

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

STEVİOSİDE'NİN DİYABETİK SIÇAN
PLASENTASINDA GLUKOZ TAŞINIMINDA ROL
ALAN GLUT1, GLUT3 VE GLUT4 EKSPRESYONLARI
ÜZERİNE ETKİSİ

Ertan KATIRCI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2017
ANTALYA

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

STEVİOSİDE'NİN DİYABETİK SIÇAN
PLASENTASINDA GLUKOZ TAŞINIMINDA ROL
ALAN GLUT1, GLUT3 VE GLUT4 EKSPRESYONLARI
ÜZERİNE ETKİSİ

Ertan KATIRCI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Emin Türkay KORGUN

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2015-873 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2017-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Histoloji ve Embriyoloji Programında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 04/01/2017

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Emin Türkay KORGUN
Akdeniz Üniversitesi

Üye :Prof. Dr. Çiler Çelik ÖZENCİ
Akdeniz Üniversitesi

Üye :Prof. Dr. Gökhan AKOYUNLU
Akdeniz Üniversitesi

Üye :Doç. Dr. Gamze TANRIÖVER
Akdeniz Üniversitesi

Üye :Prof. Dr. Güven ERBİL
Dokuz Eylül Üniversitesi

İmza



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

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Narin DERİN

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.

Ertan KATIRCI

İmza

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Emin Türkay KORGUN

İmza

TEŐEKKÜR

Akademik kariyerimin ilk basamağı olan yüksek lisans eğitimim süresince her konuda destek olup yol göstericiliği ile yanımda olan ve tez projemin gerçekleştirilmesinde önemli katkıları olan danışman hocam Prof. Dr. Emin Türkay KORGUN'a

Tez projemi gerçekleştirirken bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım 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 tüm değerli çalışanlarına;

Son olarak, eğitim hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteğini esirgemeyen ve her zaman yanımda olup beni destekleyen babama, kardeşime ve Ceren AYGÜN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: Plasentanın temel görevlerinden biri de materno-fetal besin taşınımını sağlamaktır. Embriyo gelişimi için birincil enerji kaynağı glukoz olup plasentada mevcut olan glukoz taşıyıcı (GLUT) proteinler aracılığıyla anneden fetüse taşınmaktadır. Stevia bitkisi uzun zamandır doğal tatlandırıcı ve tıbbi amaçlı olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı; Stevioside'nin normal ve diyabetik hayvanlarda, kan glukoz ve serum insülin düzeyine etkisini belirlemektir. Ayrıca, Stevioside'nin, normal ve diyabetik sıçan plasentasında glukoz taşınımında rol alan GLUT1, GLUT3 ve GLUT4 proteinlerine etkilerini belirlemektir.

Yöntem: Erkek ve dişi sıçanlar kafeste bir gece bırakıldıktan sonra dişi deneklere vajinal simir yapıldı. Simirlerinde sperm gözlenen dişi sıçanların gebeliğin sıfırıncı gününde olduğu kabul edildi. Kontrol, stevioside, diyabet ve diyabet + stevioside grupları oluşturuldu. Elisa yöntemi ile kandaki insülin miktarı belirlendi. Plasentada GLUT1, GLUT3 ve GLUT4 proteinlerinin ifadeleri immunohistokimya ile bu proteinlerin miktarları ise western blot yöntemi ile tespit edildi.

Bulgular: GLUT1 proteini, gebeliğin 15. gününde diğer gruplar ile karşılaştırıldığında diyabet + stevioside grubunda istatistiksel olarak ($p<0,05$) anlamlı oranda azaldı. 20. gününde ise diyabet grubunda diğer gruplara göre ($p<0,05$) anlamlı oranda arttı. GLUT3 proteini gebeliğin 15. gününde stevioside grubunda artış gösterirken diğer gruplar arasında bir fark yoktu. 20. günde ise diyabet grubu, stevioside ve diyabet + stevioside grubuna göre artarken kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bir fark yoktu. GLUT4 proteinin gebeliğin 15. gününde diyabet grubunda kontrol ve stevioside gruplarına göre anlamlı oranda artarken diyabet + stevioside grubuna göre fark yoktu. 20. günde GLUT4 proteini için gruplar arasında bir fark mevcut değildi. Elisa bulgularına göre insülin miktarı gebeliğin 15. ve 20. gününde diğer gruplar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı oranda azaldığı belirlendi ($p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,005$).

Sonuç: Sıçan plasentalarındaki GLUT proteinlerinin ekspresyonundaki değişimler fetüsü korumaya yönelik bir mekanizma olabilir ve Stevioside'nin plasentaya etkisi sınırlı olabilir.

Anahtar Kelimeler: GLUT1, GLUT3, GLUT4, Diyabet , Stevioside, Plaseenta

ABSTRACT

Objective: One of important roles of the placenta is to provide maternal-fetal nutrient transport. The primary source of energy for embryo development is glucose and maternal-fetal glucose transport occurs through glucose transporters (GLUTs) which are present in placenta. Stevia plant has been used as natural sweetener and medicinal for a long time. The purpose of this study is to determine the effects of stevioside on blood glucose and insulin levels in normal and diabetic animals. Moreover, we aimed to determine the effects of stevioside on GLUT1, GLUT3 and GLUT4 proteins which have important roles for glucose transport.

Method: After mating, the presence of the sperm in the vaginal smear the following morning was designated as day 0 of pregnancy. Control, stevioside, diabetes and diabetes + stevioside groups were formed. Amount of insulin was determined by Elisa method. Expressions of GLUT1, GLUT3 and GLUT4 proteins in the placenta were evaluated by western blot and immunohistochemistry.

Results: GLUT1 protein significantly decreased in the diabetes + stevioside group compared to other groups on the 15th day of gestation according to the results of western blotting and immunohistochemistry ($p < 0,05$). On the 20th day of gestation, GLUT1 protein increased ($P < 0,05$) significantly in diabetic group compared to other groups. There was no difference between other groups while GLUT3 protein was increasing in stevioside group on the 15th day of gestation. At 20 days, there was no difference compared to control group while diabetic group was increasing compared to stevioside and diabetes + stevioside. On the 15th day of gestation, GLUT4 protein significantly increased in the diabetic group compared to the control and stevioside groups, but not in the diabetes + stevioside group. There was no difference between all groups for GLUT 4 protein at 20 days. According to the findings of Elisa, the amount of insulin decreased in the statistically significant range in other groups compared to control group on the 15th and 20th day of gestation, respectively ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,005$).

Conclusion: Changes in the expression of GLUT proteins in rat placenta may be a compensatory mechanism for embryonic protection and the effect of stevioside on placenta may be limited.

Key words: GLUT1, GLUT3, GLUT4, Diabetes, Stevioside, Placenta

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Hipotezin temeli ve amaç	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Plasenta	3
2.2. Plasenta Çeşitleri	3
2.3. Sıçan Plasentası	6
2.3.1. Sıçan Plasentasının Gelişimi	6
2.3.2. Sıçanlarda Olgun Plasenta Yapısı	8
2.3.3. Sıçanlarda Plasental Dolaşım	11
2.4. Diabetes Mellitus	12
2.5. Tip 1 Diyabet	12
2.5.1. Genetik Faktörler	13
2.5.2. Çevresel Faktörler	13
2.6. Tip 2 Diyabet	14
2.7. Gebelik Diyabeti (Gestasyonel Diyabet)	15
2.8. Glukoz Taşıyıcıları	16
2.8.1. Sodyum Bağımlı Glukoz Taşıyıcıları (SGLT)	16
2.8.2. Kolaylaştırılmış Glukoz Taşıyıcıları (GLUT)	17
2.9. Plasental Glukoz Taşıyıcıları	19
2.10. Stevia Rebaudiana	20
3. GEREÇ ve YÖNTEM	23
3.1. Denekler	23
3.2. Deney Planı	23
3.3. Diyabet Modelinin Oluşturulması	24
3.4. Doku Temini ve Hazırlanması	24
3.5. İmmünohistokimya Tekniği için Doku Hazırlanması	24

3.5.1.	İmmünohistokimya Prokolü	25
3.6.	Western Blot Tekniği için Doku Hazırlanması	26
3.6.1.	Lizat Hazırlama	28
3.6.2.	Protein Miktarının Tayin Edilmesi	28
3.6.3.	SDS-PAGE Western Blot protokol	29
3.7.	Elisa Yöntemi İçin Kan Örneklerin Eldesi	30
3.7.1.	Elisa Yöntemi Protokolü	31
3.8.	İstatiksel Analiz	32
3.8.1.	Kan Glukoz Ölçümleri	32
3.8.2.	Fetüs ve Plasenta Ağırlıkları	32
3.9.	Semikantitatif Değerlendirme	33
4.	BULGULAR	34
4.1.	Fetüs Ağırlıkları	34
4.2.	Plasenta Ağırlıkları	35
4.3.	Sıçan Plasentası Genel Morfoloji	37
4.4.	İmmünohistokimyasal Bulgular	39
4.4.1.	15. Gün GLUT1, GLUT3 ve GLUT4 İmmün Boyamaları	39
4.4.2.	20. Gün GLUT1, GLUT3 ve GLUT4 İmmün Boyamaları	45
4.5.	Western Blot Bulguları	51
4.6.	Elisa Bulguları	56
4.7.	Kan Glukoz Ölçümleri	57
5.	TARTIŞMA	59
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	65
	KAYNAKLAR	66
	ÖZGEÇMİŞ	79

SİMGELER ve KISALTMALAR

AEC	:	3-amino 9- etil karbozol
AKT	:	Protein Kinaz B
APS	:	Amonyun persülfat
BSA	:	Bovin Seum Albumin
CPT1	:	Karnitin palmitoltransferaz 1
CTLA4	:	Sitotoksik T lenfosit ile ilişkili protein 4
DNA	:	Deoksiribonükleik Asit
DR 3	:	Ölüm Reseptörü 3
EEE	:	Ekstra embriyonik ektoderm
EK	:	Ektoplasental Kon
GDM	:	Gestasyonel diabetes mellitus
GLUT	:	Glukoz taşıyıcısı
HL- 60	:	İnsan promiyelositik lösemi hücre hattı
HLA	:	İnsan Lökosit Antijeni
HRP	:	Horseradish Peroksidaz
IRS-1	:	İnsün Reseptör Substratı 1
İHK	:	İç hücre kitlesi
MHC	:	Major histokompatibilite
OGTT	:	Oral glukoz tolerans testi
PBS	:	Fosfat tamponlu tuz
PDK	:	Fosfoinozitol bağımlı kinaz
PI	:	Fosfoinozitol
PI3K	:	Fosfoinozitol 3 kinaz
PIK	:	Proteinaz inhibitör kokteyli
PPAR	:	Proliferatör peroksizom aktive edici reseptör
PVDF	:	Poliviniliden Diflorid
SCD	:	Stearoil-CoA desaturaz
SDS	:	Sodyum deodisil sülfat
SH-SY5Y	:	Nöroblastom hücre hattı
STD	:	Standart
STZ	:	Streptozotosin
TBS	:	Tris Buffer Solüsyon

TE	:	Trofoektoderm
TEMED	:	Tetrametiletildiamin
TG	:	Trigliserit
TNF- α	:	Tümör nekroz faktör alfa

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.a-d	Plasentanın şekli ve fetal membranlar ve endometriyum arasındaki bağlantı alanlarının dağılımına göre tipleri	5
Şekil 2.2.a-c	Maternal ve fetal vasküler sistem arasındaki tabaka sayısına göre tipleri	6
Şekil 2.3.a-e	Maternal ve fetal dokular arasındaki interdigityasyon tipleri	7
Şekil 2.4.	Sıçan Plasentası Gelişimi	9
Şekil 2.5.	Sıçan Plasentası. Hemotrikoryal tip plasenta	10
Şekil 2.6.	Sıçan ve İnsan türlerine ait plasenta-kan bariyeri yapılarının karşılaştırılması	11
Şekil 2.7.	Sıçanlarda Plasental Dolaşım	13
Şekil 2.8.	İnsülin Sinyal Yolağı	16
Şekil 2.9.	Hücre membranında Sodyum Bağımlı Glukoz Taşıyıcısı	18
Şekil 2.10.	İnsan GLUT protein ailesinin arasındaki ilişkiyi gösteren filogenetik ağaç	19
Şekil 4.1	Gebeliğin 15. gününe ait kontrol, stevioside, diyabet ve diyabet+stevioside gruplarına ait fetüs ağırlıkları	35
Şekil 4.2.	Gebeliğin 20. gününe ait kontrol, stevioside, diyabet ve diyabet+stevioside gruplarına ait fetüs ağırlıkları	36
Şekil 4.3.	Gebeliğin 15. gününe ait kontrol, stevioside, diyabet ve diyabet+stevioside gruplarına ait plasenta ağırlıkları	37
Şekil 4.4.	Gebeliğin 20. gününe ait kontrol, stevioside, diyabet ve diyabet+stevioside gruplarına ait plasenta ağırlıkları	38
Şekil 4.5.	15 günlük kontrol grubuna ait sıçan plasentasında HE boyası	39
Şekil 4.6.	20 günlük kontrol grubuna ait sıçan plasentasında HE boyası	40
Şekil 4.7.	15. Gün sıçan plasentasında GLUT1 immünohistokimyasal boyanmaları	42
Şekil 4.8.	Gebeliğin 15. gününde sıçan plasentasında GLUT3 immünohistokimyasal boyanmaları	44

Şekil 4.9.	Gebeliğin 15. gününde sıçan plasentasında GLUT4 immünohistokimyasal boyanmaları	46
Şekil 4.10	Gebeliğin 20. gününde sıçan plasentasında GLUT1 immünohistokimyasal boyanmaları	48
Şekil 4.11.	Gebeliğin 20. gününde sıçan plasentasında GLUT3 immünohistokimyasal boyanmaları	50
Şekil 4.12.	Gebeliğin 20. gününde sıçan plasentasında GLUT4 immünohistokimyasal boyanmaları	52
Şekil 4.13.	Kontrol, stevioside, diyabet ve diyabet+stevioside gruplarına ait GLUT1, GLUT3 ve GLUT4 western bantları	53
Şekil 4.14.	Gebeliğin 15. ve 20. gününde kontrol, stevioside, diyabet ve diyabet+stevioside gruplarına ait GLUT1/ Beta aktin protein miktarları	54
Şekil 4.15.	Gebeliğin 15. ve 20. gününde kontrol, stevioside, diyabet ve diyabet+stevioside gruplarına ait GLUT3/ Beta aktin protein miktarları	56
Şekil 4.16	Gebeliğin 15. ve 20. gününde kontrol, stevioside, diyabet ve diyabet+stevioside gruplarına ait GLUT4/ Beta aktin protein miktarları	58
Şekil 4.17	Kontrol, stevioside, diyabet ve diyabet+stevioside gruplarının gebeliğin ait 15. gün ve 20. gün kan serumu insulin elisa sonuçları	59
Şekil 4.18	Kontrol, stevioside, diyabet ve diyabet+stevioside gruplarının gebeliğin 0., 9., 15. ve 20. günlerine ait kan glukoz ölçüm değerleri	60

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1.	Glukoz Taşıyıcı Proteinlerin Dağılımı ve Glukoza Affiniteleri	20
Tablo 3.1.	İmmünohistokimya yönteminde kullanılan primer antikolar, katalog numaraları ve dilüsyon oranları	26
Tablo 3.2.	Standartların hazırlanması ve değerleri	29
Tablo 3.3.	Eliza Yöntemi Prokolü	33
Tablo 4.1.	15. gün fetüs ağırlıkları	35
Tablo 4.2.	20. gün fetüs ağırlıkları	36
Tablo 4.3.	15. gün plasenta ağırlıkları	37
Tablo 4.4.	20. gün plasenta ağırlıkları	37
Tablo 4.5.	Gebeliğin 15. gününde sıçan plasentasında GLUT1 immüno boyanma yoğunluklarının semikantitatif değerlendirmesi	43
Tablo 4.6.	Gebeliğin 15. gününde sıçan plasentasında GLUT3 immüno boyanma yoğunluklarının semikantitatif değerlendirmesi	45
Tablo 4.7.	Gebeliğin 15. gününde sıçan plasentasında GLUT4 immüno boyanma yoğunluklarının semikantitatif değerlendirmesi	47
Tablo 4.8.	Gebeliğin 20. gününde sıçan plasentasında GLUT1 immüno boyanma yoğunluklarının semikantitatif değerlendirmesi	49
Tablo 4.9.	Gebeliğin 20. gününde sıçan plasentasında GLUT3 immüno boyanma yoğunluklarının semikantitatif değerlendirmesi	51
Tablo 4.10.	Gebeliğin 20. gününde sıçan plasentasında GLUT4 immüno boyanma yoğunluklarının semikantitatif değerlendirmesi	53

1. GİRİŞ

1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç

Plasenta gebelik boyunca çok önemli fonksiyonlar gerçekleştiren multifonksiyonel bir organdır. Metabolit ve gaz değişimleri, fetal atıkların uzaklaştırılması, gebelik süresince maternal fizyolojiyi değiştiren hormonların salgılanması ve maternal immün sisteme karşı bariyer oluşturma gibi plasentanın bir çok görevi vardır (Cross ve ark., 2003).

Sıçanlarda olgun plasenta yapısı 3 kısımdan oluşur. Bunlar; labirint zon, bağlantı zonu ve desidua. Labirint zon sıçan plasentasının fetal kısmıdır ve fetüs ile direkt olarak temas halindedir. Labirint zon, labirint trofoblast dev hücrelere ve sinsisyal trofoblast hücrelerine farklılaşan kök hücrelerden oluşur (Ain ve ark., 2003). Bağlantı zonu 3 farklı hücre tipinden oluşur. Bunlar; spongiotrofoblast hücreleri, glikojenik hücreler ve dev hücreler. Bağlantı zonunun ana bileşeni spongiotrofoblastlardır. Sıçan plasentalarında spongiotrofoblast hücreleri ve dev hücreleri sıçan plasentasının önemli endokrin hücreleridir. Desidua çok çeşitli hormonlar, sitokinler, büyüme faktörleri ve immünomodülatör molekülleri üretir (Jones ve ark., 2006; Jones ve ark., 2006).

Diyabet kanda yüksek glukoz seviyesi ile ifade edilen metabolik bir hastalıktır ve 3 tipi mevcuttur. Bunlar; Tip 1 diyabet, Tip 2 diyabet ve gestasyonel diyabet. Tip 1 diyabet pankreasta β hücrelerinin zarar görmesi ve buna bağlı olarak yeterli insülin üretilmemesi sonucu gelişir. Tip 2 diyabet temel olarak insülin direnci ile ilişkili olan diyabettir. Bu diyabet türü esasen insülin sinyal yolağının herhangi bir aşamasında meydana gelen hasardan dolayı ortaya çıkar. Gestasyonel diyabet gebelik sırasında ortaya çıkan glukoz intoleransı olarak tanımlanır.

Gebelik esnasında diyabet: hem annenin hem de fetüsün metabolizmasını etkilediği için bu dönem dikkat edilmesi gereken önemli bir metabolik hastalıktır. Diyabetli bireylerin çocuklarında diyabet oranı daha yüksek görülür. Diyabetik gebelikler fetal makrozomi, konjenital malformasyonlar ve prematür doğumlar ile karakterizedir (Scobie, 2007).

Streptozotosin (STZ) pankreasta insülin üreten β hücrelerine toksik etkisi olan geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Streptozotosin β hücrelerine spesifik değildir, pek çok organa da (örneğin karaciğer ve böbrek) zarar verir (McNeill, 1999; Szkudelski, 2001; Lenzen, 2008; Imaeda ve ark., 2002). STZ GLUT2 aracılığıyla hücreye girer, önce DNA alkilenmesine sonrada β hücre ölümüne neden olur (Wang ve Gleichmann, 1998; Leiter, 1985;). STZ ile diyabet oluşturulan sıçanların plasenta ağırlıkları gebeliğin 20. gününde önemli derecede daha yüksektir. Aksine fetüs ağırlıkları diyabette daha düşüktür (Gewolb ve ark., 1986; Greene ve ark., 1999; Vambergue ve Fajardy, 2011).

Glukoz hem plasenta hem de fetüs için önemli bir enerji kaynağıdır. Glukozun fetüse taşınması placentada bulunan glukoz taşıyıcı proteinler aracılığıyla sağlanır. En önemlileri GLUT1, GLUT3 ve GLUT4'tür. GLUT1 maternal dolaşımdan placentaya glukoz taşınımından sorumludur. Aksine, GLUT3 glukozun placentadan fetal dolaşıma transferinden sorumludur (Gutiérrez-Torres ve ark., 2015). GLUT4 ise placentanın metabolik gereksinimlerinin karşılanmasından sorumludur (Illsley, 2000; Lager ve Powell, 2012).

Stevia Rebaudiana Güney Amerika subtropik bölgelerinde yetişen bir bitkidir. Bu bitki ve bileşenleri (özellikle stevioside) uzun yıllardır tatlandırıcı ve tıbbi amaçlı olarak kullanılmıştır. *Stevia Rebaudiana* ve bileşenleri (stevioside) ile ilgili pek çok tıbbi çalışma yapılmıştır ve özellikle diyabet konusunda yapılan çalışmalarda iyileştirici etkisinin olduğu gösterilmiştir (Curi ve ark., 1986; Gregersen ve ark., 2004). *Stevia Rebaudiana*'nın bileşenleri (stevioside ve steviol) ile ilgili yapılan çalışmada pankreas β hücrelerinde insülin sekresyonunu direkt olarak artırmıştır (Jeppesen ve ark., 2000). Hücre hatlarında yapılan çalışmalarda stevioside, GLUT1 ve GLUT4 glukoz taşıyıcılarında artışa neden olmuştur. Ayrıca *Stevia Rebaudiana*, diyabetli hastaların kan glukozunun düşmesine neden olmuştur (Curi ve ark., 1986; Gregersen ve ark., 2004).

Bu çalışmadaki amacımız, Stevioside'nin normal ve STZ ile diyabet oluşturulmuş hayvanların kan glukoz ve insülin düzeyine etkisini belirlemek ve placentada glukoz taşınımında rol alan GLUT1, GLUT3 ve GLUT4 glukoz taşıyıcı proteinlerin lokalizasyonları ve protein miktarları üzerine etkilerini belirlemektedir. Böylece Stevioside'nin normal ve diyabetik plasental ve fetal gelişime etkisini belirlemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Plasenta

Plasenta, fetüsün normal gelişimi ve büyümesini destekleyen özelleşmiş geçici bir organdır. Plasenta maternal besin ve oksijenlerin fetüse, fetüste biriken atık ürünlerinin de maternal dolaşıma ulaşmasından sorumludur. Ayrıca, plasenta gebelik boyunca maternal fizyolojiyi düzenleyen hormonlar üretir ve maternal immün sisteme karşı bariyer oluşturur (Cross ve ark., 2003).

2.2. Plasenta Çeşitleri

Farklı hayvan türlerinde plasental morfolojiler farklılıklar gösterir. Plasenta farklı hayvan türlerine göre 3 şekilde sınıflandırılır;

- 1) Plasentanın şekli ve fetal membranlar ve endometriyum arasındaki bağlantı alanlarının dağılımına göre
- 2) Maternal ve fetal vasküler sistem arasındaki tabaka sayısına göre
- 3) Materno-fetal girinti çıkıntılara (interdigitasyon) göre (Ramsey, 1982; Wooding ve Burton, 2008; Burton ve ark., 2006; Leiser ve Kaufmann, 1994; Telugu ve Green, 2007; Slikker ve Miller, 1994)

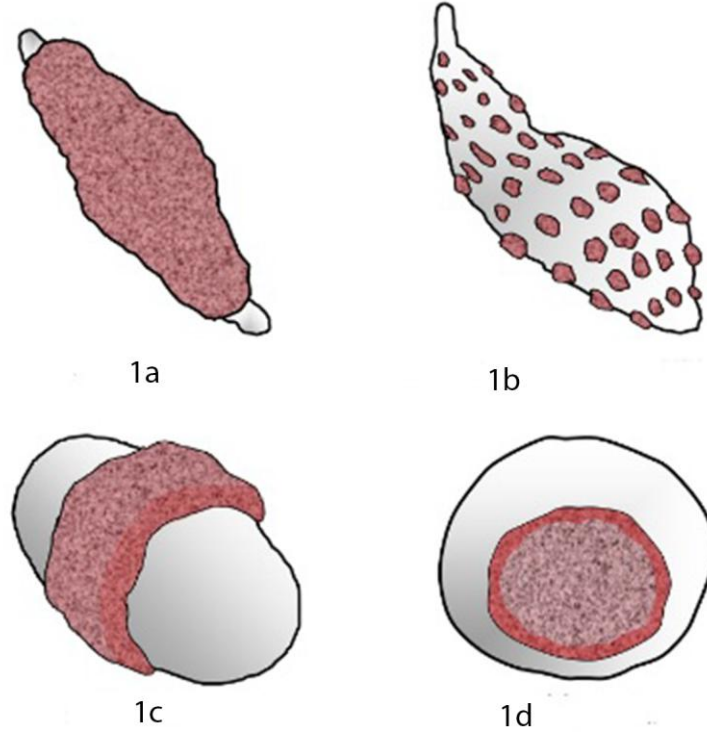
Plasentanın şekli ve fetal membranlar ve endometriyum arasındaki bağlantı alanlarının dağılımına göre de plasenta tipleri 4 çeşittir. Bunlar;

a-) Diffüz Plasenta: Bu tip plasentada katlantılar villusların ilerlemesiyle uterus luminal epitelin tüm yüzeyini kaplar. Domuz ve atlarda görülür.

b-) Kotiledon Plasenta: Bu plasenta türünde fetal kısım kotiledon, maternal kısım ise karunkula olarak adlandırılır. Ruminantlarda görülür.

c-) Kuşak Plasenta: Karnivorlara özgü olan bu plasentada; koryonik villus, koryonun merkezini çevreleyip geniş bir şerit oluşturmak için kümeleşir.

d-) Diskoidal Plasenta: Villus yapıları koryon kesesinin belirli yerlerinde disk şeklinde yapılar meydana getirir. Sıçan ve tavşanlarda görülür.

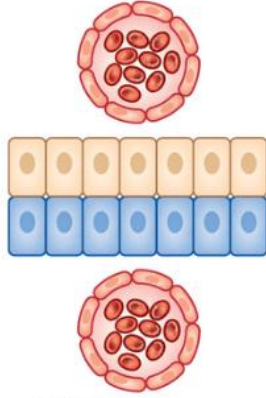


Şekil 2.1.a-d Plasentanın şekli ve fetal membranlar ve endometriyum arasındaki bağlantı alanlarının dağılımına göre tipleri **a:** diffüz plasenta **b:** kotiledon plasenta **c:** kuşak plasenta **d:** diskoidal plasenta (Furukawa ve ark., 2014)

Plasenta maternal ve fetal vasküler sistem arasındaki tabaka sayısına göre de 3 farklı tipe ayrılır. Bunlar;

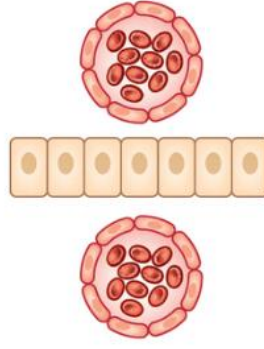
- 1- Epitelikoryal Plasenta: Bu tip plasentada trofoblastların uterusu invazyonu görülmemektedir. İnek, domuz gibi hayvanlarda görülür.
- 2- Endotelikoryal Plasenta: Maternal uterus epiteli ve bağ doku implantasyondan sonra kaybolur ve maternal endotel hücreleri ile fetal endotel hücreleri birbirinden trofoblast hücreleri ile ayrılır.
- 3- Hemokoryal Plasenta: Bu tip plasenta en invaziv olanıdır. Koryon ve maternal kan arasında direkt olarak temas vardır. Primatlarda hemomonokoryal, tavşanlarda hemodikoryal ve sıçan ve farelerde hemotrikoryal plasenta görülmektedir.

a Epitekoryyal Plasenta



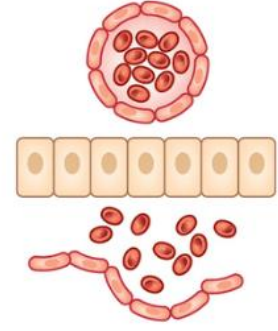
İnek, domuz ve at

b Endotelikoryyal Plasenta



köpek ve kedi

c Hemokoryyal Plasenta

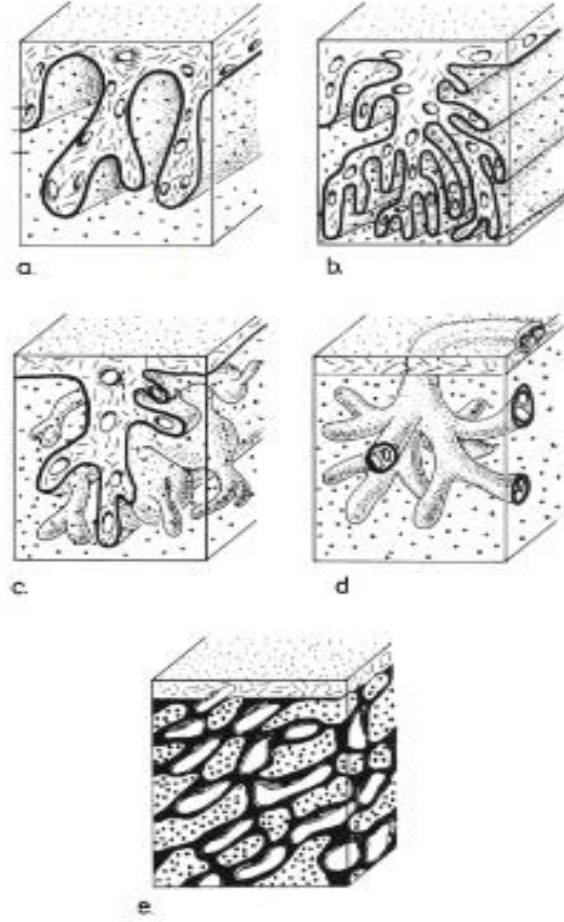


İnsan ve rodent

Şekil 2.2.a-c Maternal ve fetal vasküler sistem arasındaki tabaka sayısına göre plasenta tipleri **a:** Epitekoryyal plasenta **b:** Endotelikoryyal plasenta **c:** Hemokoryyal plasenta. Sarı hücreler (koryon) ve mavi hücreler (uterin epitel) kırmızı hücreler (vasküler endotel) (PrabhuDas ve ark., 2015)

Materno-fetal interdijitasyonlara göre plasenta 5 tipe ayrılır. Bunlar;

- a- Lamellar
- b- Villöz
- c- Trabeküler
- d- Labirint
- e- Katlantılı



Şekil 2.3.a-e Maternal ve fetal dokular arasındaki interdigitasyon tipleri **a:** Katlantılı tip **b:** lamellar tip **c:** trabeküler tip **d:** villöz tip **e:** labirint tip (Kurt Benirschke ve Rebecca, 2006)

2.3. Sıçan Plasentası

Sıçanlar çift boynuzlu uterusu sahiptir. Yetişkin bir sıçanın ağırlığı 200 ile 400 gram arasında değişir. Laboratuvarında yaygın olarak kullanılan sıçan türü wistar sıçandır. Gebelik süresi 21 gündür.

2.3.1. Sıçan Plasentasının Gelişimi

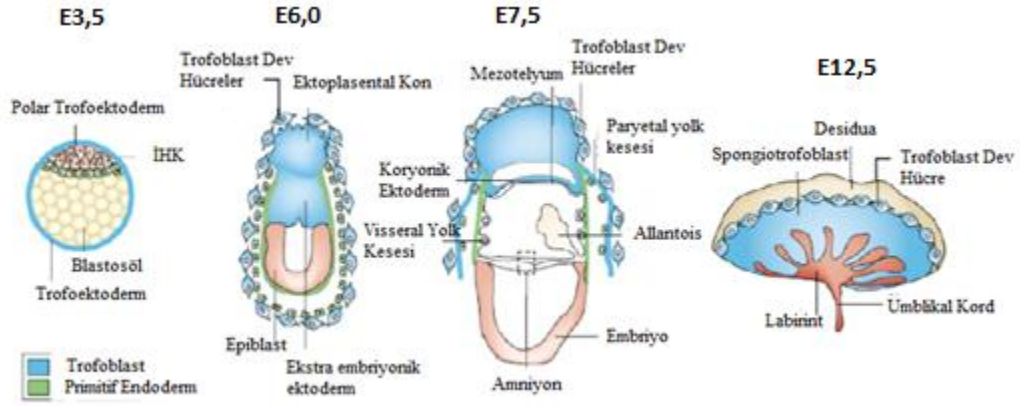
Ovidukta fertilizasyon gerçekleşir. Fertilizasyondan sonra zigot bir dizi simetrik hücre bölünmeleri geçirir ve çok sayıda blastomer morula adı verilen yapıyı oluşturur. İlk farklılaşma blastosistin oluşumunda 3.5 (E 3.5) gün sonra gerçekleşir. Blastosist trofoektoderm ve iç hücre kitlesine farklılaşır. Blastosistin dış tabakasını trofoektoderm (TE) oluştururken, iç hücre kitlesi (İHK) de trofoektoderm tabakası tarafından sarılır. İHK'nin komşuluğunda yer alan trofoblastlar polar trofoektodermi oluşturur. İHK karşı kutbunda olan trofoblastlar ise mural trofoektodermi oluşturmaktadır.

İmplantasyon zamanı (gebeliğin 4-5. günü), mural trofoektoderm hücreleri bölünmeyi durdurur, ancak trofoblast dev hücrelerini oluşturmak için nükleusunda endoreduplikasyon gerçekleşir (Watson ve Cross, 2005). Primer trofoblast dev hücreleri uterusu invaze olan hücrelerdir (Cross ve ark., 1994). Bu hücreler olgun plasenta yapısına katılmazlar. Trofoblast dev hücreleri insanda ekstravillöz sitotrofoblast hücrelerine karşılık gelmektedir. Mural trofoektoderm hücrelerinin aksine polar trofoektoderm hücreleri iç hücre kitlesinden gelen mitojenik sinyallere cevaben proliferere olmaya devam eder ve diploid ekstra-embriyonik ektoderm (EEE) ve ektoplasental konu (EK) oluştururlar (Rossant ve Cross, 2001) (Şekil 2.3.1.1.). Ektoplasental koni sekonder dev hücreleri ve daha sonra spongiotrofoblastı oluşturur.

Postimplantasyon embriyosunda, pek çok dev hücre ektoplasental konu çevreler. Plasentanın vasküler bölümü, E8. gün embriyodaki ekstra embriyonik mezoderm (allantois)'den oluşur (Cross ve ark., 2003).

Gelişim devam ettikçe, ekstra-embriyonik ektoderm gelişerek koryon epitelini oluşturur. Embriyonun arka ucunda bulunan mezodermden ise allantois gelişir. E8,5. günde allantois koryon ile temas kurar. Bu olaydan hemen sonra (E9. gün) koryonda katlantılar meydana gelir ve bu katlantılar allantoisten gelişen fetoplental kan damarlarının oluştuğu yeri belirler (Cross ve ark., 2006). Aynı zamanda koryonik trofoblast hücreleri labirint hücre tiplerine farklılaşmaya başlar.

Koryonik trofoblast hücreleri labirint bölgede 2 hücreye farklılaşır. Birinci hücre multinükleer sinsisyotrofoblast hücrelerdir ve fetal kapillerlerin endotelini çevreler. Diğer bir hücre tipi olan; mononükleer trofoblast hücreleri maternal kan sinüslerini sınırlandırır. Fetal damarlar ve trofoblastlar birlikte labirint bölgesinde geniş ve dallanmış villus yapılarını oluştururlar. Doğuma kadar daha büyük ve geniş villüs dallanmaları meydana gelir (Adamson ve ark., 2002). Materno-fetal kan akımı, besin transportunu maksimuma çıkarmak için labirint bölgede zıt akım şeklinde çalışır (Adamson ve ark., 2002).

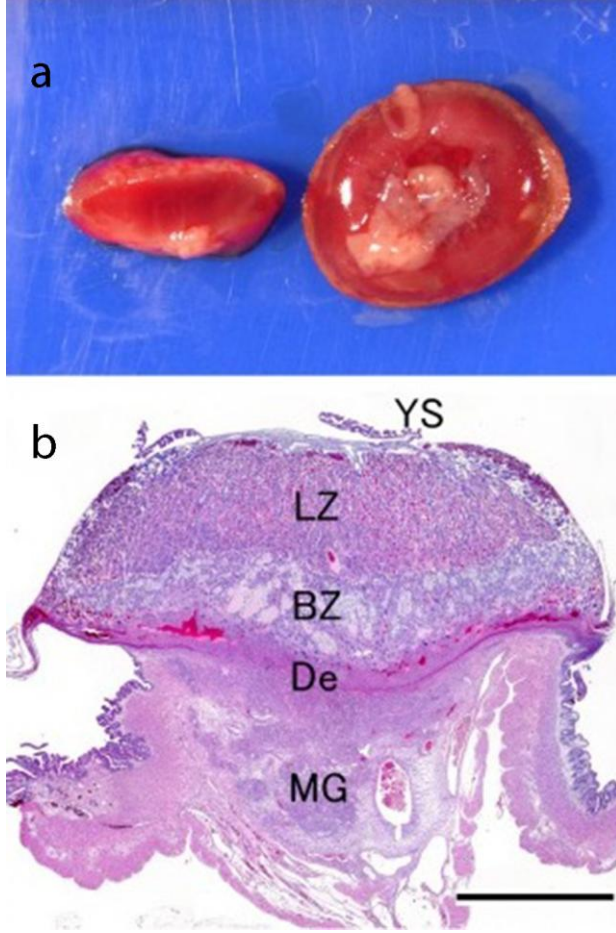


Şekil 2.4. Sıçan Plasentası Gelişimi (Rossant ve Cross, 2001)

2.3.2. Sıçanlarda Olgun Plasenta Yapısı

Sıçanlar hemotrikoryal ve diskoidal tip plasentaya sahiptir (Furukawa ve ark., 2011; Carter, 2007) (Şekil 2.5.a). Sıçanlarda, plasenta histolojik olarak 3 kısımdan oluşur (Croy ve ark., 2013) (Şekil 2.5.b). Bunlar;

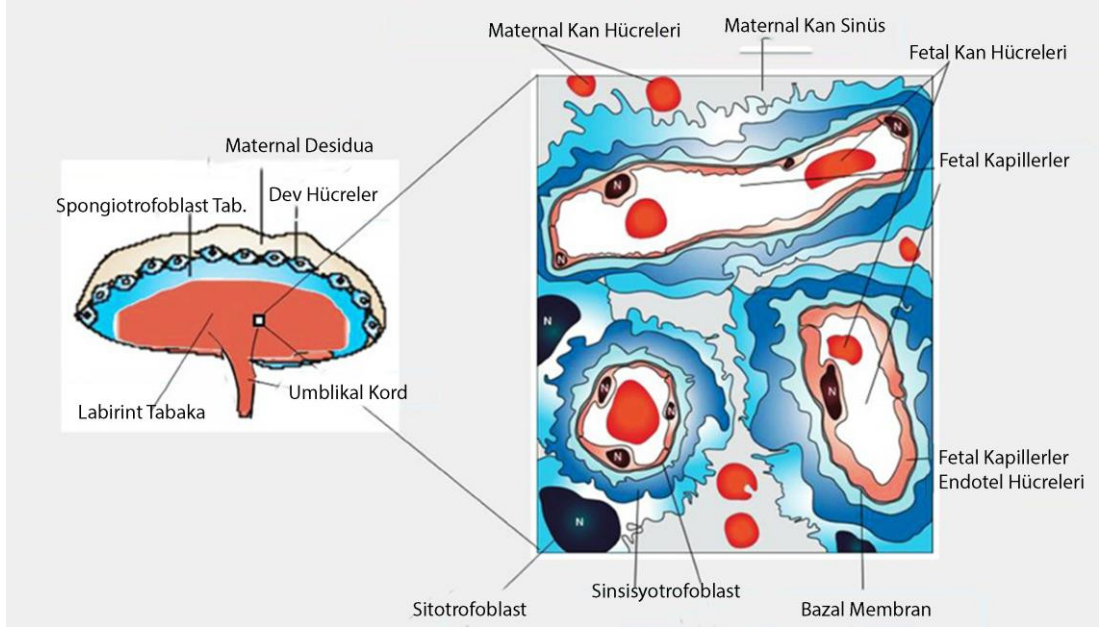
- 1-) Labirint Zon
- 2-) Bazal Zon
- 3-) Desidua



Şekil 2.5. Sıçan Plasentası. Hemotrikoryal tip plasenta. a) Gebeliğin 15.gününe ait maternal ve fetal plasentanın makroskopik görüntüsü. b) Düşük büyütmede sıçan plasentasının mikroskopik görüntüsü. HE boyanma, bar=2mm. YS: yolk kesesi, LZ: labirint zon BZ: Bağlantı zon, De: desidua, MG: metriyel bez (Furukawa ve ark., 2014)

1-) Labirint Zon

Plasentanın labirint tabakası ekstra embriyonik ektodermden gelişir. E8,5. gün allantoik mezoderm ile koryonun bazal yüzeyine tutunması ile de fonksiyonel halini alır. Labirint tabaka gelişimi boyunca spongiotrofoblast tabakası tarafından desteklenir. Labirint zon sıçan plasentasının fetal kısmıdır ve maternal sinüsler ve fetal kan damarlarını içerir. Maternal kan ile temasta olan trofoblast hücreleri, sitotrofoblast olarak adlandırılır. Sitotrofoblast büyük yuvarlak nükleusu ve nükleolusuyla kolayca ayırt edilir. Sitotrofoblastlar yüzeyinde çok sayıda mikrovillus ve pinositotik vezikül içerirler. Bu trofoblast tabakanın altında, çift tabaka sinsisyotrofoblast tabakası (sinsisyotrofoblast I ve sinsisyotrofoblast II) vardır. Gap junctionlar bu çift tabaka arasında bulunur. Bazal laminalar sinsisyotrofoblast II ve fetal kapiller endoteli arasında yerleşiktir (Furukawa ve ark., 2011).



Şekil 2.6. Sıçan Matur Plasenta. Soldaki şekil: Sıçan Plasentasını oluşturan tabakaları göstermektedir. Sağdaki şekil: Labirint tabakasının büyütülmüş şekli. Sıçandaki kan-plasenta bariyerini oluşturan hücresel elemanları göstermektedir (Kaneko Ishino ve Ishino, 2012).

2-) Bağlantı Zonu

Bağlantı zonu, ektoplasental kondan gelişir. 3 farklılaşmış hücreden oluşur: 1) Spongiotrofoblast hücreleri, 2) Trofoblastik dev hücreler, 3) Glikojenik hücreler. Spongiotrofoblast hücreleri trofoblastik dev hücre tabakasının hemen altında yerleşiktir ve bazal zonun ana yapısını oluşturur. Trofoblastik dev hücreler maternal-plasental yüzeyde yerleşiktir ve plasentanın önemli endokrin hücrelerinden biridir. Bunlar prolaktin ailesine ait hormonlar/sitokinler sentezler ve salgılar (Ain ve ark., 2003; Soares ve ark., 2007; Soares ve ark., 1996). Glikojenik hücreler gebeliğin orta zamanlarında geçici olarak bazal bölgede görülür. Bunlar küçük hücre kitleleri ve glikojen hücre adacıklarını oluştururlar. Bu hücrelerin fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir, ancak glikojen metabolizması ile ilgili olabilirler. Bağlantı zonu fetal damar içermez sadece maternal kan damarları bulunur (Furukawa ve ark., 2011).

3-) Desidua

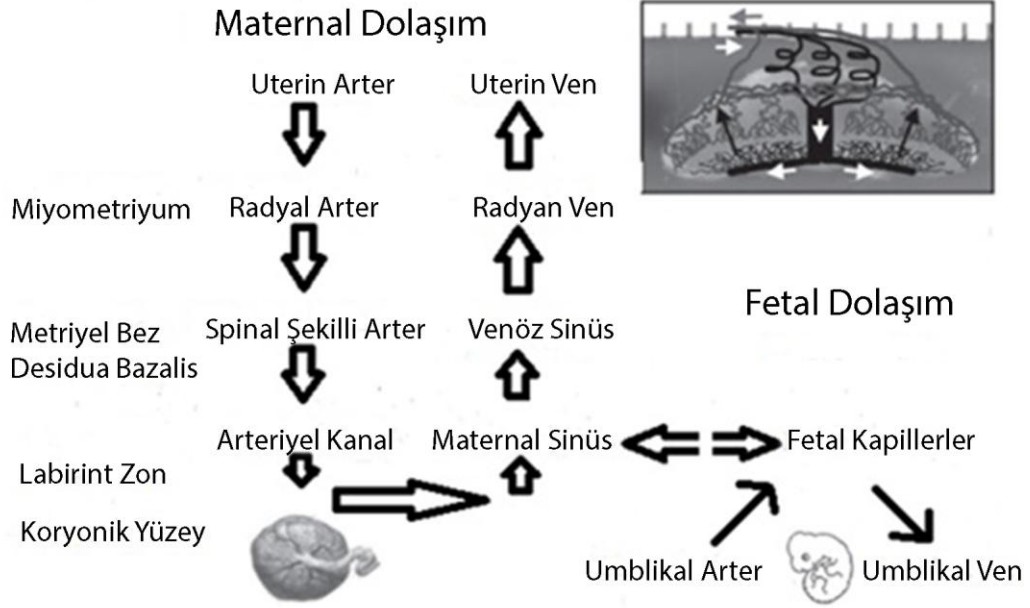
Desidual hücreler, uterinal stromal hücrelerin farklılaşmasıyla oluşur ve desidual hücreler buldukları yerlere göre farklı fonksiyon gösterirler (De ve ark., 1991; Croy ve ark., 2003). Desidua mezometriyal desidual hücrelerden oluşur ve desidual-plasental yüzey damarlanmasının gelişiminde önemli rol oynar (Furukawa ve ark., 2014). Desidua çok çeşitli hormonlar, sitokinler, büyüme faktörleri ve

immünomodülatör molekülleri üretir (Jones ve ark., 2006; Jones ve ark., 2006). Desidua bağlantı zonu ile birlikte maternal plasentayı oluşturur.

2.3.3. Sıçanlarda Plasental Dolaşım

Gebeliğin başarısı için uteroplasental ve fetoplasental dolaşımların koordineli gelişimi önemlidir. Uteroplasental dolaşım oksijen ve besin yönünden zengin maternal kanın labirint bölgeye ulaştırılmasını sağlar. Fetoplasental dolaşım ise, labirintteki besin ve oksijenleri umblikal ven aracılığıyla büyüyen embriyoya ulaştırır. Koryo-allantoik plasenta oluşmadan önce materno-fetal değişim yolk kesesinde sağlanır.

Maternal kan 5-10 spiral arterlere dallanan, radial arterler aracılığıyla uterusu girer. Spiral arterler, metriyel bezde genişler ve aşağıya doğru gittikçe düz kas ve elastin yapılarını kaybeder. Spiral arterler desidua bazalisi geçtikten sonra pek çok küçük, merkezi yerleşimli arteriyel kanallar oluşturmak üzere birleşirler. Kan plasentanın fetal yüzüne geçen düz kanallar aracılığıyla taşınır. Maternal kan arteriyel kanalları geçtikten sonra, labirint zondaki trofoblast ile sınırlandırılmış maternal sinüzoid alanların içine girerler. Maternal sinüzoidler büyük venöz sinüslere yönlendiren daha büyük kanallara kaynaşır. Maternal kan venöz sinüsler aracılığıyla labirint zona geçer. Venöz sinüsler metriyel bezin dış bölgesinden geçer ve miyometriyumdaki radial venlere girerler.



Şekil 2.7. Sıçanlarda Plasental Dolaşım (Furukawa ve ark., 2011)

Fetüsten gelen oksijence fakir kan arteriyollerde taşınır. Oksijence zengin maternal kan ise doğrudan labirintin fetal kısmına merkezi kanallar aracılığıyla iletilir. Bu şekilde, kapillerlerden çıkan fetal venöz kan trofoblast ile sınırlandırılmış sinüzoidlere giren maternal arteriyel kan ile dengelenir. Dolayısıyla, bu sistem fetuse umbilikal venöz oksijenin maksimum seviyede ulaşmasını sağlar.

2.4. Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus, hiperglisemi ile karakterize olan metabolik hastalıkların bir grubudur. Bu hastalık insülin salgılanması, insülin

lin etkinliğinin ya da her ikisinin hasarından kaynaklanır. Kronik hiperglisemili diyabetlerde uzun vadede hasar, disfonksiyon ve çeşitli organlarda, özellikle gözler, böbrekler, sinirler, kalp ve kan damarlarındaki yetmezlikler ile ilişkilidir. Diyabetin gelişmesinde, pankreas β hücrelerinin otoimmün yıkımından, insülin etkinliğinde direnç olmasına neden olan anormalliklere kadar pek çok süreç etkilidir.

2.5. Tip I Diyabet

Tip I diyabet tüm diyabetik vakaların yaklaşık %5-10'unu oluşturur. Tip I diyabet, insülin bağımlı diyabet olarak adlandırılır. Pankreasın yeterince insülini üretememesinden kaynaklanır. Tip I diyabet de iki'ye ayrılır. Tip IA, β hücrelerine

hücre bağımlı otoimmün saldırıdan kaynaklanır. Tip IB, nedeni belli olmayan yani idiyopatik olarak ifade edilir. Genellikle tip I diyabet başlığı immün aracılı tip IA için kullanılır. Tip I diyabetin ortaya çıkmasında genetik ve çevresel faktörler etkili olmaktadır.

2.5.1. Genetik Faktörler

Tip I diyabetin gelişiminde genetik yatkınlık önemlidir. Tip I diyabetli bireylerin çocuklarında diyabet oranı daha yüksektir (yaklaşık %6) (Field, 2002).

İnsanlarda MHC HLA kompleksi olarak bilinir ve 200 üzerinde gen içerir (Klein ve Sato, 2000). HLA kompleksi 6. kromozomun kısa kolu üzerinde yerleşiktir ve HLA Sınıf I ve Sınıf II moleküllerini kodlar. HLA molekülleri işlenmiş antijenleri immün sistem hücrelerine sunar. Ayrıca, HLA kompleksi vücudun kendi proteinlerini yabancı istilacıların proteinlerinden ayrılmasına yardım eder. HLA sınıf I molekülü pek çok hücrede bulunmasına karşın, HLA sınıf II molekülü yalnız antijen sunan hücrelerde bulunur.

1970'lerin başlarında yapılan araştırmalarda tip I diyabet'in HLA sınıf I molekülü ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Redondo ve ark., 2001). Kapsamlı yapılan çalışmalar sonucunda tip I diyabet'in HLA sınıf II DR3 ve DR4 ile daha yakın ilişkisinin olduğu belirlenmiştir (Solow ve ark., 1979). DR3, DR4 veya her iki genotipi içerenlerin diyabete yakalanma riski önemli ölçüde artmaktadır.

Tip 1 diyabet ile ilişkili olan HLA genlerindeki varyasyonların dışında insülin geni ve immün cevapta düzenleyici role sahip olan CTLA4 geni de önemlidir. İnsülin geni Sınıf I, Sınıf II ve Sınıf III'den oluşur. Sınıf I allelleri tip I diyabete yatkınlıkla ilişkilidir. CTLA4 aktive olmuş T hücrelerin yüzeyinde bulunan bir yüzey molekülüdür. CTLA4 T hücre aktivasyonu için negatif bir sinyal üretir. CTLA4 gen ekspresyonundaki kalıtsal değişiklikler T hücrelerinin kendinden reaktifliğini artırır ve böylece otoimmün hastalıklarda önemli rol oynar (Ueda ve ark., 2003).

2.5.2. Çevresel Faktörler

Genetik yatkınlığı olan bireylerde çevresel faktörler β hücrelerinin harabiyetini ve diyabetin ortaya çıkmasını başlatır ve süreci tetikler. Monozigot ikizlerde yapılan çalışmalar, tip I diyabet etiyolojisinde genetik faktörler kadar çevresel faktörlerin de önemli olduğu gösterilmiştir. Tip I diyabet riskini artıran çevresel faktörlerin başında

virüsler gelmektedir. Virüsler β hücrelerine doğrudan saldırarak ya da β hücrelerine otoimmün saldırıyı aktive ederek yok eder. Otoimmün tetikleyici rolü oynayan rubella, kabakulak, koksaki virüs B4'tür (Ersoy ve İmamoğlu, 2009).

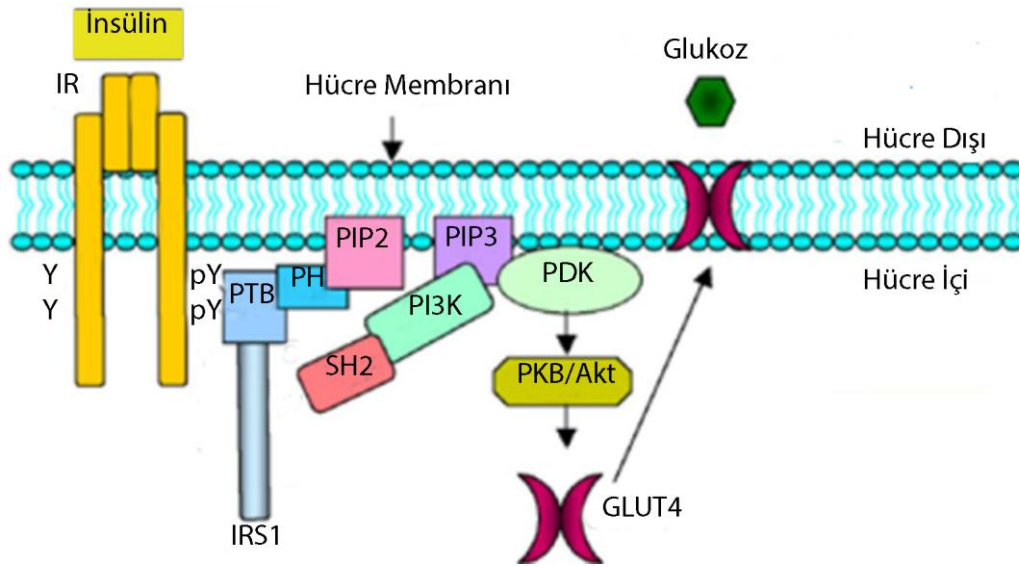
Kimyasal ajanlar ve ilaçlar β hücrelerini yok ederek tip I diyabetin gelişmesini kolaylaştırırlar. Bunlara streptozotosin ve alloksan örnek gösterilebilir (Yoon ve ark., 1987). Anne sütünden erken kesilen ve inek sütüyle beslenen bebeklerin diyabete yakalanma riski artmıştır. İnek sütünde bulunan β laktaglobulin T hücrelerinin oluşumunu kontrol eden glikodelin proteinine benzerdir. Bebeğin bağışıklık sistemi bu proteine saldırır. Bunun sonucunda T hücrelerin sayısının aşırı artmasına neden olur. Bu T hücreleri de pankreas adacığındaki insülin üreten β hücrelerine saldırarak tip I diyabetin başlangıcını tetikler.

2.6. Tip II Diyabet

Tip II diyabet tüm diyabetik vakaların yaklaşık %80-90'nını oluşturur. Tip II diyabet, insülin bağımsız diyabet olarak adlandırılır. Tip II diyabetli hastaların %80'den fazlası obezdir. Tip II diyabet genellikle 40 yaşın üzerinde olan kişilerde ortaya çıkar. Tip II diyabet, uzun süreli insülin direnci üzerine eklenen beta hücre yetmezliği sonucunda oluşur. Tip II diyabette hiperglisemi 2 şekilde meydana gelir. Birincisi, karaciğer ve kas dokusunda oluşan insülin direnci, ikincisi pankreas β hücrelerinde insülin üretiminin gittikçe azalmasıdır. İnsülin direnci, genetik etkilerle birlikte, çevresel etmenlerin etkisi ile gelişir. Çevresel etmenlerin en önemlileri obezite ve fiziksel aktivite eksikliğidir.

İnsülin, etkilerini hedef hücre membranındaki insülin reseptörleri üzerinden gösterir. İnsülin reseptörleri, ikisi ekstraselüler alfa altünitesi ve ikisi transmembran beta altünitesi olmak üzere heterotetramerik yapıda bulunur (Bakiner, 2007). İnsülin, alfa altüniteye bağlandığında, reseptörün beta altünitesindeki intrinsik tirozin kinaz aktivitesini uyarır (Rosen ve ark., 1983; Yu ve Czech, 1984; Ellis ve ark., 1987). Tirozin kinaz aktivitesi ile beta altünitede yer alan tirozin rezidülerinin otofosforilasyonu gerçekleşir. Bu durum insülin reseptör aktivasyonunun ilk basamağıdır (Luo ve ark., 1999; Ottensmeyer ve ark., 2000). İnsülin reseptörünün aktivasyonu, reseptörle ilişkide bulunan ve insülin reseptör substratı-1 (IRS-1) denilen bir seri proteinin serin-treonin grubunda fosforilasyona sebep olur (Bakiner, 2007). Glukoz transportundan sorumlu olan yolakta aktive olmuş IRS-1 proteinleri,

intraselüler bir enzim olan fosfotidil inozitol 3 kinaz (PI3K) ile temasa geçerek aktivasyonu sağlar. Aktive PI3K, fosfotidil inozitol (PI) substratlarını fosforile ederek; PIP2 ve PIP3 oluşumunu sağlar (Shepherd ve ark., 1998). Bu moleküller fosfotidil inozitol bağımlı kinaz (PDK) enzimine bağlanarak bu enzimi aktive eder ki, PDK protein kinaz B olarak da bilinen AKT fosforilasyonunu sağlar. Aktive olmuş Akt, sitozolde bulunan GLUT-4 adlı glukoz transport proteininin plazma membranına doğru yer değiştirmesini sağlar. Bu şekilde plazma membranına doğru yer değiştiren GLUT-4, glukozun hücre içine girişine olanak sağlar (Ueki ve ark., 1998; Okada ve ark., 1994; Clarke ve ark., 1994; Kanai ve ark., 1993; Cheatham ve ark., 1994; Katagiri ve ark., 1996; Martin ve ark., 1996; Kohn ve ark., 1996; Calera ve ark., 1998; Sakaue ve ark., 1998; Sharma ve ark., 1998; Hajdуч ve ark., 2001; Cho ve ark., 2001).



Şekil 2.8. İnsülin Sinyal Yolağı (Goyal ve ark., 2010)

2.7. Gebelik Diyabeti (Gestasyonel Diabetes Mellitus)

Gestasyonel diyabet (GDM), ilk kez gebelikte tanımlanan glukoz intoleransıdır. GDM çeşitli derecelerde hiperglisemiye ve gebelikle ilişkili risklere neden olur. Hiperglisemi hem annede hem de bebekte çeşitli komplikasyonlara neden olur. Annede hipertansiyon, preeklampsi ve gebelik sonrası diyabet oluşumuna neden olurken, bebekte makrozomi, konjenital malformasyonlara neden olmaktadır.

Normal gebelik sırasında ilerleyici bir insülin direnci, gebeliğin ortasından itibaren gelişir ve üçüncü trimesterde ilerler. Plasentadan salınan hormonlar ve adipokinler,

tümör nekroz faktörü α (TNF- α), insan plasental laktojen ve insan plasental büyüme hormonu dahil olmak üzere gebelikte insülin direncinin olası nedenleridir. Ayrıca, gebelik boyunca artan östrojen, progesteron ve kortizol glukoz-insülin dengesinin bozulmasına neden olur (Jovanovic-Peterson ve Peterson, 1996). Gebelik boyunca periferik insülin direncini ortadan kaldırmak için, pankreastan insülin sekresyonu artar. Pankreas, insülin direncinin metabolik stresi ile baş edebilmek için yeterli insülin salgılayamadığında GDM ortaya çıkar.

2.8. Glukoz Taşıyıcıları

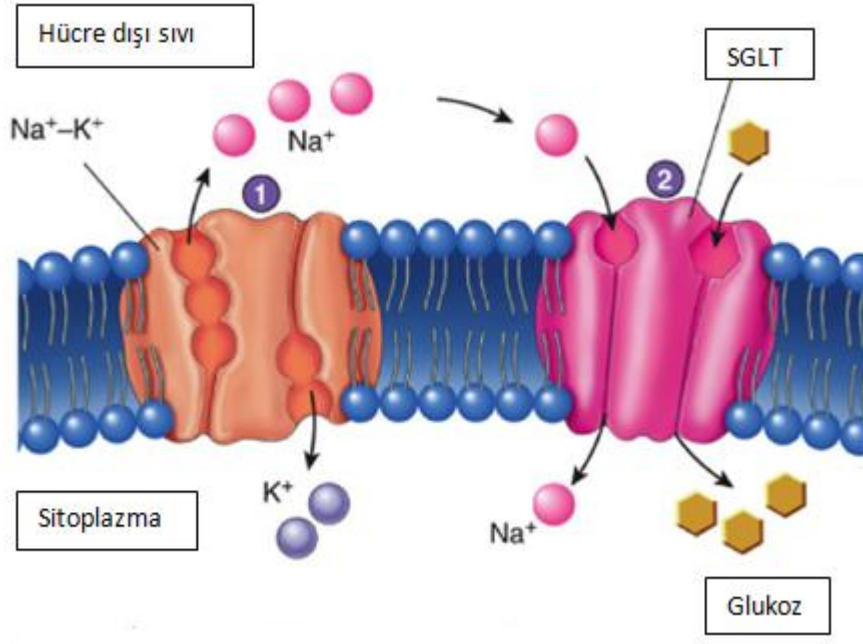
Glukoz memeliler için önemli bir enerji kaynağıdır. Glukoz besinlerden veya organlarda örneğin karaciğerde diğer substratlardan sentez ile elde edilmektedir. Besinlerden elde edilen glukoz ince bağırsağın lümeninden emilir. Hem besinlerden elde edilen hem de vücut içinde sentez yoluyla elde edilen glukoz hedef hücrelere dolaşım yolu ile ulaştırılır. Bu süreçler plazma membranları boyunca glukoz transportunu içerir. Glukoz transportu integral taşıyıcı proteinleri aracılığıyla gerçekleşir. Bu taşıyıcılar yapısal ve fonksiyonel olarak birbirinden farklı 2 gruptan oluşur. Bunlar;

a) Sodyum Bağımlı Glukoz Taşıyıcıları (SGLT)

b) Kolaylaştırıcı Glukoz Taşıyıcıları (GLUT)

2.8.1. Sodyum Bağımlı Glukoz Taşıyıcıları (SGLT)

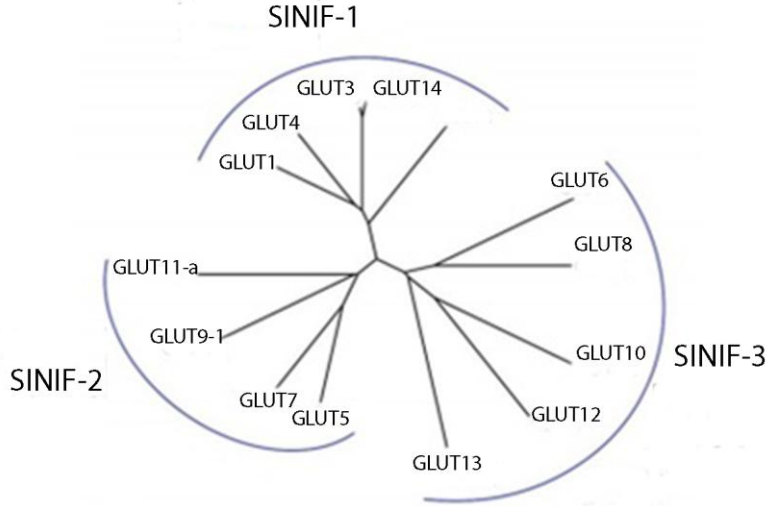
SGLT'leri sekonder aktif taşıyıcı bir mekanizmayla glukozu taşır. $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaz pompası tarafından sağlanan konsantrasyon gradienti ile glikozun hücre içine girişi sağlanır. Hücre homeostazisinin sağlanması için sodyumun hücre dışına atılması potasyumun içeri alınması gerekmektedir. Bu süreç 1 ATP harcanmasıyla gerçekleştirilir. Hücre dışında sodyum konsantrasyonunun yüksek iken hücre içinde konsantrasyonu düşüktür. Bu konsantrasyon farkı sonucunda sodyum ve glikoz aynı anda hücre içine glukoz taşıyıcı proteinler tarafından alınır. Hücre içinde biriken sodyum iyonları kan yoluyla hücre içerisinden uzaklaştırılır.



Şekil 2.9. Hücre membranında Sodyum Bağımlı Glukoz Taşıyıcısı (www.studyblue.com/notes/nutrition-review/deck/3510384)

2.8.2. Kolaylaştırılmış Glukoz Taşıyıcıları (GLUT)

GLUT üyeleri, memeli hücrelerinde dağılım gösteren integral membran proteinleridir. Bunlar metabolizma için gerekli glukozun ekstraselüler ve intraselüler kompartmanlar arasında hareketini düzenlerler (Medina ve Owen, 2002). Bugüne kadar, insanlarda 14 farklı GLUT üyesi olduğu bildirilmiştir (Medina ve Owen, 2002; Augustin, 2010). GLUT ailesi proteinleri, sekans benzerliği ve karakteristik elementlerine göre üç alt sınıfa ayrılmıştır (Şekil 2.8.2.1.); GLUT 1-4 ve 14'ü içeren, sınıf I; GLUT 5,7,9,11'i içeren, sınıf II; ve GLUT 6,8,10,12 ve 13 'ü içeren, sınıf III'tür (Joost ve Thoren, 2001; Joost ve ark., 2002).



Şekil 2.10. İnsan GLUT protein ailesinin arasındaki ilişkiyi gösteren filogenetik ağaç (Augustin, 2010)

GLUT-1; eritrositler, beyin, böbrek, kolon ve plasentada bulunur. Beyin'e glukoz taşınmasını sağlar. İnsülininden bağımsız çalışan glukoz taşıyıcısıdır. GLUT-2; karaciğer, pankreatik β -hücreleri, ince bağırsaklarda bulunur (Thorens, 1982). Yüksek kapasiteli, düşük affinitelidir. GLUT-3; nöronlar, plasenta ve testiste bulunur (Simpson ve ark., 2008). GLUT-4; adipoz doku, iskelet kasları ve kalpte bulunur. İnsülinle düzenlenen glukoz alınımını sağlar (Benomar ve ark., 2006). GLUT-5; ince bağırsaklar, testis, sperm, böbrek, iskelet kasları, adipoz dokuda ve düşük düzeyde beyinde bulunur. Fruktoz ve glukoz transportundan sorumludur (Douard ve Ferraris, 2008). GLUT-6; dalak, lökositler ve beyinde bulunur. GLUT-7; karaciğerde bulunur (Waddell ve ark., 1992). GLUT-8; testis ve beyinde bulunur (Ibberson ve ark., 2002). GLUT-9; karaciğer ve böbrekte bulunur. GLUT-10; karaciğer ve böbrekte bulunur. GLUT-11; kalp ve kasta bulunur. GLUT-12; iskelet kasında, yağ dokuda ve ince bağırsakta mevcuttur (Rogers ve ark., 2002). GLUT 13 beyinde bulunur. GLUT 14'de testiste mevcuttur (Wu ve Freeze, 2002). Tablo 2.8.2.1.' de tüm GLUT proteinlerinin organlardaki dağılımı ve glukozla olan affiniteleri gösterilmiştir.

GLUT tipi	Lokalizasyonları hücre ve organlar	Glukoza Affinite
GLUT1	ERİTROSİTLER VE BEYİN	YÜKSEK AFFİNİTE
GLUT2	KARACİĞER, PANKREAS VE İNCE BAĞIRSAK	DÜŞÜK AFFİNİTE
GLUT3	BÖBREK, TESTİS VE PANKREAS	YÜKSEK AFFİNİTE
GLUT4	ADİPOZ DOKU, İSKELET KASI VE KALP KASI	DEĞİŞKEN AFFİNİTE
GLUT5	TESTİS VE BÖBREK	-
GLUT6	BEYİN, DALAK VE LÖKOSİT	DÜŞÜK AFFİNİTE
GLUT7	KARACİĞER, TESTİS VE PROSTAT	GLUKOZ VE FRUKTOZ İÇİN YÜKSEK AFFİNİTE
GLUT8	TESTİS VE BEYİN	GLUKOZ, FRUKTOZ VE GALAKTOZ İÇİN YÜKSEK AFFİNİTE
GLUT9	KARACİĞER VE BÖBREK	-
GLUT10	KARACİĞER VE BÖBREK	-
GLUT11	KALP VE KASTA	GLUKOZ İÇİN DÜŞÜK AFFİNİTE FRUKTOZ İÇİN YÜKSEK AFFİNİTE
GLUT12	KALP VE PROSTAT	-
GLUT13	BEYİN	-
GLUT14	TESTİS	-

Tablo 2.1. Glukoz Taşıyıcı Proteinlerin Dağılımı ve Glukoza Affiniteleri (Rao ve ark., 2013)

2.9. Plasental Glukoz Taşıyıcıları

Glukoz hem plasenta hem fetüs için önemli bir enerji kaynağıdır. Fetal glukoz üretimi düşük miktardadır ve böylece fetüs tamamen maternal dolaşımdan plasenta aracılığıyla gelen glukoza bağımlıdır. Plasentada glukoz transportu kolaylaştırılmış glukoz taşıyıcı proteinler tarafından gerçekleştirilir. Sıçan plasentasında glukoz da dahil birçok maddenin materno-fetal değişimi labirint zonda gerçekleşir.

İnsan ve sıçan plasentalarında glukoz transportu esas olarak GLUT1 ve GLUT3 tarafından gerçekleşir. GLUT1 sıçan plasentasının hem bağlantı hem de labirint zonunda mevcuttur. GLUT1' in immunohistokimyasal ifadesi gebeliğin ortasında bağlantı zonunda en yüksektir ve gebeliğin sonuna doğru buradaki ekspresyonu düşer (Desoye ve Shafrir, 1994; Zhou ve Bondy, 1993). Bağlantı zonundaki GLUT1 ekspresyonu transplasental glukoz taşınımından ziyade hızlı plasental büyümenin metabolik gereksinimlerinin karşılanması ile ilişkilidir (Knip ve ark., 1998).

GLUT3 sıçan plasentasının sadece labirint zonunda eksprese edilir. GLUT3 ağırlıklı olarak labirint zonun içinde sinsisyal trofoblast tabakasında maternal kan ile ilişkili kısmında sinsisyal trofoblast hücrelerinin membranında eksprese edilir. Diyabetik

sıçanların plasentalarında gözlemlenen GLUT3 artışı maternal hiperglisemiden kaynaklanır (Boileau ve ark., 1995).

GLUT4 insüline bağımlı olarak çalışır. Plasenta insulin reseptörlerince zengindir. Plasenta, glikoz taşınması ve metabolizması açısından, klasik bir insülin hedefi olarak düşünülmemektedir. GLUT4 ekspresyonu hem insan hem de sıçan plasentalarında mevcuttur. GLUT4 ekspresyonu sıçan plasentasının bağlantı ve labirint zonunda benzerdir (Xing ve ark., 1998).

2.10. *Stevia Rebaudiana*

Stevia endemik bir bitki olup ve Asteraceae familyasının 950 cinsinin bir üyesidir. *Stevia*'nın 150'den fazla türü vardır. Fakat *Stevia Rebaudiana* tatlılık özelliğinden dolayı farklılık gösterir (Debnath, 2008). Anavatanı Paraguay ve Brezilya'nın subtropik bölgeleridir. Yerli halk tarafından yüzyıllardır şeker kaynağı ve tedavi edici olarak kullanılmaktadır.

Stevia, Steviol glukozitlerin varlığından dolayı oldukça tatlıdır. Bu steviol glukozitler, steviol, stevioside, rebaudioside A, B, C, D, E, F ve dulcoside'dir (Brandle ve Rosa, 1992). *Stevia*'nın yapraklarında Stevioside ve rebA daha yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Stevioside sukrozdan 110-270 kat, rebA ise sukrozdan 150-320 kat daha tatlıdır (Brandle ve ark., 2002). Artan stevioside metalik tat verir, artan rebA varlığı ise metalik tadı dengeler.

Şeker tatlandırıcı bir özelliğe sahiptir ancak içerdiği yüksek miktardaki kalori sebebiyle birçok tıbbi probleme sebep olmaktadır. Daha az kalori içeren ve şeker yerine daha fazla tatlılık sağlayan çeşitli alternatif tatlandırıcılar vardır. *Stevia*'nın doğal ve kalorisiz olması ayrıca neden olduğu tatlılığın şekere kıyasla 40 sn'den daha fazla sürmesi gibi avantajlara sahip olması nedeniyle şekere en iyi alternatif kaynak olarak ortaya çıkmaktadır (Sudesh ve Praveen, 2012). *Stevia* sadece bir besin takviyesi değil aynı zamanda tıpta ve ticari dünyada geniş bir kullanıma sahiptir.

Günümüze kadar literatürde *Stevia* ile yapılan çalışmalar aşağıda özetlenmiştir;

Stevia'nın sıçanlarda döllenme üzerindeki etkileri araştırılmış olup, *stevia* uygulaması sonrası testis, seminal vezikül, prostat ve kauda epididimisin histolojik ve morfolojik analizlerinde herhangi bir olumsuz duruma rastlanmamıştır. *Stevia*

uygulaması kauda epididimis, seminal vezikül ve testislerin ağırlıklarında azalmaya neden olmuştur. Bu seksüel bezlerin ağırlıklarındaki azalışın plazmada androjen seviyesindeki düşüşten kaynaklanabileceği ifade edilmiştir. Ayrıca stevia uygulaması kauda epididimisteki spermatozoaların konsantrasyonunda önemli azalmalara neden olmuştur (Melis, 1999).

Ağız sağlığını devam ettirebilmek için, doğal tatlandırıcılar şeker yerine kullanılan en iyi tatlandırıcılardır. Kontrollü insan ve hayvan çalışmalarında stevia'nın diş çürüklerini engellemede önemli bir rol oynadığı ortaya çıkmıştır. Stevioside ve Stevia ekstraktlarının yüksek miktarının, bakteriyal büyümeyi azaltma yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir (Matsukubo ve Takazoe, 2006).

Steviol glukozitler (stevia'ya tatlılık özelliği veren bileşenlerin adı) farklı hücrelerde glukoz transportunu düzenlemektedir. Steviol glukozitler GLUT-4'ü eksprese eden SH-SY5Y nöroblastom hücreleri ve GLUT-1'i eksprese eden HL-60 lösemi hücrelerinde uygulanmıştır. Ayrıca 100 nM insülin kullanılmıştır. Steviol glukozitler insüline benzer özellikler göstermiştir. Steviol glukozitler GLUT-1 ve GLUT-4 ekspresyonunda artışa neden olmuştur. Burada PI3K'm fosforilasyonunu artırarak sağlamıştır (Rizzo ve ark., 2013). Steviol glukozitlerin hücre viabilitesine ve proliferasyona etkisine bakılmıştır. Her iki hücre tipinde de viabilite ve proliferasyonuna herhangi bir etkisi olmamıştır (Rizzo ve ark., 2013). Steviol glukozitlerin apoptoz üzerine olumlu etkilerinin olup olmadığına bakılmıştır. Apoptoz üzerinde herhangi bir olumlu etki göstermemiştir. Hücrelere hidrojen peroksit uygulanıp oksidatif stres oluşturulmuştur ve steviol glukozitler uygulanmıştır. Kontrolle kıyaslandığında önemli bir fark görülmemiştir. Ayrıca steviol glukozit uygulaması yapılan hücrelerde kontrole yakın laktat dehidrogenaz aktivitesi görülmüştür (Rizzo ve ark., 2013).

Omentin kan glukozunu düzenleyen bir adipositokindir. Yapılan çalışmada stevia'nın artan dozlarının omentin miktarını önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Stevia omentin seviyesini dolaylı olarak negatif feedback aracılığıyla azaltır. Ayrıca stevia uygulanan STZ-indüklü diyabetik sıçanların açlık kan glukozları kontrole kıyasla azalmıştır (Akbarzadeh ve ark., 2014).

Uzun süreli yağ asitlerine maruz kalma α hücrelerinden glukagon salgılanmasına neden olur. Aşırı glukagon seviyesi hiperglisemik bir duruma neden olabilir. Bu da insülin direncine ve ilerki dönemde diyabete neden olabilir. Yapılan çalışmada α -TC1-6 hücreleri uzun süre palmitata maruz bırakılmıştır. Palmitat α -TC1-6 hücrelerinde glukagon salgılanmasında artışa neden olmuştur. Daha sonra da palmitata ek olarak ayrı ayrı artan dozlarda stevioside verilmiştir. Stevioside palmitatın neden olduğu glukagon salgısı artışına doz bağımlı olarak etki göstermiştir. Stevioside miktarı arttıkça α -TC1-6 hücrelerinden salgılan glukagon miktarının artışında azalma olmuştur. Stevioside yağ asitleri oksidasyonunda görev alan genlerden CPT I, SCD ve PPARy ekspresyonunda artışa neden olmuştur. Ancak stevioside uygulaması TG (trigliserit) içeriğine herhangi bir etki göstermemiştir (Hong ve ark., 2005).

Sıçanlar alloksan ile diyabet yapılmıştır. Stevia, alloksan uygulamasından sonra artış gösteren kan glukoz miktarını azaltmıştır. Sadece stevia diyeti alan grupta kontrole kıyasla kan glukoz miktarında anlamlı bir değişim yoktur. Sıçanlara yüksek doz glukoz (1.5 mg/kg vücut ağırlığı oranında) uygulanıp 0,30,60 ve 120. dakikalarda oral glukoz tolerans testi (OGTT) yapılmıştır. Stevia uygulanan gruplarda glukoz seviyesi zamana bağlı olarak azalmıştır. Diyabet karaciğerdeki antioksidanların (superoksit dismutaz, katalaz ve Glutatyon) miktarını azaltır. Stevia uygulaması yapıldığında bu antioksidanlardan superoksit dismutaz hem stevia diyeti alan hem de diyabet+stevia diyeti alan gruplarda kontrole kıyasla anlamlı değişimler olmuştur. Diyabet+stevia grubunda bu antioksidanın miktarı kontroldeki miktara ulaşmıştır. Katalaz enzimi ise en çok diyabet+stevia grubunda artmıştır. Diğer gruplardaki katalaz enzim miktarını aşmıştır. Glutatyon miktarı ise stevia uygulaması ile birlikte hem diyabet+stevia hem de stevia gruplarında önemli miktarda artmıştır (Sharma ve ark., 2012).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Denekler

Bu araştırmada kullanılan 150-250 gr ağırlıkları arasındaki 24 tane wistar sıçan Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesinden elde edildi. Ortam sıcaklığı 28±4°C' idi ve denekler için normal diyet ve su kullanıldı.

3.2. Deney Planı

Deney hayvanları ünitesinden alınan dişi sıçanlar erkek sıçanlarla çiftleştirilerek gebe grupları oluşturuldu. Bütün gruptaki dişi hayvanlar, 2 dişi+1 erkek wistar sıçan olacak şekilde kafese yerleştirildi. Ertesi gün vajinal simir işlemi yapılarak sperm görülmesi halinde deneklerin gebeliğın 0. gününde olduğu kabul edildi.

Stevioside gruplarındaki hayvanlara 1,0 mg/kg vücut ağırlığı oranında intraperitoneal şekilde stevioside enjekte edildi. 15. gün stevioside ve diyabet + stevioside grupları için 15 gün ve 20. gün stevioside ve diyabet + stevioside grupları için 20 gün stevioside enjeksiyonu yapıldı. Diyabet yapılacak olan sıçanlara, 50 mg/kg streptozotosin (STZ) ile intraperitoneal olarak tez doz enjeksiyon yapıldı (Özcan ve ark., 2012). STZ enjeksiyonundan 2 gün sonra, kan örnekleri sıçanın kuyruk veninden alındı ve glukoz seviyesi ölçüldü. Kan glukoz değeri > 200 mg/dL'den yüksek olan hayvanlar diyabet olarak kabul edildi.

Gebeliğın 15. gününde gebe grubundaki dişi sıçanların yarısı sakrifiye edildi ve plasenta ve fetüsleri alındı. Gebeliğın 20.gününde de geriye kalan hayvanlar sakrifiye edilip ve plasenta ve fetüsleri alındı. Alınan plasenta ve fetüsler tartıldı. Plasenta dokularına western blot ve immünohistokimya metodları için rutin takip işlemleri yapıldı. Devamında ise immunohistokimyasal ve western blot metodlarıyla GLUT 1, GLUT 3 ve GLUT 4 proteinleri araştırıldı. Glukoz ve insülin tayini 0., 9., 15., gebe 15 ve gebe 20 günlerde periferel kan alınıp glukometre ve Elisa yöntemiyle tespit edildi.

Gebe grubu 4'e ayrıldı. Bunlar;

Grup I- Kontrol grubu n=6 (3 dişi gebeliğin 15.gün, 3 dişi gebeliğin 20.gün)

Grup II- Stevioside grubu n=6 (3 dişi gebeliğin 15.gün, 3 dişi gebeliğin 20.gün)

Grup III- Diyabet grubu n=6 (3 dişi gebeliğin 15.gün, 3 dişi gebeliğin 20.gün)

Grup IV- Diyabet+Stevioside grubu n=6 (3 dişi gebeliğin 15.gün, 3 dişi gebeliğin 20.gün)

3.3. Diyabet Modelinin Oluşturulması

Diyabet grubunu oluşturmak için sıçanlara, 50 mg/kg STZ ile intraperitoneal olarak tek doz enjeksiyon yapıldı (Özcan ve ark.,2012). STZ enjeksiyonundan 2 gün sonra, kan örnekleri sıçanın kuyruk veninden alınarak, accu chek active cihazı ile kan glukoz seviyesi ölçüldü. Kan glukoz değeri > 200 mg/dL'den büyük ise hayvanlar diyabet olarak kabul edildi.

3.4. Doku Temini ve Hazırlanması

Gebeliklerinin 15 ve 20. günlerindeki diyabet, stevioside, diyabet+stevioside ve kontrol grubundaki sıçanlar eter anestizisi altında bayıltılıp diseksiye edildikten sonra, plasenta ve fetüsleri alınıp değerlendirildi. Öncelikle fetüs ve plasentalar hassas terazide tartılıp ağırlıklar belirlendi. Plasentaların bir kısmı immünohistokimyasal yöntem için doku takibi işlemine alınırken, geriye kalan kısmı ise western blot yöntemi için -80°C' ye alınıp işlem yapılana kadar orada muhafaza edildi.

3.5. İmmünohistokimya Tekniği için Doku Hazırlanması

Sıçanların plasenta dokuları alınıp %10 formalin ile yaklaşık olarak 16-20 saat fikse edildi. Bu dokular 3 saat musluk suyunda yıkandı. Dokular %70, 80 ve 90 alkol serilerinde 1 gün kaldı. %100 alkolde ise 3-3,5 saat bırakıldı. Her bir ksilol serisinden 2'şer dakika geçirilerek parafine alındı. Dokuları, parafin I-II-III'te 1'er saat tuttuktan sonra temiz parafinle etüvün dışına çıkartılıp gömme işlemi yapıldı. Parafin bloklardan 5 mikrometre kalınlığında kesitler lama alındı ve 60 °C etüve konulup dokunun lama iyice yapışması sağlandı.

Kullanılan Solüsyonlar:

- **Sitrat Tamponu**
 - ✓ 2,1 gr sitrik asit monohidrat
 - ✓ 900 ml distile su
 - ✓ Ph:6'ya ayarlanır (2M'lık NaOH eklenerek).
- **PBS (Phosphate Buffered Saline-Fosfat tamponlu tuz)**
 - ✓ 16 gr Sodyum Klorür
 - ✓ 0,8 gr Potasyum dihidrojen fosfat
 - ✓ 2,85 gr disodium hidrojen fosfat
 - ✓ 2 lt distile su
 - ✓ Ph:7,2-7,4 arası olmalıdır. Ayarlama yapılmaz.
- **%3 Hidrojen peroksit**
 - ✓ 7 ml %30 hidrojen peroksit
 - ✓ 63 ml metanol
- **AEC (3 amino ethyl carbazole)**
 - ✓ 20 µl AEC kromojen
 - ✓ 980 µl AEC substrat

3.5.1. İmmünohistokimya Prokolü

- Ksilol I ve II 10'ar dakika
- %100, %90, %80, %70 alkol ve distile su 5'er dakika
- Antigen Retrieval: Fiksasyon sırasında kapanan antijenik epitoplari açmak için yapılır. Sitrat Tamponu mikrodalgada 804 watt 6+6+6 dakika
- Soğutma 20 dakika
- PBS yıkama 5+5+5 dakika
- Örneğin çevresi hidrofobik kalem (pap pen) ile çizilir.
- Endojen peroksidaz aktivitesinin doyurulmasıdır. %3 Hidrojen peroksit 30 dakika
- PBS yıkama 5+5+5 dakika
- UV Block: Sekonder antikorun non-spesifik olarak bağlanabileceği alanları kapatmak için kullanılır. UV Block solüsyonu damlatılır ve 8 dk beklenir.

- Primer antikor ile inkübasyon +4°C gece boyu

Primer Antikor	Katalog Numarası	Dilüsyon
GLUT1	Abcam Ab652	1/1000
GLUT3	Abcam Ab53095	1/300
GLUT4	Abcam Ab654	1/500

Tablo 3.1. İmmünohistokimya yönteminde kullanılan primer antikorlar, katalog numaraları ve dilüsyon oranları

- PBS yıkama 5+5+5 dakika
- Thermo Primary Antibody Amplifier Quanto örneklerin üstüne damlatılır ve chamber içinde 15 dakika
- PBS yıkama 5+5+5 dakika
- Thermo HRP polymer Quanto Polyvalent örnekler üzerine damlatılır ve 45 dakika KARANLIKTA bekletilir.
- PBS yıkama 5+5+5 dakika
- Geliştirme aşamasında hazırlanan AEC slaytların üzerine damlatılır ve dokuda kırmızı boyanmalar görünene kadar devam eder. Reaksiyonu durdurmak için üzerindeki AEC'ler uzaklaştırılır ve slaytlar suya alınır.
- Mayer hematoksilen ile zıt boyama 6 saniye
- Kaiser Jelatin ile kapatma

3.6. Western Blot Tekniği için Doku Hazırlanması

Kullanılan Solüsyonlar:

- **Lizis Tamponu**
 - ✓ 10 ml 0,1 M Tris (ph: 7,4)
 - ✓ 1 ml Sodyum orthovanadate
 - ✓ 1 gr SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)
 - ✓ 90 ml distile su
- **Proteaz İnhibitör Kokteyli (25x)**
 - ✓ 1 tablet Roche PİK (proteaz inhibitör kokteyli tablet)
 - ✓ 1 ml distile su
- **Lowry A solüsyonu**
 - ✓ 2gr NaOH
 - ✓ 10,6 gr Na₂CO₃

- **Lowry B solüsyonu**
 - ✓ 1gr $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$
 - ✓ 100 ml distile su
- **Lowry C solüsyonu**
 - ✓ 1gr $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
 - ✓ 100 ml distile su
- **%30 akrilamid-bisakrilamid solüsyonu**
 - ✓ 7,7 gr Akr/ Bis (37.5:1) Biorad 161-0125
 - ✓ 20 ml distile su
- **Ayrırma Jeli Solüsyonu**
 - ✓ 18,15 gr Tris
 - ✓ 0,4 gr SDS
 - ✓ 100 ml distile su
 - ✓ ph: 8,8
- **Toplama Jeli Solüsyonu**
 - ✓ 6,05 gr Tris
 - ✓ 0,4 gr SDS
 - ✓ 100 ml distile su
- **%10 APS**
 - ✓ 0,1 gr APS
 - ✓ 1 ml distile su
- **Elektroforez Solüsyonu 5x**
 - ✓ 9 gr Tris
 - ✓ 43,2 gr Glisin
 - ✓ 600 ml distile su
 - ✓ ph: 8,3-8,6 arası çıkmalı
- **Elektroforez Solüsyonu 1x**
 - ✓ 180 ml Elektroforez 5x
 - ✓ 720 ml distile su
- **Blotlama Solüsyonu**
 - ✓ 3 gr Tris
 - ✓ 14,3 gr Glisin
 - ✓ 800 ml distile su

- ✓ 200 ml metanol
- **TBS 10x**
 - ✓ 60,55 gr Tris
 - ✓ 87,66 gr Sodyum Klorür
 - ✓ 800 ml distile su
 - ✓ ph: 7,4' e ayarla
 - ✓ Son hacim 1000 ml'ye distile su ile tamamla
- **TBS-T**
 - ✓ 100 ml TBS
 - ✓ 900 ml distile su
 - ✓ 1 ml Tween 20

3.6.1. Lizat Hazırlama

-80 C'de kriotüpte muhafaza edilen plasenta örnekleri buz içine alındı. Sırayla örnekler alınıp bistüri yardımıyla ezildi ve akışkan kıvama getirildi. Bunların darası alınıp ependorfa koyulup ağırlıkları tartıldı. 0,2 gr örnek için 600 µl lizis buffer ve 25 µl Proteaz inhibitör kokteyli koyuldu. 45 dakika-1 saat bekledikten sonra, protein ayırmanın iyi bir şekilde olması için sonikatör uygulandı. Eppendorfların içindeki dokular vortekslendi ve 15.000 rpm'de 15 dakika +4° C'de santrifüj edildi. Süpernatantlar alınıp pelet kısmı atılarak lizatlar hazırlandı. Hazırlanan lizatlar -20° C de muhafaza edildi.

3.6.2. Protein Miktarının Tayin Edilmesi

Hazırlanan lizatların içerdiği protein miktarının belirlenmesi için Lowry yöntemi (Lowry ve ark., 1951) kullanıldı. Öncelikle, bu yöntemde standartların hazırlanabilmesi için 1mg/ml şeklinde BSA (Bovine serum albumin Fraction V, Sigma Katalog No: A 9647) hazırlandı. BSA ile 6 tane standart hazırlandı. Bu standartlar şu şekildedir :

	BSA 1mg/ml	dH2O	Değerleri
Standart 1	20	-	1
Standart 2	20	20	0.5
Standart 3	20	40	0.33
Standart 4	20	60	0.25
Standart 5	20	100	0.166
Standart Kör	-	20	0

Tablo 3.2. Standartların hazırlanması ve değerleri

Lizatlar, 1:40 dilusyonlar halinde çalışıldı, yani örnekten 10µl distile sudan ise 390µl alındı. Hazırlanan standartlardan ve örneklerin her birinden 20 µl alındı. Lowry A, Lowry B ve Lowry C solüsyonları oda sıcaklığına alındı. Öncelikle Lowry B ve Lowry C solüsyonları 1'er oranda alınıp vortexlendi. Daha sonra Lowry A 100 birim şeklinde bu karışımın içine koyuldu. Lowry A:B:C karışımından 600 µl her bir örneğe ve standarta koyuldu ve 20 dakika inkübe edildi. İnkübe edildikten sonra her birine 60 µl folin koyulur ve karanlık ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon işleminden sonra 96'lık well plate'lere 200'er mikrolitre pipetlendi ve her bir standart ve örnek çift çalışıldı. Spektrofotometrede (BioTek, MQX200) 750nm dalga boyunda okunması sağlandı. Standartlar ile karşılaştırılarak her bir numunenin protein miktarı tespit edildi. Tüm numunelerin protein miktarlarının eşit olması sağlanarak western blot analizlerinde kullanıma hazır hale getirildi.

3.6.3. SDS-PAGE Western Blot protokol

- Proteinin ayrılma yüzdesine göre jel hazırlandı. Primer antikolar 40-60 kilodalton arasında olduğu için %10'luk ayırma jeli kullanıldı. Ayırma jelinin üzerine camı tamamen kaplayacak şekilde distile su koyuldu.
 - ✓ %10'luk ayırma jeli (1 jel için)
 - ✓ 1660 µl distile
 - ✓ 1000 µl ayrılma solüsyonu (ph: 8,8)
 - ✓ 1320 µl poliakrilamid (bisakrilamid)
 - ✓ 5 µl TEMED
 - ✓ 30 µl APS
- %5'lik toplama jeli kullanıldı. Tarak iki cam arasına takıldı.
 - ✓ %5 toplama jeli (1 jel için)
 - ✓ 1155 µl distile su
 - ✓ 500 µl toplama solüsyonu
 - ✓ 330 µl poliakrilamid
 - ✓ 2,5 µl TEMED
 - ✓ 15 µl APS
- Toplama jelinin donmasından sonra taraklar çıkartıldı. Taraklar çıkartıldıktan sonra camlar birbirine bakacak şekilde dikey elektroforeze yerleştirildi. Camların arasına 1x elektroforez solüsyonu döküldü. İlk kuyuca molekül ağırlığı bilinen 5 µl marker (biorad- 1610374 precision plus protein dual color) yüklendi. Marker

yüklendikten sonra örnekler yüklendi. GLUT1 için 25 mikrogram protein yüklenirken GLUT3 ve GLUT4 için 50 mikrogram protein yüklendi.

- Tank güç kaynağına bağlandı. Güç kaynağı 80 V'a ayarlandı. Bu şekilde 2-2,5 saat yürütme işlemi gerçekleştirildi.
- Elektroforez işleminin sonlarına doğru filtre kağıdı 7x10 ve PVDF membran 6x9 olacak şekilde kesildi.
- Blotlama solüsyonu hazırlanır ve +4° C'ye koyuldu.
- Elektroforez bitince camlar çıkartıldı. İnce ve kalın camların arası ince bir bıçak yardımıyla ayrıldı. Alta kalın sünger üstüne filtre kağıdı, membran ve bunun üzerine de jel yerleştirildi. Jelin üstüne de aynı şekilde membran, filtre kağıdı ve kalın sünger koyulup tankın içine yerleştirildi. Güç kaynağı 30 V'a ayarlanıp +4°C'de gece boyu blotlamaya bırakıldı.
- Sonraki gün blotmadan çıkartılan membrana proteinin geçipi geçmediğinden emin olmak için ponsu boyaması yapıldı. Ponsu boyamasını çıkartmak için 1-2 kere TBS-T yapıldı.
- GLUT1 için % 5 süt tozu ile 1 saat bloklama, GLUT3 ve GLUT4 için % 2,5 süt tozu ile 45 dakika bloklama yapıldı.
- Bloklamadan sonra +4° C'de primer antikor ile inkübasyon yapılır. GLUT1 (ab652) 1/1000, GLUT3 (ab15311) 1/500 ve GLUT4 (ab654) 1/2000 dilisyonda antikorlar hazırlandı.
- Sonraki gün membrandan primer antikor alınır ve tekrar tekrar kullanılır. TBS-T ile 3x10 dakika yıkama yapıldı.
- Sekonder antikorlar hazırlanır. GLUT1 için 1/10000, GLUT3 için 1/2500 ve GLUT4 için 1/10000 şeklinde hazırlandı.
- TBS-T yıkama yapıldı.
- Yıkamadan sonra ışımaya için kemilüminesan uygulandı.
- Membranın üzerine film koyuldu ve geliştirme yapıldı.

3.7. Elisa Yöntemi İçin Kan Örneklerin Eldesi

Hayvanlar diseksiye edilmeden önce, eter anestizisi altında abdominal aortasından enjektör yardımıyla kanı alındı. Alınan kan, vakumlu kan tüpüne aktarılır ve zaman geçirmeden santrifüj edildi. Kan örneği 4000-5000 devirde 5 dakika santrifüje edildi. Santrifüj işleminden sonra serum kısmı alındı ve diğer kısmı tıbbi atığa atıldı. Elde edilen kan serumları -20° C'ye kaldırılıp muhafaza edildi.

3.7.1. Elisa Yöntemi Protokolü

Deneklerin serumlarındaki insülin miktarını belirlemek için Sıçan/Fare İnsulin EZRMI-13K elisa kiti kullanıldı. Elisa protokolü olarak üreticinin önerdiği protokol uygulandı.

Sıçan/Fare İnsulin EZRMI-13K elisa kiti için uygulanan protokol aşağıda bulunmaktadır;

1. 10 X yıkama solüsyonu 1 X olacak şekilde dH₂O ile dilüe edildi.
2. Kit içerisinde gönderilen striplerden ihtiyaç duyulan kadar alınarak stripteki her bir kuyucuk 300 µL yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı. Bu sırada kuyucukların kurumasına izin verilmemelidir.
3. Kör ve örnek konulacak olan kuyucuklara 10 µL Assay solüsyonu konuldu.
4. Kullandığımız örnekler serum olduğu için kör standart ve kontrol kuyucuklarına 10 µL Matriks solüsyonu konuldu.
5. 0,2 ng/mL(STD 1), 0,5 ng/mL (STD 2), 1 ng/mL (STD 3), 2 ng/mL (SDT 4), 5ng/mL (SDT 5) ve 10 ng/mL (SDT 6) konsantrasyonundaki standartlar duplike olarak kuyucuklara yüklendi.
6. Kalite kontrolü örnekleri olan QC 1 ve QC 2 yine duplike olarak 10 µL yüklendi.
7. Örnekler ilgili kuyucuklara duplikler halinde yüklendi.
8. 80 µL antikor solüsyonu her bir kuyucuğa eklenir ve yapışkan kapatıcı film ile iyice kapatılarak oda sıcaklığında sallayıcı üzerinde 2 saat inkübe edildi.
9. Kapatıcı film kaldırıldı ve solüsyonlar uzaklaştırıldı.
10. Kuyucuklar 300 µL yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı.
11. 100 µL enzim solüsyonu her bir uyucuğa eklendi ve yapışkan kapatıcı film ile iyice kapatılarak oda sıcaklığında sallayıcı üzerinde 30 dakika inkübe edildi.
12. Kapatıcı film kaldırıldı ve solüsyonlar uzaklaştırıldı.
13. Kuyucuklar 300 µL yıkama solüsyonu ile 6 kez yıkandı.
14. 100 µL substrat solüsyonu kuyucuklara eklendi ve yapışkan kapatıcı film ile iyice kapatılarak oda sıcaklığında sallayıcı üzerinde 5-20 dakika inkübe edildi. Kuyucuklarda mavi rengin gözlemlenmesi reaksiyonun durdurulmasına karar vermede rol oynar. Substrat solüsyonu ile yapılan tüm çalışmalar karanlıkta yapılmalıdır.

15. 100 µL durdurma solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu. Tamamen durdurulduğundan emin olmak için plate elle sallanmalı ve mavi rengin net sarı renge dönüştüğü gözlemlenmelidir.

16. Plate 450-590 nm absorbands değerinde spektrofotometre ile okutuldu. Kuyucuklarda hiç köpük kalmamasına dikkat edilmelidir.

	Adım 1	Adım 2	Adım 3	Adım 4	Adım 5 - 7	Adım 8	Adım 9-10	Adım 11	Adım 12 - 13	Adım 14	Adım 14	Adım 15	Son
Kuyucuk			Assay Solüsyonu	Matriks Solüsyonu	STD/CQ/ ÖRN	Antikor Solüsyonu		Enzim Solüsyonu		Substrat		Durdurma Solüsyonu	
A1, B1	10 x yıkama solüsyonu 1 X olacak şekilde dilite edilir.	Her bir kuyucuk 300 µL yıkama solüsyonu ile 3 kere yıkanır.	10 µL	10 µL	-	80 µL	2 saat oda sıcaklığında sallayıcı üzerinde ağzı kapalı inkübasyon yapılır. Her bir kuyucuk 300 µL yıkama solüsyonu ile 3 kere yıkanır.	100 µL	30 dakika oda sıcaklığında sallayıcı üzerinde ağzı kapalı inkübasyon yapılır. Her bir kuyucuk 300 µL yıkama solüsyonu ile 6 kere yıkanır.	100 µL	5- 20 dakika oda sıcaklığında sallayıcı üzerinde ağzı kapalı inkübasyon yapılır.	100 µL	450-590 nm absorbands spektrofotometre ile okutulur.
C1, D1			-	10 µL	10 µL STD 1	80 µL		100 µL		100 µL			
E1, F1			-	10 µL	10 µL STD 2	80 µL		100 µL		100 µL			
G1, H1			-	10 µL	10 µL STD 3	80 µL		100 µL		100 µL			
A2, B2			-	10 µL	10 µL STD 4	80 µL		100 µL		100 µL			
C2, D2			-	10 µL	10 µL STD 5	80 µL		100 µL		100 µL			
E2, F2			-	10 µL	10 µL STD 6	80 µL		100 µL		100 µL			
G2, H2			-	10 µL	10 µL QC 1	80 µL		100 µL		100 µL			
A3, B3			-	10 µL	10 µL QC 2	80 µL		100 µL		100 µL			
C3, D3			10 µL	-	10 µL Örnek	80 µL		100 µL		100 µL			

Tablo 3.3. Eliza Yöntemi Protokolü

3.8. İstatiksel Analiz

3.8.1. Kan Glukoz Ölçümleri

Alınan deney hayvanları deneye başlarken 0. gün kabul edilerek kan glukoz ölçümleri gerçekleştirildi. Bu işlem 9., 15. ve 20.günde de yapıldı. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olup olmadığını belirlemek için SigmaStat 3.5 programı kullanılarak Student t-test ve One Way ANOVA testleri uygulandı ve p<0.05 olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.8.2. Fetüs ve Plasenta Ağırlıkları

Kontrol, stevioside, diyabet ve diyabet+stevioside gruplarına ait gebe sıçanların plasenta ve fetüsler alınıp, western blot yöntemi için kullanılan plasentaların ve bu plasentalara ait fetüslerin ağırlıkları hassas terazi ile ölçüldükten sonra gruplar

arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olup olmadığını belirlemek için SigmaStat 3.5 programı kullanılarak Student t-test ve One Way ANOVA testleri uygulandı ve $p < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.9. Semikantitatif Değerlendirme

Tüm deney gruplarında hücrelerin immüno boyanma yoğunlukları semikantitatif olarak [(-): Negatif, (+/-): Zayıf pozitif, (+): Pozitif, (++): Kuvvetli pozitif, (+++): Çok kuvvetli pozitif] şeklinde değerlendirildi.

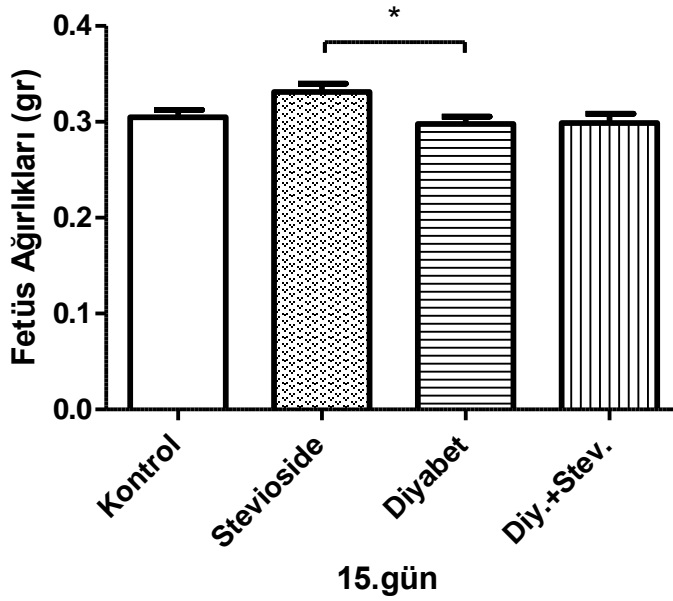
4. BULGULAR

4.1. Fetüs Ağırlıkları

Kontrol, stevioside, diyabet ve diyabet+stevioside gruplarına ait 15. gün fetüs ağırlıkları ölçüldü. Fetüs ağırlıklarının ölçümleri sonucunda, fetüs ağırlıkları en yüksek olan grup stevioside grubu olarak tespit edildi. Gebeliğin 15. gününde stevioside ve diyabet grupları arasında istatistiksel anlamlı fark ($p<0,05$) tespit edildi (Tablo 4.1., Şekil 4.1.). Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi ($p>0,05$).

15. gün Fetüs ağırlıkları (gr)	Ortalama± Standart Sapma, n değeri
Kontrol	0,304±0,0239 (n=21)
Stevioside	0,325±0,0201 (n=18)
Diyabet	0,297±0,0236 (n=18)
Diyabet+Stevioside	0,298±0,0292 (n=21)

Tablo 4.1. 15. gün fetüs ağırlıkları (ortama ± standart sapma, n (fetüs sayısı) değerleri)



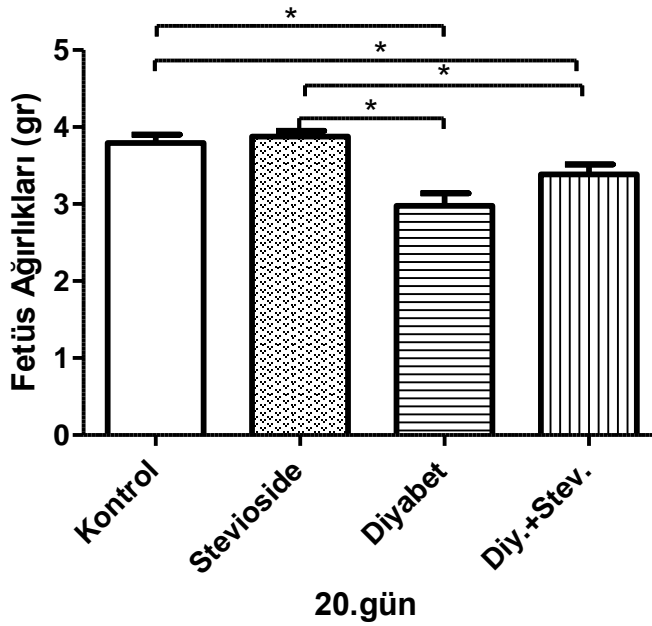
Şekil 4.1. Gebeliğin 15. gününe ait kontrol, stevioside, diyabet ve diyabet+stevioside gruplarına ait fetüs ağırlıkları. (* $p<0,05$)

Gebeliğin 20. gününde fetüs ağırlıklarında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark ($p<0,05$) tespit edildi. 20.gün fetüs ağırlıklarında diyabet grubu kontrol ve stevioside gruplarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı oranda ($p<0,05$) azaldığı belirlendi (Tablo 4.2., Şekil 4.2.). Diyabet+stevioside grubu kontrol ve

stevioside gruplarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı oranda ($p<0,05$) azaldığı belirlendi. Diyabet ve diyabet+stevioside grupları arasında istatistiksel olarak bir fark belirlenmedi ($p>0,05$).

20. gün Fetüs ağırlıkları (gr)	Ortalama±Standart Sapma, n değeri
Kontrol	3,793±0,0678 (n=19)
Stevioside	3,876±0,0597 (n=24)
Diyabet	2,978±0,177 (n=20)
Diyabet+Stevioside	3,385±0,148 (n=18)

Tablo 4.2. 20. gün fetüs ağırlıkları (ortama ± standart sapma, n (fetüs sayısı) değerleri)



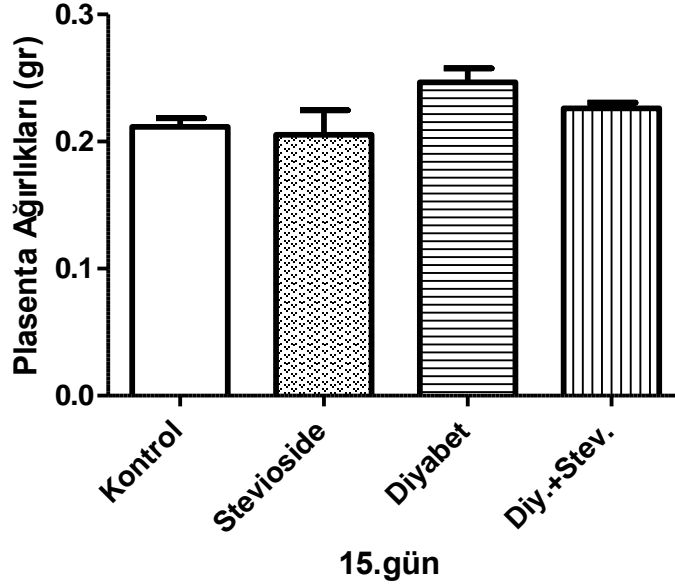
Şekil 4.2. Gebeliğin 20. gününe ait kontrol, stevioside, diyabet ve diyabet+stevioside gruplarına ait fetüs ağırlıkları. (* $p<0,05$)

4.2. Plasenta Ağırlıkları

Kontrol, stevioside, diyabet ve diyabet+stevioside gruplarına ait plasentaların ağırlıkları ölçüldü ve gerekli değerlendirmeler yapıldı. Değerlendirmeler sonucunda, gebeliğin 15. gününde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenmedi ($p>0,05$) (Tablo 4.3., Şekil 4.3.).

15. gün plasenta ağırlıkları (gr)	Ortalama±Standart Sapma, n değeri
Kontrol	0,212±0,0283 (n=21)
Stevioside	0,206±0,0610 (n=18)
Diyabet	0,243±0,0304 (n=18)
Diyabet+Stevioside	0,223±0,0290 (n=21)

Tablo 4.3. 15. gün plasenta ağırlıkları (ortama ± standart sapma, n (plasenta sayısı) değerleri)

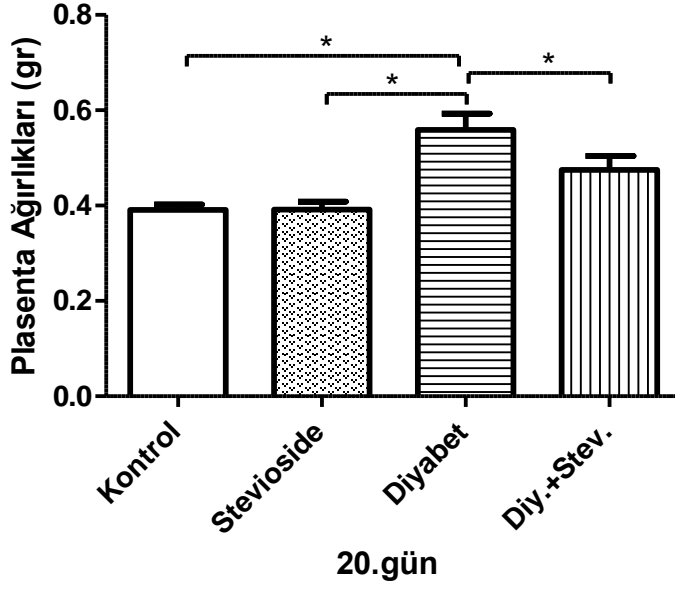


Şekil 4.3. Gebeliğin 15. gününe ait kontrol, stevioside, diyabet ve diyabet+stevioside gruplarına ait plasenta ağırlıkları. (* p<0,05)

Gebeliğin 20. gününde plasenta ağırlıklarında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark (p<0,05) tespit edildi. 20.gün plasenta ağırlıklarında diyabet grubu kontrol ve stevioside gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı oranda arttığı belirlendi. Ayrıca diyabet grubu plasenta ağırlıkları ve diyabet+stevioside grubu plasenta ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark belirlendi (p<0,05) (Tablo 4.4., Şekil 4.4.).

20. gün plasenta ağırlıkları (gr)	Ortalama±Standart Sapma, n değeri
Kontrol	0,391±0,0504 (n=19)
Stevioside	0,392±0,0563 (n=24)
Diyabet	0,559±0,109 (n=20)
Diyabet+Stevioside	0,475±0,0872 (n=18)

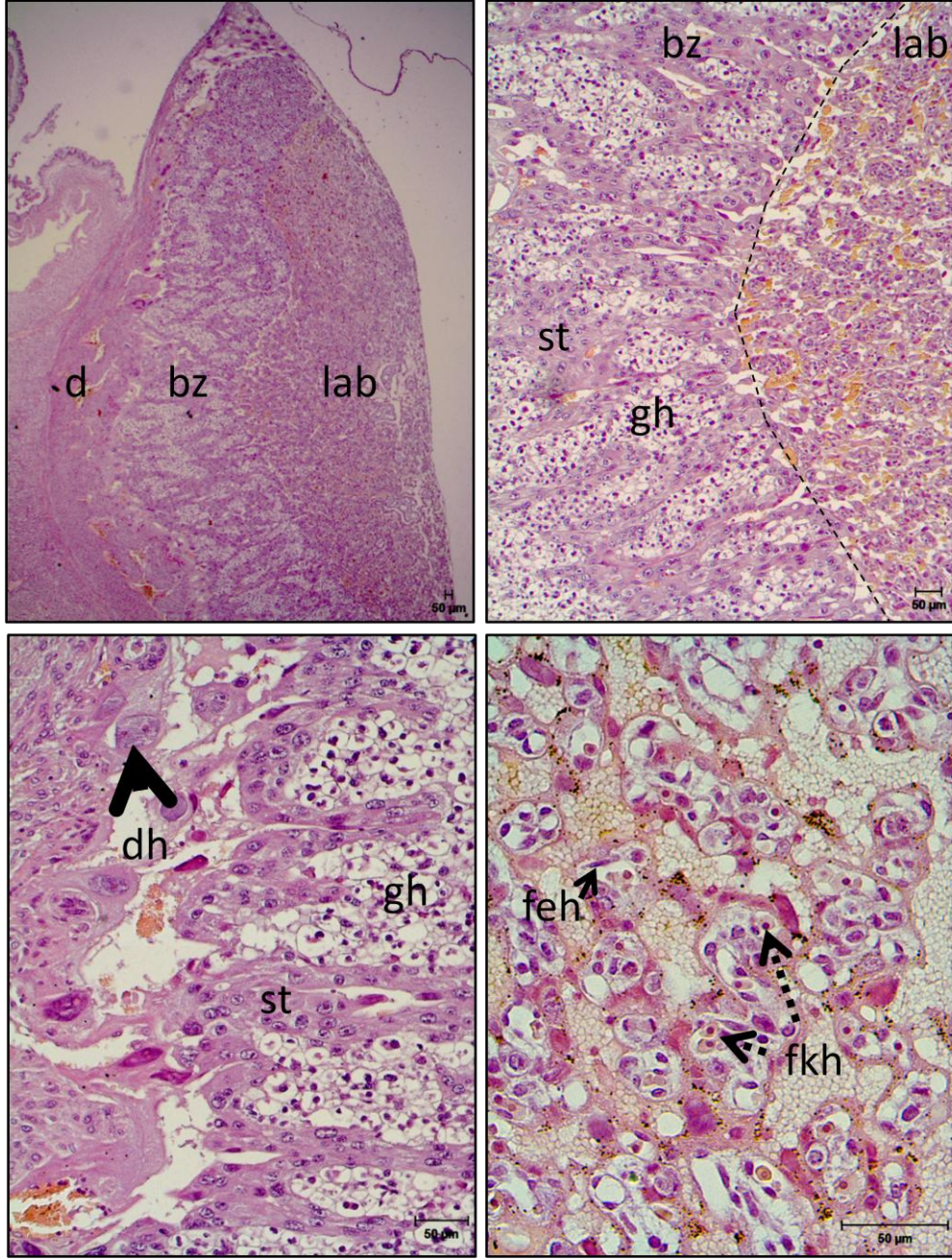
Tablo 4.4. 20. gün plasenta ağırlıkları (ortama ± standart sapma, n (plasenta sayısı) değerleri)



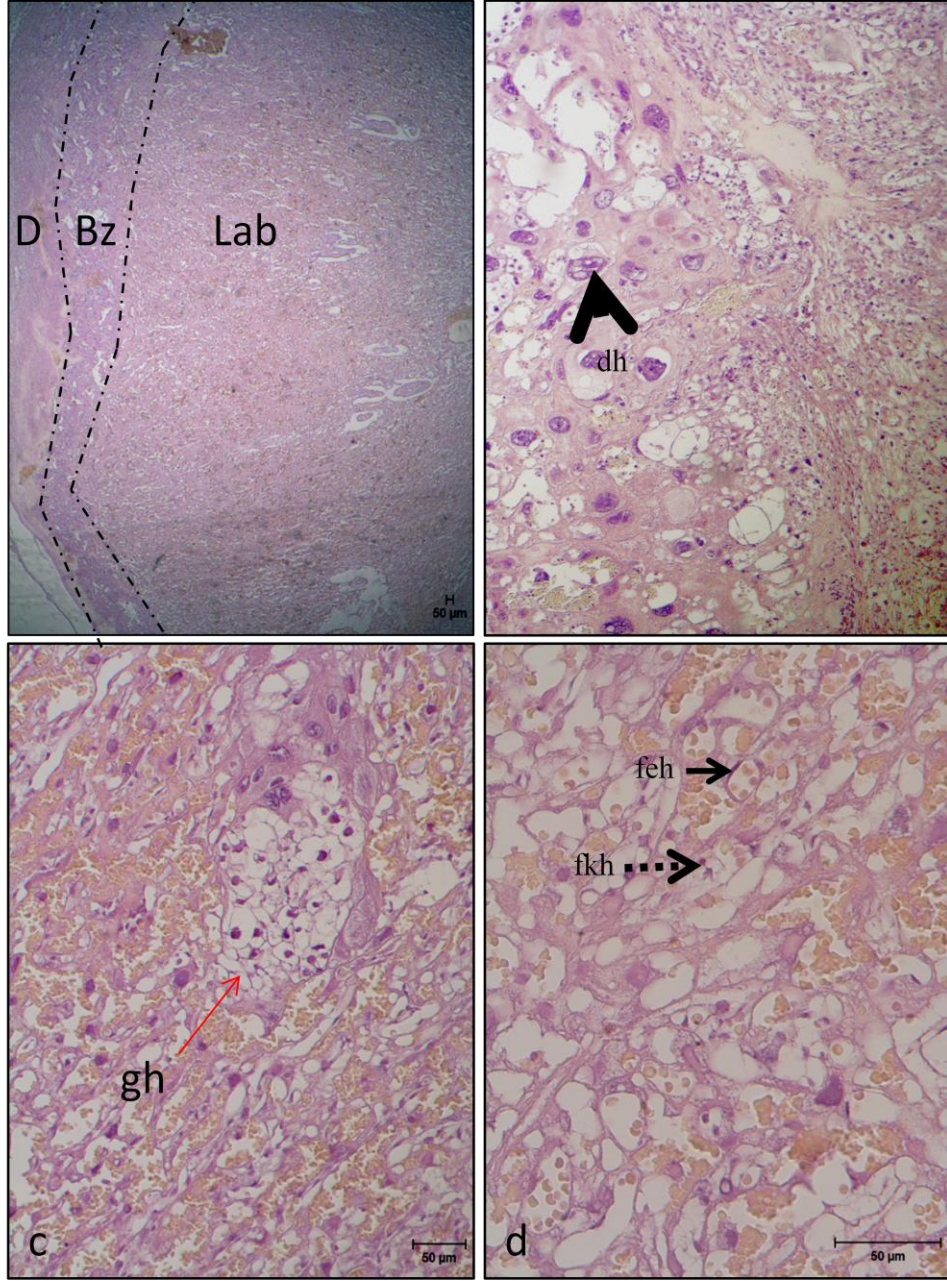
Şekil 4.4. Gebeliğin 20. gününe ait kontrol, stevioside, diyabet ve diyabet+stevioside gruplarına ait plasenta ağırlıkları. (* $p < 0,05$)

4.3. Sıçan Plasentası Genel Morfoloji

15. ve 20. güne ait sıçan plasentalarının genel morfolojik yapısı aşağıda gösterilmiştir;



Şekil 4.5. 15 günlük kontrol grubuna ait sıçan plasentasında HE boyanması a: Labirint, bağlantı ve desidua bölgeleri görülmektedir X2.5 **b:** Bağlantı zonunda glikojenik ve spongiotrofoblast hücreleri görülmektedir X10. **c:** Dev hücreler (siyah ok başı), glikojenik ve spongiotrofoblast hücreleri görülmektedir X20. **d:** Labirint zondaki fetal endotel hücreleri (siyah ok) ve fetal kan hücreleri (kesintili ok) görülmektedir X40.



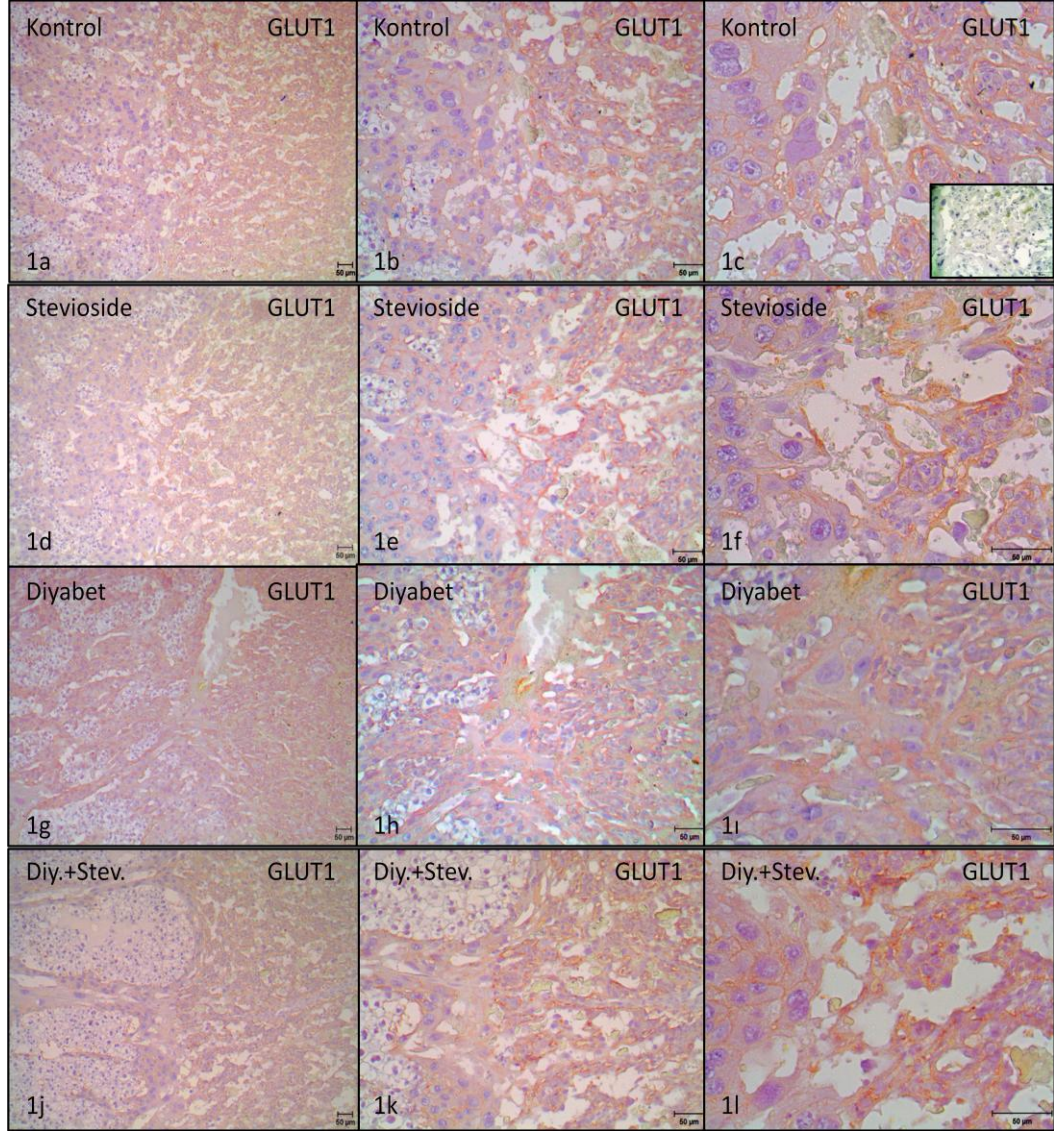
Şekil 4.6. 20 günlük kontrol grubuna ait sıçan plasentasında HE boyanması: Labirint, bağlantı ve desidua bölgeleri görülmektedir X2.5 **b:** Dev hücreler (siyah ok başı) görülmektedir X10. **c:** Labirint Zondaki glikojenik hücreler (kırmızı kesintisiz ok) görülmektedir X10. **d:** Labirint zondaki fetal kan hücreleri (kesintili ok) ve fetal endotel hücreleri (kesintisiz ok) görülmektedir X40.

4.4. İmmünohistokimyasal Bulgular

4.4.1. 15. Gün GLUT1, GLUT3 ve GLUT4 İmmün Boyamaları

Gebeliğin 15. günündeki plasentada GLUT 1 dev hücrelerde, spongiotrofoblast hücrelerinde, labirint trofoblast hücrelerinde ve fetal endotel hücrelerinde pozitif reaksiyon verirken desidua hücrelerinde, glikojenik hücrelerde, maternal ve fetal kan hücrelerinde negatif reaksiyon gösterdi.

Kontrol ve stevioside grubuna ait sıçan plasentasında labirint trofoblast hücrelerinde çok yoğun boyanma tespit edilirken diyabet ve diyabet+stevioside gruplarına ait plasentalarda labirint trofoblast hücrelerinde immün boyanma yoğunluğunun azaldığı belirlendi. Dev hücreler, spongiotrofoblast hücreleri ve fetal endotel hücrelerindeki immün boyanma yoğunlukları tüm gruplarda benzerdi.



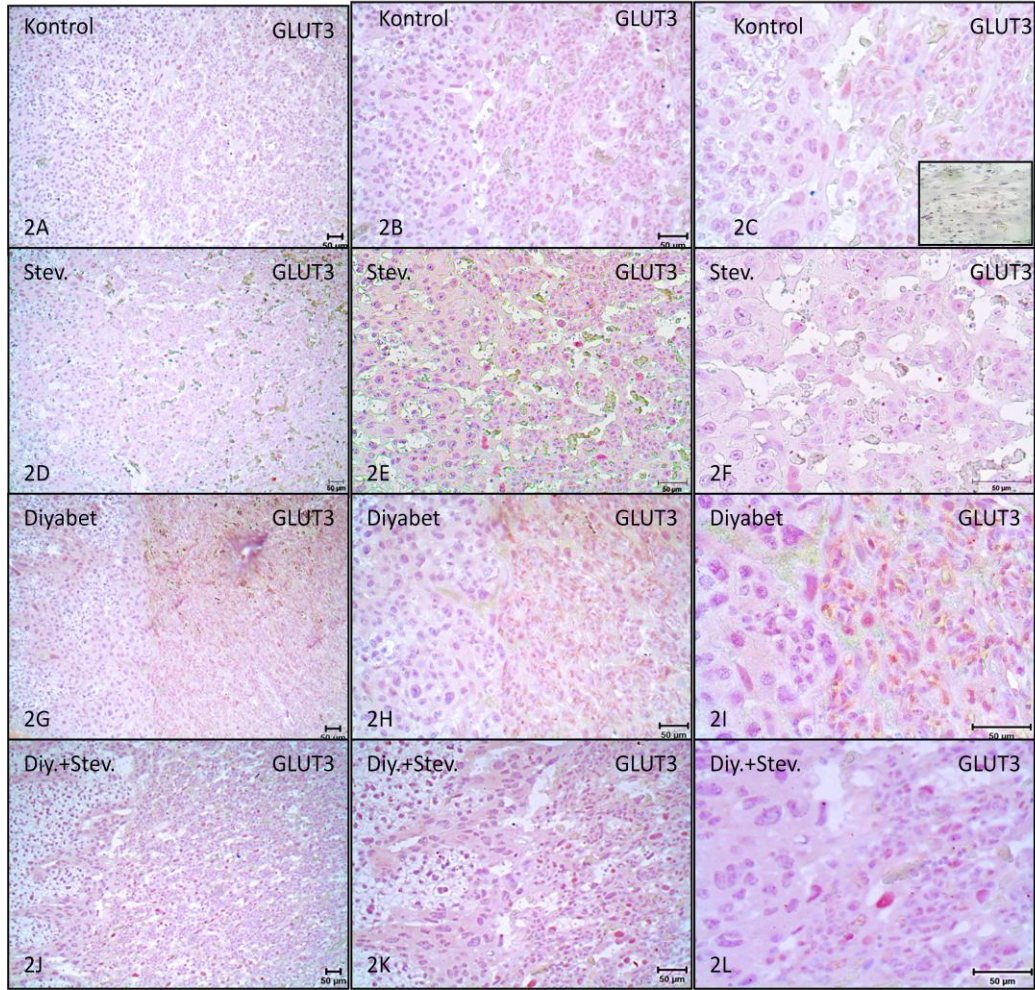
Şekil 4.7. 15. Gün sıçan plasentasında GLUT1 immünohistokimyasal boyanmaları. Kontrol grubu orijinal büyütme 10x (a). 20x (b). 40x (c). Stevioside grubu 10x (d). 20x (e). 40x (f). diyabet grubu 10x (g). 20x (h). 40x (k). diyabet+stevioside grubu 10x (l). 20x (m). 40x (n).

Kontrol, Stevioside, Diyabet ve Diyabet+ Stevioside gruplara ait GLUT1 immüno boyanma yoğunlukları semikantitatif olarak değerlendirildi ve Tablo 4.5.'de gösterildi.

15. Gebelik Günü	Des. H.	Dev H.	S.T.	Gli. H.	L.T.	F.E.H	F.K.H.	MKH
Kontrol	-	+	+	-	+++	++	-	-
Stevioside	-	+	+	-	+++	++	-	-
Diyabet	-	+	+	-	++	++	-	-
Diyabet + Stevioside	-	+	+	-	++	++	-	-

Tablo 4.5. Gebeliğini 15. gününde sıçan plasentasında GLUT1 immüno boyanma yoğunluklarının semikantitatif değerlendirmesi. Desidual Hücre: Des. H., Dev Hücre: Dev H., Spongiotrofoblast: S.T., Glikojenik Hücre: Gli. H., Labirint Dev Hücre: L.D.H., Labirint trofoblast: L.T., Fetal endotel hücre: F.E.H., Fetal Kan Hücreleri: F.K.H., Maternal Kan Hücreleri: M.K.H. (-): Negatif, (+/-): Zayıf pozitif, (+): Pozitif, (++) : Kuvvetli pozitif, (+++): Çok kuvvetli pozitif.

GLUT 3 immunohistokimyasal olarak sadece labirint trofoblast ve fetal endotel hücrelerinde pozitif reaksiyon gösterdi. Gebeliğin 15. gününde diyabet grubuna ait sıçan plasentasında labirint trofoblast ve fetal endotelde kontrol ve stevioside gruplarıyla karşılaştırıldığında daha yoğun immün boyanma tespit edildi. Diyabet+stevioside grubuna ait plasentalarda labirint trofoblast hücrelerindeki immün boyanma yoğunluğu diyabet grubuna kıyasla azaldığı belirlendi. Kontrol ve stevioside grupları arasındaki immün boyanma yoğunlukları benzerdi.



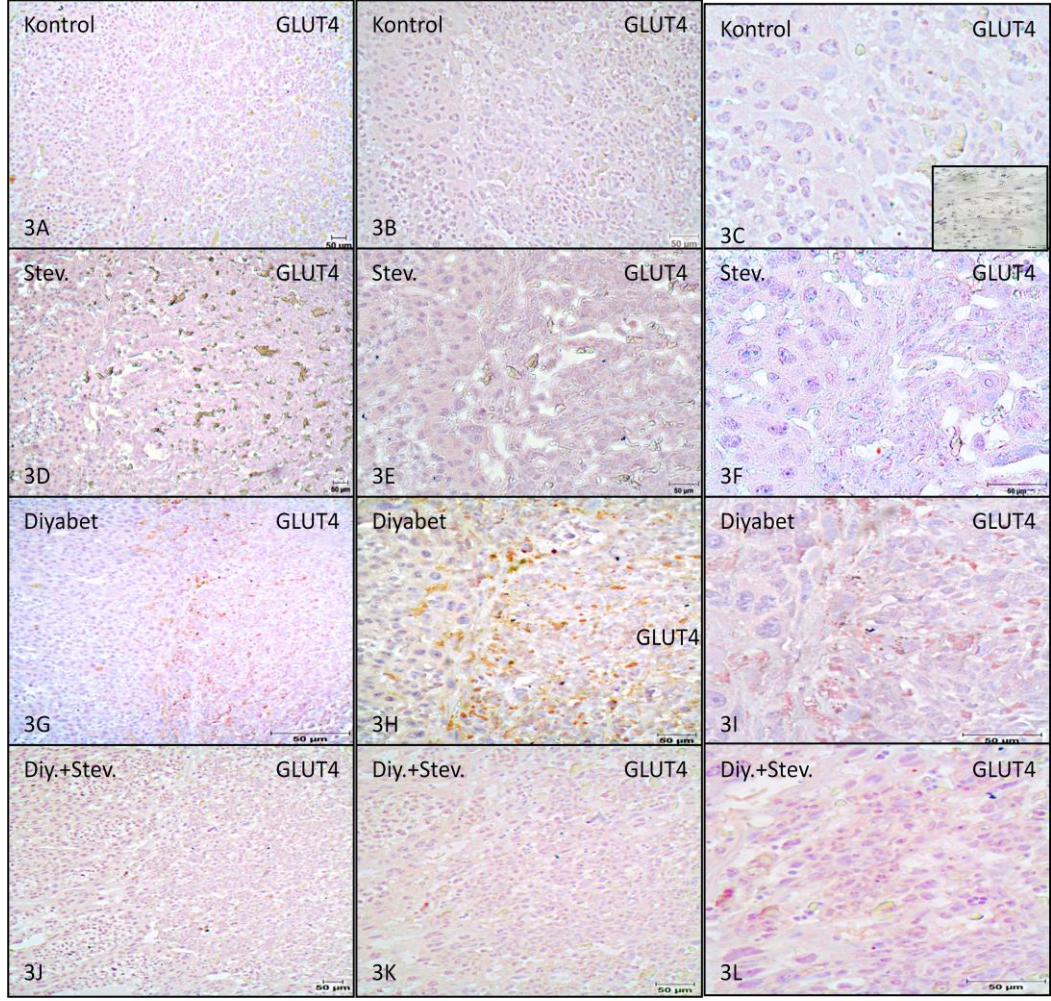
Şekil 4.8. Gebeliğin 15. gününde sıçan plasentasında GLUT3 immünohistokimyasal boyanmaları. Kontrol grubu orijinal büyütme 10x (a). 20x (b). 40x (c). Stevioside grubu 10x (d). 20x (e). 40x (f). Diyabet grubu 10x (g). 20x (h). 40x (k). Diyabet+stevioside grubu 10x (l). 20x (m). 40x (n).

Kontrol, Stevioside, Diyabet ve Diyabet + Stevioside gruplara ait GLUT3 immüno boyanma yoğunlukları semikantitatif olarak değerlendirildi ve Tablo 4.6.'da gösterildi.

15.Gebelik Günü	Des. H.	Dev H.	S.T.	Gli. H.	L.T.	F.E.H	F.K.H.	MKH
Kontrol	-	-	-	-	+	+/-	-	-
Stevioside	-	-	-	-	+	+/-	-	-
Diyabet	-	-	-	-	++	+	-	-
Diyabet + Stevioside	-	-	-	-	+	+	-	-

Tablo 4.6. Gebeliğin 15. gününde sıçan plasentasında GLUT3 immüno boyanma yoğunluklarının semikantitatif değerlendirmesi. Desidual Hücre: Des. H., Dev Hücre: Dev H., Spongiotrofoblast: S.T., Glikojenik Hücre: Gli. H., Labirint Dev Hücre: L.D.H., Labirint trofoblast: L.T., Fetal endotel hücre: F.E.H., Fetal Kan Hücreleri: F.K.H., Maternal kan hücreleri: M.K.H. (-): Negatif, (+/-): Zayıf pozitif, (+): Pozitif, (++): Kuvvetli pozitif, (+++): Çok kuvvetli pozitif.

Gebeliğin 15. gününde diyabet grubuna ait sıçan plasentasında fetal kan hücreleri kontrol ve stevioside gruplarıyla karşılaştırıldığında daha fazla immün boyanma gösterdi. Diyabet ve diyabet+stevioside grupları arasındaki immün boyanma özellikleri benzerdi. Tüm gruplarda maternal kan hücreleri benzer boyanma gösterdi.



Şekil 4.9. Gebeliğin 15. gününde sıçan plasentasında GLUT4 immünohistokimyasal boyanmaları. Kontrol grubu orijinal büyütme 10x (a), 20x (b), 40x (c). Stevioside grubu 10x (d), 20x (e), 40x (f). Diyabet grubu 10x (g), 20x (h), 40x (k). Diyabet+ stevioside grubu 10x (l), 20x (m), 40x (n).

Kontrol, Stevioside, Diyabet ve Diyabet+Stevioside gruplara ait GLUT4 immüno boyanma yoğunlukları semikantitatif olarak değerlendirildi ve Tablo 4.7.'de gösterildi.

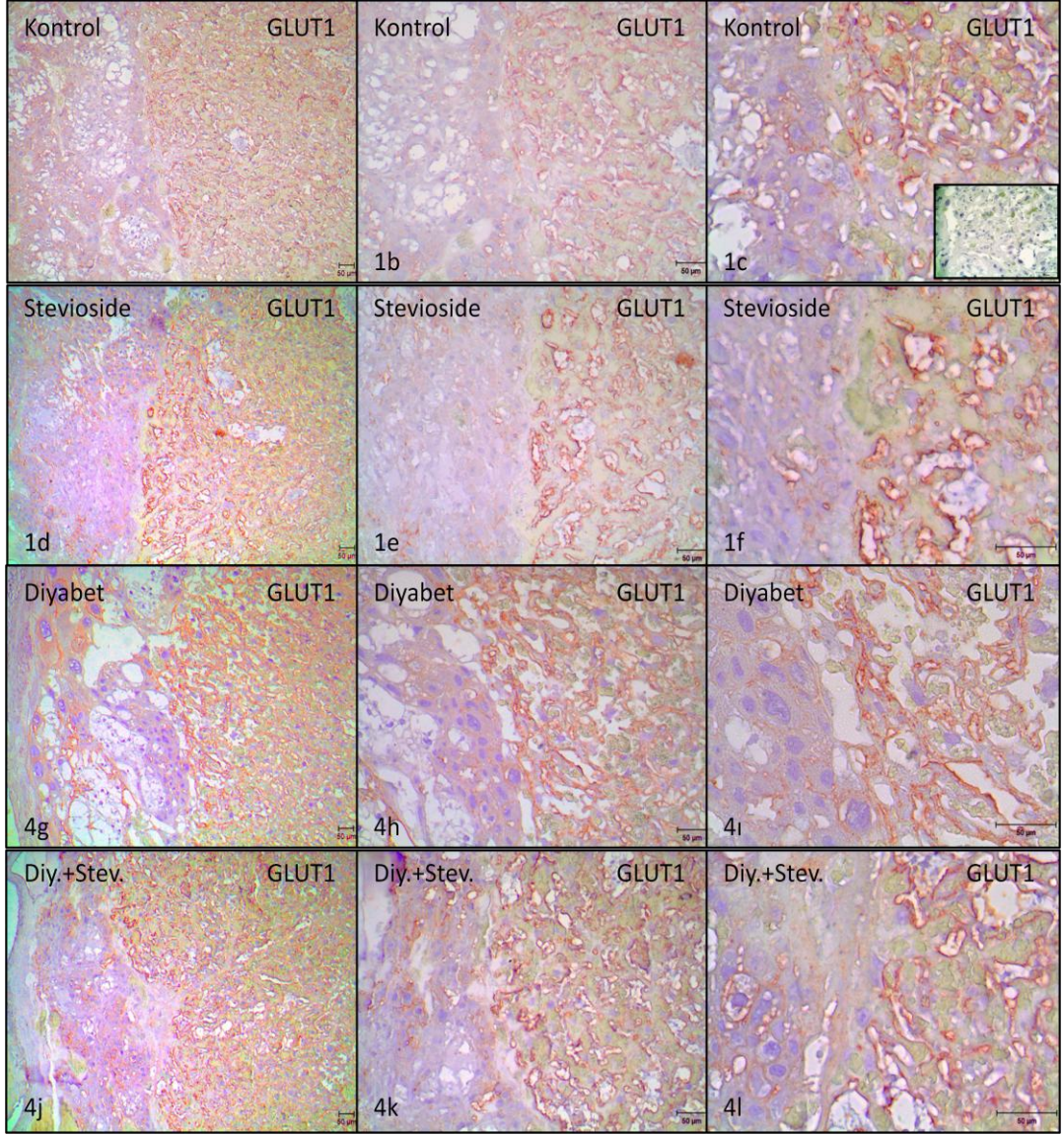
15. Gebelik Günü	Des. H.	Dev H.	S.T.	Gli. H.	L.T.	F.E.H	F.K.H.	MKH
Kontrol	-	-	-	-	-	-	+	+
Stevioside	-	-	-	-	-	-	+	+
Diyabet	-	-	-	-	-	-	++	+
Diyabet + Stevioside	-	-	-	-	-	-	++	+

Tablo 4.7. Gebeliğin 15. gününde GLUT4 immüno boyanma yoğunluklarının semikantitatif değerlendirilmesi. Desidual Hücre: Des. H., Dev Hücre: Dev H., Spongiotrofoblast: S.T., Glikojenik Hücre: Gli. H., Labirint Dev Hücre: L.D.H., Labirint trofoblast: L.T., Fetal endotel hücre: F.E.H., Fetal Kan Hücreleri: F.K.H., Maternal Kan Hücreleri: M.K.H. (-): Negatif, (+/-): Zayıf pozitif, (+): Pozitif, (++) : Kuvvetli pozitif, (+++): Çok kuvvetli pozitif.

4.4.2. 20. Gün GLUT1, GLUT3 ve GLUT4 İmmün Boyamaları

Gebeliğin 20. gününde plasentada GLUT 1 dev hücrelerde, spongiotrofoblast hücrelerinde, labirint trofoblast hücrelerinde ve fetal endotel hücrelerinde pozitif reaksiyon verirken desidual hücrelerde, glikojenik hücrelerde, maternal ve fetal kan hücrelerinde negatif reaksiyon gösterdi.

Kontrol, stevioside, diyabet ve diyabet+stevioside gruplarına ait sıçan plasentalarında labirint trofoblast hücrelerinde çok yoğun boyanma tespit edildi. Dev hücrelerdeki boyama yoğunluğu diyabet grubunda daha yoğun gözlemlenirken, spongiotrofoblast hücreleri ve fetal endotel hücrelerindeki immün boyanma yoğunlukları tüm gruplarda benzerdi.



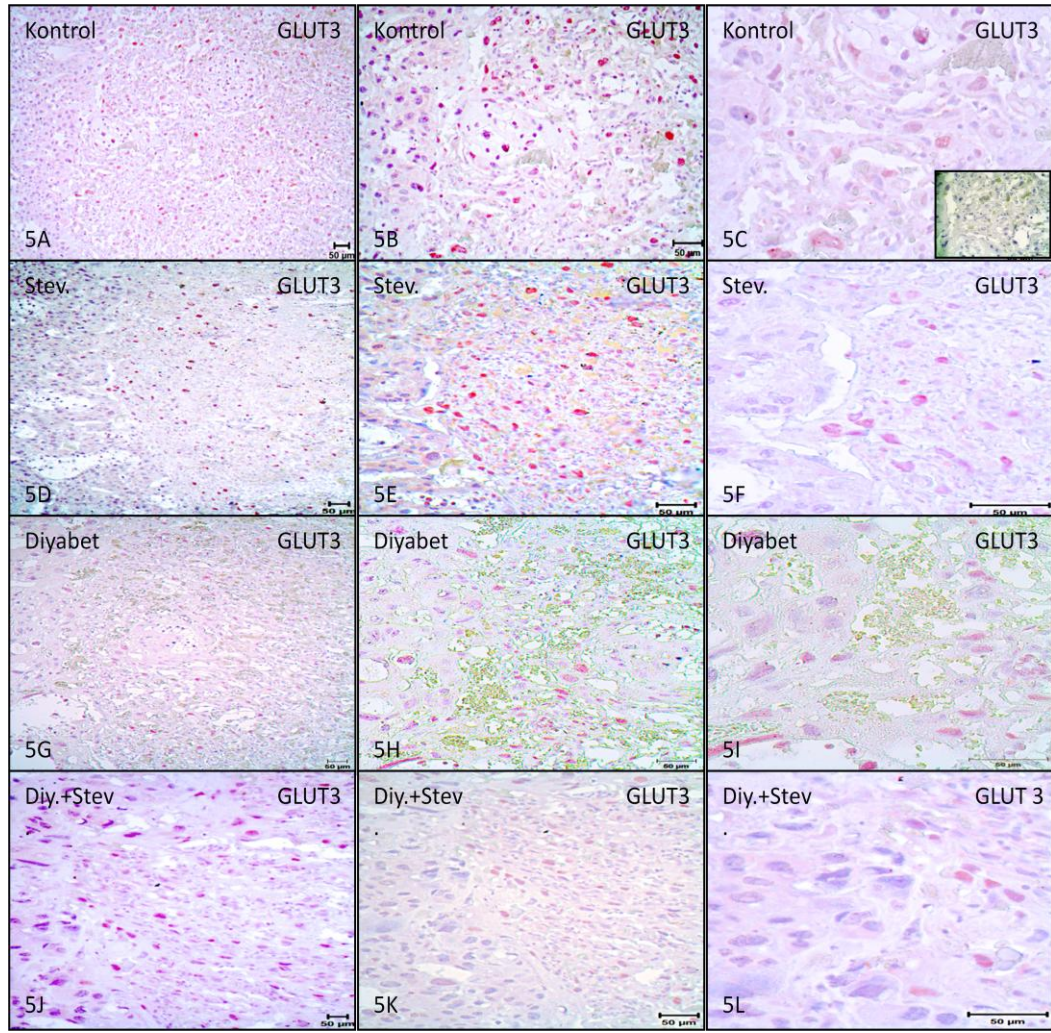
Şekil 4.10. gebeliğin 20. gününde sıçan plasentasında GLUT1 immünohistokimyasal boyanmaları. Kontrol grubu orijinal büyütme 10x (a), 20x (b), 40x (c). Stevioside grubu 10x (d), 20x (e), 40x (f). Diyabet grubu 10x (g), 20x (h), 40x (k). Diyabet+stevioside grubu 10x (l), 20x (m), 40x (n).

Kontrol, Stevioside, Diyabet ve Diyabet+ Stevioside gruplara ait GLUT1 immüno boyanma yoğunlukları semikantitatif olarak değerlendirildi ve Tablo 4.8.'de gösterildi.

20. Gebelik Günü	Des. H.	Dev H.	S.T.	Gli. H.	L.T.	F.E.H	F.K.H.	M.K.H.
Kontrol	-	+/-	+	-	+++	+++	-	-
Stevioside	-	+/-	+	-	+++	+++	-	-
Diyabet	-	+	+	-	+++	+++	-	-
Diyabet + Stevioside	-	+/-	+	-	+++	+++	-	-

Tablo 4.8. Gebeliğin 20. gününde GLUT1 immüno boyanma yoğunluklarının semikantitatif değerlendirilmesi. Desidual Hücre: Des. H., Dev Hücre: Dev H., Spongiotrofoblast: S.T., Glikojenik Hücre: Gli. H., Labirint Dev Hücre: L.D.H., Labirint trofoblast: L.T., Fetal endotel hücre: F.E.H., Fetal Kan Hücreleri: F.K.H., Maternal Kan Hücreleri: M.K.H. (-): Negatif, (+/-): Zayıf pozitif, (+): Pozitif, (++): Kuvvetli pozitif, (+++): Çok kuvvetli pozitif.

Gebeliğin 20. gününde plasentada GLUT 3 dev labirint trofoblast hücreleri ve fetal endotel hücrelerinde pozitif reaksiyon verirken desidual hücrelerde, dev hücrelerde, glikojenik hücrelerde, maternal ve fetal kan hücrelerinde negatif reaksiyon gösterdi. Gebeliğin 20.gününde gruplara ait sıçan plasentalarında labirint trofoblast hücreleri ve fetal endotel hücrelerindeki immün boyanma yoğunlukları benzerdi.



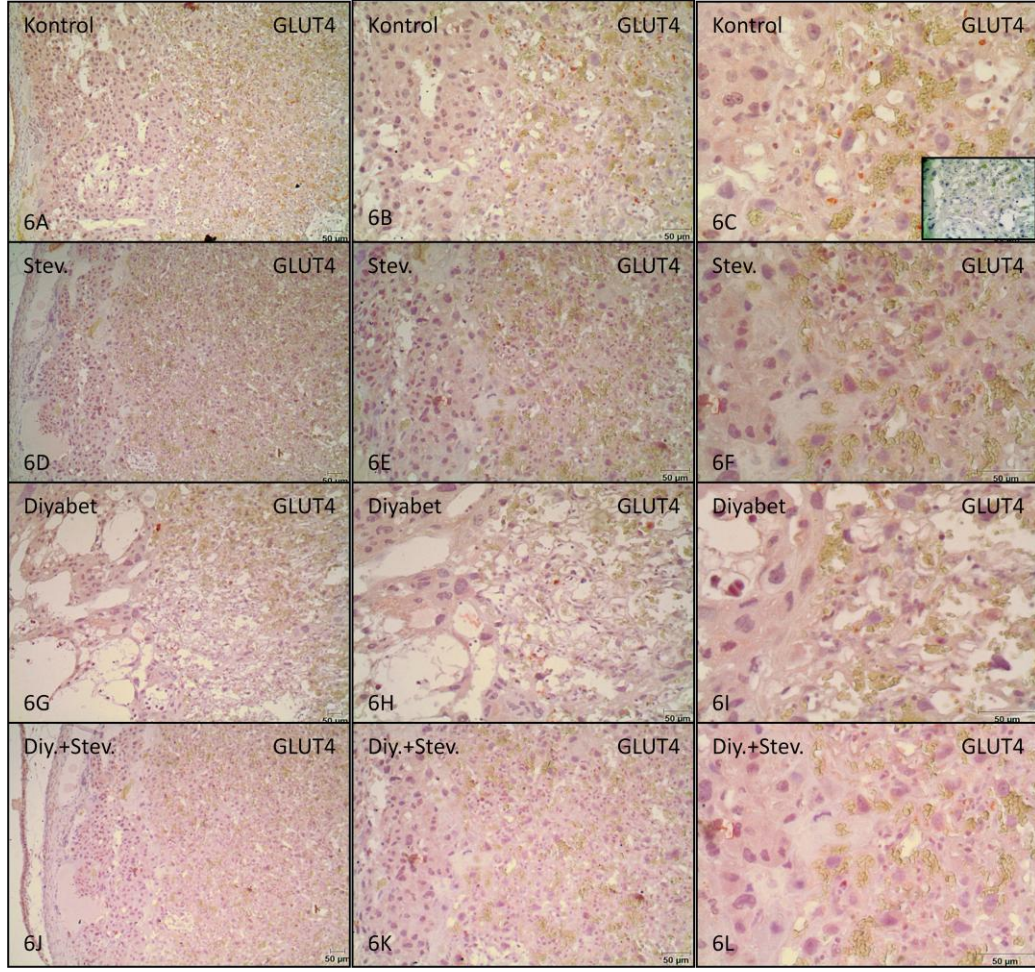
Şekil 4.11. Gebeliğin 20. gününde sıçan plasentasında GLUT3 immünohistokimyasal boyanmaları. Kontrol grubu orijinal büyütme 10x (a). 20x (b). 40x (c). Stevioside grubu 10x (d). 20x (e). 40x (f). Diyabet yapılan grubu 10x (g). 20x (h). 40x (k). Diyabet+stevioside grubu 10x (l). 20x (m). 40x (n).

Kontrol, Stevioside, Diyabet ve Diyabet+ Stevioside gruplara ait GLUT3 immüno boyanma yoğunlukları semikantitatif olarak değerlendirildi ve Tablo 4.9.'da gösterildi.

20. Gebelik Günü	Des. H.	Dev H.	S.T.	Gli. H.	L.T.	F.E.H	F.K.H.	M.K.H
Kontrol	-	-	-	-	+	+/-	-	-
Stevioside	-	-	-	-	+	+/-	-	-
Diyabet	-	-	-	-	+	+/-	-	-
Diyabet + Stevioside	-	-	-	-	+	+/-	-	-

Tablo 4.9. Gebeliğin 20. gününde GLUT3 immüno boyanma yoğunluklarının semikantitatif değerlendirmesi. Desidual Hücre: Des. H., Dev Hücre: Dev H., Spongiotrofoblast: S.T., Glikojenik Hücre: Gli. H., Labirint Dev Hücre: L.D.H., Labirint trofoblast: L.T., Fetal endotel hücre: F.E.H., Fetal Kan Hücreleri: F.K.H., Maternal Kan Hücreleri: M.K.H. (-): Negatif, (+/-): Zayıf pozitif, (+): Pozitif, (++): Kuvvetli pozitif, (+++): Çok kuvvetli pozitif.

Gebeliğin 20. gününde plasentada GLUT 4 fetal ve maternal kan hücrelerinde pozitif reaksiyon verirken desidual hücrelerde, dev hücrelerde, glikojenik hücrelerde ve fetal endotel hücrelerinde negatif reaksiyon gösterdi. GLUT 4 immünohistokimyasal boyanmalarında gruplar arasında bir fark tespit edilememiştir.



Şekil 4.12. Gebeliğin 20. gününde sıçan plasentasında GLUT4 immünohistokimyasal boyanmaları. Kontrol grubu orijinal büyütme 10x (a). 20x (b). 40x (c). Stevioside grubu 10x (d). 20x (e). 40x (f). Diyabet grubu 10x (g). 20x (h). 40x (k). Diyabet+stevioside grubu 10x (l). 20x (m). 40x (n).

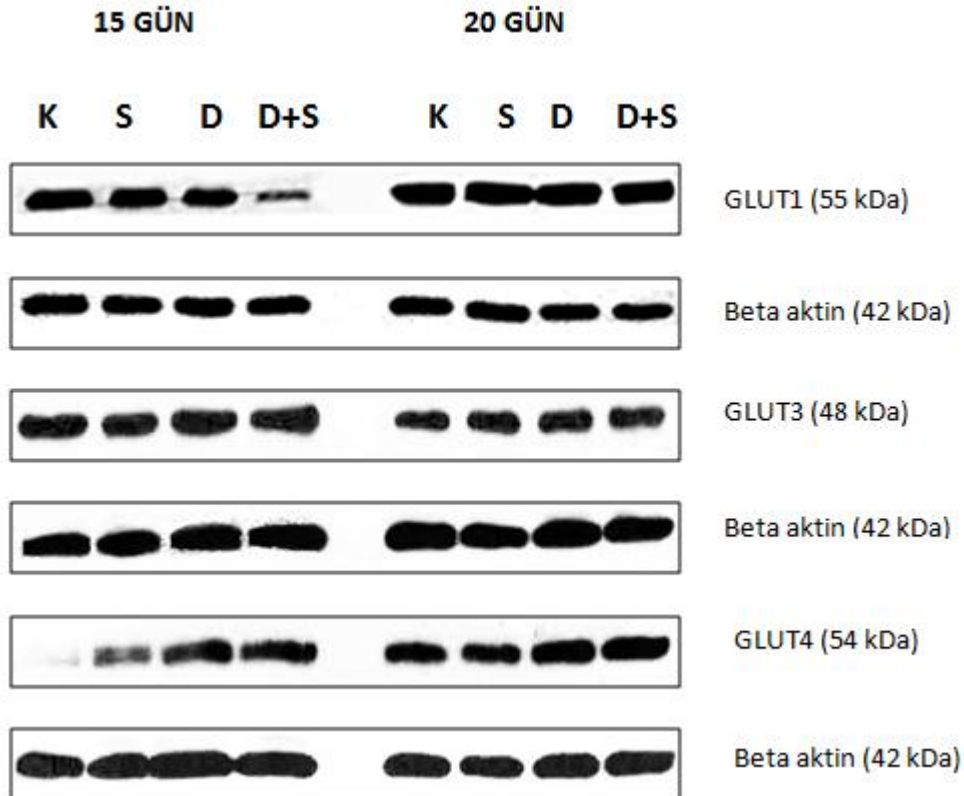
Kontrol, Stevioside, Diyabet ve Diyabet+ Stevioside gruplara ait GLUT4 immüno boyanma yoğunlukları semikantitatif olarak değerlendirildi ve Tablo 4.10. 'da gösterildi.

20. Gebelik Günü	Des. H.	Dev H.	S.T.	Gli. H.	L.T.	F.E.H	F.K.H.	M.K.H
Kontrol	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-
Stevioside	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-
Diyabet	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-
Diyabet + Stevioside	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-

Tablo 4.10. Gebeliğin 20. gününde GLUT4 immüno boyanma yoğunluklarının semikantitatif değerlendirmesi. Desidual Hücre: Des. H., Dev Hücre: Dev H., Spongiotrofoblast: S.T., Glikojenik Hücre: Gli. H., Labirint Dev Hücre: L.D.H., Labirint trofoblast: L.T., Fetal endotel hücre: F.E.H., Fetal Kan Hücreleri: F.K.H., Maternal Kan Hücreleri: M.K.H. (-): Negatif, (+/-): Zayıf pozitif, (+): Pozitif, (++): Kuvvetli pozitif, (+++): Çok kuvvetli pozitif.

4.5. Western Blot Bulguları

GLUT1, GLUT3 ve GLUT4 Ekspresyonu



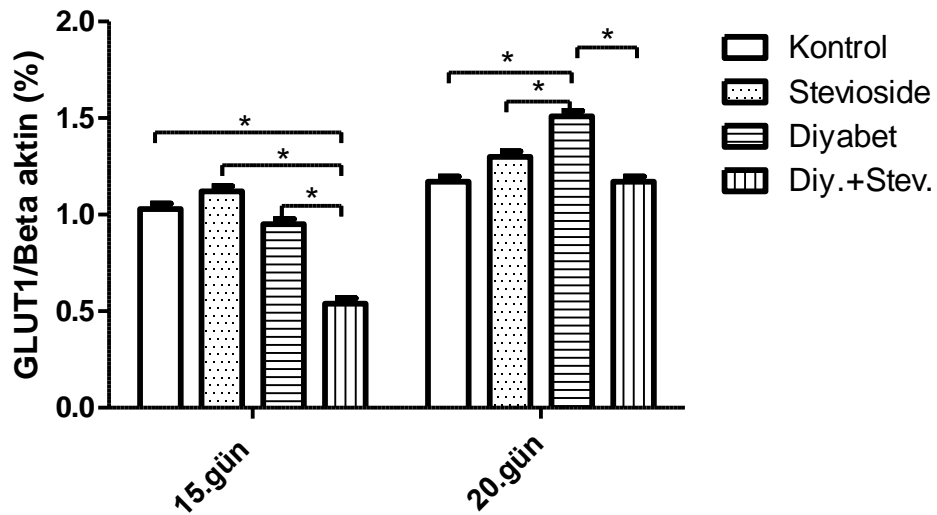
Şekil 4.13. Kontrol, Stevioside, Diyabet ve Diyabet+Stevioside gruplarına ait GLUT1, GLUT3 ve GLUT4 western bantları

Kontrol, stevioside, diyabet ve diyabet+stevioside gruplarına ait 15. ve 20 gün plasentalarda GLUT1 protein miktarı western blot metodu ile belirlendi (Şekil 4.14., 4.14a ve Şekil 4.14b).15. güne ait plasentalarda kontrol, stevioside ve diyabet grupları ile diyabet + stevioside grubu karşılaştırıldığında, GLUT1 proteininin, diyabet + stevioside grubunda diğer gruplara göre anlamlı olarak azaldığı tespit edildi ($P<0.05$). Kontrol, stevioside ve diyabet grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p>0,05$) (Şekil 4.14a).

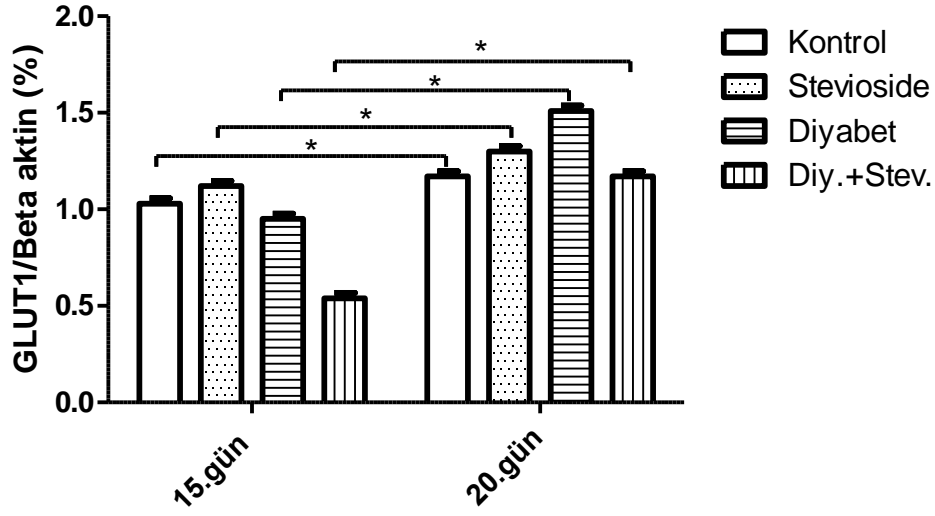
20. güne ait plasentalarda GLUT1 western sonuçlarına göre diyabet grubu diğer gruplar ile karşılaştırıldığında diyabet grubunun diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı oranda arttığı belirlendi ($P<0,05$). Kontrol grubu ile stevioside ve diyabet+stevioside grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark mevcut değildi ($P>0,05$).

GLUT1 ekspresyonu her bir grup kendi arasında mukayase edildiğinde gebeliğin 15. ve 20. gününde zamana bağlı olarak kontrol, stevioside, diyabet ve diyabet + stevioside gruplarına ait plasentalarda istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu tespit edilmiştir ($P<0,05$).

a)



b)



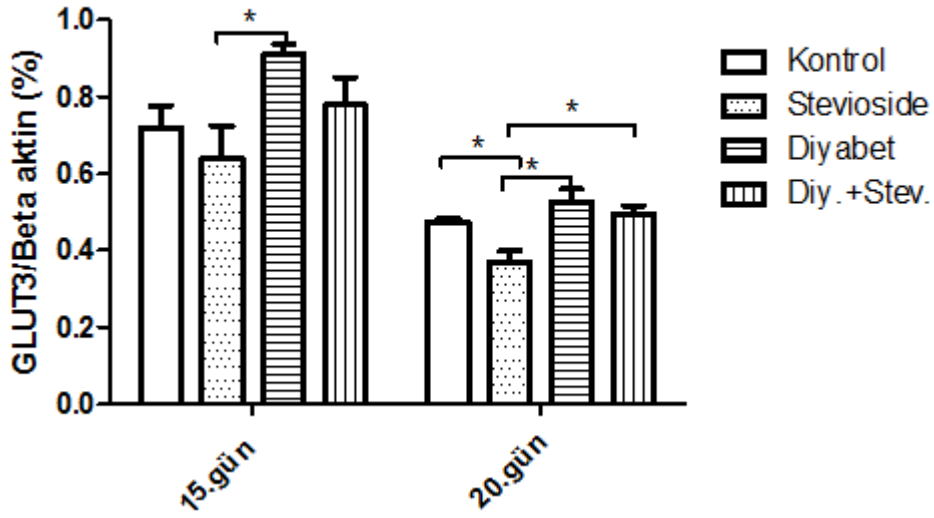
Şekil 4.14. Gebeliğin 15. ve 20. gününde kontrol, stevioside, diyabet ve diyabet+stevioside gruplarına ait GLUT1/ Beta aktin protein miktarları görülmektedir. a: Gruplar arasındaki GLUT1 protein miktarlarının karşılaştırılması b: Günler arasındaki GLUT1 protein miktarlarının karşılaştırılması (* p<0,05)

GLUT3 protein miktarı gebeliğin 15. ve 20. gününe ait plasentalarda kontrol, stevioside, diyabet ve diyabet+stevioside grupları arasında (Şekil 4.15a) ve gebelik günlerine bağlı olarak (Şekil 4.15b) değerlendirildi. Gebeliğin 15. gününde GLUT3 protein miktarı stevioside grubu ile diyabet grubu karşılaştırıldığında diyabet grubunda stevioside grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı miktarda arttığı belirlendi (p<0,05). Kontrol, diyabet ve diyabet+stevioside grupları arasında GLUT3 protein miktarında istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenmedi (p>0,05).

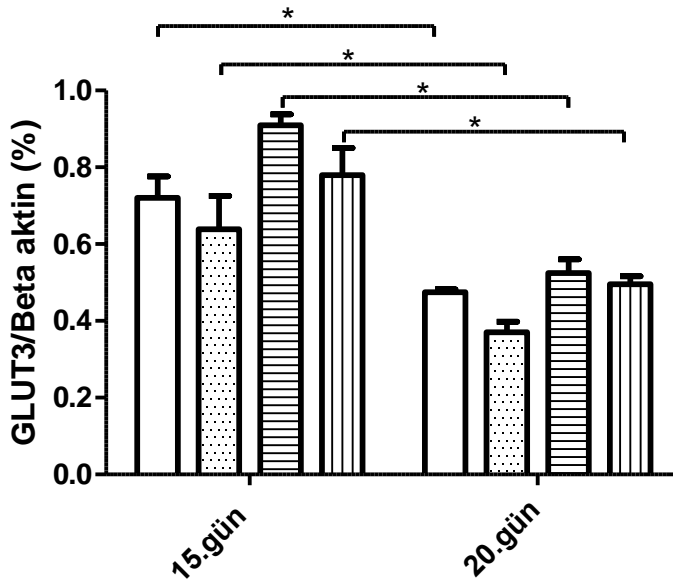
Gebeliğin 20. gününde GLUT3 protein miktarında stevioside grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak stevioside grubunda anlamlı oranda azaldığı belirlendi (p<0,05). Kontrol, diyabet ve diyabet+stevioside grupları arasında GLUT3 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenmedi (p>0,05).

GLUT3 protein miktarı, her bir grup kendi arasında mukayese edildiğinde gebeliğin 15. ve 20. gününde zamana bağlı olarak kontrol, stevioside, diyabet ve diyabet+stevioside gruplarına ait plasentalarda istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu tespit edilmiştir (P<0,05).

a)



b)



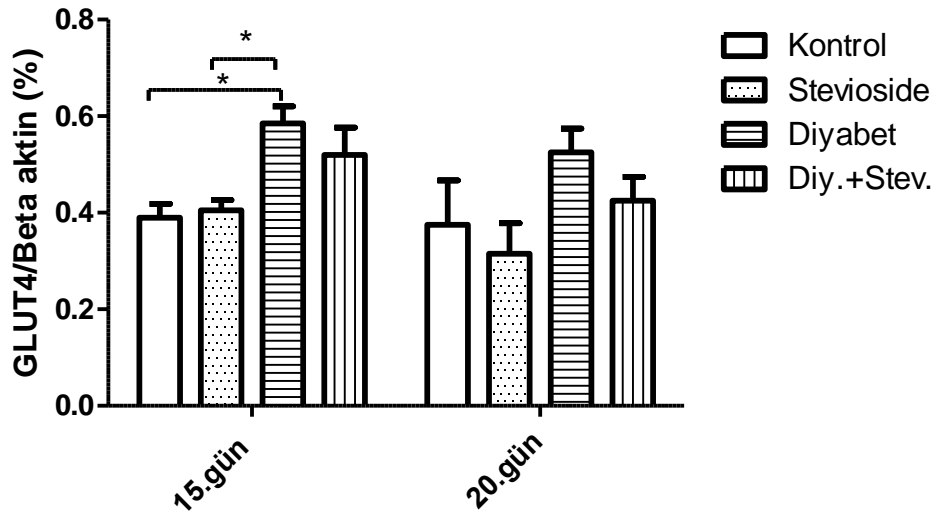
Şekil 4.15. Gebeliğin 15. ve 20. gününde kontrol, stevioside, diyabet ve diyabet+stevioside gruplarına ait GLUT3/ Beta aktin protein miktarları görülmektedir. a: Gruplar arasındaki GLUT3 protein miktarlarının karşılaştırılması b: Günler arasındaki GLUT3 protein miktarlarının karşılaştırılması (* p<0,05)

GLUT4 protein miktarı, gebeliğin 15. ve 20. gününe ait plasentalarda kontrol, stevioside, diyabet ve diyabet + stevioside grupları arasında (Şekil 4.16a) ve gebelik günlerine bağlı olarak (Şekil 4.16b) değerlendirildi. Gebeliğin 15. gününde GLUT4 protein miktarı, kontrol ve stevioside grupları ile diyabet grubu karşılaştırıldığında

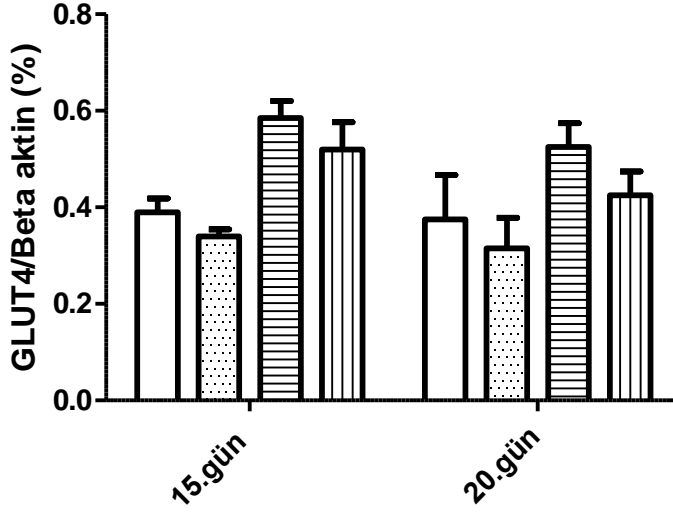
diyabet grubunda diğer gruplara göre istatistiksel olarak arttığı tespit edildi ($p < 0,05$). Diğer taraftan diyabet ve diyabet + stevioside gruplar arasında GLUT4 ekspresyonunda anlamlı fark belirlenmedi ($p > 0,05$). Gebeliğin 20. gününde GLUT4 protein miktarında gruplar arasında anlamlı fark belirlenmedi ($p > 0,05$).

GLUT4 protein miktarı, her bir grup kendi arasında mukayese edildiğinde gebeliğin 15. ve 20. gününde zamana bağlı olarak kontrol, stevioside, diyabet ve diyabet+stevoside gruplarına ait plasentalarda istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p > 0,05$).

a)



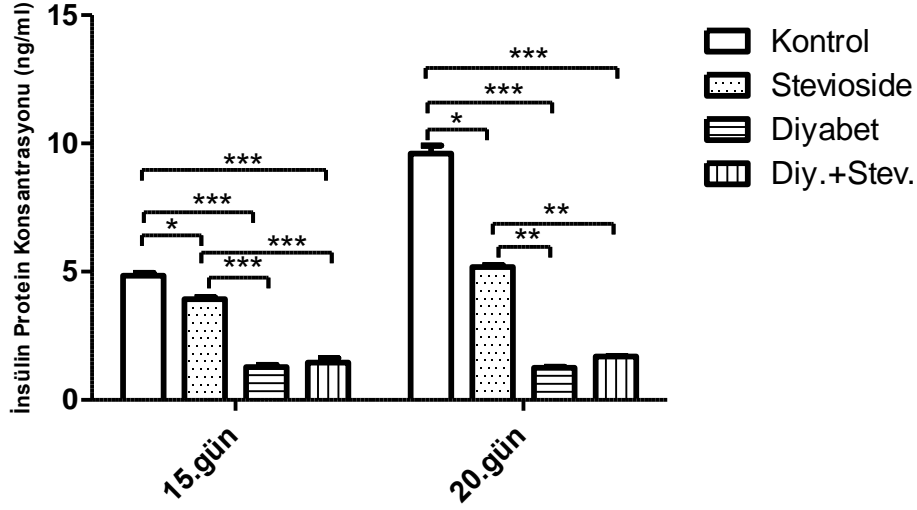
b)



Şekil 4.16. Gebeliğin 15. ve 20. gününde kontrol, stevioside, diyabet ve diyabet+stevioside gruplarına ait GLUT4/ Beta aktin protein miktarları görülmektedir. a: Gruplar arasındaki GLUT4 protein miktarlarının karşılaştırılması b: Günler arasındaki GLUT4 protein miktarlarının karşılaştırılması (* p<0,05)

4.6. Elisa Bulguları

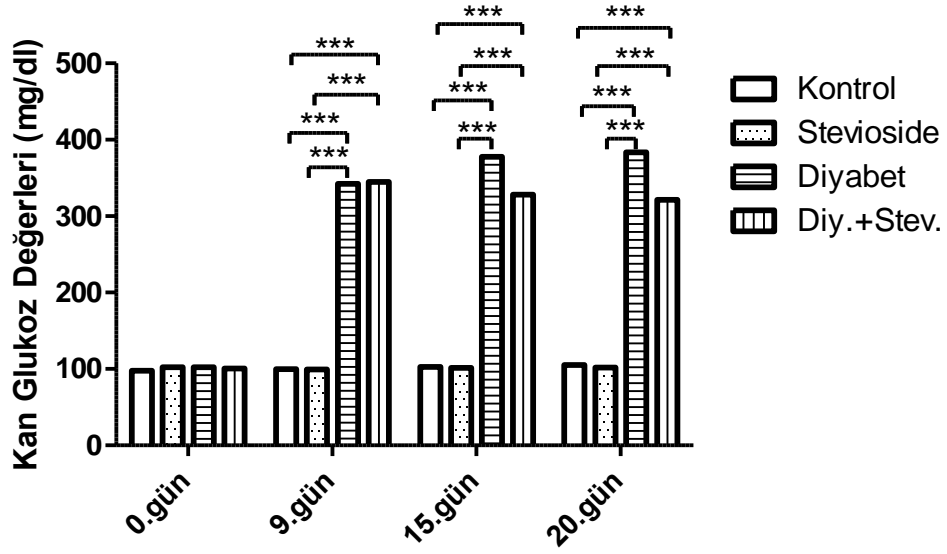
Kan Serumu İnsulin Elisa deney sonuçlarına göre 15. ve 20. günde en yüksek insülin değeri (15. gün 4,92 ng/ml ve 20. gün 9,83 ng/ml) kontrol grubunda tespit edilmiştir. Kontrol grubu hem 15. gün hem de 20. günde diyabet ve diyabet+stevioside gruplarıyla ve stevioside grubuyla karşılaştırıldığında diyabet ve diyabet + stevioside gruplarının kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı belirlendi (p<0,001). Aynı şekilde stevioside grubuyla kontrol grubu karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre stevioside grubunda azaldığı tespit edildi (p<0,05). Gebeliğin 15. gününde hem diyabet hem de diyabet + stevioside grubu stevioside grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır (p<0,001). Diğer taraftan gebeliğin 15. gününde diyabet grubu ile diyabet + stevioside grupları arasında istatistiksel olarak bir fark yoktur (p>0,05). Gebeliğin 20. gününde ise stevioside grubu hem diyabet hemde diyabet+stevioside grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır (p<0,01). Oysa diyabet grubu ile diyabet + stevioside grupları arasında istatistiksel olarak bir fark yoktur (p>0,05).



Şekil 4.17. Kontrol, stevioside, diyabet ve diyabet+stevioside gruplarına ait 15. gün ve 20. gün kan serumu insülin elisa sonuçları. (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001)

4.7. Kan Glukoz Ölçümleri

Kontrol, stevioside, diyabet ve diyabet+stevioside gruplarına ait gebeliğin 15. ve 20. gününde (Şekil 4.18.) kan glukoz ölçümleri değerlendirildi. 0. günde deneklere herhangi bir işlem uygulanmadığı için tüm gruplarda kan glukoz değerleri normal düzeydeydi. Diyabet ve diyabet+stevioside gruplarına 7. günde STZ uygulandı ve 2 gün sonra kan glukoz ölçümleri gerçekleştirildi. Bu nedenle 9. , 15 ve 20 günlerde bu iki grubun kan glukoz değerlerinde kontrol ve stevioside grubuna göre artış tespit edildi (P<0,001). 15. ve 20. günde en yüksek kan glukoz değeri diyabet grubunda belirlendi. 15. ve 20.gün kan glukoz değerlerinde diyabet ve diyabet+stevioside grupları arasında anlamlı fark tespit edilememiştir (P>0,05).



Şekil 4.18. Kontrol, stevioside, diyabet ve diyabet+stevioside gruplarının Gebeliğin 0., 9.,15. ve 20. günlerine ait kan glukoz ölçüm değerleri. Yıldız işareti (*), diyabet ve diyabet+stevioside gruplarının kontrol ve stevioside ile olan istatistiksel anlamını gösterir. (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001)

5. TARTIŞMA

Diyabet pek çok komplikasyonlara neden olan önemli bir metabolik hastalıktır. Bu hastalığın tedavisindeki amaç, uzun dönemli komplikasyonlarını önlemektir.

Plasenta anne ve fetüs arasındaki besin ve gaz değişiminden ve fetüste oluşan atık maddelerin uzaklaştırılmasından sorumlu önemli bir organdır (Georgiades ve ark., 2002). Plasenta gebeliğin devamı için gerekli olan hormonların üretim yeridir. Sonuç olarak, plasentada meydana gelen fonksiyon bozukluğu fetüste pek çok olumsuzluklara neden olur (Zhang ve ark., 2008; Damodaram ve ark., 2011). Diyabetli annelerin bebeklerinde konjenital malformasyonların görülme sıklığı normale göre 2-3 kat daha yüksektir. (Garner, 1995; Kitzmiller ve ark., 1996). Bazı çalışmalarda ise bu oran 3-8 kat daha yüksek olabilmektedir (Dunne ve ark., 1999; Schaefer-Graf ve ark., 2000). Tip 1 diyabetli kadınların gebeliklerinde HbA1c'nin yüksek olması fetal malformasyon riskini artırır (Suhonen ve ark., 2000). STZ-indüklü diyabetik sıçanların fetüslerinde malformasyonlar görülmektedir (Padmanabhan ve Shafiullah, 2001).

Glukoz memeliler için önemli bir enerji kaynağıdır. Glukozun hücre içine alınması 2 farklı taşıyıcı sistem (kolaylaştırılmış glukoz taşıyıcıları ve sodyum bağımlı glukoz taşıyıcıları) tarafından sağlanır. İnsanlarda 14 tane glukoz taşıyıcısı olduğu bildirilmiştir (Medina ve Owen, 2002; August, 2010).

Glukoz diğer pek çok doku gibi fetüsün hayatını idame edebilmesi ve gelişebilmesi için gerekli önemli bir enerji kaynağıdır. Glukoz üretimi fetüste minimal seviyededir (Kalhan ve Parimi, 2000). Bundan dolayı maternal kandaki glukoz plasentadaki glukoz taşıyıcıları aracılığıyla fetüse taşınımı gerçekleşmektedir . Sıçan plasentasında GLUT1 ve GLUT3 esas glukoz taşıyıcı proteinlerdir. GLUT1, glukozun maternal dolaşımdan plasentaya taşınımından sorumludur (Gutiérrez-Torres ve ark., 2015). GLUT3 ise glukozun plasentadan fetal dolaşıma taşınımından sorumludur (Gutiérrez-Torres ve ark., 2015). Diğer bir glukoz taşıyıcısı GLUT4 ise insüline bağımlı olarak çalışır ve plasentanın metabolik gereksinimlerinin karşılanmasından sorumludur (Illsley, 2000; Lager ve Powell, 2012).

Stevia Rebaudiana bitkisi uzun zamandır tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır. Stevia bitkisinin normal şekere göre daha tatlı olması ve kalorisiz olması gibi pek çok avantajlarından dolayı özellikle diyabet çalışmalarında kullanılmaktadır. Stevia rebaudiana bitkisinden elde edilen stevioside fare pankreas adacıklarından elde edilen hücrelerde direkt olarak insülin sekresyonunu artırmıştır. Diyabetli hastalarda kan glukozunu düşürmüştür (Curi ve ark., 1986; Gregersen ve ark., 2004).

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgulara göre diyabet grubunda gebeliğin 15. gününde fetüs ağırlıklarında stevioside grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalmanın olduğu tespit edildi. Kontrol, stevioside ve diyabet+stevioside grupları arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmedi. Diyabet ve diyabet + stevioside gruplarında 20. gün fetüs ağırlıklarında ise hem kontrol hem de stevioside gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu tespit edildi. Boileau ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (Boileau ve ark., 1995), gebeliğin 20. gününde diyabet grubu fetüs ağırlıklarında diyabet grubu kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı oranda azaldığı belirlenmiştir. Yang Yu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (Yang ve ark., 2008), balb-c, c57bl/6, cbc/j ve dba/1 fare türlerinde fetüs ağırlıkları değerlendirilmiştir. Kan glukoz değeri 200-300 mg/dl arasında ise orta seviye diyabet (Yang ve ark., 2008), >300 mg/dl'den yüksek ise ciddi seviye diyabet olarak gruplandırmıştır (Padmanabhan and Shafiullah, 2001). Balb-c, c57bl/6, cbc/j ve dba/1 fare türlerinde yapılan fetüs ağırlıkları değerlendirmesi sonucunda kontrol ve ciddi seviye diyabet arasında anlamlı fark belirlenmiştir. Özmen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (Özmen ve ark., 2014), 40 mg/kg STZ ile diyabet grubu oluşturulmuştur Diyabet ve kontrol grubuna ait fetüs ağırlıkları gebeliğin 14., 16., 18. ve 20. günlerinde değerlendirilmiştir. Fetüs ağırlıklarında gebeliğin 14. ve 20. gününde diyabet grubunda kontrole göre anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Gül ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (Gül ve ark., 2015) ise bizim bulgularımızın tersine gebeliğin 20. gününde diyabet grubuna ait fetüs ağırlıklarının kontrole göre anlamlı oranda arttığı belirlenmiştir. Fakat diğer çalışmada gebeliğin 14. ve 20. gününde anlamlı bir azalış mevcut iken gebeliğin 16 ve 18 gününde anlamlı bir fark bulunamamıştır (Özmen ve ark., 2014). Hem bizim yaptığımız çalışmada hem de diğer çalışmalarda (Boileau ve ark., 1995; Yang ve ark., 2008; Korgun ve ark., 2011) elde edilen sonuçlar ışığında, term gebelikte diyabetik sıçanlara ait fetüslerin ağırlıklarındaki anlamlı azalma, maternal diyabetin fetüs gelişimini etkilediği

yönündedir. Diyabet+stevioside grubunda ise steviosidin diyabetin fetüs gelişimi üzerindeki olumsuz etkisini sınırlı ölçüde azalttığı ileri sürülebilir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgulara göre gebeliğin 15. gününde plasenta ağırlıklarında kontrol, stevioside, diyabet ve diyabet+stevioside grupları arasında anlamlı fark belirlenmedi. Gebeliğin 20. gününde plasenta ağırlıklarında diyabet grubu kontrol, stevioside ve diyabet+stevioside gruplarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi ($p<0,05$). Korgun ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (Korgun ve ark., 2011), gebeliğin 15. gününde diyabet grubuna ait plasentaların ağırlıklarının kontrole kıyasla anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir. Özmen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (Özmen ve ark., 2014) ise 14 ve 16 günde diyabet grubunda kontrol grubuna göre plasenta ağırlıklarında azalmalar tespit edilirken 18. ve 20. günde ise artış belirlenmiştir. Bu çalışmada da gebeliğin 20. gününde plasenta ağırlıklarında diyabet grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı oranda arttığı tespit edilmiştir. Bizim çalışmamız önceden yapılan çalışmalarla (Boileau ve ark., 1995; Korgun ve ark., 2011) uyumludur. Gebeliğin sonuna doğru diyabetik plasentaların ağırlığındaki artış, diyabetik plasentalardaki yoğun glikojenik içeriğinden kaynaklanabilir.

İmmünohistokimyal deney sonuçlarımıza göre, GLUT1 immün boyanmaları plasentanın labirint ve bağlantı zonunda belirlendi. Spongiotrofoblast hücreleri, dev hücreler, fetal endotel hücreleri ve labirint trofoblast hücrelerinde GLUT1 immüno pozitif reaksiyon mevcuttu. Gebeliğin 15. gününde GLUT1 immün boyanma reaksiyonları kontrol ve stevioside gruplarında diğer gruplara göre labirint trofoblast hücrelerinde daha yoğun olduğu tespit edildi. Gebeliğin 20. gününde GLUT1 immün boyanma yoğunlukları en fazla labirint trofoblast ve fetal endotel hücrelerinde gözlemlendi. Western blot yönteminden elde ettiğimiz sonuçlara göre, 15. güne ait sıçan plasentalarında GLUT1 protein miktarında kontrol grubu, stevioside grubu ve diyabet grubu; diyabet + stevioside grubu ile karşılaştırıldığında tüm gruplara göre diyabet + stevioside grubunda istatistiksel olarak anlamlı azalma tespit edilmiştir ($p<0,05$). Gebeliğin 20. gününde GLUT1 protein miktarı diyabet grubu ile diğer gruplar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak diyabet grubunda diğer gruplara göre anlamlı oranda arttığı belirlendi ($p<0,05$). Kontrol, stevioside ve diyabet+stevioside grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlenmedi. GLUT1 protein miktarı kontrol, stevioside, diyabet ve diyabet+stevioside gruplarına ait plasentalarda

gebeliğin 20. gününde 15. güne göre tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı arttığı belirlendi. Önceki yapılan çalışmalarda Ogura ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, diyabetik fare plasentalarında gebeliğin 12. gününde GLUT1 protein miktarının kontrole göre istatistiksel olarak azaldığını belirlemişlerdir (Ogura ve ark., 1999). Diğer çalışmalarda ise STZ uygulamasından sonra sıçan plasental GLUT1 ekspresyonunda önemli bir fark belirlenmemiştir (Boileau ve ark., 1995; Korgun ve ark., 2011; Das ve ark., 1998; Devaskar ve ark., 1994). Bizim çalışmamızda da gebeliğin 15. gününde kontrol ile diyabetik grup arasında GLUT 1 protein miktarı açısından bir fark yoktur. Sadece kontrol grubu, diyabet+stevioside grubuyla karşılaştırıldığında GLUT1 protein miktarının diyabet+stevioside grubunda anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir ($p<0,05$). İnsan çalışmalarında ise diyabetik plasentalarda GLUT1 ekspresyonun kontrol grubuna göre arttığı belirtilmiştir (Jansson ve ark., 1999; Gaither ve ark., 1999). Elde ettiğimiz sonuçlara göre, STZ-indüklü diyabetik sıçanlarda gebeliğin 20. gününde materno-plasental glukoz artımı gözlenmiştir.

Gebeliğin 15. ve 20. gününe ait plasentalardaki GLUT3 immünohistokimyasal boyanmalarında immuno boyanmaların plasentanın fetal kısmı olan labirint zon'la sınırlı kaldığı tespit edildi. Diyabet + stevioside grubuna ait plasentalarda labirint trofoblast hücrelerindeki immün boyanma yoğunluğu kontrol, stevioside ve diyabet grubuna kıyasla azaldığı tespit edildi. Fetal endotel hücrelerdeki immuno boyanmaları kontrol ve stevioside grubunda benzer iken bu hücrelerdeki immuno boyanmaların yoğunluklarında diyabet ve stevioside gruplarında arttığı gözlemlendi. Fetal endotel hücrelerindeki boyanma yoğunlukları diyabet ve stevioside gruplarında aynıydı. Gebeliğin 15. gününde GLUT3 protein miktarında kontrol grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı bir fark mevcut değildi. Stevioside grubu, diyabet grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı azalmanın olduğu belirlendi ($p<0,05$). Gebeliğin 20. gününde kontrol grubu ile stevioside grubu arasında anlamlı olarak azalma mevcut iken ($p<0,05$) diğer gruplar ile kontrol grubu arasında bir fark tespit edilemedi. GLUT3 protein miktarında stevioside grubu hem diyabet hem de diyabet + stevioside gruplarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı oranda azaldığı belirlendi ($p<0,05$). GLUT3 protein miktarı gebeliğin ilerlemesine bağlı olarak 15 güne kıyasla 20. günde her bir grup kendisi ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azaldığı belirlendi ($p<0,05$). GLUT3 ile ilgili yapılan çalışmalarda, GLUT3 protein

miktarı diyabet sıçan plasentasında kontrole göre artmıştır (Boileau ve ark., 1995; Devaskar ve ark., 1994). Ayrıca, GLUT3 proteininin sadece labirent bölgede pozitif sonuç vermesi, bu proteinin fetal glukoz transportunun düzenlenmesinden sorumlu olabileceğinin göstergesidir (Gutiérrez-Torres ve ark., 2015). Elde ettiğimiz sonuçlara göre, GLUT3'ün gebeliğin daha erken dönemlerinde etkili olabileceği ve term dönemine doğru etkinliğinin azaldığı yönündedir.

GLUT4 immünohistokimyasal olarak tüm gruplarda gebeliğin 15. ve 20.gününde fetal ve maternal eritrosit hücrelerinde boyandı. GLUT4 protein miktarı, gebeliğin 15. gününde, kontrol ve stevioside grupları diyabet grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır. Diyabet + stevioside grupları ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. 20. günde ise GLUT 4 protein miktarı açısından gruplar arasında bir fark yoktur. Gutiérrez-Torres' in yaptığı çalışmada (Gutiérrez-Torres ve ark., 2015), Balb-c farelerinin plasentalarında GLUT4 ekspresyonu sinsisyotrofoblast ve stromal hücrelerde belirlenmiştir. İnsan çalışmalarında ise GLUT4 intravillöz stromal hücrelerinde pozitif reaksiyon verdiği belirlenmiştir. Diyabetik plasentalarda GLUT4 protein miktarında kontrole kıyasla değişim gözlenmemiştir (Xing ve ark., 1998). Elde ettiğimiz sonuçlara göre, GLUT4'ün ekspresyonunun sadece kan hücrelerinde görülmesi, bu proteinin plasental ve fetal gelişimde etkinliğinin sınırlı olduğu yönündedir.

Kan serumu insülin elisa sonuçlarımızdan elde ettiklerimiz sonuçlara göre, 15. günde insülin miktarı en yüksek kontrol grubunda belirlendi. Kontrol grubu insülin miktarı; stevioside, diyabet ve diyabet+stevioside gruplarına göre anlamlı oranda yüksekti. Stevioside grubu insülin miktarı ise hem diyabet hem de diyabet + stevioside gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek olduğu belirlendi. Gebeliğin 20. günündekiki insülin miktarı sonuçları tüm gruplarda gebeliğin 15. günüyle benzerdi. Akbarzadeh ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (Akbarzadeh ve ark., 2007) STZ indüklü diyabetik sıçanlar ile sağlıklı sıçanların kandaki insülin miktarı ölçülmüş ve kontrol grubunda insülin miktarının diyabetik grubu göre yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bir başka çalışmada da (Krishna ve ark., 2012) sağlıklı ve STZ-indüklü diyabetik wistar sıçanların kan serumundaki insülin miktarı belirlenip aynı şekilde diyabet grubundaki sıçanların kan serumundaki insülin miktarının kontrole göre anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Bu bulgular bizim çalışmamızın sonuçlarıyla uyumludur. Ayrıca, diyabet grubuna stevioside uyguladığımızda kan

serumu insülin miktarında diyabet grubuna göre artış olduğu belirlendi. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Gebeliğin 0., 9., 15., ve 20. gününde kan glukoz ölçümleri gerçekleştirildi. Gebeliğin 9., 15. ve 20. gününde diyabet ve diyabet + stevioside gruplarında, kontrol ve stevioside gruplarına göre anlamlı artış olduğu belirlendi. Diyabet ve diyabet+stevioside grupları arasında gebeliğin 15. ve 20. günlerinde anlamlı bir fark yoktu. Akbarzadeh ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (Akbarzadeh ve ark., 2007) STZ indüklü diyabetik sıçanlar ile sağlıklı sıçanların kan glukoz ölçümleri karşılaştırılmıştır. Kan glukoz ölçümlerinde sağlıklı sıçanlar diyabetik sıçanlar ile karşılaştırıldığında anlamlı oranda azaldığı belirlenmiştir. Diyabet grubuna stevioside uyguladığımızda kan glukoz değerinde diyabet grubuna göre azalma gözlemlenmiştir. Ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, kontrol, stevioside, STZ ile indüklenmiş diyabet grubu ve diyabet+stevioside gruplarıyla çalışıldı. Çalışmamızda steviosidenin hem fetal hem de plasental gelişime bununla birlikte maternal glukoz metabolizmasına etkisi değerlendirilmiştir. Ayrıca glukozun hem maternoplasental hem de plasentadan fetüse taşınmasını sağlayan GLUT1, GLUT3 ve GLUT4 glukoz taşıyıcılarının immünolokalizasyonları ve protein miktarları gebeliğin erken ve geç dönemlerinde değerlendirildi.

Elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde belirtilmiştir;

1. Gebeliğin 15 gününde diyabet grubunda fetüs ağırlıklarının stevioside grubuna göre düşük olduğu, 20 günde ise diyabet ve diyabet + stevioside grubundaki fetüslerin kontrol ve stevioside gruplarına göre düşük olduğu
2. Gebeliğin 15. gününe ait plasenta ağırlıklarında gruplar arasında fark yokken, gebeliğin 20. gününe ait plasenta ağırlıklarında diyabet grubunun diğer gruplara göre yüksek olduğu
3. GLUT1 protein miktarının gebeliğin 15. gününde kontrol, stevioside ve diyabet gruplarının diyabet + stevioside grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu, 20. gününde ise diyabet grubunun tüm diğer gruplara göre anlamlı olarak arttığı
4. GLUT3 protein miktarı gebeliğin 15. gününde stevioside grubuna göre diyabet grubunda yüksek olduğu diğer gruplar için anlamlı bir fark olmadığı, 20. gününde ise stevioside grubunun tüm diğer gruplara göre anlamlı olarak azaldığı
5. GLUT4 protein miktarının gebeliğin 15. gününde diyabet grubu kontrol ve stevioside gruplarına göre anlamlı olarak artarken, gebeliğin 20. gününde gruplar arasında bir fark olmadığı
6. Kan serumunda insülin miktarının kontrol ve stevioside grubunda diğer gruplara göre yüksek olduğu, kontrol grubunun stevioside grubuna göre de yüksek miktarda insülin içerdiği
7. Kan-glukoz değerinin gebeliğin 9., 15., ve 20. günde kontrol ve stevioside gruplarında diyabet ve diyabet + stevioside grubuna göre yüksek olduğu sonuçlarına varıldı.

KAYNAKLAR

Adamson S.L., Lu Y., Whiteley K.J., Holmyard D., Hemberger M., Pfarrer C., and Cross J.C. Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. *Dev Biol* 250: 358–373, 2002.

Ain R., Canham L.N., Soares M.J. Gestation stage-dependent intrauterine trophoblast cell invasion in the rat and mouse: novel endocrine phenotype and regulation. *Developmental Biology*, Volume 260, Issue 1, 1 August 2003, Pages 176-190.

Akbarzadeh A., Norouzian D., Mehrabi M.R., Jamshidi Sh., Farhangi A., Allah Verdi A., S. Mofidian¹ and B. Lame Rad. Induction Of Diabetes By Streptozotocin In Rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 2007 / 22 (2) 60-64.

Akbarzadeh S, Eskandari F, Tangestani H, Bagherinejad S.T., Bargahi A, Bazzi P, Daneshi A, Sahrapoor A, O'Connor W.J., Rahbar A.R. The Effect of Stevia Rebaudiana on Serum Omentin and Visfatin Level in STZ-Induced Diabetic Rats. *J Diet Suppl.* 2015 Mar;12(1):11-22.

Augustin R., “The protein family of glucose transport facilitators: it's not only about glucose after all,” *IUBMB Life*, vol. 62, no. 5, pp. 315–333, 2010.

Bakiner S.O. Hipertansif tip 2 diyabetik olgularda telmisartan ve losartanın insülin duyarlılığı üzerine olan etkileri. 2007, Uzmanlık Tezi.

Benirschke K., Burton G.J., Baergen R.N. *Pathology of The Human placenta*. Fifth Edition ed. 2006, New York: Springer.

Benomar Y., Naour N., Aubourg A. et al., “Insulin and leptin induce Glut4 plasma membrane translocation and glucose uptake in a human neuronal cell line by a phosphatidylinositol 3-kinase- dependent mechanism. *Endocrinology*. 2006 May;147(5):2550-6. Epub 2006 Feb 23.

Boileau P., Mrejen C., Girard J. & Mouzon S.H. 1995, Overexpression of GLUT3 placental glucose transporter in diabetic rats. *Journal of Clinical Investigation* 96 309–317.

Brandle, J.E. and Rosa, N. (1992). Heritability for yield, leaf: stem ratio and stevioside content estimated from a landrace cultivar of *Stevia rebaudiana*. *Can. J. Plant Sci.* 72: 1263–1266.

Brandle, J.E., Richman, A., Swanson, A.K., and Chapman, B.P. (2002). Leaf ESTs from *Stevia rebaudiana*: a resource for gene discovery in diterpenesynthesis. *Plant Mol. Biol.* 50: 613–622.

Burton G.J., Kaufmann P., and Huppertz B. Anatomy and genesis of the Placenta. In: Knobil and Nell's Physiology of Reproduction. 3rd ed. JD Neill (ed). Academic Press, Amsterdam. 189–243. 2006.

Calera M.R., Martinez C., Liu H., Jack A.K, Birnbaum MJ, Pilch PF. Insulin increases the association of Akt-2 with Glut4-containing vesicles. *J Biol Chem* 273:7201-4,1998.

Carter AM. Animal models of human placentation - a review. *Placenta.* 28 (Suppl A): S41–S47. 2007.

Cheatham B., Vlahos C.J., Cheatham L., Wang L., Blenis J., Kahn C.R. Phosphatidylinositol 3- kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Mol Cell Biol* 14:4902-11, 1994.

Cho H., Thorvaldsen J.L., Chu Q., Feng F., Birnbaum M.J. Akt1/pkbalph is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J Biol Chem* 276:38349-52, 2001.

Clarke J.F., Young P.W., Yonezawa K., Kasuga M., Holman GD Inhibition of the translocation of GLUT1 and GLUT4 in 3T3-L1 cells by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, wortmannin. *Biochem J* 300:631-5, 1994.

Cross J.C., Werb Z., Fisher S.J. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science.* 1994 Dec 2;266(5190):1508-18.

Cross J.C., Simmons D.G., and Watson E.D. Chorioallantoic morphogenesis and formation of the placental villous tree. *Ann NY Acad Sci* 995: 84–93, 2003.

Cross J.C., Nakano H., Natale D.R., Simmons D.G., Watson E.D. Branching morphogenesis during development of placental villi. *Differentiation*. 2006 Sep;74(7):393-401.

Croy A, Yamada A.T., DeMayo F.J. and Adamson SL. *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy*, 2013.

Croy B.A., He H., Esadeg S., Wei Q., McCartney D., Zhang J., et al. Uterine natural killer cells: insights into their cellular and molecular biology from mouse modeling. *Reproduction* 2003;126:149–60.

Curi R., Alvarez M., Bazotte R.B., Botion L.M., Godoy J.L., Bracht A. Effect of *Stevia rebaudiana* on glucose tolerance in normal adult humans. *Braz J Med Biol Res*. 1986;19:771–774.

Damodaram M., Story L., Kulinskaya E., Rutherford M., and Kumar S., “Early adverse perinatal complications in preterm growth-restricted fetuses,” *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, vol. 51, no. 3, pp. 204–209, 2011.

Das U.G., Sadiq H.F., Soares M.J., Hay W.W. Jr & Devaskar S.U. 1998 Time-dependent physiological regulation of rodent and ovine placental glucose transporter (GLUT-1) protein. *American Journal of Physiology* 274 R339–R347.

De M., Choudhuri R., Wood G.W. Determination of the number and distribution of macrophages, lymphocytes, and granulocytes in the mouse uterus from mating through implantation. *J Leukoc Biol* 1991;50:252–62.

Debnath, M. (2008). Clonal propagation and antimicrobial activity of an endemic medicinal plant *Stevia Rebaudiana*. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 2(2), pp. 045-051, February, 2008. Desoye G., Shafrir E. Placental metabolism and its regulation in health and diabetes. *Mol Aspects Med*. 1994;15(6):505-682.

Dhanush Krishna B., Suguna Rao and M.L. Satyanarayana. Serum insulin levels and lipid profiles of streptozotocin induced diabetic wistar rats. *Journal of Indian Veterinary Association, Kerala (JIVA)* 2012 Vol.10 No.2 pp.22-26 ref.13.

Douard V., Ferraris R.P. Regulation of the fructose transporter GLUT5 in health and disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295: E227–E237, 2008.

Dunne F.P., Choudhury T.A., Hartland A., Smith T., Brydon P.A., McConkey C., Nicholson H.O. (1999): Pregnancy outcome in women with insulin-dependent diabetes mellitus complicated by nephropathy. *Q J Med* 92: 451–454.

Ellis L., Morgan D.O., Clauser E., Roth R.A., Rutter W.J. A Membrane-Anchored Cytoplasmic Domain of the Human Insulin Receptor Mediates a Constitutively Elevated Insulin-Independent Uptake of 2-Deoxyglucose. *Mol Endocrinol* 1:15-24,1987.

Erica D. Watson and James C. Cross. Development of Structures and Transport Functions in the Mouse Placenta. *PHYSIOLOGY* 20: 180–193, 2005.

Field LL. Genetic linkage and association studies of Type I diabetes: challenges and rewards. *Diabetologia*. 2002 Jan;45(1):21-35.

Furukawa S., Hayashi S., Usuda K., Abe M., Hagio S., and Ogawa I. Toxicological pathology in the rat placenta. *J Toxicol Pathol*. 24: 95–111. 2011.

Furukawa S., Kuroda Y. and Sugiyama A. Comparison of the Histological Structure of the Placenta in Experimental Animals. *J Toxicol Pathol* 2014; 27: 11–18.

Gaither K, Quraishi AN, Illsley NP. Diabetes alters the expression and activity of the human placental GLUT1 glucose transporter. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999; 84:695–701.

Garner P. (1995): Type I diabetes mellitus and pregnancy. *Lancet* 346: 157–161.

Georgiades P., Fergyson-Smith A.C., and Burton G.J., “Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae,” *Placenta*, vol. 23, no. 1, pp. 3–19, 2002.

Gewolb I., Merdian W., Warshaw J., Enders A. Fine structural abnormalities of the placenta in diabetic rats. *Diabetes* 1986;35:1254-61.

Goyal S.K., Samsher, Goyal R.K. Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: a review. *Int J Food Sci Nutr.* 2010 Feb;61(1):1-10.

Greene D.A., Stevens M.J., Obrosova I., Feldman E.L. Glucose-induced oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. *Eur J Pharmacol* 1999;375:217-23.

Gregersen S., Jeppesen P.B., Holst J.J., Hermansen K. Antihyperglycemic effects of stevioside in type 2 diabetic subjects. *Metabolism.* 2004;53:73–76.

Gutiérrez-Torres D.S., González-Horta C., Del Razo L.M., Infante-Ramírez R., Ramos-Martínez E., Levario-Carrillo M., Sánchez-Ramírez B. Prenatal Exposure to Sodium Arsenite Alters Placental Glucose 1, 3, and 4 Transporters in Balb/c Mice. *BioMed Research International* Volume 2015, Article ID 175025, 1-9.

Gül M, Bayat N, Çetin A, Kepekçi RA, Şimşek Y, Kayhan B, Turhan U, Otlu A. Histopathological, Ultrastructural and Apoptotic Changes in Diabetic Rat Placenta. *Balkan Med J* 2015;32:296-302.

Hajduch E., Litherland G.J., Hundal H.S. Protein kinase B (PKB/Akt)--a key regulator of glucose transport? *FEBS Lett* 492:199-203, 2001.

Hong J., Chen L., Jeppesen P.B., Nordentoft I., Hermansen K. Stevioside counteracts the alpha-cell hypersecretion caused by long-term palmitate exposure. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006 Mar;290(3):E416-22. Epub 2005 Oct 4.

<https://www.studyblue.com/notes/nutrition-review/deck/3510384>.

Ibberson M., Riederer B.M., Uldry M., Guhl B., Roth J., Thorens B. Immunolocalization of GLUT1 in the testis and to specific brain areas and vasopressin-containing neurons. *Endocrinology.* 2002;143(1):276–284.

Illsley N. P. Glucose transporters in the human placenta. *Placenta.* 2000;21(1):14–22.

Imaeda A., Kaneko T., Aoki T., Kondo Y., Nagase H. DNA damage and the effect of antioxidants in streptozotocin-treated mice. *Food Chem Toxicol.* 2002 Jul; 40(7):979–87.

Jansson T, Wennergren M, Powell TL. Placental glucose transport and GLUT 1 expression in insulin dependent diabetes. *Am J Obstet Gynecol.* 1999; 180:163–168.

Jeppesen P.B., Gregersen S., Poulsen C.R., Hermansen K. Stevioside acts directly on pancreatic beta cells to secrete insulin: actions independent of cyclic adenosine monophosphate and adenosine triphosphate-sensitive K⁺-channel activity. *Metabolism.* 2000 Feb;49(2):208-14.

Jones R.L., Kaitu'u-Lino T.J., Nie G., Sanchez-Partida L.G., Findlay J.K., and Salamonsen L.A. Complex expression patterns support potential roles for maternally derived activins in the establishment of pregnancy in mouse. *Reproduction.* 132: 799–810. 2006.

Jones R.L., Stoikos C., Findlay J.K., and Salamonsen L.A. TGF-beta superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. *Reproduction.* 132: 217–232. 2006.

Joost, H.G. and Thorens, B. (2001) The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol. Membr. Biol.* 18, 247–256.

Joost, H.G., Bell, G.I., Best, J.D., Birnbaum, M.J., Charron, M.J., Chen, Y.T., Doege, H., James, D.E., Lodish, H.F., Moley, K.H., Moley, J.F., Mueckler, M., Rogers, S., Schurmann, A., Seino, S., and Thorens, B. (2002) Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282, E974–E976.

Jovanovic-Peterson L, Peterson C.M. Review of gestational diabetes mellitus and low-calorie diet and physical exercise as therapy. *Diabetes Metab Rev* 12:287-308, 1996.

Kalhan S., Parimi P. Gluconeogenesis in the fetus and neonate. *Semin Perinatol* 2000;24:94–106.

Kanai F., Ito K., Todaka M., Hayashi H., Kamohara S., Ishii K., Okada T., Hazeki O., Ui M., Ebina Y. Insulin-stimulated GLUT4 translocation is relevant to the

phosphorylation of IRS-1 and the activity of PI3-kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 195:762-8, 1993.

Kaneko-Ishino T., Ishino F. The role of genes domesticated from LTR retrotransposons and retroviruses in mammals. *Front Microbiol.* 2012 Jul 27;3:262.

Katagiri H., Asano T., Ishihara H., Inukai K., Shibasaki Y., Kikuchi M., Yazaki Y., Oka Y. Overexpression of catalytic subunit p110alpha of phosphatidylinositol 3-kinase increases glucose transport activity with translocation of glucose transporters in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 271:16987-90, 1996.

Kitzmiller J.L., Buchanan T.A., Kjos S., Combs C.A., and Ratner R.E. (1996): Pre-conception care of diabetes, congenital. *Diabetes Care* 1996 May; 19(5): 514-541.

Klein S., Sato A. The HLA system- first of two parts. *N Eng J Med* 2000;343:702-709.

Knipp G., Audus K. and Soares M. Nutrient transport across the placenta. *Adv Drug Deliv Rev.* 1999 Jun 14;38(1):41-58.

Kohn A.D., Summers S.A., Birnbaum M.J., Roth R.A. Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J Biol Chem* 271:31372-8,1996.

Korgun E.T., Acar N., Sati L., Kipmen-Korgun D., Ozen A., Unek G., Ustunel I., Demir R. Expression of glucocorticoid receptor and glucose transporter-1 during placental development in the diabetic rat. *Folia Histochemica Et Cytobiologica* Vol. 49, No. 2, 2011 pp. 325–334.

Lager S., Powell T.L. Regulation of nutrient transport across the placenta. *J Pregnancy.* 2012;2012:179827.

Leiser R., and Kaufmann P. Placental structure: in a comparative aspect. *Exp Clin Endocrinol.* 102: 122–134. 1994.

Leiter E.H. Differential susceptibility of BALB/c sublines to diabetes induction by multi-dose streptozotocin treatment. *Current topics in microbiology and immunology.* 1985; 122:78–85.

Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 2008 Feb; 51(2):216–26.

Lowry, O.H., et al., Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951. 193(1): p. 265-75.

Luo R.Z., Beniac D.R., Fernandes A., Yip C.C., Ottensmeyer F.P. Quaternary structure of the insulin-insulin receptor complex. *Science* 285:1077-80,1999.

Martin S.S., Haruta T., Morris A.J., Klippel A., Williams L.T., Olefsky J.M. Activated phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient to mediate actin rearrangement and GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*. 1996 Jul 26;271(30):17605–17608.

Matsukubo, T. and Takazoe, I. (2006). Sucrose substitutes and their role in caries prevention. *International Dental Journal* (2006) 56, 119-130.

McNeill, J.H. *Experimental models of diabetes*. Boca Raton, Fla: CRC Press LLC; 1999.

Medina R.A. and Owen G.I., “Glucose transporters: expression, regulation and cancer,” *Biological Research*, vol. 35, no. 1, pp. 9–26, 2002.

Melis MS. Effects of chronic administration of *Stevia rebaudiana* on fertility in rats, *J Ethnopharmacol*. 1999 Nov 1;67(2):157-61.

Ogura K., Sakata M., Yamaguchi M., Kurachi H., Murata Y. High concentration of glucose decreases glucose transporter-1 expression in mouse placenta in vitro and in vivo. *J Endocrinol*. 1999 Mar;160(3):443-52.

Okada T., Sakuma L., Fukui Y., Hazeki O., Ui M. Blockage of chemotactic peptide-induced stimulation of neutrophils by wortmannin as a result of selective inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 269:3563-7, 1994.

Ottensmeyer F.P., Beniac D.R., Luo R.Z., Yip C.C. Mechanism of transmembrane signaling: insulin binding and the insulin receptor. *Biochemistry* 39:12103-12,2000.

Ozcan F., Ozmen A., Akkaya B., Aliciguzel Y., Aslan M. Beneficial effect of myricetin on renal functions in streptozotocin-induced diabetes, *Clin Exp Med* (2012)12:265–272.

Ozmen A., Unek G., Kipmen-Korgun D., Korgun E.T. The PI3K/Akt and MAPK-ERK1/2 pathways are altered in STZ induced diabetic rat placentas. *Histol Histopathol.* 2014 Jun;29(6):743-56.

Özyardımcı Ersoy C., İmamoğlu Ş. Diabetes Mellitus 2009 Multidisipliner yaklaşımla tanı, tedavi ve izlenim.

Padmanabhan R. and Shafiullah M. Intrauterine Growth Retardation in Experimental Diabetes: Possible Role of the Placenta. *Arch Physiol Biochem.* 2001 Jul;109(3):260-71.

PrabhuDas M., Bonney E., Caron K., Dey S., Erlebacher A., Fazleabas A., Fisher S., Golos T., Matzuk M., McCune J.M., Mor G., Schulz L., Soares M., Spencer T., Strominger J., Way S.S., Yoshinaga K. Immune mechanisms at the maternal-fetal interface: perspectives and challenges. *Nat Immunol.* 2015 Apr;16(4):328-34.

Ramsey E.M. The placenta. Human and Animal. Praeger, New York. 1982.

Rao P.N, Shashidhar A, and Ashok C. In utero fuel homeostasis: Lessons for a clinician. *Indian J Endocrinol Metab.* 2013 Jan-Feb; 17(1): 60–68.

Redondo M.J., Fain P.R., Eisenbarth G.S. Genetics of type IA diabetes. *Recent Prog Horm Res.*2001;56:69–89.

Rizzo B, Zambonin L, Angeloni C, Leoncini E, Segal F.V.D., Prata C, Fiorentini D, and Silvana Hrelia. Steviol Glycosides Modulate Glucose Transport in Different Cell Types, *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:348169.

Rogers S., Macheda M.L., Docherty S.E., Carty M.D., Henderson M.A., Soeller W.C., Gibbs E.M., James D.E., Best J.D. Identification of a novel glucose transporter-like protein—GLUT-12. *Am. J. Endocrinol. Metabol.* 282, E733-E738.

Rosen O.M., Herrera R., Olowe Y., Petruzzelli M., Cobb M.H. Phosphorylation activates the insulin receptor tyrosine protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:3237-3240,1983.

Rossant J., Cross J.C. Placental development: lessons from mouse mutants. *Nat Rev Genet* 2: 538-548,2001.

Sakaue H., Ogawa W., Takata M., Kuroda S., Kotani K., Matsumoto M., Sakaue M., Nishio S., Ueno H., Kasuga M. Phosphoinositide 3-kinase is required for insulin-induced but not for growth hormone- or hyperosmolarity-induced glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 11:1552-62, 1997.

Schaefer-Graf U.M., Buchanan T.A., Xiang A., Songster G., Montoro M., Kjos S.L. (2000): Patterns of congenital anomalies and relationship to initial maternal fasting glucose levels in pregnancies complicated by Type 2 and gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol* 182: 313–320.

Scobie, I.N., *Diabetes and Pregnancy*, in *Atlas of Diabetes Mellitus*. 2007, Informa UK Ltd: Abingdon, OXON. p. 111-114.

Sharma P.M., Egawa K., Huang Y., Martin J.L., Huvar I., Boss G.R., Olefsky J.M. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity by adenovirus-mediated gene transfer and its effect on insulin action. *J Biol Chem* 273:18528-37, 1998.

Sharma R., Yadav R., Manivannan E. Study of effect of *Stevia rebaudiana bertonii* on oxidative stress in type-2 diabetic rat models, *Biomedicine & Aging Pathology*, Volume 2, Issue 3, July–September 2012, Pages 126–131.

Shepherd P.R., Withers D.J., Siddle K. Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem J*. 1998 Aug 1; 333(Pt 3): 471–490.

Simpson I.A., Dwyer D., Malide D., Moley K.H., Travis A., Vannucci S.J. (August 2008). "The facilitative glucose transporter GLUT3: 20 years of distinction". *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295 (2): E242–E253.

Slikker W., and Miller R.K. Placental metabolism and transfer role in developmental toxicology. In: *Developmental Toxicology*, 2nd ed. CA Kimmel, and J Buelke-Sam (eds). Raven Press, New York. 245–283. 1994.

Soares M.J., Chapman B.M., Rasmussen C.A., Dai G., Kamei T., and Orwig KE. Differentiation of trophoblast endocrine cells. *Placenta*. 17: 277–289. 1996.

Soares M.J., Konno T., and Alam S.M. The prolactin family: Effectors of pregnancy-dependent adaptations. *Trends Endocrinol Metab*. 18: 114–121. 2007.

Solow H., Hidalgo R., Singal D.P. Juvenile-onset diabetes HLA-A, -B, -C and -DR alloantigens. *Diabetes*.1979;28:1–4.

Suhonen L., Hiilesmaa V., Teramo K. (2000): Glycemic control during early pregnancy and fetal malformations in women with Type I diabetes mellitus. *Diabetologia* 43: 79– 82.

Suman Rao P.N., Shashidhar A., Ashok C. In utero fuel homeostasis: Lessons for a clinician. Review article, 2013, volume 17, issue 1:60-68.

Sun J., Zhang Q., Wang Z. and Yan B. Effects of Nanotoxicity on Female Reproductivity and Fetal Development in Animal Models. *Int. J. Mol. Sci*. 2013, 14(5), 9319-9337.

Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*. 2001; 50(6):537–546.

Telugu B.P., and Green J.A. Comparative placentation. In: *Comparative Reproductive Biology*, 1st.ed. H Schatten, and GE Constantinescu (eds). Blackwell Publishing, Iowa. 271–319. 2007.

Thorens B. Molecular and cellular physiology of GLUT2, a high-Km facilitated diffusion glucose transporter. *Int Rev Cytol* 137A: 209–238, 1992.

Ueda H., Howson J.M., Esposito L., et all. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 2003; 423:506-11.

Ueki K., Yamamoto-Honda R., Kaburagi Y., Yamauchi T., Tobe K., Burgering B.M., Coffey P.J., Komuro I., Akanuma Y., Yazaki Y., Kadowaki T. Potential role of protein kinase B in insulin-induced glucose transport, glycogen synthesis, and protein synthesis. *J Biol Chem* 273:5315-22, 1998.

Vambergue A., Fajardy I. Consequences of gestational and pregestational diabetes on placental function and birth weight. *World J Diabetes* 2011;2:196-203.

Waddell D., Zomerschoe A.G., Voice M.W. and Burchell A. Cloning and expression of a hepatic microsomal glucose transport protein. Comparison with liver plasma membrane glucose-transport protein GLUT 2. *Biochem. J.* (1992) 286 (173–177).

Wang Z., Gleichmann H. GLUT2 in pancreatic islets: crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice. *Diabetes*. 1998 Jan; 47(1):50–6.

Wooding P., and Burton G. *Comparative Placentation. Structures, Functions and Evolution.* Springer, Berlin. 2008.

Wu X., Freeze H.H. GLUT14, a duplicon of GLUT3, is specifically expressed in testis as alternative splice forms. *Genomics* 80: 553–557, 2002.

Xing A. Y., Challier J. C., Lepercq J., Caüzac M., Charron M. J., Girard J., and Hauguel-de Mouzon S. Unexpected Expression of Glucose Transporter 4 in Villous Stromal Cells of Human Placenta. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998 Nov;83(11):4097-101.

Yadav S.K., Guleria P. Steviol Glycosides from Stevia: Biosynthesis Pathway Review and their Application in Foods and Medicine. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2012;52(11):988-98.

Yoon J.W., Kim C.J., Pak C.Y., McArthur R.G. Effects of environmental factors on the development of insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin Invest Med* 1987;10:457-69.

Yu K.T., Czech M.P. Tyrosine phosphorylation of the insulin receptor beta subunit activates the receptor-associated tyrosine kinase activity. *J Biol Chem* 259:5277-86,1984.

Zhang X., Decker A., Platt R.W. and Kramer M.S., “How big is too big? The perinatal consequences of fetal macrosomia,” *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 198, no. 5, pp. 517.e1–517.e6, 2008.

Zhou J., Bondy C.A. Placental glucose transporter gene expression and metabolism in the rat. *J Clin Invest.* 1993 Mar; 91(3): 845–852.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Ertan	Uyruğu	T.C.
Soyadı	Katırcı	Tel no	05057528998
Doğum tarihi	24.02.1987	e-posta	ertankatirci@hotmail.com

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Safranbolu Anadolu Lisesi	2005
Lisans	Ankara Üniversitesi- Biyoloji Bölümü	2012
Yüksek Lisans		
Doktora		

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YDS	67.5

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)

Burslar-Ödüller:

Yayınlar ve Bildiriler:

1. Poster Sunum 30 Nisan - 3 Mayıs 2016 XIII. Uluslararası katılımlı Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi " Stevioside ve STZ Uygulanmış Sıçan Plasentalarında GLUT1 Ekspresyonu "