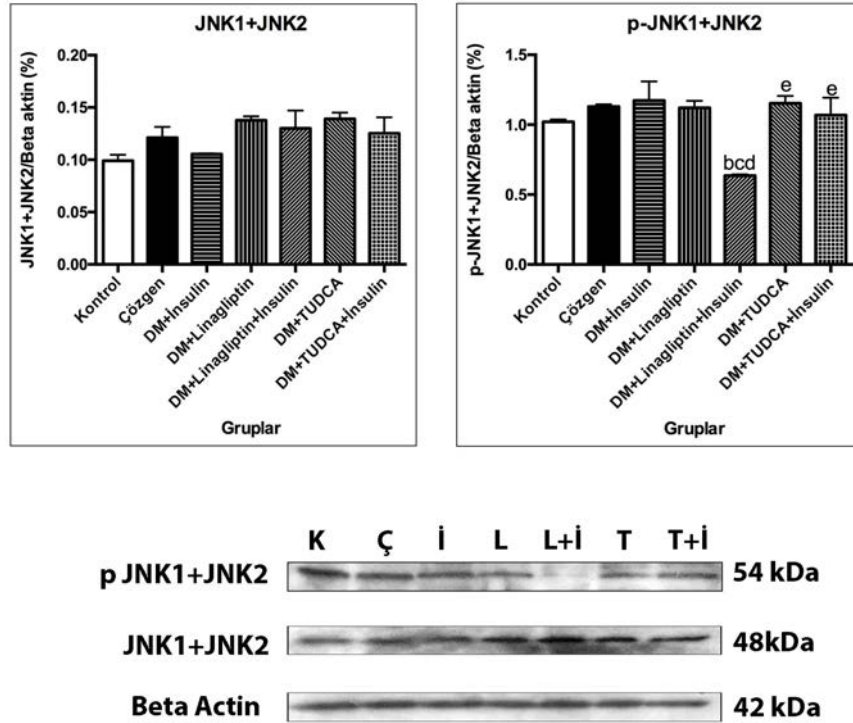
Western blot analizine göre ATF6 protein ekspresyonu açısından gruplar arasında herhangi bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.14).

4.5.3. Total ve Fosforile JNK1+JNK2 Protein İfadesi

Total JNK1+JNK2 protein ifadesi bakımından gruplar arasında herhangi bir farklılık olmadığı belirlendi. p-JNK1+JNK2 ifadesinin DM+ Linagliptin+ İnsülin grubunda diğer tüm gruplara göre azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.15; $P<0.05$).



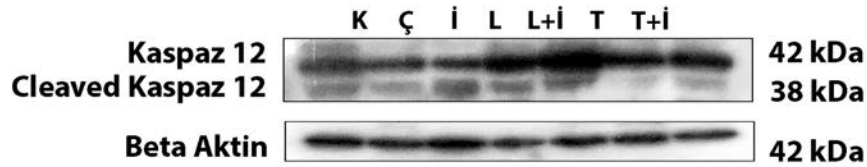
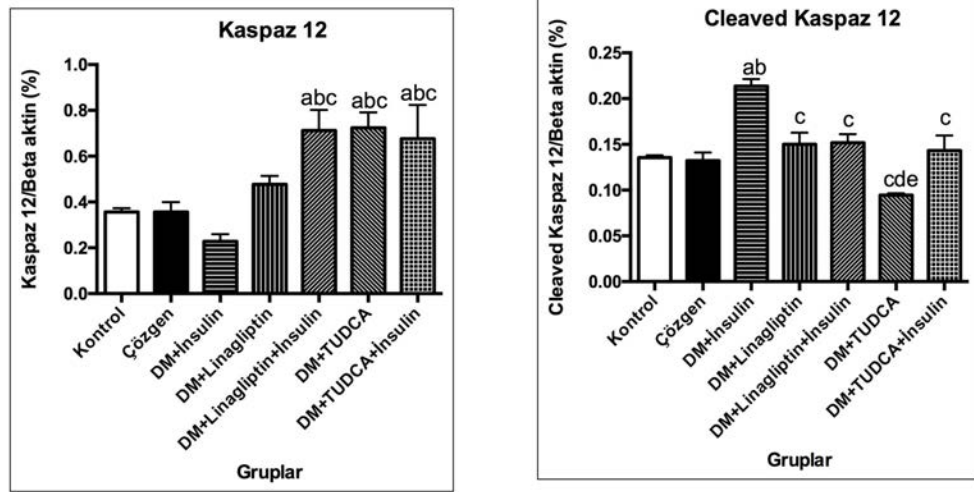
Şekil 4.14. Ovaryum örneklerinin ATF6 protein band görüntüleri. Histogram grafiğinde gösterilen veriler ort \pm SEM olarak ifade edilir. Tek yönlü varyans analizi ve Tukey'in çoklu karşılaştırma testi uygulandı.



Şekil 4.15. Ovaryum örneklerinin total ve fosforile JNK1+JNK2 protein band görüntüleri. Histogram grafiğinde gösterilen veriler ort \pm SEM olarak ifade edilir. Tek yönlü varyans analizi ve Tukey'in çoklu karşılaştırma testi uygulandı. a $P < 0.05$ kontrol grubundan farklı olduğunu, b $P < 0.05$ çözgen grubundan farklı olduğunu, c $P < 0.05$ DM+ İnsülin grubundan farklı olduğunu, d $P < 0.05$ DM+Linagliptin grubundan farklı olduğunu, e $P < 0.05$ DM+ Linagliptin+ İnsülin grubundan farklı olduğunu temsil etmektedir.

4.5.4. Kaspaz 12 Protein İfadesi

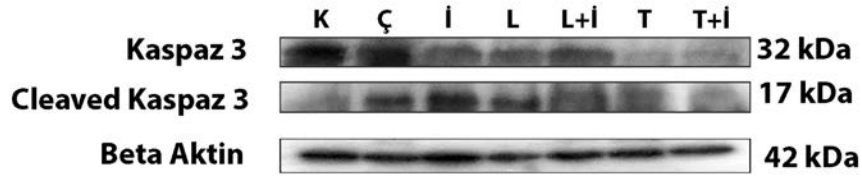
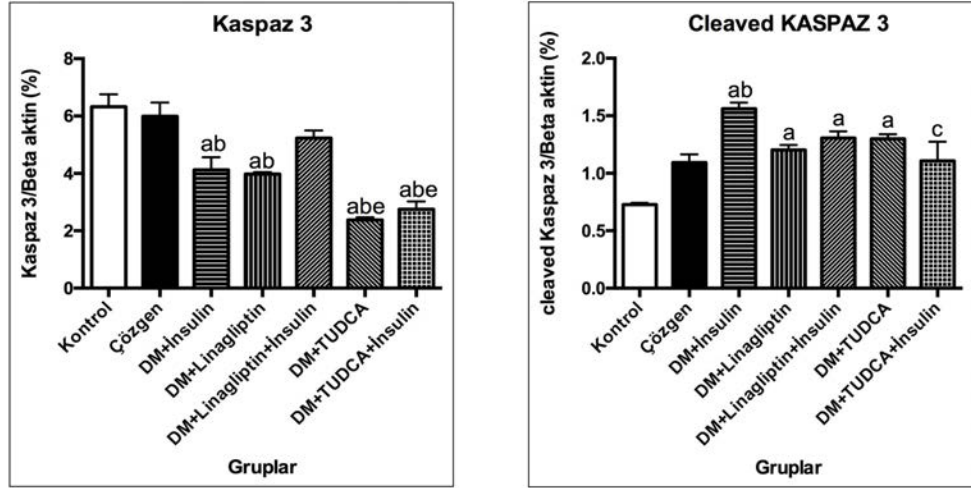
Total kaspaz 12 protein ifadesi DM+ Linagliptin+ İnsülin, DM+ TUDCA ve DM+ TUDCA+ İnsülin gruplarında kontrol, çözgen ve DM+İnsülin gruplarına göre arttı ($P<0.05$). Cleaved kaspaz 12 protein ifadesi ise DM+ İnsülin grubunda diğer gruplara kıyasla oldukça yüksek olduğu gözlemlendi ($P<0.05$). Linagliptin, Linagliptin+ İnsülin, TUDCA ve TUDCA+ İnsülin uygulanan diyabet gruplarında cleaved kaspaz 12 ifadesi insülin uygulanan diyabet grubuna göre azalma gösterdi ($P<0.05$).



Şekil 4.16. Ovaryum örneklerinin total ve cleaved kaspaz 12 protein band görüntüleri. Histogram grafiğinde gösterilen veriler ort \pm SEM olarak ifade edilir. Tek yönlü varyans analizi ve Tukey'in çoklu karşılaştırma testi uygulandı. a $P<0.05$ kontrol grubundan farklı olduğunu, b $P<0.05$ çözgen grubundan farklı olduğunu, c $P<0.05$ DM+ İnsülin grubundan farklı olduğunu, d $P<0.05$ DM+ Linagliptin grubundan farklı olduğunu ve e $P<0.05$ DM+ Linagliptin+ İnsülin grubundan farklı olduğunu temsil etmektedir.

4.5.5. Kaspaz 3 Protein İfadesi

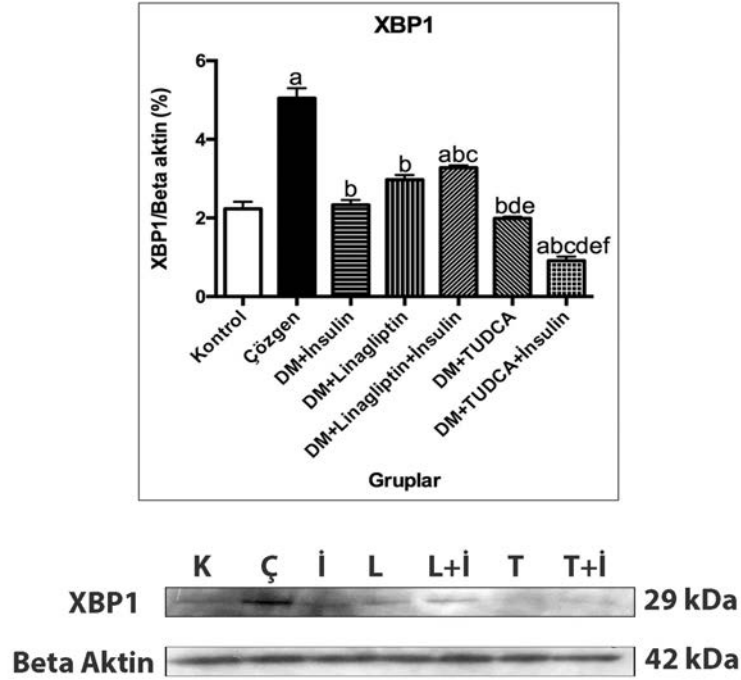
Western blot analizine göre total kaspaz 3 protein ifadesi DM+ İnsülin, DM+ Linagliptin, DM+ TUDCA ve DM+ TUDCA+ İnsülin gruplarında kontrol ve çözgen gruplarına kıyasla azaldı ($P<0.05$). DM+ Linagliptin+ İnsülin grubunda gözlenen total kaspaz 3 ifadesi kontrol ve çözgen grubu ile benzer olduğu belirlendi ($P>0.05$). Cleaved kaspaz 3 ifadesi ise kontrol grubuna kıyasla DM+ İnsülin, DM+ Linagliptin, DM+ Linagliptin+ İnsülin ve DM+ TUDCA gruplarında arttı. DM+ TUDCA+ İnsülin grubunda gözlenen cleaved kaspaz 3 ifadesi kontrol ve çözgen grubuyla kıyaslandığında fark olmadığı tespit edildi (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Ovaryum örneklerinin total ve cleaved kaspaz 3 protein band görüntüleri. Histogram grafiğinde gösterilen veriler ort \pm SEM olarak ifade edilir. Tek yönlü varyans analizi ve Tukey'in çoklu karşılaştırma testi uygulandı. a $P<0.05$ kontrol grubundan farklı olduğunu, b $P<0.05$ çözgen grubundan farklı olduğunu, c $P<0.05$ DM+ İnsülin grubundan farklı olduğunu, d $P<0.05$ DM+ Linagliptin grubundan farklı olduğunu, e $P<0.05$ DM+ Linagliptin+ İnsülin grubundan farklı olduğunu ve f $P<0.05$ DM+ TUDCA grubundan farklı olduğunu temsil etmektedir.

4.5.6. XBP1 Protein İfadesi

XBP1 protein ifadesinin çözgen grubunda diğer tüm gruplardan daha yüksek olduğu gözlemlendi ($P<0.05$). DM+ İnsülin, DM+ Linagliptin ve DM+ TUDCA grupları kontrol grubu ile benzer XBP1 ifadesi gösterdiği belirlendi. DM+ Linagliptin ve DM+ Linagliptin+ İnsülin gruplarında yine benzer XBP1 ifadesi olduğu gözlemlendi. En az band yoğunluğunun DM+ TUDCA+ İnsülin grubunda olduğu görüldü (Şekil 4.18; $P<0.05$).



Şekil 4.18. Ovaryum örneklerinin XBP1 protein band görüntüleri. Histogram grafiğinde gösterilen veriler ort \pm SEM olarak ifade edilir. Tek yönlü varyans analizi ve Tukey'in çoklu karşılaştırma testi uygulandı. a $P<0.05$ kontrol grubundan farklı olduğunu, b $P<0.05$ çözgen grubundan farklı olduğunu, c $P<0.05$ DM+ İnsülin grubundan farklı olduğunu, d $P<0.05$ DM+ Linagliptin grubundan farklı olduğunu, e $P<0.05$ DM+ Linagliptin+ İnsülin grubundan farklı olduğunu ve f $P<0.05$ DM+ TUDCA grubundan farklı olduğunu temsil etmektedir.

4.6. qRT PCR Bulguları

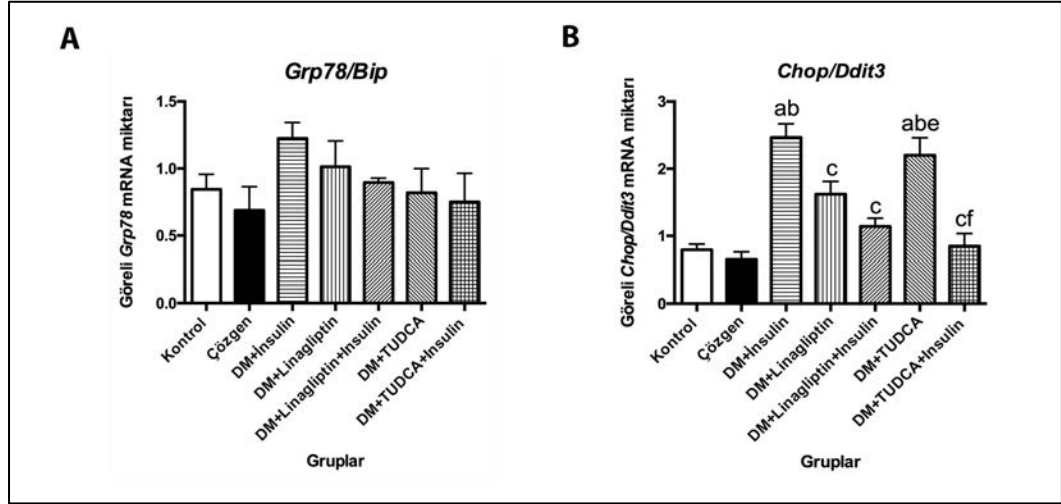
4.6.1. *Grp78/BiP* ve *Chop/Ddit3* Gen İfadesi

Oluşturulan yedi deney grubundan toplanan sağ ovaryumlarda *Grp78*, *Chop* ve *beta aktin* gen ekspresyonunu mRNA düzeyinde miktarsal olarak değerlendirmek amacıyla mRNA izolasyonu yapıldı. Bunu takiben izole edilen mRNA'lardan Reverse Transkripsiyon ile cDNA eldesi ve elde edilen cDNA örnekleri ile kantitatif real-time PCR yapılarak amplifikasyon gerçekleştirildi.

Şekil 4.19'da gösterildiği üzere *Grp78/Bip* mRNA ekspresyonu DM+ İnsülin grubunda artmış olmasına rağmen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edildi ($P= 0.4146$). *Chop/Ddit3* mRNA ekspresyonu DM+ İnsülin ve DM+ TUDCA gruplarında arttı ($P<0.0001$). DM+ Linagliptin, DM+ Linagliptin+ İnsülin ve DM+ TUDCA+ İnsülin gruplarında *Chop/Ddit3* mRNA ekspresyonu DM+ İnsülin grubuna göre anlamlı miktarda azaldı ($P<0.05$).

TUDCA hem glikoz homeostazı üzerine yararlı etkisinin olması hem de ER stresini azaltan bir kimyasal şaperon olması nedeniyle linagliptinin ER stresini ve diyabet ile olan ilişkisini değerlendirmek açısından önem taşımaktadır. Bulgularımıza göre TUDCA insülin ile birlikte kullanıldığında *Chop/Ddit3* mRNA ekspresyonunu

sadece TUDCA verilen gruba göre etkin bir şekilde baskıladığı gözlemlendi. Ayrıca linagliptin ve insülinin birlikte kullanımı, TUDCA+ İnsülin grubundaki verilerle paralel olarak ER stresi ile ilişkili apoptotik yanıtta etkin olan *Chop/Ddit3* mRNA ekspresyonunu azaltmış olduğu tespit edildi.



Şekil 4.19. Ovaryum örneklerinde *Grp78/Bip* (A) ve *Chop/Ddit3* (B) gen ekspresyon düzeylerini qRT-PCR ile karşılaştırılması. Histogram grafiğinde gösterilen veriler ort. \pm SEM olarak ifade edilir. Tek yönlü ANOVA varyans analizi ve Tukey'in çoklu karşılaştırma testi uygulandı. a $P < 0.05$ kontrol grubundan farklı olduğunu, b $P < 0.05$ çözgen grubundan farklı olduğunu, c $P < 0.05$ DM+ İnsülin grubundan farklı olduğunu, e $P < 0.05$ DM+ Linagliptin+ İnsülin grubundan farklı olduğunu, f $P < 0.05$ DM+ TUDCA grubundan farklı olduğunu temsil etmektedir.

5. TARTIŞMA

T1DM’li kadınlarda üreme bozuklukları yaygındır ve bunların % 40’a kadarının yaşamları boyunca önemli adet düzensizlikleri veya üreme bozuklukları yaşayacakları öngörülmektedir (Codner ve ark., 2012). Çocukluk ve ergenlik döneminde ortaya çıkan T1DM ile birlikte üreme anormallikleri üreme yaşamının erken dönemlerinde ortaya çıkabilir ve kendini pubertal gecikme ve birincil amenore olarak gösterebilir. Ek olarak, adet döngüsü bozukluğu, subfertilite, iyi bilinen gebelik komplikasyonları ve erken menopoz, T1DM ile ilişkilendirilmektedir (Kjaer ve ark., 1992; Dorman ve ark., 2001; Sjoberg ve ark., 2013). Son yirmi yılda insülin tedavisinin yoğunlaştırılması bu sorunların bazılarını iyileştirmiş gibi (Codner ve ark., 2012) görünse de T1DM’li kadınlarda polikistik over sendromu ve hiperandrojenik özellikler de dahil olmak üzere yeni üreme problemleri ortaya çıkmaktadır (Codner ve Escobar-Morreale, 2007; Escobar-Morreale ve Roldan-Martin, 2016). Dolayısıyla, T1DM’li kadınlar için yeni ve yardımcı tedavilerin araştırılması gerekmektedir.

Önceki çalışmalar, ER stresinin periferik insülin direnci, tip 1 ve tip 2 diyabet gibi metabolik bozuklukların patogeneğinde rol oynadığını bildirmiştir (Eizirik ve ark., 2008; Back ve Kaufman, 2012; Okan ve ark., 2021). Ayrıca hipergliseminin ER stresine paralel olarak oksidatif strese de neden olduğu ve her iki yolun da aşırı ROS üretimine ve aşağı yönde patolojik etkilere katkıda bulunduğu kanıtlanmıştır (Mooradian ve Haas, 2011; Basha ve ark., 2012). Linagliptinin endotel fonksiyonu üzerindeki herhangi bir yararlı etkisinin hiperglisemideki azalmaya bağlı olmayan STZ ile indüklenmiş bir T1DM sıçan modelinde (β pankreatik hücrelerin nekrozla yok edildiği bu T1DM modelinde insülin salgısını yükselterek glikozu düşürmek mümkün değildir) araştırılmıştır. 4 hafta boyunca linagliptin (2mg/kg, günlük oral gavaj) uygulaması NOX2 ifadesini azaltarak vasküler oksidatif stres seviyelerini azaltmış ve mezenterik arterlerde endotel bağımlı gevşemeyi iyileştirmiştir (Salheen ve ark., 2015a). Araştırmacılara (Kroller-Schon ve ark., 2012; Salheen ve ark., 2015b) göre, linagliptin diğer iki DPP-4 inhibitörü olan sitagliptin ve vildagliptinde olmayan glikozdaki herhangi bir azalmadan bağımsız olarak antioksidan aktivite gösterebilmektedir. Bizde çalışmamızda farelerden alınan ovaryum örneklerinde oksidatif stres ilişkili doku hasarının önemli belirteçlerinden MDA seviyesini ve NADPH oksidaz izoformlarından NOX1 aktivitesini (Kroller-Schon ve ark., 2012;

Salheen ve ark., 2015a; Yayla ve ark., 2018) ELISA yöntemi aracılığıyla inceledik. Bulgularımıza göre hem MDA hem de NOX1 değerleri DM+ İnsülin grubunda artmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte linagliptin ve insülinin birlikte uygulanmasının, sadece linagliptin uygulanan gruba göre oksidatif stres seviyelerini azaltmada daha etkin olduğu görülmektedir.

GLP-1, gıda alımı ve glikoz regülasyonu ile ilgili birden fazla organ üzerinde etki ederek kan şekeri homeostazının korunmasında önemli roller oynar. En önemlisi, GLP-1 insülin sekresyonunu uyarır ve β hücresi hayatta kalımını ve proliferasyonunu desteklerken pankreasta glukagon sekresyonunu inhibe eder (Marathe ve ark., 2013). Bu nedenle GLP-1 diyabet tedavisi için oldukça önemli bir hedeftir. Doğal GLP-1, DPP-4 aracılı bozulmaya eğilimli olduğundan, iki tip ilaç (topluca inkretin ilaçları olarak adlandırılır) geliştirilmiştir: GLP-1 etkisini taklit eden ancak DPP-4 bozulmasına karşı dirençli olan GLP-1 agonistleri ve endojen GLP-1 aktivitesini uzatan linagliptinin de dahil olduğu DPP-4 inhibitörleri (Drucker ve Nauck, 2006). T1DM'li hastalarda glukagon sekresyonu uygun olmayan şekilde artar (Greenbaum ve ark., 2002) ve insüline bir DPP-4 eklenmesi, bu tür hastalarda glisemik kontrolü iyileştirebilir ve insülin talebini azaltabilir (Frandsen ve ark., 2016). Son zamanlarda yapılan çalışmalar, linagliptinin hayvan modellerinde β hücresi sağ kalımını ve işlevini iyileştirdiğini göstermiştir (Chen ve ark., 2012a; Zhao ve ark., 2016). Ek olarak, bol miktarda α hücresi ve az miktarda β hücresi içeren T1DM fare modelinde linagliptinin α hücrelerinde GLP-1 varlığını artırarak bir kan şekeri düşürücü etkiyi kolaylaştırabileceği de kanıtlanmıştır (Zhang ve ark., 2017). Çalışmamızda STZ enjeksiyonundan iki gün sonra ve deney bitiminde T1DM'li farelerde ölçülen kan glikoz değerleri sadece Linagliptin uygulanan grupta değişmezken hem linagliptin hem de insülin uygulanan grupta azalma eğilimi göstermesi kan şekeri düşürücü etkinin insülin kaynaklı olduğunu göstermektedir.

DPP-4 inhibitörleri, endojen GLP-1 konsantrasyonunu iki ila üç kat artırarak glikoza bağımlı insülin sekresyonunu ve glukagon inhibisyonunu güçlendirir, ancak vücut ağırlığı üzerinde hiçbir etkisi yoktur (Madsbad ve ark., 2008). Çalışmamızda, diyabet gruplarında kontrol ve çözümlen gruplarına kıyasla deney süresince daha az kilo alımı ve kilo kaybı gözlenirse de istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı gözlemlendi.

Genç-yetişkin T1DM hastalarında serum DPP-4 aktivitesinin arttığı gösterildi (Osawa ve ark., 2016). Ayrıca, bu aktivitenin diyabet süresi ve g-glutamil transferaz düzeyi ile temsil edilen karaciğer disfonksiyonu ile pozitif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir. Bu veriler, T1DM'de DPP-4'ün potansiyel bir patofizyolojik rolü olduğunu düşündürür ve gelecekte bu hastalığın tedavilerinin geliştirilmesi için değerli bir etkidir. Bu nedenle biz de çalışmamızda Linagliptin, Linagliptin- İnsülin, TUDCA ve TUDCA- İnsülin kombine uygulamasının DPP-4 aktivitesi üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla serum örneklerini ELISA yöntemiyle inceledik. DM+ İnsülin grubunda en yüksek DPP-4 aktivitesi olduğunu gördük. Diğer uygulama gruplarında bu aktivitenin DM+ İnsülin grubuna göre azaldığı fakat kontrol ve çözgen gruplarına göre artmış olduğu tespit edildi. Bu bulgumuzu pozitif bir kontrol sonucu olarak değerlendirdik ve böylelikle bulgularımızın literatür bilgisi ile uyumlu olduğunu kanıtladık. DPP-4 aktivitesi linagliptin ve glikoz homeostazi üzerine yararlı etkisi olduğu bilinen TUDCA (Vettorazzi ve ark., 2017) uygulamasıyla azaldı. Ek olarak insülin kullanımının bu aktiviteyi etkilemediğini gözlemledik.

T1DM'li ergenlik öncesi kızlarda yapılan çalışmalara göre artan sayıda küçük büyüyen folikül olduğunu öneren yüksek anti-Müllerian hormon konsantrasyonlarına sahip oldukları gözlenmiştir ve bu durum insülin tedavisinin granüloza hücreleri üzerinde uyarıcı bir etkisi olduğunu göstermektedir (Codner ve ark., 2011). Literatürle uyumlu olarak, çalışmamızda oluşturulan deney gruplarındaki farelerin ovaryal folikül rezervinin değerlendirilmesi için yaptığımız folikül sayımına göre, kontrol ve çözgen gruplarına kıyasla DM+ İnsülin grubunda primordiyal folikül sayısında artış olduğu belirlendi ($P<0.05$). DM+ Linagliptin+ İnsülin ve DM+ TUDCA+ İnsülin gruplarında ise DM+ İnsülin grubuna göre primordiyal folikül sayısında azalma olduğu ($P<0.05$), fakat bu azalmanın kontrol ve çözgen grubuna göre farklı olmadığı gözlemlendi ($P>0.05$). Oluşturulan deney grupları arasında primer ve sekonder folikül sayıları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı belirlendi. DM+ Linagliptin grubunda antral folikül sayısı en azdı. Fizyolojik olarak pankreas, önemli bir ilk geçiş klirensi ile portal vene insülin salgılar (Shishko ve ark., 1992). T1DM'de, subkutan insülin doğrudan sistemik dolaşım sistemine emilir, ilk geçiş hepatik klirensi atlanır ve böylece ovaryumları artan insülin konsantrasyonlarına maruz bırakır. Yüksek sistemik insülin konsantrasyonlarına maruz kalma, ovaryum insülin ve IGF-1 reseptörlerini uyarır, bu da folikül stimülasyonuna ve ovaryum androjen üretiminin artmasına neden

olabilir (Escobar-Morreale ve ark., 2000). Bu faktörler, T1DM'de polikistik over sendromunun artmasına katkıda bulunur (Escobar-Morreale ve Roldan-Martin, 2016). Çalışmamızda DM+ İnsülin grubunda artan primordiyal folikül sayısının gözlenmesi olası bir polikistik over sendromunun göstergesi olabilir. Ayrıca Linagliptin uygulanan gruplarda, primordiyal folikül sayısında azalma görülmesi ve özellikle hem linagliptin hem de insülinin bir arada uygulanmasıyla bu sayının daha da azalması polikistik over sendromu gibi üreme rahatsızlıklarını iyileştirebileceğini düşündürmektedir. Antral folikül sayısının en az Linagliptin uygulanan grupta gözlenmesi, primordiyal folikül havuzunun korunduğu ve primordiyalden büyüyen foliküllere geçişin azaldığını düşündürmektedir. %99' dan fazla fare ovaryum germ hücreleri atrezi yoluyla kaybolur ve çok azı ovulasyona ulaşır (Tingen ve ark., 2009). Atretik folikül sayısının en az DM+ Linagliptin+ İnsülin grubunda gözlenmesi ise linagliptin ve insülinin birlikte kullanımının T1DM fare modelinde diğer gruplara göre daha az folikül kaybına neden olduğunu göstermektedir. Bu durum sağlıklı bir foliküler gelişim için fayda sağlayabilir.

Daha önce yaptığımız çalışmada, T1DM'li fare ovaryumlarında hem kaspaz 12 hem de kaspaz 3'ün önemli ölçüde indüklendiğini gösterdik. T1DM'nin neden olduğu aşırı ER stresinin, ovaryum dokusunda kaspaz 12-9-3 sinyal kaskadı yoluyla apoptotik bir mekanizmayı desteklemesinin muhtemel olduğunu gördük (Okan ve ark., 2021). Bu tez projemizde ise, diyabetle indüklenen aşırı ER stresini dengelemek ve ER stresi ile gelişen apoptotik mekanizmanın linagliptin ve insülin uygulaması ile fare ovaryumunda homeostaz sürecini destekleyip destekleyemeyeceğini araştırdık. Bunun için, üreme çağındaki 6 haftalık Balb/C dişi farelerin ovaryum dokusunda T1DM'ye yanıt olarak ER stresi ile ilişkili apoptotik sürece katkıda bulunan UPR dönüştürücülerinin aktivasyonunu analiz ettik. Memelilerde, ER'nin katlama kapasitesi aşıldığında, ER zarında yerleşik proteinler PERK, ATF6 ve IRE1, katlanmamış protein yanıtını (UPR) (Hetz ve Papa, 2018) başlatır. PERK, eIF2'yi fosforile ettiği otofosforilasyon yoluyla dimerleşir ve aktif hale geçer. Bu da gen ifadesini düzenlemek için hücre çekirdeğine yer değiştiren transkripsiyon faktörü ATF4'ün artan translasyonu ile eş zamanlı olarak protein sentezinde genel bir azalma ile sonuçlanır (Hetz ve Papa, 2018). CREB2 olarak da bilinen ATF4, çok çeşitli dokularda yapısal olarak ifade edilir (Mamady ve Storey, 2008). ATF4'ün osteoblast farklılaşması sırasında gerekli olan yüksek seviyeli proliferasyonu düzenlemede

önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Wortel ve ark., 2017). ATF4, ovulasyon için gerekli olan C/EBP α ve C/EBP β dahil olmak üzere C/EBP ailelerinin üyeleriyle heterodimerler oluşturulabilir (Vallejo ve ark., 1993; Fan ve ark., 2011). Birkaç çalışma, ATF4'ün üremedeki rolünü de tanımlamıştır. Koryonik villus dokusunda azalan ATF4 ekspresyonu hamile kadınlarda düşüğe neden olabilir (Chai ve ark., 2013). Ayrıca ATF4'ün foliküler fonksiyonu düzenlemedeki rolünü ortaya koyan çalışmalar vardır. Örneğin, ATF4'ün değiştirilmiş ifadesi, foliküllerin gelişimi ile yakından ilişkilidir (Lin ve ark., 2012b; Barilovits ve ark., 2014; Cui ve ark., 2014). Ayrıca korpus luteumun fonksiyonel ve erken regresyon evrelerinde ATF4 indüklenebilir (Park ve ark., 2014). Bununla birlikte, ATF4'ün ovaryumdaki işlevinin altında yatan spesifik düzenleyici mekanizmalar belirsizliğini korumaktadır. Bazı çalışmalar ATF4'ün ovaryum granüloza hücre hasarını indüklediğini ve ovaryum folikül aktivasyonunu inhibe ettiğini göstermektedir (Barilovits ve ark., 2014; Liu ve ark., 2019). Çalışmamızda ATF4 protein ifadesi DM+ İnsülin grubunda arttı. Hem linagliptin hem de linagliptin ve insülin uygulamalarından sonra bu gruptaki ATF4 protein ifadesinin TUDCA uygulanan gruplara göre daha çok düşmesi, linagliptinin tip 1 diyabetik fare ovaryumlarında ER stres koşullarını hafifletmede daha etkili olduğunu göstermektedir.

UPR dönüştürücülerinden bir diğeri olan ATF6'nın hücre canlılığının sürdürülmesinde rol oynadığı bildirilmiştir (Ambrose ve Mackenzie, 2013). Bir başka çalışmada ATF6'nın desidual hücrelerin proliferasyonu üzerinde güçlü bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Lian ve ark., 2011). Daha önce yapılan bir çalışmada, fizyolojik koşullarda fare granüloza hücrelerinde primer folikül aşamasından başlayarak, folikül gelişiminin çeşitli aşamaları boyunca ATF6 ifadesi gözlenmiştir. Büyüyen folikül aşamasına doğru ATF6 immün boyanma yoğunluğu daha güçlü hale gelmiştir (Xiong ve ark., 2017). Aynı çalışmanın *in vitro* aşamasında, ATF6'dan yoksun fare granuloza hücrelerinde gözlenen apoptotik hücre sayısı, kontrol grubuna göre önemli ölçüde düşük çıkmıştır. Ayrıca TUNEL pozitif hücre oranının ATF6 yoksun grupta kontrol grubuna göre açıkça daha düşük olduğu gösterilmiştir (Xiong ve ark., 2017). Bizim çalışmamızda ise tüm deney gruplarında her bir foliküler aşamada ATF6 ifadesi gözlendi. Özellikle tüm gruplardaki büyüyen foliküllerin oositlerindeki zona pellusida da yoğun membranöz ATF6 ifadesi olduğu belirlendi. Ayrıca, DM+Linagliptin grubundaki primordiyal foliküllerdeki ATF6 immün boyanmanın diğer gruplardakine

kıyasla azaldığı gözlemlendi. ATF6'nın linagliptin uygulaması ile birlikte foliküler atretik folikülün seçiminde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Önceki çalışmamıza benzer şekilde (Okan ve ark., 2021) western blot yöntemi ile de ATF6 protein ifadesi için gruplar arasında anlamlı bir fark bulamadık.

Aktif hale getirilmiş IRE1, TRAF2'yi göreve çağırır, bu da ASK1 ve JNK aşağı yönde aktivasyonu ile sonuçlanır (Urano ve ark., 2000). Bir yandan uzun süreli ER stresi sırasında sürdürülen JNK aktivitesi, Bcl-2 (B hücreli lenfoma 2) protein ailesinin anti-apoptotik üyelerini inhibe eder. Öte yandan, JNK, Bid (BH3 etkileşen alan ölümü agonisti) ve Bim (hücre ölümünün Bcl-2 etkileşimli aracısı) gibi yalnızca proapoptotik BH3 proteinlerini fosforile eder ve aktif hale getirir. Kombine olarak, bu olaylar Bax (Bcl-2 ilişkili X protein) ve Bak (Bcl-2 benzeri protein 7)'in oligomerizasyonuna yol açarak dış mitokondriyal zarın geçirgenleşmesine ve içsel apoptotik sürecin yürütülmesine neden olur (Kim ve ark., 2006; Dhanasekaran ve Reddy, 2008). Çalışmamızda, p-JNK1+ JNK2 immun boyanma yoğunluğu DM+ İnsülin grubunda arttı. Diğer tüm gruplarda özellikle büyüyen foliküllerde piknotik granuloza hücrelerinde ve atretik foliküllerde immun boyanma şiddetinde artma oldu. Elde ettiğimiz western blot bulgularımıza göre, total JNK1+ JNK2 bakımından gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı. Elde ettiğimiz bulgulara göre, DM+ Linagliptin+ İnsülin grubunda p-JNK1+ JNK2 band yoğunluğunun diğer tüm gruplara göre oldukça az görülmesi, bu kombine uygulamanın p-JNK1+ JNK2 yolağını baskılamada daha etkin olduğu görülmektedir.

Folikülogenez, büyüme ve atrezi, bir dizi oldukça karmaşık fizyolojik değişiklikler içerir. Granuloza hücreleri ve oosit arasındaki çapraz konuşma da foliküler gelişimin sonucunu etkileyen önemli bir faktör olarak kabul edilir (Lin ve ark., 2012a). Bununla birlikte, foliküllerin çoğu bozulma veya atrezi geçirir ve sadece çok azı başarılı bir şekilde ovulasyona ulaşır. Granuloza hücre apoptozunun foliküler atrezi için bir belirteç ve indükleyici olduğu bilinmektedir (Maruo ve ark., 1999). Çalışmamızda ER stresi ilişkili apoptotik süreçte rol oynayan kaspaz 12 ve kaspaz 3 protein ifadeleri T1DM'li fare ovaryumlarında incelenmiştir. Elde ettiğimiz bulgulara göre; kaspaz 12 immun boyama yoğunluğu bakımından gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı. Total kaspaz 12 protein ifadesi kontrol ve çözünen grupları ile karşılaştırıldığında DM+ Linagliptin+ İnsülin, DM+ TUDCA ve DM+ TUDCA+

İnsülin gruplarında anlamlı olarak artma olduğu gözlemlendi. Cleaved kaspaz 12 protein ifadesi ise DM+ İnsülin grubunda diğer tüm gruplardan yüksek olduğu belirlendi. Linagliptin uygulanan gruplarda cleaved kaspaz 12 ifadesinde azalma vardı. Bu verilere paralel olarak ER stresini azaltma kapasitesi bilinen ajanlardan biri olan TUDCA uygulanan gruplarda da benzer şekilde azalmanın olması, linagliptinin bir ER stres inhibitörü ve antidiyabetik ajan gibi hareket ettiğini ve ER stresine karşı hayatta kalım cevabını indüklediğini göstermektedir. Bununla birlikte cleaved kaspaz 3 immün boyanma yoğunluğu DM+ İnsülin grubunda arttı. Özellikle tüm gruplardaki büyüyen folikül aşamasındaki piknotik çekirdekli granuloza hücrelerinde boyanma vardı. Bu boyanma yoğunluğu DM+ İnsülin grubu ile karşılaştırıldığında linagliptin uygulanan gruplarda daha azdı. Ayrıca Linagliptin ve insülinin birlikte kullanımı apoptoza uğrayan granuloza hücre sayısını da azalttığı görüldü. Total kaspaz 3 protein ifadesi internal kontrol beta aktin ile oranlandığında, DM+ İnsülin, DM+ Linagliptin, DM+ TUDCA ve DM+ TUDCA+ İnsülin gruplarında kontrol ve çözünen gruplarına göre band şiddetinde azalma olduğu belirlendi. DM+ Linagliptin+ İnsülinde gözlenen band yoğunluğunun kontrol ve çözünen grupları ile benzer olduğu gözlemlendi. Cleaved kaspaz 3 protein ifadesi ise DM+ TUDCA+ İnsülin grubu haricinde diğer tüm gruplarda kontrol ve çözünen gruplarına kıyasla artma olduğu tespit edildi. En yüksek artış DM+ İnsülin grubunda gözlemlendi. Linagliptin uygulanan gruplarda cleaved kaspaz 3 ifadesi anlamlı olmamakla birlikte DM+ İnsülin grubuna göre daha azdı. Elde edilen bulgulara göre linagliptinin tek başına ya da insülin ile birlikte kullanımının T1DM fare ovaryumlarında apoptotik süreçte kaspaz 12 ve kaspaz 3 yollarını baskılamada benzer etkide buldukları görülmektedir.

UPR'nin önemli bir bileşenlerinden biri olan XBP1, aynı zamanda diğer birçok açıdan önemli bir nükleer transkripsiyon faktörüdür. Örneğin, XBP1 lipid metabolizmasının, glikoz metabolizmasının, obezitenin ve aterosklerozun düzenlenmesine aracılık eder (Wu ve ark., 2015). Ayrıca son on yılda, artan sayıda araştırma çalışması, ER ve dişi üreme arasındaki ilişkiye odaklanmış durumdadır (Logue ve ark., 2013; Yang ve ark., 2016). Endojen XBP1'in normal preimplantasyon embriyonik gelişimi için çok önemli olduğunu bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2012a). Önceki çalışmamızda, T1DM fare ovaryumlarında önemli ölçüde artan XBP1 seviyelerini göstermiştik (Okan ve ark., 2021). Şimdiki çalışmamızda ise, DM+ İnsülin grubunda XBP1 ifadesi artarken, Linagliptin ve TUDCA uygulanan gruplarda bu ifadede azalış gözlemlendi. Özellikle

DM+ Linagliptin+ İnsülin, DM+ TUDCA ve DM+ TUDCA+ İnsülin gruplarında gözlenen XBP1 ifadeleri kontrol ve çözgen gruplarıyla benzerlik gösterdi. IRE1 α /XBP1, ER protein şaperonlarını kodlayan genlerin ekspresyonunu ve hücre hayatta kalmasında işlev gören ERAD yollarını indükler (Schroder ve Kaufman, 2005). Linagliptin ve insülinin birlikte kullanımını diğer UPR dönüştürücülerinin de ifadelerini azalttığı gibi XBP1'in de ifadesini azalttığı görülmektedir. Western blot bulguları antikordan kaynaklı olduğunu düşündüğümüz anlamlı olmayan band görüntüleri vermesi nedeniyle tartışılmamıştır.

Grp78 ve CHOP, ER stresi altında anti- ve proapoptotik roller oynar (Li ve ark., 2014). ATF6 susturma işleminden sonra granüloza hücrelerinde *Grp78* mRNA seviyelerinin belirgin şekilde arttığı, buna karşılık, *Chop* mRNA ifadesinin ATF-6 knockdown grubunda önemli ölçüde azalma gösterdiği bildirilmiştir (Xiong ve ark., 2017). Bizim çalışmamızda ise; *Grp78* mRNA seviyeleri bakımından gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmazken, *Chop* mRNA seviyelerinde DM+ İnsülin ve DM+ TUDCA gruplarında artma oldu. DM+ Linagliptin, DM+ Linagliptin+ İnsülin ve DM+ TUDCA+ İnsülin gruplarında ise bu ifade anlamlı olarak azalma olduğu gözlemlendi. Elde edilen bulgulara göre T1DM farelerde yalnızca TUDCA uygulaması *Chop* mRNA seviyelerini değiştirmekte etkin değilken, TUDCA ve insülinin birlikte kullanımını bu ifadeyi azaltmada ve pro- apoptotik süreci inhibe etmekte daha başarılı olduğu görülmektedir. Bu verilere paralel olarak Linagliptin ve Linagliptin+ İnsülin uygulamalarından her ikisi de *Chop* mRNA seviyelerini azaltmada benzer etkiye sahip olduğu görülmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, STZ ile indüklenmiş T1DM modeli oluşturulan farelere bir DPP-4 inhibitörü olan linagliptinin insülin ile birlikte uygulanmasının sonucunda fare ovaryan folikül rezervine olan etkileri sağlıklı folikül sayımı yöntemi ile değerlendirildi. Ayrıca, ER stresi ilişkili yanıtta rol oynayan dönüştürücülerin fare ovaryumlarındaki ekspresyon düzeyleri immunohistokimya, western blot ve qRT-PCR yöntemleri ile araştırılmış ve elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- 1) Linagliptin ve insülin kombine uygulamasının T1DM fare ovaryumlarında ER stresine karşı homeostazı sağlayıcı yönde etkilediğini gösteren literatürdeki ilk çalışmadır.
- 2) Linagliptin insülin kombine tedavisinin ovaryumlardaki oksidatif stres seviyelerini azaltmada ve kan şekerini düşürmede daha başarılı olduğu ortaya konulmuştur.
- 3) DM+ Linagliptin+ İnsülin grubunda atretik folikül sayısında ve cleaved kaspaz 12, cleaved kaspaz 3, XBP1, ATF4 ve p- JNK1+ JNK2 gibi şiddetli ER stresi sırasında apoptotik süreçte yer alan proteinlerin ifadelerinde azalma olduğu gösterilmiştir.
- 4) Linagliptin ve insülinin birlikte kullanımının *Chop* mRNA seviyelerini azaltmada ve pro-apoptotik süreci inhibe etmede daha başarılı olduğu gösterilmiştir.

Sonuç olarak çalışmamızın, T1DM hastalığını dişi farelerde modelleyerek tedavide uygulanan insüline ek olarak bir DPP-4 inhibitörü olan linagliptinin eklenmesi ile diyabet ile indüklenen ER stresi ile ilişkili ovaryan patolojilerin tedavisinde kullanılabilecek yeni yaklaşımlara ışık tutacağına inanmaktayız.

KAYNAKLAR

Abraham T, Pin CL, Watson AJ. Embryo collection induces transient activation of XBP1 arm of the ER stress response while embryo vitrification does not. *Mol Hum Reprod.* 2012;18:229-242.

Ambrose RL, Mackenzie JM. ATF6 signaling is required for efficient West Nile virus replication by promoting cell survival and inhibition of innate immune responses. *J Virol.* 2013;87:2206-2214.

Araki E, Oyadomari S, Mori M.. Endoplasmic reticulum stress and diabetes mellitus. *Intern Med.* 2003;42:7-14.

Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet.* 2001;358:221-229.

Back SH, Kang SW, Han J, Chung HT. Endoplasmic reticulum stress in the beta-cell pathogenesis of type 2 diabetes. *Exp Diabetes Res.* 2012;2012:618396.

Back SH, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes. *Annu Rev Biochem.* 2012;81:767-793.

Barilovits SJ, Newsom KJ, Bickford JS, Beachy DE, Rhoton-Vlasak A, Nick HS. Characterization of a mechanism to inhibit ovarian follicle activation. *Fertil Steril.* 2014;101:1450-1457.

Basha B, Samuel SM, Triggler CR, Ding H. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: possible involvement of endoplasmic reticulum stress? *Exp Diabetes Res* 2012;2012:481840.

Broekmans FJ, Knauff EA, te Velde ER, Macklon NS, Fauser BC. Female reproductive ageing: current knowledge and future trends. *Trends Endocrinol Metab.* 2007;18:58-65.

Cao SS, Kaufman RJ. Unfolded protein response. *Curr Biol.* 2012;22:R622-626.

Cao SS, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in cell fate decision and human disease. *Antioxid Redox Signal.* 2014;21:396-413.

- Chai L, Ling K, He X, Yang R. Expression of ATF4 and VEGF in chorionic villus tissue in early spontaneous abortion. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2013; 170:434-438.
- Chang AS, Dale AN, Moley KH. Maternal diabetes adversely affects preovulatory oocyte maturation, development, and granulosa cell apoptosis. *Endocrinology.* 2005;146:2445-2453.
- Cheang WS, Wong WT, Zhao L, Xu J, Wang L, Lau CW, Chen ZY, Ma RC, Xu A, Wang N, Tian XY, Huang Y. PPARdelta Is Required for Exercise to Attenuate Endoplasmic Reticulum Stress and Endothelial Dysfunction in Diabetic Mice. *Diabetes.* 2017;66:519-528.
- Chen L, Klein T, Leung PS. Effects of combining linagliptin treatment with BI-38335, a novel SGLT2 inhibitor, on pancreatic islet function and inflammation in db/db mice. *Curr Mol Med.* 2012a;12:995-1004.
- Chen Y, Wang JJ, Li J, Hosoya KI, Ratan R, Townes T, Zhang SX. Activating transcription factor 4 mediates hyperglycaemia-induced endothelial inflammation and retinal vascular leakage through activation of STAT3 in a mouse model of type 1 diabetes. *Diabetologia,* 2012b;55:2533-2545.
- Codner E, Escobar-Morreale HF. Clinical review: Hyperandrogenism and polycystic ovary syndrome in women with type 1 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:1209-1216.
- Codner E, Iniguez G, Hernandez IM, Lopez P, Rhumie HK, Villarroel C, Rey RA. Elevated anti-Mullerian hormone (AMH) and inhibin B levels in prepubertal girls with type 1 diabetes mellitus. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2011;74:73-78.
- Codner E, Iniguez G, Lopez P, Mujica V, Eyzaguirre FC, Asenjo S, Torrealba I, Cassorla F. Metformin for the treatment of hyperandrogenism in adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Horm Res Paediatr.* 2013;80:343-349.
- Codner E, Merino PM, Tena-Sempere M. Female reproduction and type 1 diabetes: from mechanisms to clinical findings. *Hum Reprod Update.* 2012;18:568-585.
- Colton SA, Pieper GM, Downs SM. Altered meiotic regulation in oocytes from diabetic mice. *Biol Reprod.* 2002;67:220-231.

Cui Y, Ma Z, Zhao H, Chen X, Zhang Y, Guo H, Zhao Y, Chen ZJ. Activation of eIF2alpha signaling cascade is associated with testosterone-induced cell apoptosis in INS-1 cells. *Horm Metab Res.* 2014;46:574-580.

Deacon CF. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in the treatment of type 2 diabetes: a comparative review. *Diabetes Obes Metab.* 2011;13:7-18.

Deacon CF, Holst JJ. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes: comparison, efficacy and safety. *Expert Opin Pharmacother.* 2013;14:2047-2058.

Dhanasekaran DN, Reddy EP. JNK signaling in apoptosis. *Oncogene.* 2008;27:6245-6251.

Dorman JS, Steenkiste AR, Foley TP, Strotmeyer ES, Burke JP, Kuller LH, Kwoh CK, Familial A, Diabetes S. Menopause in type 1 diabetic women: is it premature? *Diabetes.* 2001;50:1857-1862.

Drucker DJ. Dipeptidyl peptidase-4 inhibition and the treatment of type 2 diabetes: preclinical biology and mechanisms of action. *Diabetes Care.* 2007;30:1335-1343.

Drucker DJ, Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet.* 2006;368:1696-1705.

Dufrane D, van Steenberghe M, Guiot Y, Goebbels RM, Saliez A, Gianello P. Streptozotocin-induced diabetes in large animals (pigs/primates): role of GLUT2 transporter and beta-cell plasticity. *Transplantation.* 2006;81:36-45.

Eizirik DL, Cardozo AK, Cnop M. The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocr Rev.* 2008;29:42-61.

Eroschenko VP. diFiore's Atlas of Histology. Çeviren: Demir R. diFIORE'nin Histoloji Atlası Fonksiyonel İlişkileriyle. 12. basım, Palme Yayıncılık, Ankara; 2013, s: 505-531.

Escobar-Morreale HF, Roldan B, Barrio R, Alonso M, Sancho J, de la Calle H, Garcia-Robles R. High prevalence of the polycystic ovary syndrome and hirsutism in women with type 1 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:4182-4187.

Escobar-Morreale HF, Roldan-Martin MB. Type 1 Diabetes and Polycystic Ovary Syndrome: Systematic Review and Meta-analysis. *Diabetes Care*. 2016; 39:639-648.

Fan HY, Liu Z, Johnson PF, Richards JS. CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP)-alpha and -beta are essential for ovulation, luteinization, and the expression of key target genes. *Mol Endocrinol*. 2011;25:253-268.

Frandsen CS, Dejgaard TF, Madsbad S. Non-insulin drugs to treat hyperglycaemia in type 1 diabetes mellitus. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2016;4:766-780.

Gao Q, Goodman JM. The lipid droplet-a well-connected organelle. *Front Cell Dev Biol*. 2015;3:49.

Gartner LP, Hiatt JL. Female Reproductive System. In: Ozols I, Mahon J, eds. *Color Textbook of Histology*, 3rd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007, p: 463-474.

Ghoul JE, Smiri M, Ghrab S, Boughattas NA, Ben-Attia M. Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antioxidant activities of traditional aqueous extract of *Zygophyllum album* in streptozotocin diabetic mice. *Pathophysiology*. 2012;19:35-42.

Greenbaum CJ, Prigeon RL, D'Alessio DA. Impaired beta-cell function, incretin effect, and glucagon suppression in patients with type 1 diabetes who have normal fasting glucose. *Diabetes*. 2002;51:951-957.

Guo H, Fang C, Huang Y, Pei Y, Chen L, Hu J. The efficacy and safety of DPP4 inhibitors in patients with type 1 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract*. 2016;121:184-191.

Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Derijard B, Davis RJ. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J*. 1996;15:2760-2770.

Guzeloglu-Kayisli O, Lalioti MD, Aydiner F, Sasson I, Ilbay O, Sakkas D, Lowther KM, Mehlmann LM, Seli E. Embryonic poly(A)-binding protein (EPAB) is required for oocyte maturation and female fertility in mice. *Biochem J*. 2012;446:47-58.

Han J, Back SH, Hur J, Lin YH, Gildersleeve R, Shan J, Yuan CL, Krokowski D, Wang S, Hatzoglou M, Kilberg MS, Sartor MA, Kaufman RJ. ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nat Cell Biol*. 2013;15:481-490.

Hansen KR, Knowlton NS, Thyer AC, Charleston JS, Soules MR, Klein NA. A new model of reproductive aging: the decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause. *Hum Reprod.* 2008;23:699-708.

Harada M, Nose E, Takahashi N, Hirota Y, Hirata T, Yoshino O, Koga K, Fujii T, Osuga Y. Evidence of the activation of unfolded protein response in granulosa and cumulus cells during follicular growth and maturation. *Gynecol Endocrinol.* 2015;31:783-787.

Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell.* 2000;5:897-904.

Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calton M, Sadri N, Yun C, Popko B, Paules R, Stojdl DF, Bell JC, Hettmann T, Leiden JM, Ron D. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell.* 2003;11:619-633.

Hasnain SZ, Prins JB, McGuckin MA. Oxidative and endoplasmic reticulum stress in beta-cell dysfunction in diabetes. *J Mol Endocrinol.* 2016;56:R33-54.

Heath-Engel HM, Chang NC, Shore GC. The endoplasmic reticulum in apoptosis and autophagy: role of the BCL-2 protein family. *Oncogene.* 2008;27:6419-6433.

Hetz C, Papa FR. The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. *Mol Cell.* 2018;69:169-181.

Hu JL, Hu XL, Guo AY, Wang CJ, Wen YY, Cang SD. Endoplasmic reticulum stress promotes autophagy and apoptosis and reverses chemoresistance in human ovarian cancer cells. *Oncotarget.* 2017;8:49380-49394.

Hu R, Chen ZF, Yan J, Li QF, Huang Y, Xu H, Zhang XP, Jiang H. Endoplasmic Reticulum Stress of Neutrophils Is Required for Ischemia/Reperfusion-Induced Acute Lung Injury. *J Immunol.* 2015;195:4802-4809.

Huang N, Yu Y, Qiao J. Dual role for the unfolded protein response in the ovary: adaptation and apoptosis. *Protein Cell.* 2017;8:14-24.

Ibanez L, Valls C, Marcos MV, Ong K, Dunger DB, De Zegher F. Insulin sensitization for girls with precocious pubarche and with risk for polycystic ovary syndrome: effects

of prepubertal initiation and postpubertal discontinuation of metformin treatment. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:4331-4337.

Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, Diamant M, Ferrannini E, Nauck M, Peters AL, Tsapas A, Wender R, Matthews DR. Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes, 2015: a patient-centred approach. Update to a position statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetologia.* 2015;58:429-442.

Jensterle M, Goricar K, Janez A. Add on DPP-4 inhibitor alogliptin alone or in combination with pioglitazone improved beta-cell function and insulin sensitivity in metformin treated PCOS. *Endocr Res.* 2017;42:261-268.

Kabel AM, Al-Shehri AH, Al-Talhi RA, Abd Elmaaboud MA. The promising effect of linagliptin and/or indole-3-carbinol on experimentally-induced polycystic ovarian syndrome. *Chem Biol Interact.* 2017;273:190-199.

Kanasaki K. The role of renal dipeptidyl peptidase-4 in kidney disease: renal effects of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors with a focus on linagliptin. *Clin Sci (Lond).* 2018;132:489-507.

Karagiannis T, Paschos P, Paletas K, Matthews DR, Tsapas A. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for treatment of type 2 diabetes mellitus in the clinical setting: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2012;344:e1369.

Kaufman RJ. Regulation of mRNA translation by protein folding in the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci.* 2004;29:152-158.

Kaufman RJ, Scheuner D, Schroder M, Shen X, Lee K, Liu CY, Arnold SM. The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002; 3:411-421.

K Kierszenbaum AL. *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology.* Çeviren: Demir R. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş.* 10.basım, Palme Yayıncılık, Ankara; 2006, s: 566-578.

Kim C, Karvonen-Gutierrez C, Kong S, Arends V, Steffes M, McConnell DS, Randolph JF, Jr., Harlow SD. Antimüllerian hormone among women with and without type 1 diabetes: the Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Study

and the Michigan Bone Health and Metabolism Study. *Fertil Steril*. 2016;106:1446-1452.

Kim R, Emi M, Tanabe K, Murakami S. Role of the unfolded protein response in cell death. *Apoptosis*. 2006;11:5-13.

Kimball SR. Eukaryotic initiation factor eIF2. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999;31:25-29.

Kjaer K, Hagen C, Sando SH, Eshoj O. Epidemiology of menarche and menstrual disturbances in an unselected group of women with insulin-dependent diabetes mellitus compared to controls. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992;75:524-529.

Klemann C, Wagner L, Stephan M, von Horsten S. Cut to the chase: a review of CD26/dipeptidyl peptidase-4's (DPP4) entanglement in the immune system. *Clin Exp Immunol*. 2016;185:1-21.

Koibuchi N, Hasegawa Y, Katayama T, Toyama K, Uekawa K, Sueta D, Kusaka H, Ma M, Nakagawa T, Lin B, Kim-Mitsuyama S. DPP-4 inhibitor linagliptin ameliorates cardiovascular injury in salt-sensitive hypertensive rats independently of blood glucose and blood pressure. *Cardiovasc Diabetol*. 2014;13:157.

Krebs J, Agellon LB, Michalak M. Ca(2+) homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: An integrated view of calcium signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;460:114-121.

Kroller-Schon S, Knorr M, Hausding M, Oelze M, Schuff A, Schell R, Sudowe S, Scholz A, Daub S, Karbach S, Kossmann S, Gori T, Wenzel P, Schulz E, Grabbe S, Klein T, Munzel T, Daiber A. Glucose-independent improvement of vascular dysfunction in experimental sepsis by dipeptidyl-peptidase 4 inhibition. *Cardiovasc Res*. 2012; 96:140-149.

Kuan CY, Yang DD, Samanta Roy DR, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA. The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron*. 1999;22:667-676.

Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature*. 1994;369:156-160.

Lambeir AM, Durinx C, Scharpe S, De Meester I. Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2003;40:209-294.

Lee AS. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods*. 2005;35:373-381.

Lee J, Ozcan U. Unfolded protein response signaling and metabolic diseases. *J Biol Chem*. 2014;289:1203-1211.

Li H, Zhu X, Fang F, Jiang D, Tang L. 2014;575:68-73.

Li W, Yao M, Wang R, Shi Y, Hou L, Hou Z, Lian K, Zhang N, Wang Y, Li W, Wang W, Jiang L. Profile of cardiac lipid metabolism in STZ-induced diabetic mice. *Lipids Health Dis*. 2018;17:231.

Lian IA, Loset M, Mundal SB, Fenstad MH, Johnson MP, Eide IP, Bjorge L, Freed KA, Moses EK, Austgulen R. Increased endoplasmic reticulum stress in decidual tissue from pregnancies complicated by fetal growth restriction with and without pre-eclampsia. *Placenta*. 2011;32:823-829.

Lin JY, Pitman-Crawford JL, Bibby AH, Hudson NL, McIntosh CJ, Juengel JL, McNatty KP. Effects of species differences on oocyte regulation of granulosa cell function. *Reproduction*. 2012a;144:557-567.

Lin P, Yang Y, Li X, Chen F, Cui C, Hu L, Li Q, Liu W, Jin Y. Endoplasmic reticulum stress is involved in granulosa cell apoptosis during follicular atresia in goat ovaries. *Mol Reprod Dev*. 2012;79:423-432.

Lin T, Lee JE, Kang JW, Shin HY, Lee JB, Jin DI. Endoplasmic Reticulum (ER) Stress and Unfolded Protein Response (UPR) in Mammalian Oocyte Maturation and Preimplantation Embryo Development. *Int J Mol Sci*. 2019;20.

Liu J, Luo LF, Wang DL, Wang WX, Zhu JL, Li YC, Chen NZ, Huang HL, Zhang WC. Cadmium induces ovarian granulosa cell damage by activating PERK-eIF2alpha-ATF4 through endoplasmic reticulum stress. *Biol Reprod*. 2019;100:292-299.

Livingstone R, Boyle JG, Petrie JR, Team RS. A new perspective on metformin therapy in type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2017;60:1594-1600.

- Logue SE, Cleary P, Saveljeva S, Samali A. New directions in ER stress-induced cell death. *Apoptosis*. 2013;18:537-546.
- Madsbad S, Krarup T, Deacon CF, Holst JJ. Glucagon-like peptide receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in the treatment of diabetes: a review of clinical trials. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2008;11:491-499.
- Mamady H, Storey KB. Coping with the stress: expression of ATF4, ATF6, and downstream targets in organs of hibernating ground squirrels. *Arch Biochem Biophys*. 2008;477:77-85.
- Marathe CS, Rayner CK, Jones KL, Horowitz M. Glucagon-like peptides 1 and 2 in health and disease: a review. *Peptides*. 2013;44:75-86.
- Maruo T, Laoag-Fernandez JB, Takekida S, Peng X, Deguchi J, Samoto T, Kondo H, Matsuo H. Regulation of granulosa cell proliferation and apoptosis during follicular development. *Gynecol Endocrinol*. 1999;13:410-419.
- Maurel M, Chevet E, Tavernier J, Gerlo S. Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation. *Trends Biochem Sci*. 2014;39:245-254.
- McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev*. 2000;21:200-214.
- McNatty KP, Fidler AE, Juengel JL, Quirke LD, Smith PR, Heath DA, Lundy T, O'Connell A, Tisdall DJ. Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function. *Mol Cell Endocrinol*. 2000;163:11-20.
- Monniaux D, Clement F, Dalbies-Tran R, Estienne A, Fabre S, Mansanet C, Monget P. The ovarian reserve of primordial follicles and the dynamic reserve of antral growing follicles: what is the link? *Biol Reprod*. 2014;90:85.
- Monniaux D, Huet C, Besnard N, Clement F, Bosc M, Pisselet C, Monget P, Mariana JC. Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. *J Reprod Fertil Suppl*. 1997;51:3-23.
- Monniaux D, Michel P, Postel M, Clement F. Multi-scale modelling of ovarian follicular development: From follicular morphogenesis to selection for ovulation. *Biol Cell*. 2016;108:149-160.

Mooradian AD, Haas MJ. Glucose-induced endoplasmic reticulum stress is independent of oxidative stress: A mechanistic explanation for the failure of antioxidant therapy in diabetes. *Free Radic Biol Med.* 2011;50:1140-1143.

Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem.* 2002;277:34287-34294.

Nakagawa T, Yuan J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol.* 2000;150:887-894.

Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature.* 2000;403:98-103.

Nandi A, Poretsky L. Diabetes and the female reproductive system. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2013;42:915-946.

Oakes SA, Papa FR. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. *Annu Rev Pathol.* 2015;10:173-194.

Okan A, Demir N, Sozen B. Unfolded protein response triggers differential apoptotic mechanisms in ovaries and early embryos exposed to maternal type 1 diabetes. *Sci Rep.* 2021;11:12759.

Osawa S, Kawamori D, Katakami N, Takahara M, Sakamoto F, Katsura T, Yasuda T, Kaneto H, Matsuhisa M, Matsuoka TA, Shimomura I. Significant elevation of serum dipeptidyl peptidase-4 activity in young-adult type 1 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2016;113:135-142.

Osowski CM, Urano F. Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. *Methods Enzymol.* 2011;490:71-92.

Ozcan L, Tabas I. Role of endoplasmic reticulum stress in metabolic disease and other disorders. *Annu Rev Med.* 2012;63:317-328.

Park HJ, Park SJ, Koo DB, Kong IK, Kim MK, Kim JM, Choi MS, Park YH, Kim SU, Chang KT, Park CK, Chae JI, Lee DS. Unfolding protein response signaling is involved in development, maintenance, and regression of the corpus luteum during the bovine estrous cycle. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;441:344-350.

Park HJ, Park SJ, Koo DB, Lee SR, Kong IK, Ryoo JW, Park YI, Chang KT, Lee DS. Progesterone production is affected by unfolded protein response (UPR) signaling during the luteal phase in mice. *Life Sci.* 2014;113:60-67.

Park SW, Ozcan U. Potential for therapeutic manipulation of the UPR in disease. *Semin Immunopathol.* 2013;35:351-373.

Poretsky L, Smith D, Seibel M, Pazianos A, Moses AC, Flier JS. Specific insulin binding sites in human ovary. *J Clin Endocrinol Metab.* 1984;59:809-811.

Porter KR, Claude A, Fullam EF. A Study of Tissue Culture Cells by Electron Microscopy : Methods and Preliminary Observations. *J Exp Med.* 1945;81:233-246.

Porter KR, Kallman FL. Significance of cell particulates as seen by electron microscopy. *Ann N Y Acad Sci.* 1952;54:882-891.

Pospisilik JA, Ehses JA, Doty T, McIntosh CH, Demuth HU, Pederson RA. Dipeptidyl peptidase IV inhibition in animal models of diabetes. *Adv Exp Med Biol.* 2003a;524:281-291.

Pospisilik JA, Martin J, Doty T, Ehses JA, Pamir N, Lynn FC, Piteau S, Demuth HU, McIntosh CH, Pederson RA. Dipeptidyl peptidase IV inhibitor treatment stimulates beta-cell survival and islet neogenesis in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes.* 2003b;52:741-750.

Pozzilli P, Maddaloni E, Buzzetti R. Combination immunotherapies for type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.* 2015;11:289-297.

Rana T, Shinde VM, Starr CR, Kruglov AA, Boitet ER, Kotla P, Zolotukhin S, Gross AK, Gorbatyuk MS. An activated unfolded protein response promotes retinal degeneration and triggers an inflammatory response in the mouse retina. *Cell Death Dis.* 2014;5:e1578.

Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, del Rio G, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J Biol Chem.* 2001;276:33869-33874.

Reddy P, Zheng W, Liu K. Mechanisms maintaining the dormancy and survival of mammalian primordial follicles. *Trends Endocrinol Metab.* 2010;21:96-103.

Ross MH, Pawlina W. Histology : A Text and Atlas, with Correlated Cell and Molecular. Çeviren: Baykal B. Histoloji Konu Anlatımı Ve Atlas İlişkili Hücre Biyolojisi ve Moleküler Biyoloji ile. 6. basım, Palme Yayıncılık, Ankara; 2013, s: 830-870.

Salheen SM, Panchapakesan U, Pollock CA, Woodman OL. The Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor Linagliptin Preserves Endothelial Function in Mesenteric Arteries from Type 1 Diabetic Rats without Decreasing Plasma Glucose. PLoS One. 2015a; 10:e0143941.

Salheen SM, Panchapakesan U, Pollock CA, Woodman OL. The DPP-4 inhibitor linagliptin and the GLP-1 receptor agonist exendin-4 improve endothelium-dependent relaxation of rat mesenteric arteries in the presence of high glucose. Pharmacol Res. 2015b;94:26-33.

Scaramuzzi RJ, Baird DT, Campbell BK, Driancourt MA, Dupont J, Fortune JE, Gilchrist RB, Martin GB, McNatty KP, McNeilly AS, Monget P, Monniaux D, Vinales C, Webb R. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. Reprod Fertil Dev. 2011;23:444-467.

Schroder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. Annu Rev Biochem 2005;74:739-789.

Scriven P, Coulson S, Haines R, Balasubramanian S, Cross S, Wyld L. Activation and clinical significance of the unfolded protein response in breast cancer. Br J Cancer. 2009;101:1692-1698.

Shen X, Zhang K, Kaufman RJ. The unfolded protein response--a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. J Chem Neuroanat. 2004;28:79-92.

Shin JW, Jurisic G, Detmar M. Lymphatic-specific expression of dipeptidyl peptidase IV and its dual role in lymphatic endothelial function. Exp Cell Res. 2008;314:3048-3056.

Shishko PI, Kovalev PA, Goncharov VG, Zajarny IU. Comparison of peripheral and portal (via the umbilical vein) routes of insulin infusion in IDDM patients. Diabetes. 1992;41:1042-1049.

Sjoberg L, Pitkaniemi J, Haapala L, Kaaja R, Tuomilehto J. Fertility in people with childhood-onset type 1 diabetes. Diabetologia. 2013;56:78-81.

Spencer TE. 2014. Biological roles of uterine glands in pregnancy. *Semin Reprod Med* 32:346-357.

Szegezdi E, Fitzgerald U, Samali A. Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;1010:186-194.

Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep.* 2006;7:880-885.

Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res.* 2001;50:537-546.

Takahashi N, Harada M, Hirota Y, Nose E, Azhary JM, Koike H, Kunitomi C, Yoshino O, Izumi G, Hirata T, Koga K, Wada-Hiraike O, Chang RJ, Shimasaki S, Fujii T, Osuga Y.. Activation of Endoplasmic Reticulum Stress in Granulosa Cells from Patients with Polycystic Ovary Syndrome Contributes to Ovarian Fibrosis. *Sci Rep.* 2017;7:10824.

Takahashi N, Harada M, Hirota Y, Zhao L, Yoshino O, Urata Y, Izumi G, Takamura M, Hirata T, Koga K, Wada-Hiraike O, Fujii T, Osuga Y. A potential role of endoplasmic reticulum stress in development of ovarian hyperstimulation syndrome. *Mol Cell Endocrinol.* 2016;428:161-169.

Tesch GH, Allen TJ. Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Nephrology (Carlton).* 2007;12:261-266.

Thong EP, Codner E, Laven JSE, Teede H. Diabetes: a metabolic and reproductive disorder in women. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2020;8:134-149.

Tian L, Gao J, Hao J, Zhang Y, Yi H, O'Brien TD, Sorenson R, Luo J, Guo Z. 2010. Reversal of new-onset diabetes through modulating inflammation and stimulating beta-cell replication in nonobese diabetic mice by a dipeptidyl peptidase IV inhibitor. *Endocrinology* 151:3049-3060.

Tingen CM, Bristol-Gould SK, Kiesewetter SE, Wellington JT, Shea L, Woodruff TK. Prepubertal primordial follicle loss in mice is not due to classical apoptotic pathways. *Biol Reprod.* 2009;81:16-25.

Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, Ron D. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science.* 2000;287:664-666.

Vallejo M, Ron D, Miller CP, Habener JF. C/ATF, a member of the activating transcription factor family of DNA-binding proteins, dimerizes with CAAT/enhancer-binding proteins and directs their binding to cAMP response elements. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:4679-4683.

Vettorazzi JF, Kurauti MA, Soares GM, Borck PC, Ferreira SM, Branco RCS, Michelone LSL, Boschero AC, Junior JMC, Carneiro EM. Bile acid TUDCA improves insulin clearance by increasing the expression of insulin-degrading enzyme in the liver of obese mice. *Sci Rep*. 2017;7:14876.

Vue Z, Mullen RD, Yen S, Ontiveros AE, Stewart AC, Behringer RR. Female Reproductive Tract. In: Reference Module in Biomedical Sciences Encyclopedia of Reproduction. 2nd ed., p 261-268.

Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, 2011;334:1081-1086.

Wang M, Kaufman RJ. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature*. 2016;529:326-335.

Wassarman PM, Albertini DF. The mammalian ovum In: Knobil E, Neill JD, eds. *The Physiology of Reproduction*. Raven Press; 1994, p 79–122.

Wischnitzer S. The nuclear envelope: its ultrastructure and functional significance. *Endeavour*. 1974;33:137-142.

Wortel IMN, van der Meer LT, Kilberg MS, van Leeuwen FN. Surviving Stress: Modulation of ATF4-Mediated Stress Responses in Normal and Malignant Cells. *Trends Endocrinol Metab*. 2017;28:794-806.

Wu KK, Huan Y. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Curr Protoc Pharmacol*. 2008;Chapter 5:Unit 5 47.

Wu R, Zhang QH, Lu YJ, Ren K, Yi GH. Involvement of the IRE1 α -XBP1 pathway and XBP1s-dependent transcriptional reprogramming in metabolic diseases. *DNA Cell Biol*. 2015;34:6-18.

Xiong Y, Chen H, Lin P, Wang A, Wang L, Jin Y. ATF6 knockdown decreases apoptosis, arrests the S phase of the cell cycle, and increases steroid hormone production in mouse granulosa cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2017;312:C341-C353.

Yang DD, Kuan CY, Whitmarsh AJ, Rincon M, Zheng TS, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA. Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature*. 1997;389:865-870.

Yang Y, Pei X, Jin Y, Wang Y, Zhang C. The roles of endoplasmic reticulum stress response in female mammalian reproduction. *Cell Tissue Res*. 2016;363:589-597.

Yayla M, Cetin D, Adali Y, Kilicle PA, Toktay E. Potential therapeutic effect of pomegranate seed oil on ovarian ischemia/reperfusion injury in rats. *Iran J Basic Med Sci*. 2018;21:1262-1268.

Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Dave UP, Prywes R, Brown MS, Goldstein JL. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell*. 2000;6:1355-1364.

Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, Yui D, Gomi F, Katayama T, Tohyama M. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J Biol Chem*. 2001;276:13935-13940.

Yoshida H, Okada T, Haze K, Yanagi H, Yura T, Negishi M, Mori K. Endoplasmic reticulum stress-induced formation of transcription factor complex ERSF including NF-Y (CBF) and activating transcription factors 6alpha and 6beta that activates the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol*. 2001;21:1239-1248.

Zhang JY, Diao YF, Kim HR, Jin DI. Inhibition of endoplasmic reticulum stress improves mouse embryo development. *PLoS One*, 2012a;7:e40433.

Zhang JY, Diao YF, Oqani RK, Han RX, Jin DI. Effect of endoplasmic reticulum stress on porcine oocyte maturation and parthenogenetic embryonic development in vitro. *Biol Reprod*. 2012b;86:128.

Zhang Y, Fava GE, Wu M, Htun W, Klein T, Fonseca VA, Wu H. Effects of Linagliptin on Pancreatic alpha Cells of Type 1 Diabetic Mice. *J Endocr Soc*. 2017;1:1224-1234.

Zhao S, Chan LK, Chen L, Cheng TW, Klein T, Leung PS. Combination of Telmisartan and Linagliptin Preserves Pancreatic Islet Cell Function and Morphology in db/db Mice. *Pancreas*. 2016;45:584-592.

Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, Stevens JL, Ron D. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 1998;12:982-995.