T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

HİPERGLİSEMİK KOŞULLARDA VE DİYABETİK PLASENTALARDA mTOR SİNYAL YOLAĞININ ANJİYOGENEZ MEKANİZMASINA ETKİSİ

Aslı ÖZMEN

Doktora Tezi

Antalya, 2015

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

HİPERGLİSEMİK KOŞULLARDA VE DİYABETİK PLASENTALARDA mTOR SİNYAL YOLAĞININ ANJİYOGENEZ MEKANİZMASINA ETKİSİ

Aslı ÖZMEN

Doktora Tezi

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Emin Türkay KORGUN

Çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2012.03.0122.005)

"Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir"

Antalya, 2015

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurul ve Senato Kararı

Sağlık Bilimleri Enstitüsünün 22/06/2000 tarih ve 02/09 sayılı enstitü kurul kararı ve 23/05/2003 tarih ve 04/44 sayılı senato kararı gereğince 'Sağlık Bilimleri Enstitülerinde lisanüstü eğitim gören doktora öğrencilerinin tez savunma sınavına girebilmeleri için, doktora bilim alanında en az bir yurtdışı yayın yapması gerektiği' ilkesi gereğince yapılan yayınların listesi aşağıdadır.

1. **Ozmen A**, Unek G, Kipmen-Korgun D, Cetinkaya B, Avcil Z, Korgun ET Glucocorticoid exposure altered angiogenic factor expression via Akt/mTOR pathway in rat placenta. Ann Anat. 2015 Mar;198: 34-40.

2. Ozturk N, Yaras N, **Ozmen A,** Ozdemir S. Long-term administration of rosuvastatin prevents contractile and electrical remodelling of diabetic rat heart. J Bioenerg Biomembr. 2013 Aug;45(4):343-5

3. Gozde Unek, **Aslı Ozmen**, Dijle Kipmen-Korgun, Emin Turkay Korgun. Immunolocalization of PCNA, Ki67, p27 and p57 in normal and dexamethasone-induced intrauterine growth restriction placental development in rat. Acta Histochemica 114 (2012), 31– 40

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı'nda, Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir. 28.08.2015

Tez Danışmanı	:	Prof. Dr. Emin Türkay KORGUN Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Üye	:	Prof. Dr. Necdet DEMİR Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Üye	:	Prof. Dr. Çiler ÇELİK-ÖZENCİ Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Üye	:	Prof. Dr. İnanç MENDİLCİOĞLU Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı
Üye	:	Prof. Dr. Serdar FİLİZ Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun ...../ ...../ 2009 tarih ve ...../..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Narin DERİN
Enstitü Müdürü

ÖZET

Plasenta kompleks bir vasküler sisteme sahiptir ve feto-plasental damar sistemi maternal ve fetal düzenlenişlerdeki hatalara oldukça duyarlıdır. Vasküler yapıların gelişimi ve fonksiyonu diyabetik çevreden etkilenmektedir. Anjiyogenez süresinde pek çok kritik basamak, çeşitli moleküller ve sinyal iletim yolakları tarafından düzenlenmektedir. mTOR sinyal iletim yolağının anjiyogenez mekanizmalarında rol oynadığı bilinmektedir. Ancak diyabetik gebeliklerde mTOR yolağının plasental anjiyogenez mekanizmaları üzerindeki etkileri bilinmemektedir. Bu nedenle bu çalışmada, kültür ortamında HUVEC hücrelerine yüksek miktarda glikoz verilerek, hipergliseminin anjiyogenez mekanizmaları üzerine etkisi ve bu etkinin mTOR sinyal iletim yolağına bağlı olup olmadığı değerlendirilmiştir. Elde ettiğimiz verilere göre, hiperglisemik koşullarda VEGF ekspresyonu mRNA düzeyinde, çözünür VEGF ekspresyonu ise protein düzeyinde artmıştır. VEGFR2 hem mRNA hem de protein düzeyinde artış gösterirken VEGFR1 sadece mRNA düzeyinde artmıştır. mTOR'un hedef proteinlerinden biri olan 4EBP1'in fosforilasyonu hiperglisemik koşullarda artmıştır. Akt fosforilasyonu azalmış, p70S6K fosforilasyonu ise değişmemiştir. HIF-1α ekspresyonu ise mRNA düzeyinde artmıştır. Rapamisin ve PP242 inhibisyonu ile hiperglisemik koşullarda artan 4EBP1 ve VEGFR2 ekspresyonu azalmıştır. Matrijel ve yara iyileşme analizi sonuçlarına göre hiperglisemik koşullarda endotel hücre migrasyonunun ve damar tüpü oluşturma kapasitesinin arttığı, mTOR yolağı inhibisyonu ile bu artışın baskılandığı gözlenmiştir. Kız bebeklere ait diyabetik plasentalarda hem plasental ağırlığın, hem de mTOR, 4EBP1, VEGF ve VEGFR2 ekspresyonunun azaldığı, erkek plasentalarda anlamlı bir değişim olmadığı gözlenmiştir. Bu çalışma ile birlikte diyabette bozulan plasental vasküler homeostazda mTOR yolağının rol oynayabileceği ve cinsiyete bağlı olarak farklılıkların gözlenebileceği ilk kez ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Diyabet, Anjiyogenez, mTOR, HUVEC, Plasenta

ABSTRACT

Placenta has a complex vascular system and is very sensitive to alterations in maternal and fetal systems. Development and function of the vascular structures are affected from diabetic environment. Angiogenesis is regulated by several important molecules and signalling pathways. Although mTOR pathway is frequently studied for its roles in protein synthesis and translation mechanisms, angiogenesis regulatory effects has also been studied. However, the putative roles of mTOR pathway in diabetic angiogenesis mechanisms in human placenta haven't been studied yet. Therefore, in this study HUVECs are incubated at hyperglycemic conditions and mTOR pathway proteins and angiogenesis related proteins are examined. According to our results VEGF mRNA levels and soluble VEGF concentrations are increased in hyperglycemic conditions. VEGFR2 expression is both increased at mRNA and protein level. VEGFR1 level is increased only at mRNA level and increased HIF-1α expression is only detected at mRNA level. Akt phoshorylation is decreased, 4EBP1 phoshorylation is increased and p70S6K phoshorylation remained unaffected from hyperglycemic conditions. After mTOR inhibition, increased angiogenic responses are decreased. Besides hyperglycemia induced cellular migration and angiogenic network forming capacities are also decreased after mTOR pathway inhibition. It is detected that in diabetic female human term placentas, the pacental weight and mTOR, 4EBP1, VEGF and VEGFR2 expression levels are decreased but in male placentas it remained similiar between groups. Thus, for the first time with this study, the putative roles of mTOR signalling pathway in angiogenesis mechanisms in diabetic placentas and sex spesific changes have been reported.

Key Words: Diabetes, Angiogenesis, mTOR, HUVEC, Placenta

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleşmesinde;

Danışman hocam Prof. Dr. Emin Türkay KORGUN'a, tezimin gerçekleşmesi için doktora eğitimimin başından beri göstermiş oldukları maddi ve manevi tüm destekleri için,

Anabilim Dalımızdaki tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma, ihtiyaç duyduğum her an yanımda oldukları için,

Doç. Dr. Dijle Kipmen KORGUN'a, tezimin PCR analizleri esnasında yardımlarını benden esirgemedikleri için,

Birlikte çalıştığım tüm ekip arkadaşlarıma (Gözde ÜNEK, Büşra ÇETİNKAYA, Ertan KATIRCI, Karolin DOĞUM ve Müge MOLBAY) ihtiyaç duyduğum anda bana yardımcı oldukları için,

Prof. Dr. İnanç MENDİLCİOĞLU, Uzman Dr. Cem SANHAL ve Uzman Dr. Gül BÜLBÜL'e, dokuların temininde bana her türlü kolaylığı sağladıkları için,

Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün değerli çalışanlarına tüm emekleri için,

Doç. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN'e, akademik hayata adım atmama vesile oldukları ve bu alanda bana yol gösterdikleri için,

Sevgili eşim Jankat ÖZMEN'e ve sevgili kızım Janset ÖZMEN'e bu zorlu yolda her zaman yanımda oldukları ve gösterdikleri anlayış ve sabır için,

Sevgili ailemin tüm fertlerine, bana her zaman destek oldukları için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

		Sayfa
ÖZET		**V**
ABSTRACT		**VI**
TEŞEKKÜR		**VII**
İÇİNDEKİLER DİZİNİ		**VIII**
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ		**XI**
ŞEKİLLER DİZİNİ		**XII**
ÇİZELGELER DİZİNİ		**XV**
GİRİŞ		**1**
1.1.	Hipotezin Temeli ve Amaç	**1**
GENEL BİLGİLER		**3**
2.1.	Plasenta	**3**
2.2.	İnsan Plasentasının Gelişimi ve Yapısı	**4**
2.3.	Plasental Villus Ağacının Yapısı	**7**
2.3.1.	Mezenşimal villus (MV)	**8**
2.3.2.	Kök villus (KV)	**8**
2.3.3.	İmmatür intermediyet villus (İMİV)	**9**
2.3.4.	Matür intermediyet villus (MİV)	**9**
2.3.5.	Terminal villus (TV)	**9**
2.4.	Term Plasentanın Yapısı	**10**
2.4.1.	Fetal kısım	**11**
2.3.2.	Maternal Kısım	**11**
2.4.	Plasental Villöz Damarların Gelişimi ve Yapısı	**13**
2.4.1.	Vasküler gelişimin morfolojik özellikleri	**13**
2.5.	Plasentada Vaskülogenez ve Anjiyogenezin Moleküler Regülasyonu	**14**
2.5.1.	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF)	**15**
2.5.2.	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptör 1 ve 2	

(VEGFR1, VEGFR2) 17
2.6. PI3K/Akt Sinyal İletim Yolağı **19**
2.7. mTOR Sinyal İletim Yolağı **19**
2.8. mTOR İnhibisyonu **22**
2.9. mTOR ve Anjiyogenez **23**
2.10. mTOR ve Plasenta **24**
2.11. Diabetes Mellitus **25**
2.11.1. Diyabet ve Hiperglisemi **26**
2.11.2. Diyabet ve Anjiyogenez **27**
2.12. Diyabetik Gebelikler **28**
2.13. Diyabetik Plasenta **29**
2.14. Hipotez **32**

GEREÇ ve YÖNTEM **33**
3.1. Göbek Kordonu Venöz Endotel Hücre (HUVEC) İzolasyonu ve Hücre Kültürü **33**
3.2. Hücre Karakterizasyonu **34**
3.3. Doz Belirleme Çalışmaları **35**
3.4. Tripan Mavisi ile Canlılık Oranlarının Değerlendirilmesi **36**
3.5. Hücre Kültürü Deney Gruplarının Oluşturulması **36**
3.6. Matrijel Anjiyogenez Testi **37**
3.7. Yara İyileşme Analizi **37**
3.8. ELISA (Enzim Bağlı Immunosorbent Analiz) Protokolü **38**
3.9. Western Blot Analizi **40**
3.9.1. HUVEC Hücre Lizatı Hazırlama **40**
3.9.2. SDS-PAGE Western Blot protokolü **40**
3.9.3. İnsan Plasenta Dokusundan Lizat Hazırlama **41**
3.9.4. Protein miktarının belirlenmesi **42**
3.10. qRT-PCR (Kantitatif Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Protokolü **43**

3.10.1. HUVEC hücrelerinde ve insan plasenta dokusunda hedef mRNA'larının kantitatif düzeylerinin belirlenmesi **43**
3.10.2. DNaz uygulaması **44**
3.10.3. cDNA (Komplementer DNA) Eldesi **45**
3.10.4. qRT-PCR uygulaması **46**
3.10.5. qRT-PCR uygulamasında planlanan PCR programı **46**
3.11. İnsan Plasentası Doku Takibi ve Rutin Histolojik Boyamalar **47**
3.11.1. Rutin Işık Mikroskopik Gözlemler **47**
3.12. İstatistik **48**

BULGULAR **49**
4.1. HUVEC İzolasyonu ve Kültürü Bulguları **49**
4.2. Hücre Karakterizasyonu Bulguları **49**
4.3. İnhibitör Uygulaması İçin Doz Belirleme Analizi Bulguları **50**
4.4. Tripan Mavisi Boyaması İle Canlılık Oranları Değerlendirilmesi Bulguları **52**
4.5. Hücre Kültürü Western Blot Analizi Bulguları **52**
4.6. Hücre Kültürü qRT-PCR Analizi Bulguları **54**
4.7. Matrijel Analizi Bulguları **55**
4.8. Yara İyileşme Analizi Bulguları **58**
4.9. ELİSA Analizi Bulguları **61**
4.10. Diyabetik İnsan Plasentası Işık Mikroskobi Analizi Bulguları **62**
4.11. İnsan Plasentası Western Blot Analizi Bulguları **64**
4.12. İnsan Plasentası qRT-PCR Analizi Bulguları **65**

TARTIŞMA **66**
SONUÇLAR **73**
KAYNAKLAR **74**
ÖZGEÇMİŞ **94**

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADA **:** Amerika Diyabet Derneği (The American Diabetes Association)
AGEs : İleri Glikasyon Son Ürünleri
4E-BP1 : Ökaryotik Başlatıcı Faktör 4E-Bağlanma Proteini 1
bFGF : Bazik fibroblast büyüme faktörü
cAMP : Siklik Adenozin Mono Fosfat
cDNA : Komplementer DNA
DM : Diabetes Mellitus
DMSO : Dimetil Sülfoksit
EGF : Epidermal Büyüme Faktörü
EH : Endotelyal Hücreler
ELISA : Enzim Aracılı İmmünosorbent Deneyi
EVT : Ekstravillöz Trofoblast
FGF : Fibroblast Büyüme Faktörü
Flk-1 : Fötal Karaciğer Kinazı
Flt-1 : Fms-benzeri Tirozin Kinaz-1
G-CSF : Granülosit Koloni Stimüle Edici Faktör
GDM : Gestasyonel Diabetes Mellitus
HbA1c : Hemoglobin A1c
HIF-1α : Hipoksi ile İndüklenebilen Faktör-1α
HLA : İnsan Lökosit Antijeni
HUVEC : İnsan Göbek Kordonu Venöz Endotel Hücre
IGF-1 : İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1
IL-8 : İnterlökin-8
IUGR : Intrauterin Gelişme Geriliği
LDL : Düşük Dansite Lipoprotein
MAPK : Mitojenin Aktifleştirdiği Protein Kinaz
MHC : Major Histokompatibilite Kompleksi

MMP-9 : Matrix Metalloproteinaz-9

mRNA : Mesajcı Ribonükleik Asit

mTOR : Memeli Rapamisin Hedefi Protein

mTORC1 : mTOR Kompleks 1

mTORC2 : mTOR Kompleks 2

NO : Nitrik Oksit

OGTT : Oral Glikoz Tolerans Testi

PAH : Periferal Arteryal Hastalık

PAI-1 : Plazminojen Aktivatör İnhibitör -1

PDGF : Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü

PGI2 : Prostaglandin 2

PlGF : Plasental Büyüme Faktörü

PIKK : Fosfoinositid-3-Kinaz İlişkili Kinaz

PIP3 : Fosfotidil İnositol TriFosfat

PI3K : FosfoİnositId 3 Kinaz

PKC : Protein Kinaz C

PTP : Tirozin-Fosfataz Proteinler

qRT-PCR : Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zinzir Reaksiyonu

ROS : Reaktif Oksijen Türleri

S6K1 : S6 Kinaz 1

SGK : Serum ve Glukokortikoid ile Regüle olan Kinazlar

T1DM : Tip 1 Diabetes Mellitus

T2DM : Tip 2 Diabetes Mellitus

TGF-β : Transforme Edici Büyüme Faktörü-beta

TNF–α : Tümör Nekroz Faktör-alfa

VEGF : Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

VEGFR1 : Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptör1

VEGFR2 : Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptör2

vWF : vonWillebrand Faktör

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
2. 1.	İnsan plasentasının ve plasentaya ait koryonik villus yapılarının şematik çizimi	**3**
2. 2.	Erken plasental gelişimin şematize edilmiş şekli	**6**
2.3. 1.	Plasental villus ağacı yapısını oluşturan hücreler ve diğer yapılar	**8**
2.3. 2.	Term plasentada çeşitli villus tiplerinin enine kesit çizimi	**10**
2.4. 1.	İnsan term plasentanın görünümü	**11**
2.4. 2.	Term plasentasındaki fibrinoid tabakaları	**13**
2.6. 1.	Plasental villus tiplerinde vaskülogenez ve anjiyogenez	**15**
2.6. 2.	VEGF ailesinin vaskülogenez, anjiyogenez ve lenfanjiyogenezdeki moleküler mekanizmaları	**16**
2.6. 3.	VEGF uyarımı sonucu hücre içinde devreye giren hücre içi sinyal iletim yolakları	**18**
2.8. 1.	mTOR komplekslerinde yer alan proteinler	**20**
2.8. 2.	mTOR komplekslerinin hedef proteinleri; substratları	**21**
2.9. 1.	mTOR inhibitörlerinin etki mekanizması	**23**
2.10. 1.	mTOR yolağının anjiyogeneze etki mekanizması	**24**
2.14. 1.	Diyabetik koşullarda gözlenen plasental ve fetal değişimler	**31**
3.8. 1.	ELİSA analizi basamaklarının şematik gösterimi	**38**
3.8. 2.	ELİSA analizlerinde kullanılan standartların hazırlama prosedürü	**39**
4. 1.	HUVEC hücreleri	**49**
4. 2.	İmmunfloresan boyama ile hücre karakterizasyonu	**50**
4.3.1.	Pasajlama esnasında hücre morfolojisi	**50**
4.3. 2.	Doz belirleme çalışmaları fosfo-Akt ekspresyon düzeyleri	**51**
4.3. 3.	Doz belirleme çalışmaları fosfo-4EBP1 ekspresyon düzeyleri	**51**

4.3. 4.	Doz belirleme çalışmaları fosfo-Akt ve fosfo-4EBP1ekspresyon düzeylerine ait grafik	**52**
4.4. 1.	Thoma Lamında Tripan mavisi ile hücre sayımı	**52**
4.5.1.	Normoglisemik ve hiperglisemik koşullarda ve inhibitör uygulamasının ardından mTOR yolağı proteinlerinin ekspresyonu	**53**
4.5.2.	Normoglisemik ve hiperglisemik koşullarda ve inhibitör uygulamasının ardından anjiyogenez ilişkili protein ekspresyonu	**54**
4.6.1.	Normoglisemik ve hiperglisemik koşullarda ve inhibitör uygulamasının ardından anjiyogenez genlerin mRNA ekspresyonu	**55**
4.7.1.	Matrijel Analizleri için uygun hücre sayısının belirlenmesine yönelik sonuçlar	**56**
4.7.2.	Matrijel Analizlerinde süreye bağlı olarak damar benzeri yapıların oluşum aşamaları	**57**
4.7.3.	Matrijel Analizi sonucu oluşan damar benzeri yapıların gruplara göre dağılımı izlenmektedir	**58**
4.8. 1.	Kontrol gruplarında yara iyileşme analizi	**59**
4.8. 2.	Normoglisemik koşullarda yara iyileşme analizi	**59**
4.8. 3.	Hiperglisemik koşullarda yara iyileşme analizi	**60**
4.8. 4.	Yara iyileşme analizi istatistiksel verileri	**60**
4.9.1.	ELİSA analizi sonuçları	**61**
4.10.1.	Kontrol ve diyabetik plasenta ağırlıkları	**62**
4.10.2.	İnsan plasentası rutin ışık mikroskobik analizi	**63**
4.11.1.	İnsan plasentası mTOR yolağı ilişkili proteinlerin Western Blot analizi sonuçları	**64**
4.11.2.	İnsan plasentası anjiyogenez ilişkili proteinlerin Western Blot analizi sonuçları	**65**
4.12.1.	Kontrol ve diyabetik insan plasentası qRT-PCR analizi sonuçları	**65**

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge		Sayfa
2.14. 1.	Diyabetik insan plasentalarında gözlenen değişiklikler	**29**
3.3. 1.	Uygulanan inhibitör konsantrasyonları ve inkübasyon süreleri	**35**
3.9. 1.	Western Blot analizinde kullanılan primer ve sekonder antikorlar	**43**
3.10. 1.	qRT-PCR için kullanılan oligonükleotid sekansları	**47**
4.10. 1.	Diyabet ve kontrol gruplarına ait hasta verileri	**63**

GİRİŞ

1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç

Plasenta, yaşam ömrü gebelik ile sınırlı olan ve embriyo/fetüs gelişimini sağlayan bir organdır [1]. Fetüsün immünolojik redden korunması, besinlerin transportu, fetal atıkların uzaklaştırılması ve fetal, maternal ve plasental metabolizmaları etkileyen çeşitli peptid ve steroid hormonların sentezlenmesinde rol alır [2].

Plasenta hakkında günümüzde bilinenlerin çoğu plasentanın morfolojisi ve genel fonksiyonları ile ilgili olup diyabet, preeklampsi ve büyüme geriliği gibi klinik tablolar gösteren hastaların plasental gelişimi hakkında bilgiler sınırlıdır [3]. Plasental ve fetal gelişim üzerinde maternal çevrenin oldukça büyük etkisi vardır. Plasental gelişimdeki aksaklıklar nedeniyle insanlarda düşük, preeklampsi ve fetüste büyüme geriliği oluşmaktadır [4].

Diyabetik gebelikler hem anne hem de fetüs için olası riskler taşımaktadır. Diyabetik bir anneden doğan bebeklerin obezite ve diyabete yatkınlık riskleri yüksektir. Günümüzde diyabetik gebeliklerde görülen mortalite oranları normal gebeliklerdeki mortalite oranlarına yaklaşmıştır ancak hala genel popülasyondan yüksektir. Bununla birlikte diyabetik gebelikler, konjenital malformasyon, fetal makrozomi, sıkıntılı solunum sendromu nedeniyle prematüre doğum, yenidoğanda sarılık, hipoglisemi ve polisistemi görülmesi ile karakterizedir [5].

Uterus içi diyabetik çevreden yalnızca fetüs değil aynı zamanda plasenta da olumsuz etkilenmektedir. Maternal diyabet plasentada yapısal ve fonksiyonel değişikliklere sebebiyet vermektedir. Plasenta karmaşık bir vasküler sisteme sahiptir ve maternal ve fetal kanın birbirine karışmadan her iki dolaşımın yan yana olmasına olanak sağlar. Plasentadaki fetal kan damarları, maternal kan ile yıkanan koryonik viluslar içerisinde yer alır. Trofoblast ve endotel hücreleri, maternal ve fetal dolaşım arasında besin, oksijen ve atıkların taşınımını düzenler. Bu nedenle feto-plasental damarların sağlıklı ve başarılı gelişimi, büyümesi ve olgunlaşması fetal gelişim ve canlılık için oldukça önemlidir. Feto-plasental damar sistemi meydana gelebilecek herhangi bir hemodinamik modifikasyona veya hem maternal hem de fetal metabolik endokrin düzenlenişlerdeki hatalara oldukça duyarlıdır. Damarların gelişimi ve fonksiyonu diyabetik çevreden doğrudan etkilenebilir [6].

Anjiyogenez çok sayıda molekül tarafından düzenlenen karmaşık bir süreçtir. Bu süreçte endotel hücrelerinde pek çok kritik basamak, çeşitli moleküller tarafından düzenlenmektedir. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF), Anjiyopoietinler, Anjiyogenin, Epidermal Büyüme Faktörü (EGF), Prostaglandin E1 ve E2, Tümör

Nekroz Faktör-alfa (TNF–α), Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF) ve VEGF Reseptör 1 (VEGFR1) ve Reseptör 2 (VEGFR2) gibi çeşitli proteinlerin endotel hücre büyümesini ve hareketini aktive ettikleri bilinmektedir [7]. Bunlara ek olarak mTOR (The Mammalian Target of Rapamycin)'un HIF-1α aracılığıyla anjiyogenez mekanizmasını etkilediği düşünülmektedir ve bu yönde çalışmalar giderek artmaktadır [8-13].

Yapılan çalışmalar sonucunda mTOR'un plasentada fonksiyonel olduğu tespit edilmiştir [14-17]. Ancak mTOR aracılığıyla gerçekleşen plasental anjiyogenez mekanizmaları henüz aydınlatılmamıştır. mTOR ile glikoz ilişkisi bilinmesine rağmen diyabetik gebeliklerde mTOR aktivitesinin nasıl değiştiği ve bu durumun anjiyogenez mekanizmalarına etkileri bilinmemektedir. Günümüzde diyabetik gebeliklerde plasental anjiyogenez mekanizmasının hiperglisemik koşullardan etkilendiği bilinmektedir. 2010 yılında yapılan bir çalışmada diyabetik gebeliklerde plasentada vasküler ve trofoblastik hücrelerdeki VEGF, VEGFR1 ve VEGFR2 ekspresyonlarında değişiklikler gözlenmiştir [18] ancak bu etkinin mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

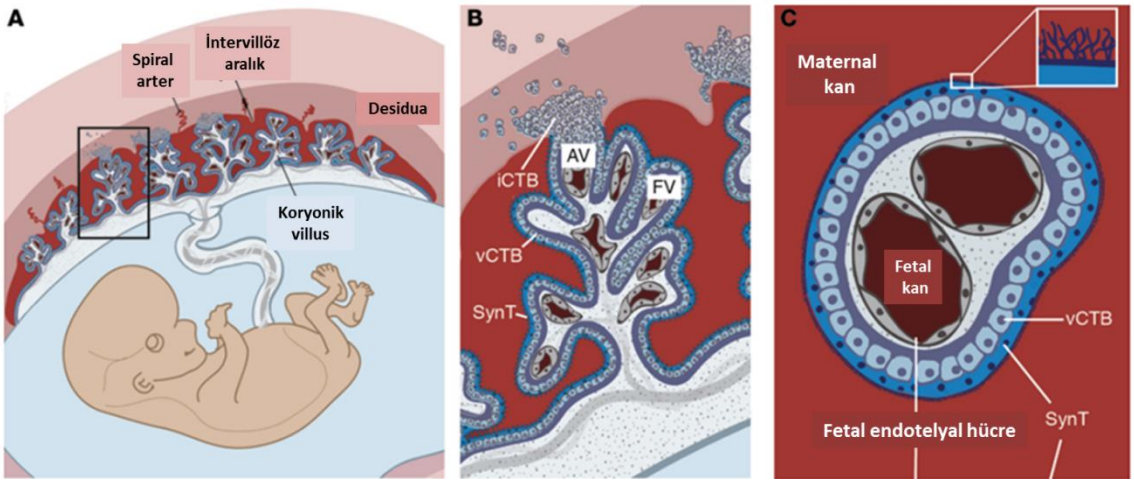
Bu çalışmada, göbek kordonundan izole edilen endotel hücrelerine (HUVEC) kültür ortamında yüksek miktarda glikoz verilerek, hipergliseminin anjiyogenez mekanizmaları üzerine etkisi ve bu etkinin mTOR sinyal iletim yolağına bağlı olup olmadığı değerlendirilmiştir. Bunun için endotel hücrelerine mTOR inhibitörleri (Rapamisin ve PP242) uygulanarak hiperglisemik koşullarda mTOR inhibisyonunun anjiyogenez mekanizması üzerindeki etkisi aydınlatılmaya çalışılmıştır. Rapamisin ile mTORC1, PP242 ile hem mTORC1 hem de mTORC2 inhibe edilmiştir. Böylelikle mTOR yolağında detaylı bir inhibisyon sağlanarak anjiyogenez üzerindeki etkisi aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Bu çalışmanın amacı gebelikleri esnasında hiperglisemiye maruz kalan kadınlardaki plasental anjiyogenez mekanizmalarının moleküler basamaklarını araştırmak ve bu süreçte mTOR sinyal iletim yolağının olası rolünü ortaya koymaktır.

GENEL BİLGİLER

2.1. Plasenta

Plasenta yaşam ömrü gebelik ile sınırlı olan karmaşık ve vazgeçilmez fonksiyonlara sahip bir organdır. Kısa yaşam ömrü olmasına karşın uterus içi çevrede memeli embriyo/fetüs sağ kalımını destekler. Plasentanın fonksiyonları arasında konseptusun tutunması, maternal immün sistem tarafından embriyo reddinin önlenmesi, maternal besin ve oksijenin fetüse ulaşması ayrıca fetal metabolik atıkların maternal dolaşıma verilmesi ve çeşitli hormonların sentezlenmesi yer almaktadır. Plasental gelişim süreci, genetik, epigenetik ve fizyolojik mekanizmaların, gestasyonel yaşa bağlı olarak koordineli düzenlenişi aracılığıyla gerçekleşir [19].



Şekil 2. 1. İnsan plasentasının ve plasentaya ait koryonik villus yapılarının şematik çizimi. Şekilde insan plasentasın maternal ve fetal orjinli dokular içeren kimerik bir organ olduğu görülmektedir. AV: Demirleyici villus, FV: Yüzen Villus, iCTB: invaziv Sitotrofoblast, vCTB: villöz Sitotrofoblast, SynT: Sinsisyotrofoblast [19].

Plasenta, maternal ve fetal yapılar içeren kimerik bir organdır (Şekil 2.1.) [19]. Plasentalı memelilere (eutherian) ait plasentalar korunmuş karakteristik özellikler gösterse de bazı temel farklılıklar mevcuttur. Bu farklılıklar plasentanın yapısı, plasental arayüz tipi, maternofetal interdijitasyonların şekline göre aşağıdaki gibi sıralanabilir [3].

1. Plasenta yapısı
    a. Diffüz
    b. Kotiledonar
    c. Kuşak benzeri
    d. Diskoidal
    e. Bidiskoidal
2. Plasental arayüz tipi
    a. Epitelo-koryal
    b. Endo-koryal
    c. Hemo-koryal
3. Materno-fetal interdijitasyonların şekli
    a. Katlantılı
    b. Lamellar
    c. Villöz
    d. Trabekülar
    e. Labirint

İnsan plasentası anatomik olarak diskoidal şekil, hemo-monokoryal arayüz ve villöz maternofetal interdijitasyonlara sahiptir [3].

2.2. İnsan Plasentasının Gelişimi ve Yapısı

Normal plasental gelişim ve fonksiyon, fetüs için oldukça önemlidir. Blastosistin trofoektoderm tabakası insan plasentasının gelişiminden sorumlu hücrelerdir [20]. İmplantasyonun ardından plasental hücreler (trofoblastlar) ilk başta embriyoya kıyasla çok daha hızlı çoğalırlar [21] ve materno-fetal arayüzü oluştururlar [19]. İmplantasyon sonrası ilk haftalarda trofoblast hücre soyu iki temel trofoblast alt tipine farklanır. Bunlardan birincisi sinsisyotrofoblastı da içeren villöz trofoblastlar ve ikincisi ekstravillöz trofoblastlardır (EVT). Villöz trofoblastlar ana germinatif trofoblast popülasyonudur ve sinsisyal füzyon ile sinsisyotrofoblastı oluşturur. Sinsisyotrofoblast villöz ağacın tüm dış yüzeyini sararak plasental bariyer yapısına katılır. Ekstravillöz trofoblastlar, demirleyici villus kolonlarından köken alan hücrelerdir ve plasental yatakta yer alan maternal hücrelerin içine invaze olur [22].

İmplantasyon sonrası ilk hafta maternal dokular ile temasta olan hücre sinsisyotrofoblasttır. Sinsisyotrofoblast içinde lakünalar oluşur ve daha sonra bu lakünalar birleşerek tek büyük bir boşluk halini alarak maternal kan için intervillöz aralığı oluşturur. Lakünar alana bakan sinsisyotrofoblast yüzeyi genişleyerek villöz yapıları oluşturur [3]. Plasental villus oluşumu postkoitum 13. günde başlar. Bu evrede sitotrofoblastlar trabekülaları invade ederler ve lakünalara doğru trofoblastik filizlenmeler oluşur. Bu yapılar primer villuslardır. Primer villus dışta sinsisyotrofoblast içte sitotrofoblastik hücrelerden oluşur. Varlıkları plasentasyonun villöz evrelerinin

başladığını işaret eder [23]. Bu gelişim basamakları özetle aşağıdaki gibi (Şekil 2.2.) evrelendirilmiştir [3].

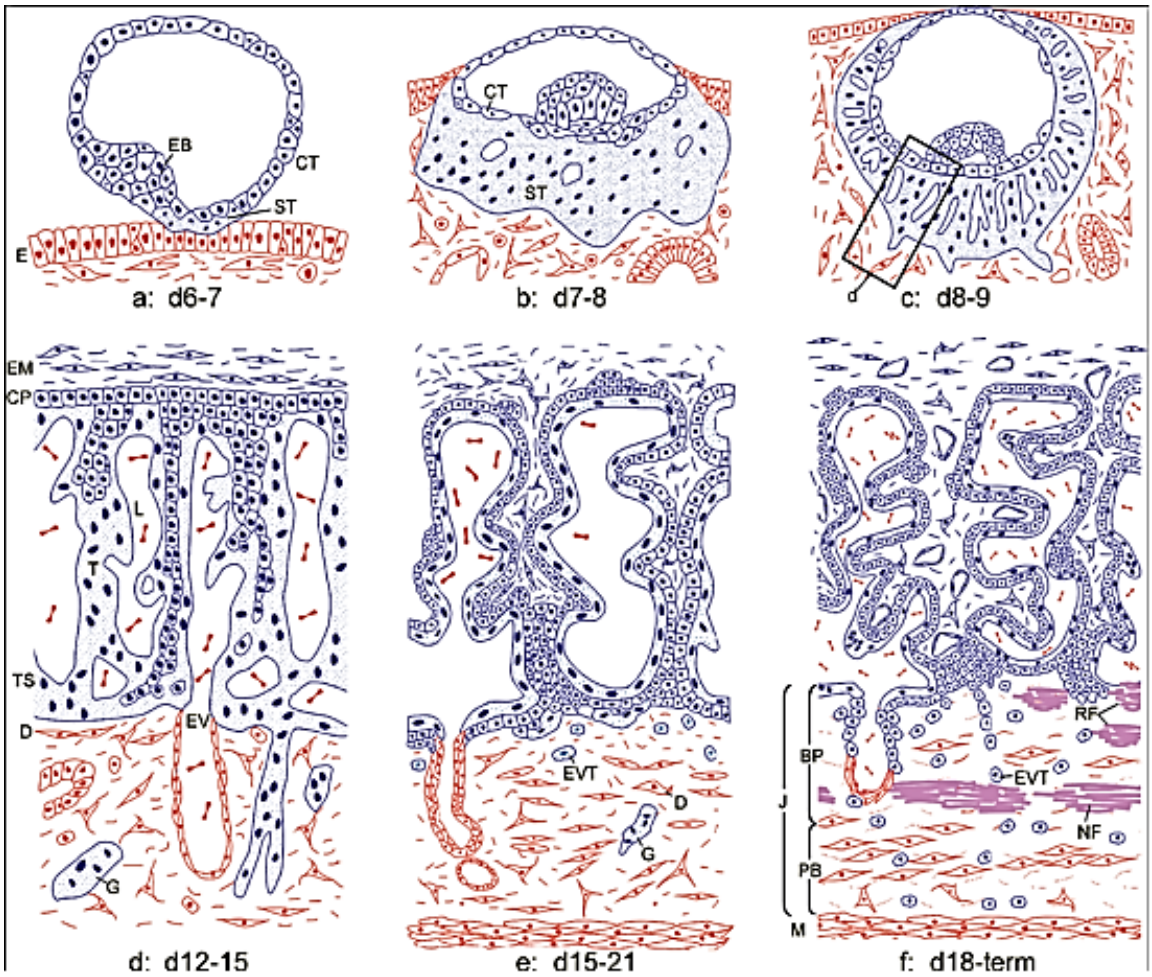
1. **Prelaküner evre**

   Postkoitum 8. güne kadar geçen evredir. Sitotrofoblast hücrelerinin çoğalmaya devam etmesi ile oluşan sinsisyal kütle implantasyon alanında dallanmalar oluşturur. Parmaksı uzantıları endometriyuma invaze olur ve endometriyum ile interdijitasyonlar yapar
2. **Laküner evre**

   Postkoitum 8 ila 13. günler arasındaki evredir. 8. günde sinsisyotrofoblast içerisinde küçük vakuoller belirir. Vakuoller büyüyüp genişleyerek lakünaları ve laküna sistemini oluştururur. Sitotrofoblast hücreleri, sinsisyal trabeküller içine uzanır ve 13. günde trofoblastik kabuğa ulaşır. Lakünar oluşum, blastosisti çevreleyen trofoblastik yapıyı üç tabakaya ayırır: primer koryonik plak, trabeküller ile birlikte lakünar sistem ve trofoblastik kabuk. Primer koryonik plak, sinsisyotrofoblast ile çevrelenen sitotrofoblastlardan oluşur. Trabeküllerin distal uçlarının birleşmesi, trofoblast tabakasının dış yüzeyini yani trofoblastik kabuğu oluşturur.
3. **Erken villus evreleri**

   Postkoitum 13 ila 28. günler arasındaki evreyi kapsar. Erken villus evresinde sitotrofoblastlar trabekülaları invade ederler ve lakünalara doğru trofoblastik filizlenmeler oluşur ve bu yapılar primer villus olarak adlandırılır.

Maternal dokular ile direk temas kuran bazı villuslar demirleyici villus adını alır ve plasenta ve embriyonun uterin dokulara sabitlenmesini sağlar. Gebeliğin 5. haftasında demirleyici villuslardan köken alan EVT'lar maternal dokular ile ilk teması kurarlar [3].



Şekil 2. 2. Erken plasental gelişimin şematize edilmiş şekli **a,b:** Prelaküner evreler **c:** Laküner evre **d:** Laküner evreden villöz evreye geçiş **e:** Sekonder villus evresi **f:** Tersiyer villus evresi Maternal dokular kırmızı, fetal dokular mavi, Fibrin içerikli maternal ve fetal dokular mor renktedir. (E: Endometriyal epitel, EB: Embriyoblast; CT: Sitotrofoblast, ST: Sinsisyotrofoblast, EM: Ekstraembriyonik mezoderm, CP: Primer Koryonik Plak, T: Trabeküla ve primer villus, L: Laküna, TS: Trofoblastik Kabuk, EV: Endometriyal damar, D: Desidua, RF: Rohr fibrinoidi, NF: Nitabuch/uteroplasental fibrinoid, G: Trofoblastik dev hücre, EVT: Ekstravillöz sitotrofoblast, BP: Bazal Plak, PB: Plasental yatak, J:Bağlantı zonu, M: Miyometriyum) [3].

Gebeliğin 5. haftasında (postkoitum 21. gün), primer villuslar embriyoblasttan köken alan allantoik mezenşim tarafından invade edilir ve böylece sekonder villus olarak adlandırılırlar. Birkaç gün sonra vaskülogenez süreci ile *de novo* fetoplasental damarların oluşum süreci başlar [24]. İlk fetoplasental kapillerler gebeliğin 5-6. haftalarında gözlenir [25] ve sekonder villus, tersiyer villus adını alır [23].

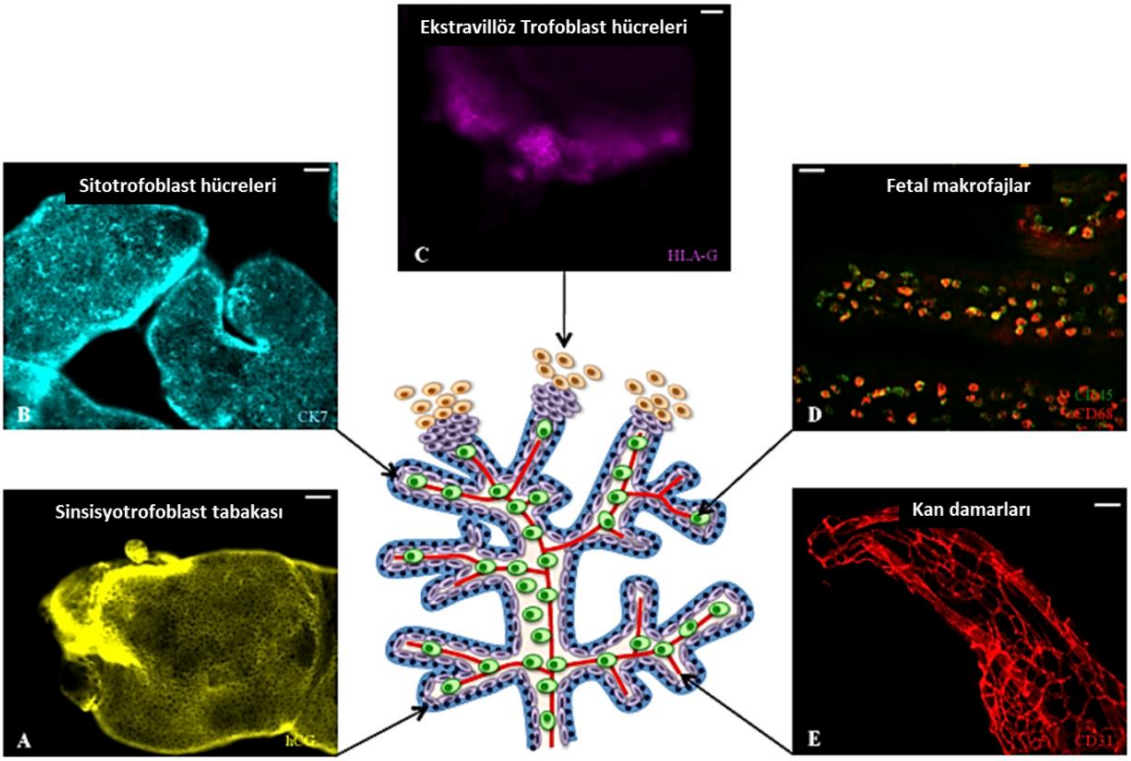
Fetoplasental dolaşım başladıktan hemen sonra fetal ve maternal kan arasında yakın temas kurulur. İki dolaşım sistemi plasental bariyer ile daima birbirinden ayrılır. Plasental bariyer şu tabakalardan oluşur [3]:

1. Sinsisyotrofoblast tabakası
2. Sitotrofoblast hücreleri
3. Sitotrofoblastik bazal lamina
4. Plasental villöz bağ doku
5. Fetal endotel hücre bazal laminası
6. Fetal endotel hücresi

2.3. Plasental Villus Ağacının Yapısı

Term plasentada, yüzen villuslar maternal kan ile direk temas halindedir ve gaz ve besin değişimine aracılık eder. Demirleyici villuslar ise hem maternal kan hem de desidua ile direkt temas halindedir ve plasentayı uterusa sabitler. Villusun en dış yüzeyinde yer alan sinsisyotrofoblast tabakası maternal kan ile temas halindedir ve gaz ve besin değişiminden sorumludur. Demirleyici villusun uç kısımları ise uternal damarların yeniden modellenmesine aracılık ederek embriyonun histiotrofik beslenmesini sağlayan invazif EVT'leri içerir. Sitotrofoblast hücreleri ise sinsisyotrofoblast ve EVT hücreleri için öncü hücreler olarak görev alırlar. Villöz stromada fetal makrofajlar (Hofbauer hücreleri), çeşitli bağ doku hücreleri ve yoğun bir kapiller ağı bulunur (Şekil 2.3.1.) [26].

Tersiyer villus kendi içinde farklı alt sınıflara ayrılarak mezenşimal villus, immatür intermediat villus, kök villus, matür intermediat villus ve terminal villus olarak gruplandırılır (Şekil 2.3.2.) [3].



Şekil 2.3. 1. Plasental villus ağacı yapısını oluşturan hücreler ve diğer yapılar. Şekilde plasental villus yapısının A: Sinsisyotrofoblast tabakası (hCG ile boyama sonucu), B: Sitotrofoblast hücreleri (Sitokeratin 7 ile boyama sonucu), C: Ekstravillöz trofoblast hücreleri (HLA-G ile boyama sonucu), D: villöz stromada yer alan fetal makrofajlar (CD68 boyama sonucu) ve E: kan damarlarından (CD31 ile boyama sonucu) oluştuğu görülmektedir [26].

2.3.1. Mezenşimal villus (MV)

Bunlar en primitif villuslardır ve genellikle birinci nesil tersiyer villuslar olarak kabul edilirler. Gebeliğin ilk dönemlerinde baskın tiptir. Gebeliğin daha sonraki dönemlerinde kök villus ve immatür intermediyet villusların uçlarında, oldukça küçük, ince, göze çarpmayan yapılar şeklinde izlenirler. Aynı zamanda villöz çoğalma ve dallanma bölgesi olarak rol oynar. Stroma gevşek olarak yerleşen kollajen liflerden oluşur. Fetal kapillerler gelişmemiştir ve dilate sinüzoidler görülmez. Kalın trofoblastik tabakanın altında primitif kapillerlerin farklı gelişimsel evreleri izlenir [3].

2.3.2. Kök villus (KV)

Oldukça yoğun fibröz bir stroma, ışık mikroskopu altında ayırt edilebilir bir medya tabakasına sahip arter, ven, arteriyol veya venüller ile karakterizedir. Kök villuslar; a) ana kök (truncus chorii), b) trunkustan çıkan kalın, dört nesil dal (rami chorii), c) sayıları 2 ile 30 arasında değişen ve birbirine eşit olmayan çatallaşan

(dikotomik) dallanmalar (ramuli chorii) d) kök villusların özel bir tipi olan demirleyici villus olarak alt gruplara ayrılır. Demirleyici villuslar, hücre kolonlarıyla bazal plağa tutunurlar [3].

2.3.3. İmmatür intermediyet villus (İMİV)

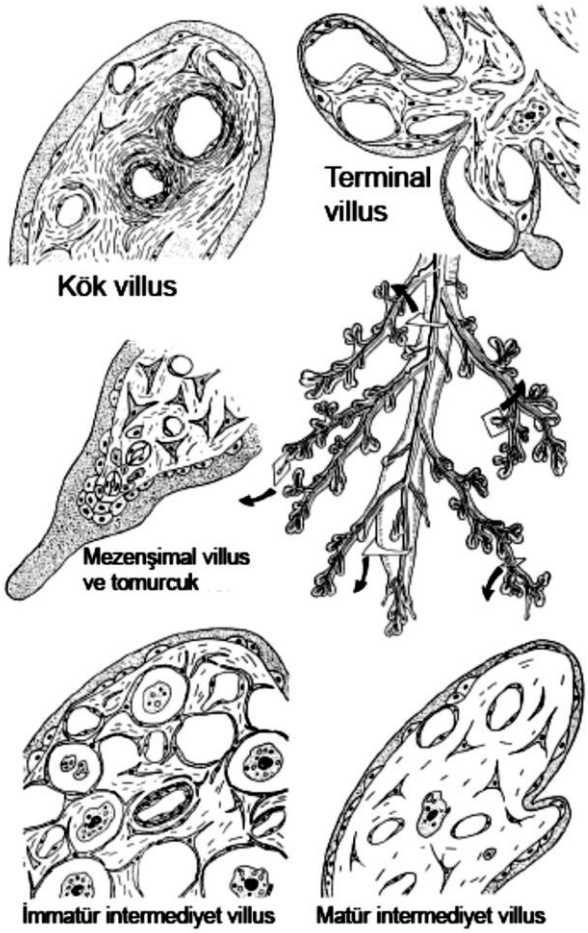
Kök villusların periferal, immatür, yumru şekildeki devamıdır. İmmatür plasentalarda baskın villus tipidir. İMİV'ler ilk iki trimester boyunca mezenşimal villusların matürasyonuyla oluşurlar. Daha sonra kök villuslara dönüşürler. Dolayısıyla İMİV'ler de MİV'ler gibi, mezenşimal ve tamamen gelişmiş villuslar arasında bir formdur. İMİV'lerin kök villuslardaki gibi oldukça kalın bir trofoblastik kabuğu vardır. En karakteristik özellikleri ağsı (retiküler) yapıdaki stromalarıdır. Sabit stromal hücrelerinin büyük yelkenvari uzantılarıyla sınırlandırılan çok sayıdaki stromal kanallardan oluşur. Fetal damarlar ve kollajen lif demetleri bu stromal kanalların aralarında yer alırlar [3].

2.3.4. Matür intermediyet villus (MİV)

Bunlar uzun, ince, uç (periferal) dallanmalardır. Bu villusların damarları ışık mikroskobuyla ayırt edilebilen medya tabakasından yoksundur. Gebeliğin son trimesterinde mezenşimal villuslardan oluşan MİV'ler terminal villusları oluştururlar. Dolayısıyla mezenşimal ve tamamen gelişmiş villuslar arasında bir geçiş formdur [3].

2.3.5. Terminal villus (TV)

Matür intermediyet villusların yaptığı, üzüm benzeri, son dallanmalardır. Yüksek derecede kapillarizasyon ve oldukça genişlemiş (dilate) sinüzoidlerle karakterizedir. Fetomaternal alışverişin ana kısmını oluştururlar [3].



Şekil 2.3. 2. Term plasentada çeşitli villus tiplerinin enine kesit çizimi [3]

2.4. Term Plasentanın Yapısı

Fetüs büyüdükçe uterus, koryon kesesi ve plasenta da büyür. Plasentanın hacminin artması ve kalınlaşması, gebeliğin yaklaşık 20. haftasına kadar hızlı bir şekilde devam eder [27]. 4. ayda villus sistemi tamamlanır ve bu ayın sonunda plasenta tam şeklini almış olur (Şekil 2.4.1.) [28]. Tam gelişmiş bir plasenta, desiduanın yaklaşık %15-30'unu kaplar ve ağırlığı yaklaşık olarak fetüs ağırlığının 1/6'sı kadardır. Plasenta termde yaklaşık 500g ağırlığında olup 18-20cm çapında, 2-2,5cm kalınlığındadır ve 10-20 adet kotiledon içerir. İntervillöz aralıkların hacmi tahmini olarak 150-250 ml'dir. Villusların toplam yüzeyi, yani anne fetüs arasında madde değişim alanı 10-15m^2'dir [29]. Term plasentada iki ayrı bölüm vardır:

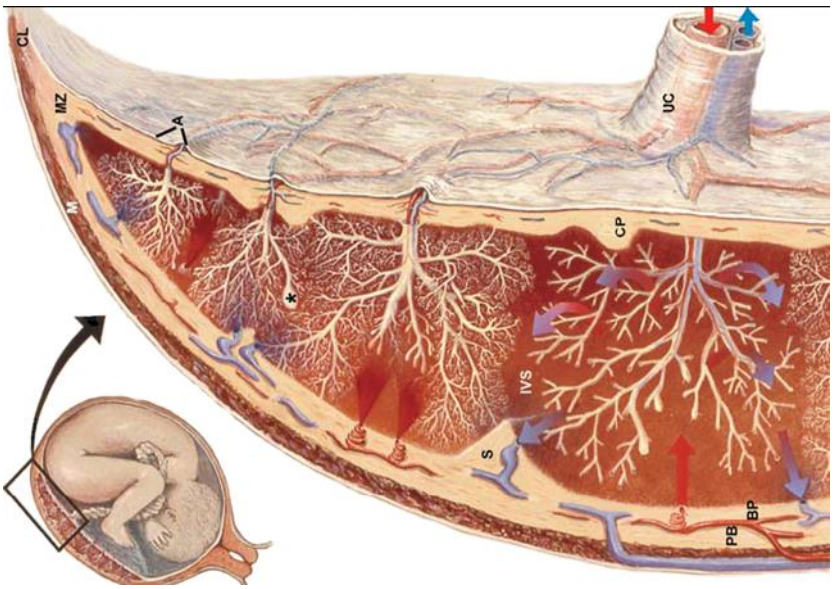
1: fetal kısım

2: maternal kısım

2.4.1. Fetal kısım

Koryon villuslarının oluşturduğu bu bölüm fetüsa ait olup koryon frondozumdan gelişir. Yapının fetal yüzü amniyon epiteli ile intervillöz boşluğa bakan yüzü ise sinsisyotrofoblast ve sitotrofoblast hücrelerinin oluşturduğu tabaka ile örtülüdür.

Her koryon ağacındaki kan dolaşımı, bir arter ve bir venden oluşan kapalı bir sistemdir. Anneden gelen temiz kan uterusun spiral arterleri ile bazal plağa girer. Oldukça düzenli aralıklarla intervillöz boşluklara açılan bu arterlerin lümenleri açılma yerlerine doğru daralır. Temiz kan intervillöz boşluklara yüksek basınçla dökülür ve koryon ağacında bulunan küçük villuslara çarpar, villustaki kan ileri doğru itilir ve villusların dikleşmesi sağlanır [3, 30].



Şekil 2.4. 1. İnsan term plasentanın görünümü UC: Umbilikal kord, A: Amniyon, CP: Koryonik Plak, MZ: Marginal zon, CL: Koryon Leve, M: Miyometriyum, IVS: İntervillöz Aralık, BP: Bazal Plak, PB: Plasental Yatak, S: Plasental Septa, *: Hücre Adacıkları [3].

2.4.2. Maternal Kısım

Anneye ait olan bu kısım, intervillöz boşlukları çevreleyen trofoblastlar, plasental septumlar ve bazal plaktan (desidua bazalis) oluşur. Plasental septalar, fibrinoid ve çeşitli hücrelerden meydana gelmiş, bazal plaktan intervillöz aralığa doğru uzanan, hiçbir zaman koryonik plağa ulaşmayan ve plasental villus ağacını tam bölmeyen düzensiz yapılardır. Plasental septaların oluşması, gelişmenin 6-8. haftalarından itibaren belirir, gebelik yaşına bağlı olarak gelişir. Bazal plak büyümesine uterus duvarı uyum sağlayamaz ve bazal plak katlantılar yaparak septaları oluşturur.

Villöz aralık içine doğru uzanan, plasental villus ağacını kısmen bölmelere ayıran septalar, aynı zamanda demirleyici villusların tutundukları çıkıntılar olarak da kabul

edilir. Septaların oluşmaya başladığı 6-8. haftalarda, yapıyı oluşturan hücresel elemanlar sitotrofoblast ve onun çok nükleuslu dev hücreleri, desidual hücreler ile septaların üst kenarlarına tutunmuş, demirleyici villuslar ve onların sinsisyo ve sitotrofoblast hücreleridir [3, 30].

Plasenta büyüdükçe ve yaşlandıkça meydana gelen histolojik değişiklerin, artan metabolik ihtiyaçları karşılamak üzere uteroplasental dolaşımın etkinliğini arttırmayı amaçladığı düşünülmektedir. Bu değişiklikler; sinsisyotrofoblast kalınlığında incelme, villöz sitotrofoblastların kısmen kaybolması, Hofbauer hücrelerinde artış, stromada azalma ve kapillerlerin sayısının artarak sinsisyal yüzeye yaklaşmasıdır [31].

Plasental elemanların arasında trofoblastlar, yapısal, fonksiyonel ve gelişimsel olarak en fazla değişiklik gösteren elemanlardır. Gebelik ilerledikçe villöz sitotrofoblastlar villusların büyük bir bölümünde ortadan kalkar ve term plasentasında villus yüzeyinin ancak %20'sinde bulunur [32]. Sinsisyotrofoblast kalınlığı da ortalama 20 μm'den termde 3.5 μm'ye iner. Villuslar dallanmaya devam ettikçe, terminal dalların sayısı artarken, hacimleri azalır ve sitotrofoblastların baskınlığı ortadan kalkar. Sinsisyum inceldiğinde, fetal damarlar daha belirgin hale gelerek yüzeye yaklaşır [33].

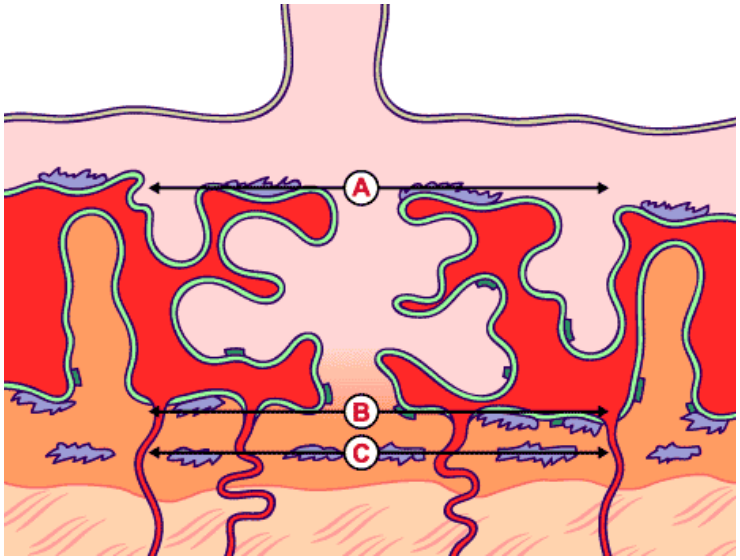
Bu değişiklikler 1. trimesterde 50-100 μm olan materno-fetal difüzyon mesafesini, termde yaklaşık 4-5 μm'ye indirir. Sonuçta termde, oldukça ince olarak plasental bariyer; sinsisyotrofoblast, birbiriyle kaynaşmış trofoblast ve fetal endotel hücre bazal membranları ve fetal kapiller endoteli katmanlarından oluşur. Böylece çoğu fetüs kapillerindeki kan, villuslararası boşluktaki anne kanı ile aşırı derecede yakınlaşır. Bütün bu değişiklikler fetüsün artan metabolik gereksinimlerini karşılamaya yöneliktir [32].

Gebeliğin sonlarına doğru, plasentada fibrinoid birikim oluşmaktadır. Fibrinoid; fibrin, plasental salgılar ve ölü trofoblast hücrelerinden oluşan, hücreden yoksun eozinofilik birikim anlamına gelmektedir. Maternal ve fetal elemanlarca yapıldığı belirlenmiştir. 37 haftanın üstündeki gebeliklerin %22'sinde fibrinoid birikim makroskobik olarak gözlenmektedir. Fibrinoid birikim plasentada birçok yerde izlenebilir:

- Fetal yüzde düz koryonda,
- Villusların içinde,
- Plasental septumlarda,
- Maternal ve fetal damarlarda,
- Koryonik plağın intervillöz aralığa bakan yüzünde (Langhans fibrinoid tabakası),
- Bazal plakta (Rohr ve Nitabuch fibrinoid tabakaları).

Langhans fibrinoid tabakası ve bazal plaktaki fibrinoid birikimler olan Rohr ve Nitabuch tabakaları tüm plasentalarda gözlenen yapılardır (Şekil 2.4.2). Rohr tabakası,

bazal plağın yüzeysel katı olup intervillöz aralıkla temas eder. Nitabuch tabakası ise derinde maternal ve fetal hücrelerin karşı karşıya geldikleri alandadır [3, 30].



Şekil 2.4. 2. Term plasentasındaki fibrinoid tabakaları. A. Langhans fibrinoid tabakası B. Rohr fibrinoid tabakası C. Nitabuch fibrinoid tabakası. Koyu mavi renkle gösterilenler fibrinoid birikimler, açık mavi renkle gösterilen sinsisyotrofoblast tabakası, pembe renkle gösterilenler plasentanın fetal kısımları, turuncu renkle gösterilenler plasentanın maternal kısımları, kırmızı renkli alanlar ise intervillöz aralıktır [34].

2.5. Plasental Villöz Damarların Gelişimi ve Yapısı

İnsan plasentası oldukça vaskülarize bir organdır. Gebeliğin sonunda, plasentada yaklaşık 550km uzunluğa ve 15m^2 yüzey alanına sahip olan bir kapiller ağ mevcuttur [35]. Bu oluşum materno-fetal değişimin etkili bir şekilde gerçekleşebilmesi için önemlidir ve plasental villus ağacının gelişiminde önemli bir rol oynar. Dolayısıyla vaskülogenez ve devamında gerçekleşen anjiyogenez plasental gelişimde önemli bir role sahiptir. Plasental anjiyogenezin düzenlemesinde ortaya çıkabilecek hatalar, uterus içi fetal büyüme geriliğine ve diğer olumsuz obstetrik sonuçlara neden olabilir [3, 30].

2.5.1. Vasküler gelişimin morfolojik özellikleri

Post-koitum 18-20.günler arası mezenşimal villus içerisinde vaskülogenezin ilk morfolojik belirtileri ortaya çıkar. Hemanjiyoblastik hücreler *in situ* farklanır ve küçük yığınları veya trofoblastik epitelin hemen altında uzanan kordları oluştur. Bu endotelyal prekürsör hücreler, desmozom ya da sıkı bağlantılar ile birbirine bağlanmıştır. Kordlar, kademeli olarak lümen yapısı ve ardından damar yapısını oluşturmaktadırlar [25, 36]. Lümen oluşumunun ilk işaretleri yaklaşık olarak post-koitum 23. günde gözlenir ve immünohistokimyasal ve morfolojik kanıtlar bu süreçte apoptozun rol oynadığını işaret etmektedir [37]. Yeni oluşan lümenlerde, hemanjiyoblastik yığınların iç kısımlarındaki hücrelerden farklanan nükleus içeren genç eritrositler sıklıkla izlenir. Stromal hücrelerin devreye girmesi ve bir seri hücre bölünmesi ile hücre kordonları uzar. Ardından bağlantı

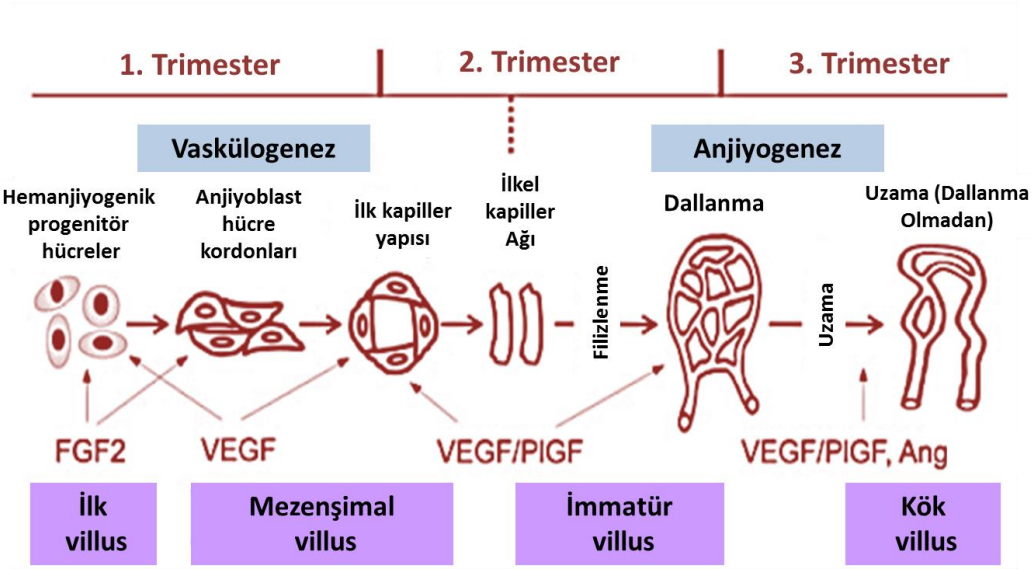
sapındaki allantoik divertikül yanında gelişen damarlar ile birleşerek feto-plasental ağın kurulması gerçekleşir. Erken evrelerden itibaren stromal hücreler perisit olarak bu süreçte yer alırlar ve kapiller yüzdesi gebelik yaşı ile artan perisit sayısı ile ilişkilidir [38]. Kollajen, laminin ve fibronektinden oluşan bazal membran 1. ve 2. trimesterde gözlenmezken, 3. trimesterde endotel hücrelerini ve perisitleri saran bir yapı olarak ortaya çıkar [25].

İnsan plasentası endotel hücreleri fenestrasızdır ve adherens ve sıkı bağlantılar aracılığıyla komşu hücrelere tutunur [39, 40]. Bu bağlantılar kapiller duvarı sabitlenmenin yanı sıra paraselüler transportu da düzenler. Yapılan çalışmalarda ilk trimesterde sıkı bağlantılarda Okludin ve Klaudin 1 ve 2'nin yer almadığı, bunun yanısıra adherens bağlantılarda da plakoglobin'in yer almadığı gözlenmiştir. Bu proteinler bu bağlantıların olgun (matür) formlarında var olan moleküllerdir [41]. Dolayısıyla ilk trimesterde gözlenen bu immaturite, kapiller yapıların yeniden modellenmeye oldukça açık ve permeabl olduklarını işaret etmektedir.

Plasental vasküler ağ, gebelik boyunca devamlı ve yoğun yeniden modellenme süreçleri geçirir. 1. ve 2.trimesterde plasental villus içinde kapiller profilde sayı, hacim ve yüzey alanı açısından kademeli bir artış olmaktadır [42]. 25. haftada kapiller uzunluk artışı hızlanmaktadır ve toplam uzunluk terme kadar artmaya devam etmektedir [43]. Uzama endotel hücre proliferasyonu ve endotel hücrelerinin yeniden modellenmesi ile gerçekleşir. Sağlıklı gelişen villuslarda villus/kapiller uzunluk oranı 2. trimesterden itibaren sabittir. Ancak kapillerlerin hatalı büyümelerinin villöz yüzeyden kapiller loop obtrüzyonuna neden olduğu, bunun da trofoblast epitelinin kabartı benzeri çıkıntılar yapmasına ve burada yeni terminal villus oluşumlarına neden olduğu düşünülmektedir [44, 45]. Konfokal mikroskobi ile 3 boyutlu görüntüleme sayesinde, matür plasentalarda terminal villus oluşumunun hem kapiller loop obtrüzyonu hem de kör nokta filizlenmeleri ile gerçekleştiği gözlenmiştir [46]. Günümüzde terminal villus oluşumunda iki mekanizmada da anjiyogenezin itici güç olduğu bilinmektedir.

2.6. Plasentada Vaskülogenez ve Anjiyogenezin Moleküler Regülasyonu

Plasentada hem dallanma (branching) hem de dallanma olmayan; uzama (non-branching) yoluyla anjiyogenez gerçekleşmektedir. Dallanma ile anjiyogenez, filizlenme aracılığıyla yeni damar oluşumu şeklinde ortaya çıkar. Uzama ile anjiyogenez, uzama ile kapiller loopların oluşması şeklinde ortaya çıkar. Post-koitum 24. haftadan önce dallanma şeklinde anjiyogenezin gerçekleştiği tanımlanmışken, 24. haftadan terme kadar geçen süreçte dallanma olmayan; uzama şeklinde anjiyogenez olarak devam etmektedir (Şekil 2.6.1.) [47].

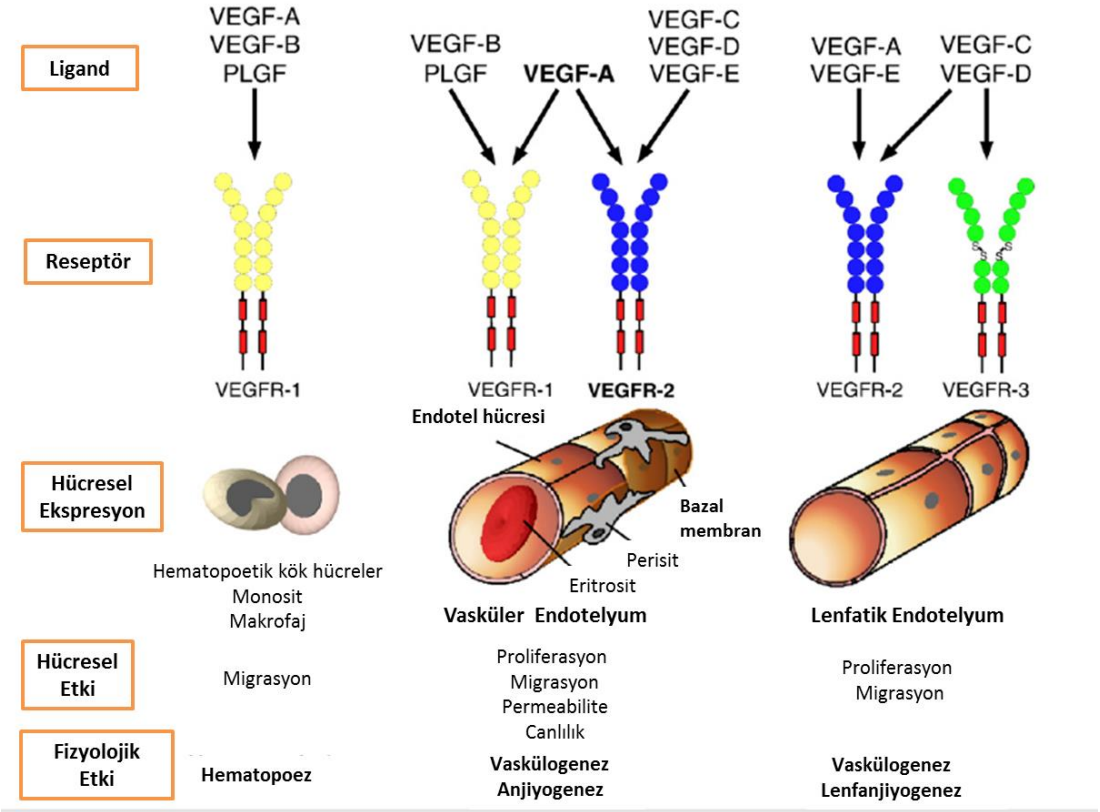


Şekil 2.6. 1. Plasental villus tiplerinde vaskülogenez ve anjiyogenez [48].

Vaskülogenez ve anjiyogenez farklı büyüme faktörleri ve sinyal iletim yolakları tarafından düzenlenmektedir. VEGF plasental vasküler gelişimin her aşamasında önemli bir faktördür. FGF2 embriyonik gelişim esnasında hemanjiyogenik progenitörlerin oluşumunda kısmi bir rol oynamaktadır [49]. Plasental Büyüme Faktörü (PIGF), villöz ağacın gelişiminde VEGF ile benzer bir rol oynamaktadır (Şekil 2.6.1.) [50].

2.6.1. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF)

VEGF, en iyi karakterize edilmiş anjiyogenik faktörler arasındadır ve damar oluşumunda kritik rol oynayan en potent anjiyogenik faktörlerden biridir. VEGF, büyük ölçüde korunmuş, 30-46kDa'luk, salgısal, heparin bağlayıcı homodimerik bir glikoproteindir. VEGF gen ailesi, 6 üyeden oluşur; VEGF-A, -B, -C, -D, -E ve PlGF (Şekil 2.6.2.).



Şekil 2.6. 2. VEGF ailesinin vaskülogenez, anjiyogenez ve lenfanjiyogenezdeki moleküler mekanizmaları [51].

İnsan VEGF genine ait protein kodlayıcı bölgeler 8 ekzon halinde düzenlenmiş olup kromozom 6p21.3' te lokalizedir [52]. Tek bir VEGF geninin alternatif kırpılması (splicing) sonucunda her biri 121, 145, 165, 183, 189 ve 206 amino asit uzunluğunda 6 farklı VEGF-A izoformu (VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF183, VEGF189, VEGF206) oluşur [53, 54]. İlginç olarak, her ne kadar bütün izoformlar benzer biyolojik aktivite gösterseler de, VEGF121 ve VEGF165 ekstraselüler alana salgılanırken, VEGF189, VEGF206 ve az miktarda da VEGF165 heparan sülfatlara afinitelerinden dolayı hücre–veya matriks ilişkili kalırlar [55]. VEGF genini eksprese eden hücrelerin birçoğunda VEGF121 ve VEGF165 baskın olarak bulunmakla birlikte [54, 55] VEGF145 en az rastlanan izoformdur. VEGF gen promotörü, tek bir transkripsiyon başlama bölgesi, SP-1 faktör bağlama bölgesi, AP-1 ve AP-2 transkripsiyon faktörleri için bağlama bölgeleri (Hipoksi ile düzenlenen bölge) [54] içerir.

VEGF, ilkin vasküler geçirgenliği (permeabiliteyi) ve vasküler endotelyal hücre çoğalmasını uyarıcı etkisiyle karakterize edilmiştir [56, 57]. Bu önemli molekül, arterler, venler ve lenfatiklerden köken alan mikro ve makro-vasküler endotelyal hücreler için potent bir mitojendir ve diğer hücreler için herhangi bir mitojenik etki göstermez [58-60]. Bu nedenden dolayı VEGF' in çok sınırlı bir hedef hücre özgünlüğü

(spesifitesi) [60, 61] vardır. VEGF, üç boyutlu *in vitro* modellerde mikrovasküler endotelyal hücrelerin kollajen jellere invazyonlarını ve kapiller benzeri yapılar oluşturmalarını uyararak anjiyogenik etki gösterir. Bu çalışmalar aynı zamanda VEGF ve bFGF'nin bu indüksiyonda sinerjik etki gösterdiklerini ortaya koymuştur [60].

Farklı knock-out çalışmalar, VEGF'nin önemini vurgulamıştır. Farelerde, VEGF alellerinden birinin ortadan kaldırılması, ölümcül vasküler anomalilerle sonuçlanmıştır. Yine farelerde, her iki alelin birden knock-out edilmesi, damar sisteminin hemen hemen tamamının ortadan kalkmasına yol açmıştır [60, 62-64].

Normal gebelik sürecinde plasental VEGF ekspresyonu gebelik yaşı ile birlikte artmaktadır. Plasentada amniyon, koryon [65] ve fetal endotelyal hücreler [66], trofoblastlar, Hofbauer hücreleri, vasküler düz kas hücreleri [67] VEGF eksprese etmektedirler. 2 spesifik VEGF reseptörü; VEGFR-1 (Flt-1) ve VEGFR-2 (KDR/ Flk-1) trofoblastlarda ve endotel hücrelerinde eksprese olmaktadır [68] ve VEGF hücre içi etkilerini bu reseptörleri üzerinden gerçekleştirmektedir.

2.6.2. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptör 1 ve 2 (VEGFR1, VEGFR2)

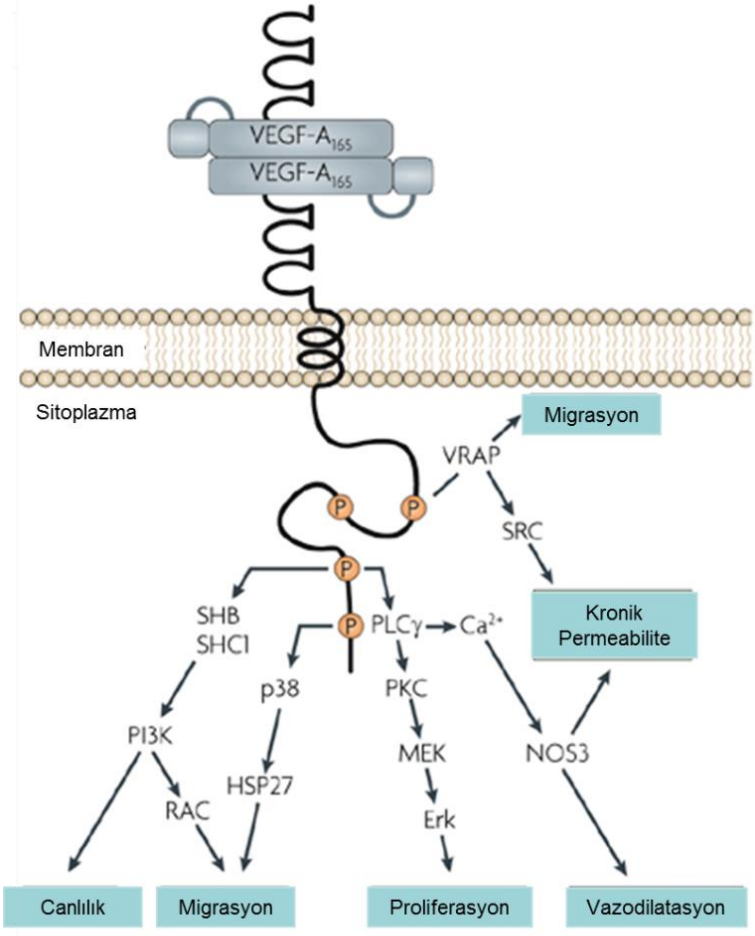
En iyi tanımlanmış VEGF reseptörleri VEGFR-1 (flt-1) ve VEGFR-2 (KDR/flk-1)'dir (Şekil 2.6.2.). Diğer VEGF reseptörlerinden nöropilinler, ana reseptörlere bağlanmayı yönlendiren aksesuar reseptörler olarak tanımlanmışlardır [69].

VEGF-A, Tip III tirozin kinaz aile reseptörlerinden, c-fms-benzeri tirozin kinaz (VEGFR-1, flt-1) [70] ve kinaz domeyn inserti içeren reseptör (VEGFR-2, KDR/flk-1)'e bağlanarak endotelyal hücre çoğalması, geçirgenliği, göçü ve kapiller tüpleri oluşturmalarına neden olur [70-72]. Flk-1 (fetal liver kinase, fötal karaciğer kinazi), KDR'nin kemiricilerdeki homologudur ve insan KDR'si ile %85 homoloji gösterir. Bu reseptörler, "7 Ig" veya "flt" gen ailesine aittir ve 7 tane ekstrasellüler Ig–benzeri domeyn, bir transmembran domeyn ve iyi korunmuş bir tirozin kinaz domeyni içerirler [56, 73, 74].

VEGFR2, VEGF'in mitojenik, anti-apoptotik, permabilite artırıcı etkilerini düzenlemekten sorumlu iken VEGFR1'in negatif regülatör olarak iş gördüğü düşünülmektedir [72]. VEGFR1'in negatif regülatör görevini açıklayabilmek için en çok kabul edilen hipotez VEGFR1'in sahte (decoy) reseptör olduğudur [75]. VEGFR1'in VEGF'e bağlanma afinitesi yüksek olmasına karşın kinaz aktivitesi düşüktür [76]. Fare $Vegfr1^{-/-}$ embriyolar, embriyonik 8.5–9 günlerde endotelyal aşırı büyüme nedeniyle ölmektedirler [77]. VEGFR1 yokluğunda endotelyal progenitör hücre sayısında artış olması, bu reseptörün vasküler regülasyondaki negatif düzenleyicini rolünü destekler niteliktedir [78]. Vasküler endotelyal hücreler ve hematopoetik kök hücreler [79, 80], monositler ve makrofajlar [74] gibi farklı hücrelerde de eksprese olmaktadır. Bu hücrelerde, hücre göçünde önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir [81, 82].

VEGFR2 ise vasküler ve lenfatik endotelyal hücreler ve megakaryosit, hematopoetik kök hücre gibi farklı hücrelerde eksprese olmaktadır [83]. $Vegfr2^{-/-}$ embriyolar, endotelyal ve hematopoetik kök hücrelerdeki gelişim hataları nedeniyle

embriyonik 8.5-9.5 günlerde ölmektedir. Dolayısıyla VEGFR2'nin damar gelişimindeki önemi ortaya çıkmaktadır [84]. VEGF'in endotel hücrelerindeki fizyolojik ve patolojik etkilerinin temel aracısı VEGFR2'dir [85]. VEGF stimülasyonundan sonra, VEGFR2 otofosforile olarak aktive olur. İnsanlarda oto-fosforile olan pek çok tirozin-kinaz fosforillenme alanları (rezidü) (951, 1054, 1059, 1175 ve 1214) bildirilmiştir [86]. Bu fosforillenme alanlarına göre farklı yolaklar (PI3K/Akt, MAPK, PKC,…) ve ilişkili çeşitli mekanizmalar devreye girmektedir [87]. Bu mekanizmalar proliferasyon, migrasyon ve geçirgenlik ile ilgili süreçlerdir. Bu süreçleri düzenleyen hücre içi sinyal iletim yolakları Şekil 2.6.3.'de gösterilmiştir. VEGFR2'nin aktive ettiği sinyal iletim yolaklarından birisi PI3K/Akt yolağıdır [85].



Şekil 2.6. 3.VEGF uyarımı sonucu hücre içinde devreye giren hücre içi sinyal iletim yolakları [88].

2.7. PI3K/Akt Sinyal İletim Yolağı

Akt (=Protein Kinaz B, PKB) bir serin/treonin kinazdır ve cAMP bağımlı protein kinaz A/ protein kinaz G/ protein kinaz C (AGC) süperailesinin bir üyesidir [89, 90]. Bu kinazlardan bazılarının düzenlenmesinde ortaya çıkan aksaklıklar kanser ve diyabet gibi hastalıklarla yakından ilişkilidir. Protein Kinaz B, Akt1 ve Akt2 genleri tarafından kodlanan bir proteindir. Memelilerde 3 Akt/PKB geni tanımlanmıştır [91, 92].

- Akt1- PKBα, 14q32 üzerinde
- Akt2- PKBβ, 19q13 üzerinde
- Akt3- PKBγ, 1q44 üzerinde lokalizedir.

Fosfotidil İnositol-3-Kinaz (PI3K) tarafından üretilen Fosfotidilinositol TriFosfat (PIP3), Akt'nin hücre membranına translokasyonunu sağlar [89, 90]. Merkezi kinaz katalitik domaini, treonin rezidüsü içerir ve bu rezidünün (Treonin308) Protein Bağımlı Kinaz (PDK) aracılı [93] fosforilasyonu Akt'nin kısmi olarak aktivasyonu sağlamaktadır. mTORC2 tarafından Serin 473 rezidülerinin fosforillenmesi [94] ise Akt'in tamamen aktivasyonu için gereklidir.

Akt, çeşitli hedef proteinlerini etkileyerek glikoz alımı, gen transkripsiyonu, hücre proliferasyonu, farklılaşması, büyümesi, hücre göçü, apoptoz ve hücre canlılığının devamının kontrolü gibi önemli rollere sahiptir [95-98]. Günümüzde özellikle diyabet, kanser, tümör anjiyogenezi gibi konularda en sık çalışılan Akt ilişkili yolak, mTOR yolağıdır.

2.8. mTOR Sinyal İletim Yolağı

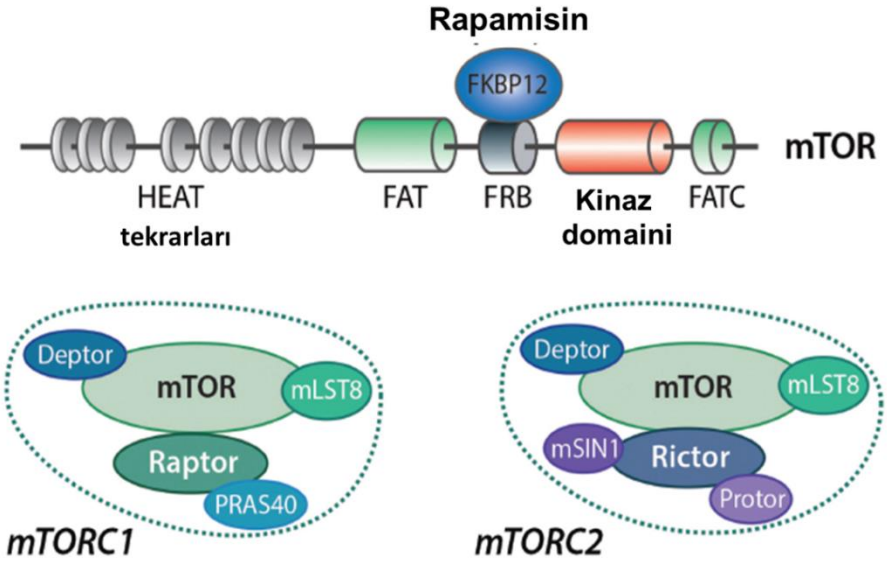
mTOR (Memeli Rapamisin Hedefi Protein, mammalian Target of Rapamycin), Fosfoinositid-3-Kinaz İlişkili Kinaz Ailesi'nin (PIKK) üyesi bir Serin/Treonin kinazdır [99]. Maya ve memelilerde yapılan genetik ve biyokimyasal yaklaşımlar; bir toprak bakterisi tarafından üretilen ve bir makrolid olan, klinikte immün baskılayıcı olarak kullanılan Rapamisinin hedefi olarak TOR'un keşfini sağlamıştır. mTOR; büyüme faktörleri, değişen besin şartları ve enerji dalgalanmaları gibi çevresel olaylara karşı geniş spektrumlu bir cevap oluşturmaktadır [100]. Yapısal olarak mTOR şu bölgelerden oluşur (Şekil 2.8.1.);

- N-terminal domaini
    - tandem HEAT (found in huntingtin, elongasyon faktör 3, protein fosfataz 2A alt ünitesi ve TOR proteini) tekrarlarını içeren bir bölge (protein-protein etkileşimlerine aracılık eder),
    - FAT (FRAP, ATM ve TRRAP) domaini
- Katalitik domaini PI3K isoformları ile yüksek sekans homolojisine sahiptir.
    - C terminal bölgesinde FRB (FKBP12-rapamisin bağlanma bölgesi) ve FATC (FAT C-terminal, mTOR kinaz aktivitesini modüle eder) arasında yer alır [101, 102].

mTOR, fonksiyonel ve yapısal olarak farklı multiprotein komplekslerinden oluşan 2 kompleksin (mTOR Kompleks1 ve Kompleks2; mTORC1, mTORC2) katalitik

alt ünitesidir. mTORC1 ve mTORC2 sahip olduğu yardımcı proteinler [103-105]; özellikle Raptor (mTOR'un regülatör ilişkili proteini) ve Rictor (Rapamisin hassas olmayan mTOR proteini) proteinleri ile birbirinden ayırt edilirler [106]. Her iki protein de skafold protein olarak iş görerek, regülatör ve substratların devreye girmesini kolaylaştırır.

mTORC1'de ayrıca PRAS40 (prolinden-zengin AKT substratı 40 kDa) ve mTORC2'de mSIN1 (memeli stres-aktive protein kinaz ilişkili protein 1) ve Protor (Rictor ile gözlenen protein) yer almaktadır. Her iki komplekste ortak yer alan proteinler ise mLST8 (memeli letal Sec13 protein 8) ve Deptor (DEP domain-içeren mTOR ilişkili protein)'dir [107] (Şekil 2.8.1.).

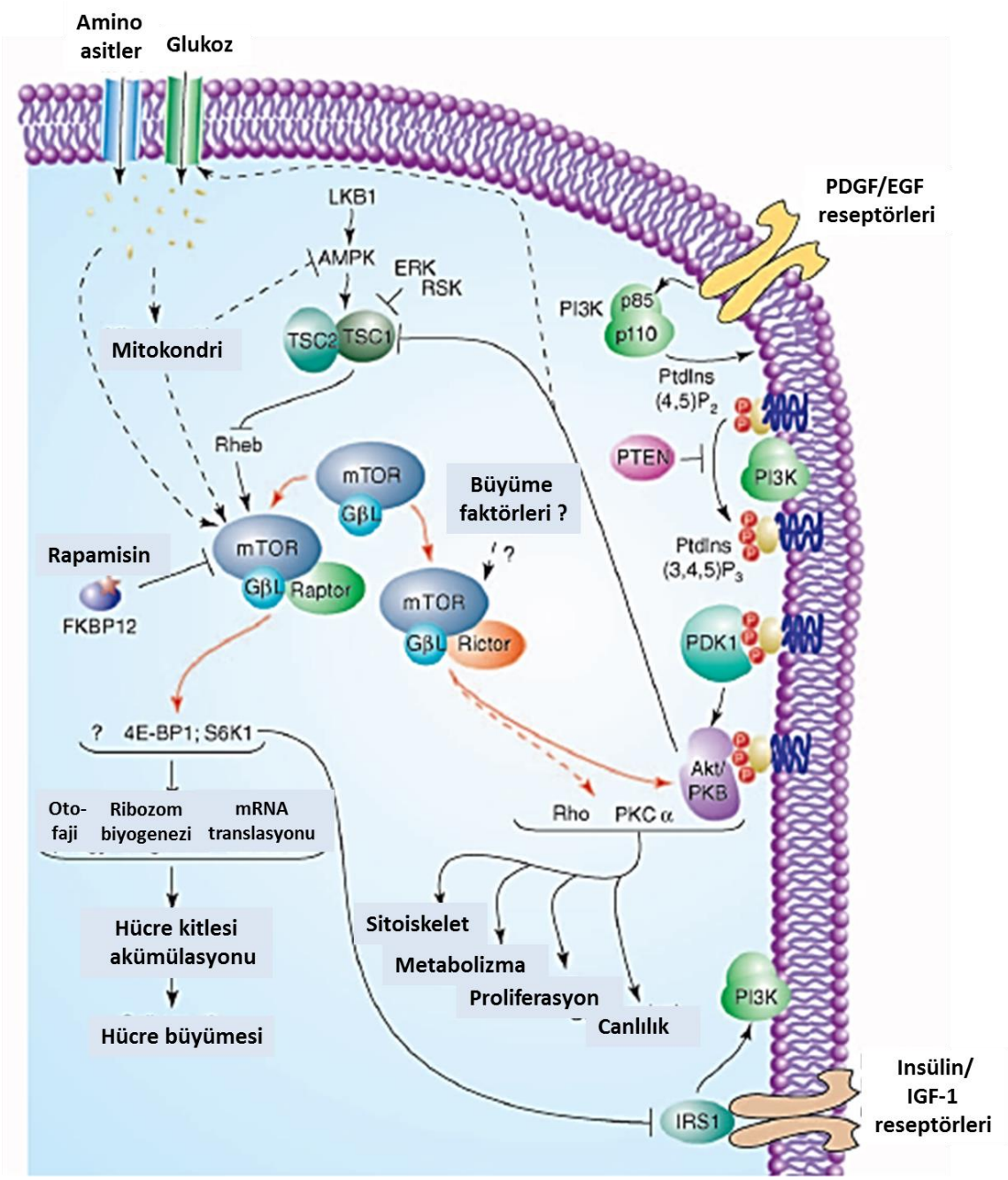


Şekil 2.8. 1. mTOR komplekslerinde yer alan proteinler [108].

mTORC1 besinler özellikle glikoz, büyüme faktörleri, stres ve enerji ile düzenlenirken (Şekil 2.8.2.) mTORC2 için günümüzde sadece büyüme faktörlerinin doğrudan etkisi gösterilebilmiştir. mTORC1 esas olarak protein sentezinden sorumludur. mTORC1 substratları; S6K1 (S6 Kinaz1) ve 4E-BP1 (eIF4E Bağlayıcı Protein 1) mRNA translasyonu ile ilişkilidir. Bir dizi fosforilasyon mekanizmasının ardından S6K1 ve 4EBP1 aktive olarak translasyonun başlamasını ve devamlılığını sağlar [109]. mTORC1'in, HIF1α üzerinden anjiyogenezi düzenlediği bilinmektedir [107].

mTORC2 ise daha çok hücre iskeleti düzenlenmesinde ve hücre polarizasyonunda görevlidir. mTORC2 çok sayıda hücre iskeleti düzenleyicisini kontrol eder [110, 111]. Son yıllardaki veriler mTORC2'nin AGC kinaz ailesi üyelerini (Akt, SGK [serum ve glukokortikoid ile regüle olan kinazlar] ve PKC [Protein Kinaz C])'yi de

fosforillediğini göstermektedir [94, 112-114]. Bu proteinler, hücre canlılığı, hücre döngüsünün ilerlemesi ve anabolizma ile ilişkilidir (Şekil 2.8.2.) [107].



Şekil 2.8. 2. mTOR komplekslerinin hedef proteinleri; substratları [115].

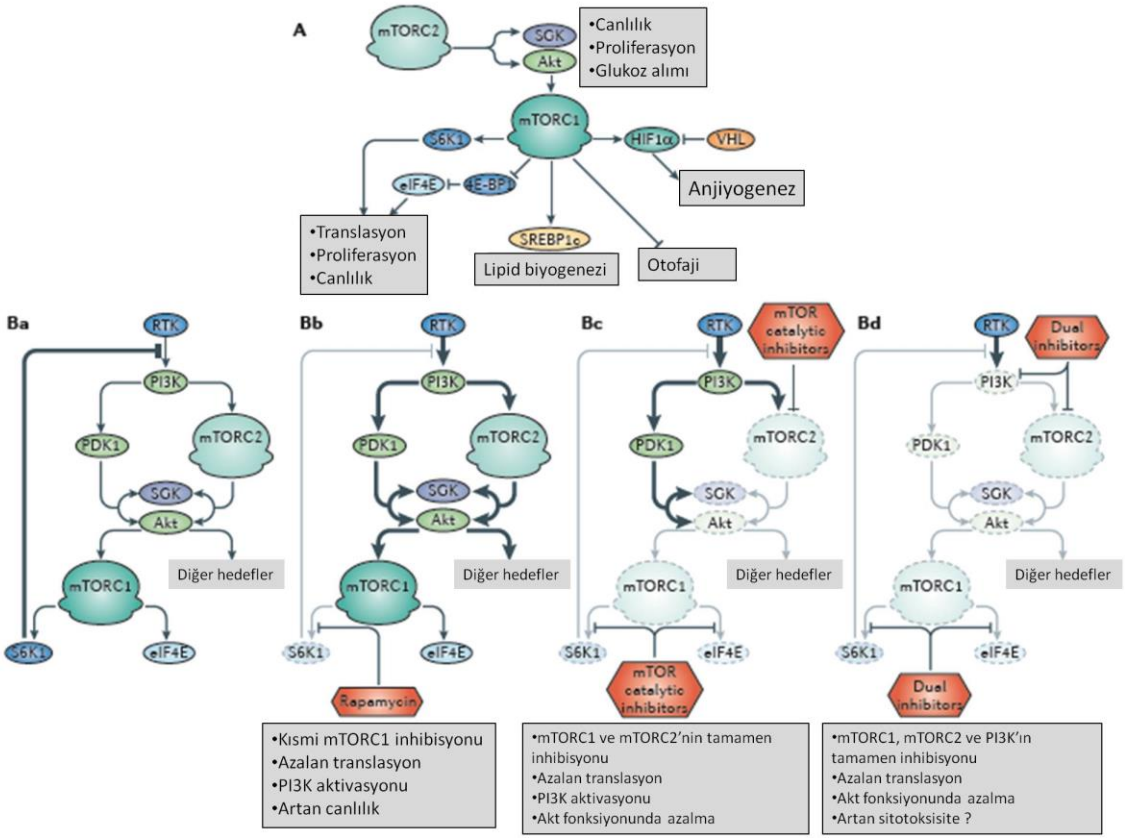
2.9. mTOR İnhibisyonu

Mayalarda ve memelilerde, Rapamisin mTORC1 aktivitesini inhibe eder ancak mTORC2'yi inhibe etmez. Rapamisin 12 kDa'luk FK506-bağlayıcı proteine bağlanır ve RAPTOR-bağlı mTOR'u inaktive eder. Rapamisin bu işlevini mTORC1'i RAPTOR'un mTOR'dan ayrılmasını önleyerek gerçekleştirir [116-118]. Dolayısıyla mTOR subtratlarına bağlanamaz.

Rapamisin kanser tedavilerinde klinik uygulamalar için umut vaat eden bir molekül olarak ortaya çıkmıştır ancak bugüne kadar beklenen etkiyi gösterememiştir. Rapamisin bazlı terapotik yaklaşımlardaki olumsuzluklar S6K1'in bloke edilmesiyle ortaya çıkan geri bildirim mekanizması nedeniyle yaşanmaktadır. Bu proteinin inhibisyonu, PI3K sinyal iletiminde artışa neden olmaktadır ve Akt ve diğer AGC kinazların canlılık ve proliferatif etkilerini önemli ölçüde tetiklemektedir [119]. S6K1 inhibisyonu ayrıca MEK-ERK sinyal yolağını [120] ve PDGFR (platelet-kökenli büyüme faktör reseptörü) transkripsiyonunu [121] aktive etmektedir. Rapamisin tedavilerinin istenen başarı düzeyine ulaşamamasının bir diğer nedeni de Rapamisinin mTORC1'i tamamen inhibe edememesinden kaynaklanıyor olabilir.

Rapamisin ile S6K1 aktivitesi tamamen baskılanırken (Şekil 2.9.1.), 4EBP1 fosforilasyonu kısa süreli, kısmi olarak devam eder [122-126]. Hiperaktive olan PI3K-Akt yolağı 4EBP1 fosforilasyonunu tetikleyebilir. mTORC1'in Rapamisin hassas kompleks olarak bilinmesine rağmen son yıllarda ortaya çıkan çalışmalarda, bazı fonksiyonlarının Rapamisin dirençli olduğu ortaya konmuştur [123]. Bununla birlikte mTORC2 esasen Rapamisin dirençli kompleks olarak bilinse de yine son çalışmalarda Rapamisine maruziyetin uzadığı koşullarda bazı hücre tiplerinde Rapamisine yanıt olarak belirli fonksiyonların baskılandığı gözlenmiştir [127].

Bu 2 majör engel, ikinci jenerasyon mTOR inhibitörlerinin gerekliliğini doğurmuştur. Hem mTORC1 hem de mTORC2'yi inhibe eden ATP kompetatif (=katalitik) mTOR inhibitörleri yaratılmıştır [124, 128-130]. Bunlar (PP242, PP30, Torin1, Ku-0063794, WAY-600, WYE-687, WYE-354…) bir seri küçük sentetik moleküllerdir ve diğer kinazları inhibe etmezler [124]. S6K1 ve Akt fosforilasyonlarının değerlendirilmesi ile elde edilen sonuçlara göre bu bileşikler nanomolar konsantrasyonlarda etkilerini gösterirler. Örneğin Torin 1, 4EBP1 ve mTORC2 aracılı Akt fosforilasyonunu da bloke ederek rapamisine oranla çok daha etkili bir yanıt oluşturmuştur [122, 129-131]. Ayrıca bir diğer mTOR katalitik inhibitörü olan PP242, deneysel fare lösemi modelinde rapamisinden çok daha iyi terapotik yanıt vermiştir ve normal lenfositler üzerinde makul düzeyde etkiler göstermiştir [107, 132].

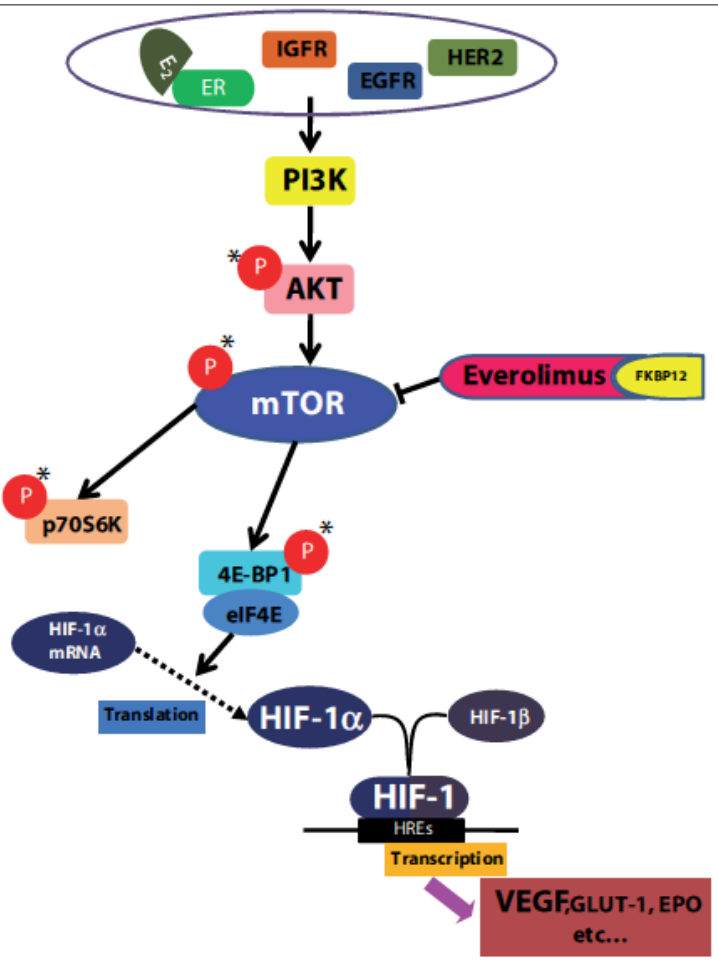


Şekil 2.9. 1. mTOR inhibitörlerinin etki mekanizması [107].

mTOR disregülasyonu, sıklıkla tümör büyümesi, metastaz ve anjiyogenez ile ilişkilendirilmektedir [133]. mTOR; translasyon, hücre büyümesi, protein sentezi ve anjiyogenez üzerindeki etkilerini substratları olan p70S6K ve 4EBP1 aracılığıyla gerçekleştirir [134]. mTOR'un 4EBP1'i fosforillemesi sonucu serbest hale geçen eIF4E, c-myc, siklin D1, b-FGF, VEGF ve MMP-9 (Matrix Metalloproteinaz-9)'u etkileyerek hücre canlılığı, tümorogenez, anjiyogenez, invazyon ve metastazı teşvik etmektedir [135-139]. Ayrıca, HIF1α'nın mTOR aracılı artan ekspresyonu, VEGF aktivitesinde artışa neden olmaktadır [140, 141].

2.10. mTOR ve Anjiyogenez

mTOR'un anjiyogenez ile ilişkisine yönelik literatürde çok sayıda çalışma mevcuttur [11]. Bu çalışmalarda daha çok tümör anjiyogenezi ve mTOR inhibitörlerinin anti-anjiyogenik özellikleri üzerinde durulmaktadır. 2009 yılında yapılan bir çalışmada rapamisin ve türevlerinin doz bağımlı olarak lösemik hücrelerde VEGF ekspresyonunu azalttığı gözlenmiştir [142]. Bir diğer çalışmada Rapamisin uygulaması ile S6K1 ve Akt fosforilasyonlarında, dolayısıyla VEGF-A164 ekspresyonunda azalma olduğu gözlenmiştir. Dolayısıyla hem mTORC1 hem de mTORC2'nin rapamisinden etkilenmiş olabileceği ifade edilmektedir [143].



Şekil 2.10. 1. mTOR yolağının anjiyogeneze etki mekanizması [144].

Bazı araştırmacılara göre ise mTOR, mTORC2 üzerinden de anjiyogenik aktiviteyi düzenleyebilmektedir. siRNA kullanılarak mTORC1 ve mTORC2 ayrı ayrı bloke edildiğinde mTORC1'in değil, mTORC2'nin downregülasyonu sonucu endotel hücre canlılığı ve migrasyonunun azaldığı gözlenmiştir [145]. mTOR'un endotel hücre migrasyonu üzerindeki etkisini mTORC2 üzerinde p27 aracılığıyla gerçekleştirdiği bildirilmiştir [146]. Ayrıca mTORC1'in, HIF1α üzerinden [141] anjiyogenezi düzenlediği bilinmektedir (Şekil 2.10.1).

2.11. mTOR ve Plasenta

Yapılan çalışmalar sonucunda mTOR'un plasentada fonksiyonel olduğu tespit edilmiştir [14-17]. Yapılan çalışmalar sonucunda mTOR'un plasental gelişimde erken dönem proliferasyon ve büyüme süreçlerinde önemli olduğu ve mTOR geni hasarında letalitenin görüldüğü bildirilmiştir [147, 148]. mTOR sinyal iletiminin rol oynadığı amino asit iletimi, trofoblast hücre motilitesi ve implantasyonun başlaması için önemlidir [149].

Utreus içi büyüme geriliği (IUGR) görülen gebeliklerde mTOR aktivitesinin düşük olduğu görülmüştür. Yapılan çalışmalarda kültüre villöz fragmentlerde görülen amino asit transportundaki düşüşün mTOR aktivisindeki azalma ile korele olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanısıra IUGR tanısı alan gebeliklere ait plasentalarla yapılan analizler sonucu mTOR yolağı proteinlerinin ekspresyon düzeyinin düşük olduğu ve Endoplazmik Retikulum stresinin yüksek olduğu belirlenmiştir [14, 150]. IUGR görülen fetüslerin hipoglisemik olduğu [151] ve plazma İnsülin ve IGF-I düzeylerinin düşük olduğu [152, 153], ayrıca maternal IGF-I ve glikoz düzeylerinin de düşük [151, 154] olduğu bildirilmiştir. Dolayısıyla glikoz ve büyüme faktörlerinin azalması nedeniyle IUGR plasentaların gözlenebileceği ifade edilmiştir. Bu faktörler mTOR yolağı düzenleyicisi olduğu için, mTOR'un plasentada bir sensör görevi görerek besin ve büyüme faktörlerini algılayarak plasental büyümeyi düzenlediği düşünülmektedir [155].

2.12. Diabetes Mellitus

Diabetes ve mellitus (DM-) kelimeleri yunanca akıp gitmek anlamına gelen "dia + betes" ve bal kadar tatlı anlamına gelen "mellitus" kelimelerinden türetilmiştir. Diabetes Mellitus üç ana gruba ayrılır: Tip 1 Diabetes Mellitus (T1DM), Tip 2 Diabetes Mellitus (T2DM) ve Gestasyonel Diabetes Mellitus (Gebelik Diyabeti) [5, 156].

T1DM, çocukluk çağında sık görülen, insülin üretiminde görev alan pankreasın beta hücrelerinin otoimmün nedenlerle hasara uğraması sonucu gelişen kronik metabolik bir hastalıktır. İnsülin bağımlı ya da jüvenil diyabet olarak da adlandırılır. Diyabet türlerinin %5-10'unu oluşturur. Etiyolojisinde genetik ve çevresel faktörler rol oynamaktadır [157, 158].

T2DM ise insülin bağımsız diyabet olarak da adlandırılır ve yetişkin yaşamda ortaya çıkar. Tüm diyabet türlerinin %90-95'ini oluşturur [156]. T2DM görülen hastalarda temel bozukluk insülinin fizyolojik etkilerine karşı periferik dokularda, özellikle de çizgili kaslarda direnç gelişmesidir. İnsülin direncini oluşturabilen veya arttırabilen etkiler arasında yaşlanma, sedanter yaşam, obezite, stres, glukokortikoidler, seks hormonu yapısındaki ilaçlar, gebelik, glikoz toksisitesine yol açan uzun süreli hiperglisemi ve genetik yatkınlık bulunur [159-162].

İlk kez gebelik esnasında tespit edilen diyabete Gestasyonel Diabetes Mellitus (GDM) denir. Gebeliklerin %2-5'inde GDM'a rastlanır [163]. Gestasyonel diyabetli kadınların büyük çoğunluğunda glikoz intoleransı doğum sonrasında normale dönmektedir. Ancak, ileri dönemlerde Tip 2 Diyabet ortaya çıkma riski oldukça fazladır. Bu riskin normal glikoz toleransı olan kadınlara göre 6 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir [164].

Dördüncü bir diyabet grubu olarak da özel tip diyabet yer almaktadır. B hücre disfonksiyonuna neden olan Monogenik diyabet (örneğin neonatal diyabet), ekzokrin pankreas hastalıklarından kaynaklanan diyabet (örneğin pankreatit), ilaç ya da kimyasal indüklü diyabet (örneğin glukokortikoidler ve tiroid hormonları), enfeksiyonlar ve çeşitli genetik sebeplerle ortaya çıkan özel diyabet türleri bu grupta yer almaktadır [156].

2.12.1. Diyabet ve Hiperglisemi

Diyabet dünya genelinde en büyük sağlık problemlerinden biridir. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre günümüzde 346 milyon insan diyabetiktir ve 2030'da diyabete bağlı ölümlerin iki katına çıkacağı tahmin edilmektedir. Bu nedenle bu hastalığın önlenmesi ya da korunmasına yönelik çalışmalar önemini korumaktadır [165].

Diyabet poliüri, polidipsi, glikozüri, ketonüri ve açıklanamayan kilo kaybı ve hiperglisemi; plazma örneğinde (Amerikan Diyabet Derneği kriterlerine göre; The American Diabetes Association (ADA)) açlık glikoz düzeyinin 126 mg/dl üzerinde olması ve 75g şeker yüklemesi sonrası 2 saatlik plazma glikoz düzeyinin 200 mg/dl üzerinde bulunması ile karakterize metabolik bir bozukluktur [166]. Glikolize hemoglobin düzeyleri (HbA1c) de, diyabet tanısında kullanılan bir diğer kriterdir ve % 6.5 ve üzeri HbA1c değerleri olan bireyler diyabetik olarak kabul edilir. HbA1c kriterinin diyabetik teşhisi için kullanıma yönelik bazı şüpheler olsa da, ölçüm sonuçlarının netliği, bireyin kendi ölçümleri aradında bile farklılıkların az olması, açlık kan ölçümüne gerek kalmaması ve stres gibi diğer faktörlerden çok daha az etkilenmesi nedeniyle kullanım avantajları vardır. Glikolize hemoglobin düzeyi 2-3 aylık süreyi yansıtmaktadır [167].

Diyabete yatkınlığı olan bireylerin açlık plazma glikoz düzeyleri ise 100-125mg/dL, tokluk plazma glikoz düzeyleri 140-199 mg/dL ve HbA1c düzeyleri ise %5.7 - %6.4 arasında kabul edilmektedir [167]. Uzun süren hiperglisemik koşullar glikoz toksisitesine neden olmaktadır. Tedavi hedefi olarak ADA, HbA1c düzeylerinin %7'den düşük olması gerektiğini, Amerikan Klinik Endokrinologlar Derneği (American Association of Clinical Endocrinologists) ise %6.5'dan düşük tutulması gerektiğini önermektedirler [168].

Hipergliseminin hücresel hasara neden olabilmesi için plazma glikozunun ilk olarak hücre içine taşınması gerekmektedir. Bu işlem kolaylaştırılmış taşıma ile glikoz taşıyıcı proteinler ile gerçekleşir. İskelet kası ve adipoz dokuda, insülin varlığında glikoz transport oranı artmaktadır ancak pekçok hücre tipinde glikoz alımı için insüline ihtiyaç duyulmamaktadır. Hiperglisemik bir çevre ile karşılaştıklarında pek çok hücre, hücre içi glikoz konsantrasyonunu dengelemek için transport oranını düşürmektedir. Bunun aksine bazı hücre türleri, efektif olarak bu süreci düzenleyemezler ve artan plazma glikoz düzeylerine karşı daha hassas olurlar [169]. Pankreatik B hücreleri, nöronal hücreler ve vasküler hücreler bu tür hücrelere örnek teşkil etmektedir. Bu hücrelerde hücre içi glikoz düzeyleri ekstraselüler glikoz konsantrasyonu ile benzer düzeydedir [169-171]. Sonuç olarak bu hücreler hiperglisemik hasara oldukça yatkındır [166].

Hücre içi glikoz düzeylerinin yükselmesi, hücre içi yolaklarda meydana gelen değişiklikler aracılığıyla hücresel hasara sebebiyet vermektedir. Bu değişiklikler arasında glikoz metabolizmasında artış, süperoksit radikallerinin üretiminde artış, antioksidan enzim kapasitesinde azalma, PKC yolağının aktivasyonu, geri dönüşümsüz olarak proteinlerin glikasyonu ve ileri glikasyon son ürünlerin (AGEs) oluşumu yer

almaktadır. Bu değişimlerin temelinde ise Oksidatif stres yani Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) oluşumu ve eliminasyonu arasındaki dengesizlik yer almaktadır [166, 169].

Hipergliseminin ciddi bir sonucu "hiperglisemik hafıza"dır. Bu fenomene göre diyabetik hastalarda glisemik kontrol sağlansa bile hipergliseminin etkileri devam etmektedir [172]. AGEs oluşumunun "hiperglisemik hafıza" fenomeninin ortaya çıkmasında rol oynadığı düşünülmektedir [173].

2.12.2. Diyabet ve Anjiyogenez

Diyabet tedavisi hiperglisemi kontrolü üzerine dayanmaktadır ve bu hastalığın etki sınırları diyabete bağlı gelişen vasküler komplikasyonlarla koreledir [174]. Diyabette koroner arter hastalıklarında 4 kat artış, periferal vasküler hastalıklarda 10 kat artış ve mortalite oranlarında 3-4 kat artış görülmektedir. Mortalite nedeninin temeli %75 oranında vasküler hastalıklardır [175]. T1DM'da hipergliseminin sonucu olarak endotelyal disfonksiyon nedeniyle vasküler hatalar ortaya çıkar. T2DM'da ise asıl etmen endotelyal disfonksiyondur, hiperglisemi bu sürece sebep olmaktan ziyade bu süreci hızlandırır [176].

Dünya çapında milyonlarca kişi diyabet hastasıdır ve bu hastaların Periferal Arteryal Hastalık (PAH)'a yakalanma riskleri yüksektir. PAH, arterlerin daralma veya tıkanma ile karakterize kol ve bacaklarda kan dolaşımında azalmaya neden olan bir bozukluktur. Diyabette vasküler hastalıklar hem mikrosirkülasyonu hem de büyük damarları etkiler. Mikroanjiyopati, damarlar ve kılcal damarlar düzeyinde bazal membran kalınlaşması ve plazma çözünenleri için geçirgenliğin artışı ile karakterizedir. Diyabetik hastalarda PAH, ağırlıklı olarak orta boy arterleri etkileyen anjiyopati ve anormal metabolik durum nedeniyle gözlenmektedir. En önemli metabolik nedenleri, arterlerin ateroskleroza duyarlı hale gelmesine yol açan kronik hiperglisemi, dislipidemi ve insülin direncidir [177].

Diyabetik koşulların vasküler sistem üzerinde etkilerini açıklamak için çeşitli teoriler öne sürülmüştür. Özellikle hipergliseminin endotel hücreleri üzerindeki etkileri kardiyovasküler hastalık oluşum mekanizmalarını açıklamak bakımından önemlidir. Hipergliseminin vasküler sistem üzerindeki olumsuz etkilerini çeşitli hücresel mekanizmalarla açıklayan pek çok çalışma ortaya konmuştur. Hiperglisemi; hücre dışı ve hücre içinde değişikliklere neden olmakta, bunun sonucunda sinyal iletim yolaklarında gen ekspresyonu ve protein fonksiyonu etkilenmekte ve endotelyal disfonksiyona sebebiyet vermektedir [178].

Hiperglisemik koşullarda proteinlerin primer aminlerinin nonenzimatik yoldan glikolize olmaları, lipid ve proteinleri etkileyerek vasküler değişikliklere ve harabiyete neden olurlar. Dolaşımdaki fazla serbest yağ asitleri, oksidatif stres ve Nitrik Oksit (NO) inhibisyonu yoluyla endotel fonksiyonu bozulur. Böylece NO ve prostasiklinde bir azalma ve vazokonstriktörler olan Endotelin-I ve Anjiyotensin-II'de artma gözlenmektedir [177].

Hiperglisemi, epigenetik mekanizmalar (histon asetilasyonu, kromatin modifikasyonu, transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu) aracılığıyla da endotel hücre fonksiyonunu etkileyebilir. Hiperglisemik koşullarda NF-κß ile düzenlenen inflamatuvar genler ve histon asetil tranferaz gibi ko-aktivatörler insan monosit hücrelerinde devreye girmektedir [179]. Ayrıca hiperglıseminin NF-κß geninde H3K4 ve h3k9 metilasyon paternlerinde epigenetik değişikliklere neden olduğu gözlenmiştir [172, 180] . Tanaka ve ark., artan oksidatif stres aracılığıyla glikozun endotel hücrelerinde Foxo1 transkripsiyon faktörününün artışına neden olarak iNOS aktivasyonu sebebiyle endotelyal disfonksiyona neden olduğu bildirilmiştir [181]. Dolayısıyla, çeşitli mekanizmalar aracılığıyla, hiperglisemi indüklü epigenetik mekanizmalar hiperglisemik hafızaya neden olan faktörlerden biri olabilir [182].

Diyabette anjiyogenez organ veya hücre bağımlı olarak farklı anjiyogenik yanıtlar vermektedir [183]. Örneğin Retinada, diyabet pro-anjiyogenik bir rol oynar ve diyabetik retinopatilerde anti-anjiyogenik terapilerle VEGF'i nötralize etmeye çalışılır [184, 185]. Buna karşın kalpte, VEGF sinyalleri diyabette düzensizdir ve kollateral damar oluşumu aksar [186]. Kanser hücrelerinde ise yüksek glikoz, HIF-1α akümülasyonunu dolayısıyla VEGF ekspresyonunu tetikler. Buna karşın normal hücrelerde yüksek HIF-1α ve VEGF ekspresyonunu inhibe eder [187-189].

2.13. Diyabetik Gebelikler

Gebelikte diyabet görülme oranı %3-20 arasındadır [190]. Diyabet ile komplike olmuş gebelikler hem anne hem de fetüs açısından dikkatli takip gerektiren riskli gebeliklerdir [191]. Yeterli glisemik kontrol sağlanamadığında bebekte konjenital malformasyondan intrauterin ölüme, annede hipoglisemiden diyabetik ketoasidoz, retinopati, nöropati ve nefropatiye kadar farklı nedenlerle morbidite ve mortaliteye neden olabilen metabolik bir bozukluktur [192]. Fetal makrozomi, polihidramniyoz, doğum travmaları, sıkıntılı solunum sendromu, neonatal hipoglisemi, hiperbilüribinemi ve hipokalsemi gelişme olasılığı GDM'lu gebeliklerde artmaktadır [191, 193].

Fetal makrozomi, 4000g üzerinde doğum ağırlığı olan bebekler olarak tanımlanmıştır ve normal doğumların %12'sinde, GDM görülen doğumların ise %15-45'inde görülmektedir. Diyabetik gebeliklerde yüksek oranda glikoz plasentadan fetal dolaşıma geçerek yağ olarak depolanmaktadır [194]. Makrozomik yenidoğanların yenidoğan sarılığına ve hipoglisemiye yakalanma riskleri 5 kat daha fazladır [194, 195].

Normal gebelik, özellikle geç ikinci trimester ve üçüncü trimesterlerde, geçici insülin direnci artışının görüldüğü bir durumdur [196, 197]. Yapılan birçok çalışmada, gebelerin büyük çoğunluğunun, gebelikleri süresince artmış insülin direncine rağmen normoglisemik durumlarını muhafaza ettikleri, bu durumun da insülin salgılanmasındaki bir artış nedeniyle olduğu gösterilmiştir [198]. İnsülin salgısında, özellikle de ilk faz insülin salınımında yeterince artış olmayan gebelerde ise gestasyonel diyabet gelişmektedir [196]. Bununla birlikte gestasyonel diyabet hastalarının aslında gebelik öncesi tanısı konmamış T2DM hastası olma ihtimallerinin oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir. Giderek artan diyabet oranı nedeniyle, gebe kalmadan önce anne adaylarının diyabetik olup olmadıklarının araştırılması önerilmektedir. Bununla birlikte

ilk trimesterde diyabet teşhisi konan hastaların T2DM olarak kabul edilmesi gerektiği belirtilmiştir [156].

2.14. Diyabetik Plasenta

Diyabetik annelere ait term plasentalar maternal hiperglisemi ve fetal hipervolemiye bağlı olarak normalden daha büyük, kalın ve pletoriktir [199]. Diyabetik plasentalardaki farklılıklar ilk kez 1958 yılında Thomsen ve Lieschke [200] tarafından tanımlanmıştır ve artan plasental ağırlık, pletora ve villöz immaturite olarak bildirilmiştir. Bununla birlikte 1963'te Burstein ve ark. [201] sinsisyal düğümlerde artış olduğunu belirtmişlerdir. 1968'de Liebhart ve ark. [202] plasental kollajen ve mukopolisakkarit içeriğinde azalma olduğunu belirtse de 1976'da Jones ve Fox [203] diyabetik plasentalarda bazal membran kalınlaşması olduğunu bildirmişlerdir. Bu kalınlaşmanın enzimatik olmayan glikalizasyon [204] ya da Kollajen Tip IV artışı nedeniyle [205, 206] olabileceği belirtilmiştir. Teasdale ve ark. 1981'de [207] ve Björk ve Persson 1984'de [208] plasental değişim yüzeyinde artış olduğunu rapor etmişlerdir. Laurini ve ark. 1984'de [209] bazal membran kalınlaşması ve kollajen içeriğinde artışın yanı sıra diyabetik plasentalarda endotelyal proliferasyon artışı olduğunu belirlemişlerdir. 1993'te ise Jones ve Desoye [210] endotel hücrelerinde glikojen depolanmasında artış olduğuna işaret etmişlerdir. Tablo 2.14.1.'de diyabetik plasentalarda gözlenen değişiklikler özetlenmiştir.

Tablo 2.14. 1. Diyabetik insan plasentalarında gözlenen değişiklikler

	Diyabetik plasenta
Plasental ağırlık	↑
Villöz maturasyon	↓
Pletora	↑
Sinsisyal düğüm sayısı	↑
Bazal membran kalınlığı	↑
Plasental transport yüzeyi	↑
Endotelyal proliferasyon	↑
Endotel hücrelerinde glikojen depolanması	↑

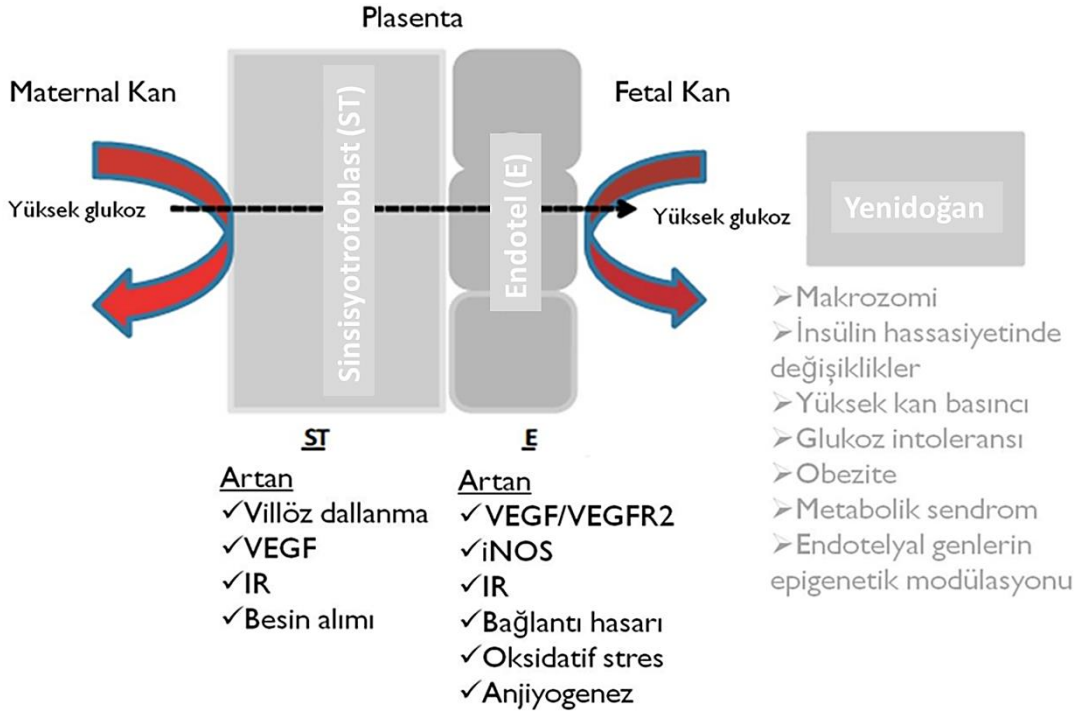
Diyabetik gebeliklerin plasentalarında en sık gözlenen anomali, plasental villusların tam olarak olgunlaşamamasıdır [211]. Sağlıklı gebeliklerde erken dönem plasentalarda gözlenen plasental villuslardaki sitotrofoblast hücrelerinin çok sayıda olması, dikkate değer bir proliferatif aktiviteyi işaret eder. Epidermal büyüme faktörü sitotrofoblastların sinsisyotrofoblasta farklanmasını uyarır. T1DM hastalarının plasentalarında epidermal büyüme faktörü reseptöründe transkript ve protein düzeyinde azalmanın gözlenmesi sitotrofoblastların farklanmaktan ziyade çoğalmasına neden olmuş olabilir. Dolayısıyla plasental villuslarda sitotrofoblastlardan zengin daha büyük plasentalar gözlenir [199]. Plasental villuslarda sitotrofoblastların proliferasyonunda artışın yanı sıra, villöz stromal hücrelerde, villöz kapiller sayısında ve villus çaplarında da artış olmaktadır. Trofoblastik bazal membranın kalınlaşması gözlenebilir. Bu

kalınlaşma, enzimatik olmayan glikasyon veya kollajen artışına bağlı olabilir. Kollajen Tip IV diyabetik plasentalarda daha yoğundur.

Diyabetik plasentada kalsifiye alanların artışı sıklıkla gözlenir. Villöz fibrinoid nekrozu diyabetik plasentalarda daha da artmaktadır. Umblikal kord, daha fazla Wharton jeli içerdiği için genellikle daha kalındır [212]. Diyabetik plasentalarda glikojen depolanması artmaktadır. Ancak diyabet, diğer tüm organlarda glikojen içeriğini azaltmaktadır. Diyabette nefropati görülüyorsa, fetal büyüme geriliği, plasentada infarktüs, desiduanın normalden kalın olması ve plasenta ağırlığında ve büyüklüğünde azalma görülmektedir [212].

Diyabetik plasentaların karakteristik özelliklerinden biri de transport yüzey alanlarının genişlemesidir. Bu genişleme, yetersiz maternofetal transportu telafi etmek için olabilir. Diyabetik plasentalarda villöz yüzey alanı %30-50 oranında artmıştır. Üstelik villöz kapillerlerin uzunlukları %30 oranında, yüzey alanları %40 oranında artmıştır. Bu mekanizma, materno fetal taşınımı kısıtlanmış olan difüzyon sınırlı substratların (örn:oksijen) telafi edilmesine yönelik olabilir. Trofoblast bazal membran kalınlaşmasının ve yoğun fetal metabolizmanın bir sonucu olan fetal hipoksi, FGF-2, VEGF, PGF-1 gibi anjiyogenik faktörlerin sentezini uyarıyor olabilir [213].

Maternal diyabette plasental anjiyogenezin arttığını gösteren çalışmalarda kapiller uzunluğun artışı, dallanma ve kapiller yüzey alanının artışı bildilmiştir. Bu durum VEGF-A ve VEGFR-2'nin vasküler endotelde ve sinsisyotrofoblastlardaki güçlü boyanması ile korelasyon göstermektedir. Buna karşın Helske ve ark., diyabetik plasentalarda VEGFR-1ekspresyonunun arttığını, VEGFR-2 düzeylerinin değişmediğini ifade etmiştir [214]. Şekil 2.14.1.'de diyabetik koşullarda plasentada anjiyogenez süreçleri ile ilişkili değişimler görülmektedir [215].



Şekil 2.14. 1. Diyabetik koşullarda gözlenen plasental ve fetal değişimler [215].

Anjiyogenez düzenleyici faktörlerde meydana gelen diyabet ilişkili değişiklikler, diyabette değişen plasental anjiyogenez ve hipervaskülarizasyonun temel nedeni olarak kabul edilmektedir [216-220]. Diyabet türüne göre; pregestasyonel (T1D ya da T2D) ya da gestasyonel diyabet, plasental vasküler gelişim farklı etkilenmektedir. Pregestasyonel diyabet tüm plasental ve fetal gelişimi etkilerken, gestasyonel diyabet sadece 2. trimesterin sonuna doğru etki etmekte ve anjiyogenez ve mikrovasküler yeniden modellenme gibi süreçleri etkilemektedir. Bu farklılık plasental morfolojiyede yansıyarak diyabet türüne göre plasental vasküler ağaç yapısında değişikliklere neden olabilir. Örneğin T1D'de ilk trimesterden itibaren plasental vaskülatürde değişikliklerin olduğu gözlenmiştir. Ancak çalışmalarda farklı sonuçlar mevcuttur. Plasental vasküler indeksin hem azaldığını [221] hem de arttığını [222] söyleyen çalışmalar mevcuttur.

Üçüncü trimesterde, T1D ve GDM benzer şekilde etki etmektedir. T1D'de hem longitudinal büyüme artmaktadır hem de villöz kapillerlerin artan dallanması gerçekleşmektedir [216, 217, 219, 220]. Benzer gözlemler GDM'da da mevcuttur. GDM'da kapiller dallanmada artış [217] ve kapiller yüzey alanında artış [207] söz konusudur.

Plasental hipervaskülarizasyon bulgularının yanısıra, endotel direncinin değiştiğine dair veriler de mevcuttur. Adherens bağlantı proteinlerinin yüzey

ekspresyonu ölçümlerinin sonucuna göre VE-kaderin ve Beta-katenin ekspresyonunda hem T1D [223] hem de GDM'da [224] bir azalma gözlenmektedir. Ayrıca sıkı bağlantı proteinlerinden zonula okludens 1'de GDM'da azalmıştır [224]. Bu moleküller anjiyogenezde önemli rollere sahiptir ve aynı zamanda bariyer görevleri de vardır. Bu nedenle diyabette bu moleküllerde ortaya çıkan değişiklikler plasental anjiyogenez sürecini etkilemektedir [190].

2.15. Hipotez

Besin ve büyüme faktörleri tarafından düzenlenen mTOR sinyal iletim yolağının anjiyogenez mekanizmalarını etkilediği bilinmektedir. Ancak diyabetik koşullarda anjiyogenez mekanizmalarında mTOR sinyal iletim yolağının rolü henüz aydınlatılmamıştır. Hiperglisemik koşuların anjiyogenez üzerindeki etkisini düzenleyen sinyal iletim yolaklarına dair veriler kısıtlıdır. Ayrıca diyabetik koşullarda plasental anjiyogenez mekanizmalarında gözlenen değişimlere dair çelişkili yayınlar mevcuttur. Bu bilgilere dayanarak hipotezimizi "hiperglisemik koşullarda ve diyabetik plasentalarda mTOR sinyal iletim yolağının anjiyogenezi düzenlediği" yönünde kurduk. Bu çalışma ile amacımız gebelikleri esnasında hiperglisemiye maruz kalan kadınlarda görülen anormal plasental anjiyogenez mekanizmalarında mTOR yolağının rolünü ortaya koymaktır.

GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Göbek Kordonu Venöz Endotel Hücre (HUVEC) İzolasyonu ve Hücre Kültürü

Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar

- **Endotelyal Büyüme Besiyeri Bullet Kit** (Lonza Clonetics EGM (CC-3124), Endotelyal Bazal Medyum (500ml) ve büyüme faktörlerini içeren Kit (CC-3124 = CC-3121 & CC-4133))

Kit içerisindeki Serum ve büyüme faktörleri

- ❖ Fetal bovin serum (10 ml)
- ❖ Bovin beyin ekstraktı (2ml)
- ❖ Epidermal büyüme faktörü (0.5 ml)
- ❖ Hidrokortizon (0.5 ml)
- ❖ Gentamisin, amfoterisin B (0.5 ml)
- ❖ Askorbik Asit (0.5 ml)

- **Hank'in Dengeli Tuz Solüsyonu**: Hank's Balanced Salt Solution (HBSS; Gibco, #14185-052)
- **100X penisilin/streptomisin** (Sigma, #A5955) %1 olarak medyuma eklendi
- **Kolajenaz-Dispaz** (Roche, #11097113001) 1mg/ml olacak şekilde 500 ml hazırlandı.
- **Tripsin-EDTA solüsyonu:** %0.025 Trypsin-EDTA (1X) (Gibco, #25200-056)
- **Tripsin Nötralize Solüsyon** (TNS, Gibco, #R-002-10)
- **Gelatin** (Sigma, G1393), HBSS ile 1:1 oranında dilüe edildi, filtreden geçirilerek steril edildi
- **Tripan Mavisi Solüsyonu**: Trypan Blue Solution (%0.4) (Sigma, #T8154;
- **Soğutmalı Santrifüj:** Sigma, 2-16K
- **Steril Kabin**: Class II Safety Cabinet (Metisafe)
- **İnkübatör:** Hera Cell 150 Incubator (Hera)
- **Spektrofotometre:** µQuant BioTek Spectrophotometer
- **Hemasitometre:** Hemacytometer (Marienfeld, #0640710)
- **Faz kontrast mikroskobu:** Olympus IX71

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı desteği ve Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu izni ile doğum sonrası elde edilen plasentalar hızla laboratuvara ulaştırılarak göbek kordonu kesildi. Kordondaki fazla kan uzaklaştırıldıktan sonra kateter yardımı ile vene girilerek HBSS ile damar yıkandı. Yıkamanın ardından damarın (göbek

kordonunun) alt ucu klemplendi. 1mg/ml konsantrasyondaki Kolajenaz-Dispaz enzimi 15-25ml olacak şekilde damara enjekte edildikten sonra damarın üst ucu da klemplenerek enzimin damar içinde kalması sağlandı. Bu şekilde 15 dakika 37°C su banyosunda inkübasyon gerçekleştirildi ve endotel hücrelerinin izolasyonu sağlandı. İnkübasyonun ardından göbek kordonunun alt ucu açılarak enzim ve içerisindeki endotel hücreleri Kondisyonel Endotelyal Büyüme Medyumu içerisine akıtıldı. Elde edilen solüsyon (enzim + medyum) 800rpm 20°C'de 7 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüjün ardından süpernatant uzaklaştırıldı ve pelet (endotel hücreleri) medyum ile resüspanse edildi. Elde edilen endotel hücreleri daha önce %1 jelatin ile kaplanmış olan $25cm^2$lik flaska ekildi ve 37°C %5CO_2 ortamında inkübasyona bırakıldı. Hücreler %80-85 doluluğa (konfluensi) ulaştığında $75cm^2$lik flaska pasajlandı. Pasajlama işlemi Tripsin-EDTA ile hücrelerin kaldırılması, TNS ile Tripsin etkinliğinin durdurulması ve bir miktar medyum eklendikten sonra süspansiyonun santrifüj edilmesi ile gerçekleştirildi. Santrifüjün ardından pelet medyum ile resüspanse edildi ve $75cm^2$lik flaska aktarıldı. Hücreler yeterli sayıya ulaşana kadar pasajlama işlemine devam edildi.

3.2. Hücre Karakterizasyonu

Kullanılan Malzemeler ve Solüsyonlar:

- **Endotel hücre belirteci antikor: CD31**, Endothelial Cell Clone JC70A, Dako IR61061
- **Endotel hücre belirteci antikor: vWF**, Von Willebrand Factor, Dako IR 52761
- İzotip Kontol; **Mouse IgG1** [225X0931] Dako, X0931
- İzotip Kontol; **Rabbit serum** Dako, X0902
- Sekonder Antikor**: Goat anti-mouse IgG-FITC** (Santa Cruz,# sc-2010)
- Sekonder Antikor: **Goat anti-rabbit IgG-FITC** (Santa Cruz, # sc-2012)
- **Fosfat tamponlu tuz solüsyonu (Phosphate Buffered Saline, PBS):**
    - 7.2 gr Na2HP04.12H20 (Merck)
    - 0.8 gr KH2P04 (Merck)
    - 16 gr NaCl (Merck)

Yukarıdaki kimyasallar 2 litre distile su içerisinde çözüldü ve pH'sı 2N NaOH ile pH=7.4 olacak şekilde ayarlandı.

• **Permeabilizasyon** (Geçirgenlik) **Solüsyonu**: %1 Triton X-100 (Sigma, #T8787)

• **Bloklama Solüsyonu:** Ultra V Block (LabVision, #TA-125-UB)

• **Antikor Dilüent Solüsyonu**: Large Volume UltrAb Diluent (LabVision, #TA-125-UD)

• **Kapatma Solüsyonu:** DAPI'li kapatma solüsyonu, VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI (Vector Labs, #H-1500)

İzole edilen hücrelerin endotel olduğunun teyit edilmesi için hücreler %1 jelatin ile kaplı 4 kuyucuklu lamlara (chamber slide) ekildi ve 24 saat hücrelerin tutunması beklendi. Ardından hücrelerin medyumu uzaklaştırılarak hücreler PBS ile yıkandı ve ardından ters bir şekilde steril kabin içerisinde 24 saat bekletilerek oda ısısında

hücrelerin fikse olması sağlandı. Endotel hücre belirteçleri olan vWF ve CD31 antikorları ile immünofloresan tekniği kullanılarak HUVEC hücreleri boyandı.

İmmünofloresan boyanma şu şekilde gerçekleştirildi. Kuyucuklara önceden soğutulmuş ve 1:1 oranında hazırlanmış metanol-aseton fiksatifi konularak hücreler 5 dakika +4°C'de tespit edildi. Lamlar, önce 5 dakika PBS ile yıkandı ve zar geçirgenliğinin sağlanması için 5 dakika %1 Triton X-100 içeren PBS içinde inkübe edildi ve ardından tekrar 5 dakika PBS ile yıkandı. Özgül olmayan bağlanmaları bloke etmek için bloklama solüsyonu ile oda ısısında 10 dakika bekletildi. Bloklama solüsyonu uzaklaştırılarak, örnekler üzerine primer antikorlar eklendi ve oda ısısında 2 saat nemli ortamda inkübe edildi. Negatif kontrol olarak, primer antikorlar ile aynı konsantrasyonda olmak üzere, uygun izotip kontrol antikorları veya bunları içeren serum kullanıldı. İnkübasyon süresi sonunda, PBS ile 3 defa 5'er dakikalık yıkamaların ardından lamlar üzerindeki örnekler floresan işaretli sekonder antikor ile 1 saat oda ısısında karanlıkta inkübe edildi. Takip eden PBS yıkamalarından sonra kesitlerin üzeri DAPI'li kapatma solüsyonu damlatılarak kapatıldı ve floresan mikroskobunda boyanmalar değerlendirildi. %98 ve üzeri yoğunlukta boyanmalar saf endotel hücresi olarak kabul edildi.

3.3. Doz belirleme Çalışmaları

Kullanılan İnhibitörler

- **Rapamisin** (Sigma, # RO395)
- **PP242** (Sigma, # P0037)

Uygulanması planlanan inhibitör grupların etkin dozlarını belirlemek üzere, literatürde kullanılan dozlar dikkate alınarak farklı konsantrasyonlarda ve sürelerde Rapamisin ve PP242 kimyasallarının HUVEC hücreleri üzerindeki etkisi değerlendirildi. HUVEC hücreleri Tablo 3.3.1.'de belirtilen süre ve konsantrasyonlarda inhibitörler ile inkübe edildi. Ardından Western Blot analizi ile Akt ve 4EBP1 proteinlerinin fosforilasyon düzeyleri değerlendirilerek en uygun doz tespit edildi.

Tablo 3.3. 1. Uygulanan inhibitör konsantrasyonları ve inkübasyon süreleri

İnhibitör Grupları	İnkübasyon süreleri
10 nM Rapamisin	1, 2, 4 saat
25 nM Rapamisin	1, 2, 4 saat
50 nM Rapamisin	1, 2, 4 saat
100 nM Rapamisin	1, 2, 4 saat
100 nM PP242	1, 2, 4 saat
250 nM PP242	1, 2, 4 saat
500 nM PP242	1, 2, 4 saat
1000 nM PP242	1, 2, 4 saat

3.4. Tripan Mavisi ile Canlılık Oranlarının Değerlendirilmesi

Doz belirleme analizlerinde kullanılan inhibitör konsantrasyonlarının hücre canlılığı üzerindeki etkisini değerlendirmek için Tripan Mavisi ile hücre boyaması gerçekleştirildi. Hücreler Tripsin-EDTA ile kaldırıldıktan sonra TNS ve bir miktar medyum ilavesi ile 800rpm'de 7 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Pelet 1 ml medyum ile resüspanse edildi. 10 mikrolitre hücre süspansiyonu 10 mikrolitre Tripan Mavisi ile 1:1 oranına karıştırıldı. Thoma Lamında lam ve lamel arasına 20 mikrolitre pipetlenerek hücreler mikroskop altında gözlendi. Ölü ve canlı hücreler sayıldı. Gruplar arası farklar değerlendirildi.

3.5. Hücre Kültürü Deney Gruplarının Oluşturulması

Kullanılan Kimyasallar

- **D (+) Glucose ≥99% (GC)** (Sigma, #G5400-250G)
- **D Mannitol BioXtra ≥98% (GC) (**Sigma, # M9546-250G)
- **Rapamisin** (Sigma, # RO395)
- **PP242** (Sigma, # P0037)
- **DMSO** (Sigma,# D2650)

Doz belirleme çalışmaları ile uygun inhibitör dozları belirlendikten sonra deney grupları oluşturuldu. Glikoz etkisini değerlendirmek için 5mM ve 25mM D-Glikoz verilerek normoglisemik ve hiperglisemik koşullar yaratıldı. Hiperglisemik koşulların yarattığı hücre içi ozmotik basıncı kontrol etmek için hücrelere 25mM konsantrasyonlarda Mannitol verilerek glikozun yarattığı etkilerinin ozmotik basınçtan kaynaklanıp kaynaklanmadığı değerlendirildi. İnhibitörler DMSO'da çözüldüğü için çözgen grubu olarak DMSO eklendi.

Hücreler 75'lik flask içerisinde %70 konfluent olunca serum içermeyen Endotel Medyumuna alınarak deney grupları oluşturuldu. İlk olarak Glikoz ve Mannitol eklenen hücrelere 20. saatte 25nM Rapamisin ve 500nM PP242 ilave edildi. Böylece 24 saatlik inbübasyon süresinin son 4 saat saatinde hücreler inhibitöre maruz kalmış oldu. 24 saat sonunda deney tamamlanarak hücreler Western Blot, PCR ya da Matrijel analizleri için kullanıldı.

<u>Oluşturulan Deney grupları</u>

1. Kontrol
2. 5mM Glikoz (Normoglisemi)
3. 25mM Glikoz (Hiperglisemi)
4. 5mM Glikoz + 25mM Rapamisin
5. 25mM Glikoz + 25mM Rapamisin
6. 5mM Glikoz + 500mM PP242
7. 25mM Glikoz + 500mM PP242
8. DMSO (Çözgen grubu)
9. 25mM Mannitol (Ozmotik Basınç Kontrolü)

3.6. Matrijel Anjiyogenez Testi

Kullanılan kimyasal: Matrigel Matrix Basement Membrane, 10ml (BD, #354234)

HUVEC hücrelerinin hiperglisemik koşullarda ve mTOR yolağı inhibitörleri varlığında anjiyogenez kapasitesinin değerlendirilmesi için damar benzeri yapılarının gözlendiği matrijel analizi gerçekleştirildi. -20 derecede muhafaza edilen matrijel buz içerisinde +4 derecede gece boyu bekletildi ve sıvı kıvama gelmesi sağlandı. Aynı zamanda 96 well plate ve 2-200 mikrolitre kapasiteli steril pipet uçları da gece boyu soğutuldu. Ertesi gün matrijel buz içerisinde steril kabin içerisine alındı ve tüm işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi. 96 well plate'lerdeki her bir kuyucuğa 50 mikrolitre matrijel pipetlendikten sonra matrijel kaplı 96 kuyucuklu plate 37 derecelik inkübatör içine konuldu ve 30 dakika beklenerek matrijelin katı kıvama geçmesi sağlandı. Artan matrijel alikuatlanarak -20 dereceye kaldırıldı.

Ardından hücreler Tripsinizasyon işlemi ile flasktan kaldırıldı. Santrifüj sonrasında elde edilen pelet, 1 ml medyum ile resüspanse edildi. Thoma Lamı (Hemasitometri) kullanılarak hücre sayımı gerçekleştirildi. Matrijel Analizleri için en uygun hücre sayısını belirlemek üzere farklı konsantrasyonlarında hücreler matrijellere ekildi ve 48 saat boyunca belirli aralıklarla hücreler gözlendi ve fotoğrafladırıldı. Damar benzeri yapıların oluşması için en uygun hücre sayısı belirlendikten sonra deney grupları matrijellere ekilerek gruplar arası farklar gözlendi. Bu işlem için her grup hücre ikili (dublik) olarak ekildi ve oluşan damar benzeri tübüller sayılarak gruplar arası farklar değerlendirildi.

3.7. Yara İyileşme Analizi

Hücrelerin göç (migrasyon) yeteneklerinin değerlendirildiği yara iyilişme analizinde, HUVEC hücreleri 6 kuyucuklu plate'lere $2x10^4$ hücre/2ml medyum konsantrasyonda ekildi. Hücreler %70 konfluensi oranına ulaştıklarında kuyucuğun ortası hücre kazıyıcı alet ile kazınarak endotel hücrelerinin uzaklaşması sağlandı. Kondisyonel medyum, serum içermeyen medyum ile değiştirildi ve deney grupları oluşturuldu. Normoglisemik ve hiperglisemik koşulların oluşturulması ile eş zamanlı olarak inhibitör uygulamasına da başlandı. 4 saat sonra inhibitörler ortamdan uzaklaştırılarak, aynı hücrelerin sadece normoglisemik ya da hiperglisemik koşullarda inhibisyona devam etmesi sağlandı. 24 saatlik inkübasyonun sonunda deney gruplarını içeren medyum uzaklaştırılarak hücreler kondisyonel medyum ile inkübasyona devam etti. Kazımanın gerçekleştirildiği saat 0. saat kabul edildi ve her 24 saatte bir hücreler takip edildi ve fotoğraflandırıldı. Çekilen fotoğrafların her grup için başlangıç alanı ile aynı alandan çekilmesine özen gösterildi. Hücreler 96 saat takip edildikten sonra deney sonlandırıldı.

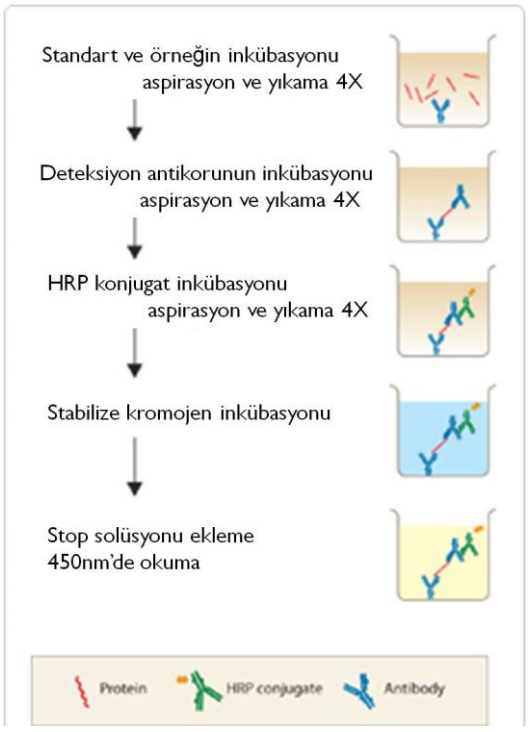
3.8. ELISA (Enzim Bağlı Immunosorbent Analiz) Protokolü

Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar:

- VEGF Quantikine ELISA Kit (R&D, #DVE00)
- VEGF R1/Flt-1 Quantikine ELISA Kit (R&D, #DVR200)
- VEGF R2/KDR Quantikine ELISA Kit (R&D, #DVR100B)

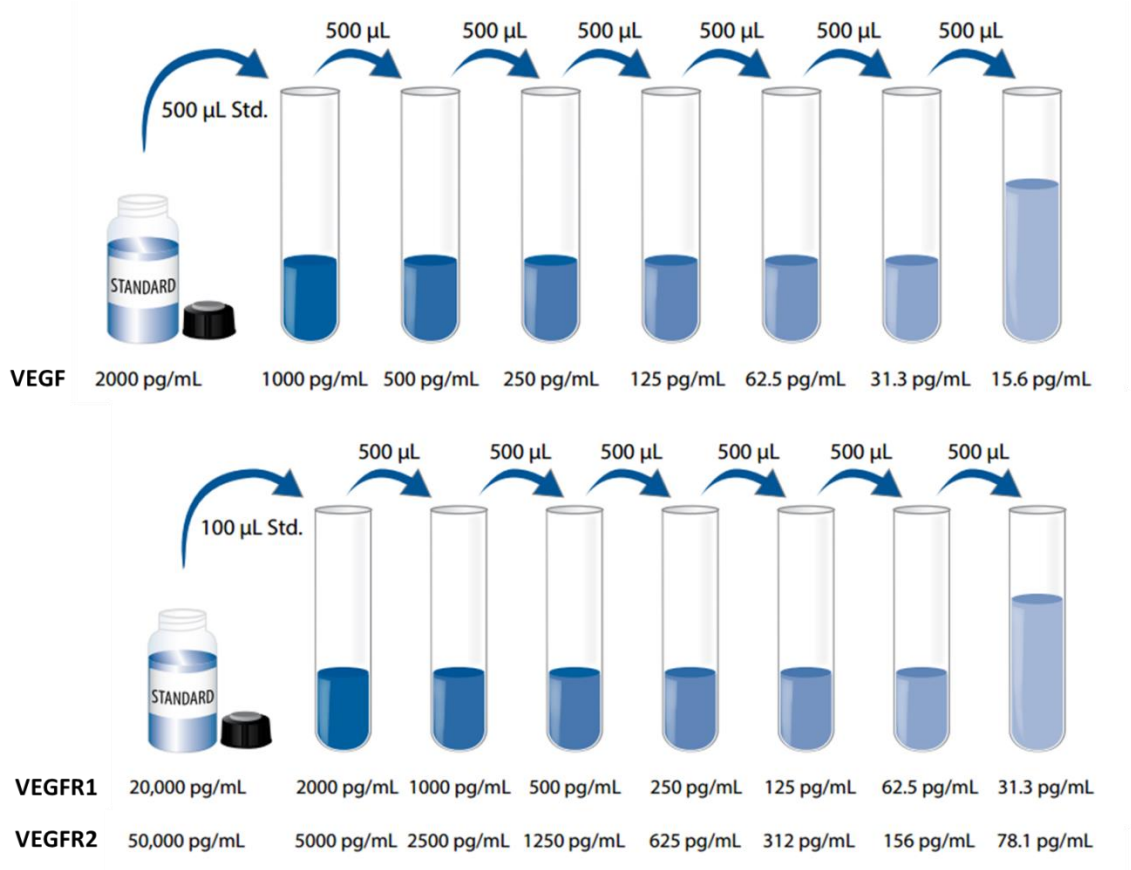
Kit içeriği:

- Monoklonal yakalayıcı (capture) antikorla (VEGF, VEGFR1 veya VEGFR2) kaplı 96 kuyucuklu plate
- Konjugat = Peroksidazla (HRP) bağlı tespit edici (detection) monoklonal antikor (VEGF, VEGFR1 veya VEGFR2)
- Standart (toz): Rekombinant insan VEGF, VEGFR1 veya VEGFR2 standardı
- Dilüent
- Yıkama solüsyonu (25X)
- Renk ajanı A: Hidrojen peroksit
- Renk ajanı B: kromojen (Tetramethylbenzidine)
- Reaksiyon durdurma solüsyonu: 2 N sülfirik asit



Şekil 3.8. 1. ELİSA analizi basamaklarının şematik gösterimi

Oluşturulan deney gruplarına ait medyumlardaki çönünür formdaki (soluble) VEGF, VEGFR1 ve VEGFR2 miktarları ELİSA yöntemi ile değerlendirildi. Bu işlem için ticari ELISA kitleri kullanıldı. Bu kitlerin içinden çıkan çalışılacak olan proteinle kaplanmış olan 96 kuyucuklu plate'lerdeki her kuyucuğa hangi örneğin ve hangi standardın konacağı önceden belirlendi. Her örnek ve standard ikişerli olarak çalışıldı. Üretici firmanın önerisi doğrultusunda protokol kitapçığına bağlı kalınarak analiz gerçekleştirildi (Şekil 3.8.1.). İlk olarak kitin içerisindeki yönergelere bağlı kalarak standartlar hazırlandı (Şekil 3.8.2.). Kısaca; her kuyucuğa uygun miktarda dilüent ve ardından standart ve örneklerden pipetlenerek 2 saat oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki sıvı dökülerek ve yıkama solüsyonundan her seferinde 400 µl koymak ve ardından dökmek suretiyle 3 kere yıkandı. Son yıkamanın ardından kuyucukların kurumasına izin vermeden tüm kuyucuklara 200 µl konjugat (HRP bağlı belirleyici antikor) eklendi ve 2 saat oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda yine yıkama solüsyonu ile kuyucuklar 3 kere yıkandı. Ardından tüm kuyucuklara 200µl substrat solüsyonu eklendi ve oda ısısında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kuyucuklar boşaltılmadan üzerlerine 50 µl reaksiyon durdurucu solüsyon eklendi. Kuyucuklar 30 dakika içinde µQuant BioTek Spektrofotometre cihazında 450nm dalga boyunda okutuldu.



Şekil 3.8. 2. ELİSA analizlerinde kullanılan standartların hazırlama prosedürü

3.9. Western Blot Analizi

3.9.1. HUVEC Hücre Lizatı Hazırlama

Kullanılan solüsyonlar

- **Sample Buffer 2X, Laemmli electrophoresis Reagent** (Sigma, # S-3401)
- **Hücre kazıyıcı (**Cell Scraper, Corning #3010)
- **Hank'in Dengeli Tuz Solüsyonu**: Hank's Balanced Salt Solution (HBSS; Gibco, #14185-052)
- **Thermomixer Comfort:** Eppendorf

75cm^{2}lik flasklardaki hücrelerin medyumu uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 6-8ml HBSS ile 2 kez yıkandı. Yıkamanın ardından 1ml Laemli Buffer ile muamele edildi ve hücre kazıyıcı yardımı ile hücreler kazındı ve 1,5ml'lik eppendorf tüplerine aktarıldı. Hücreler 95 derecede 5 dakika kaynatıldı ve Western Blot analizi aşağıda açıklandığı gibi gerçekleştirildi

3.9.2. SDS-PAGE Western Blot protokolü

Kullanılan Solüsyonlar

5X Yürütme Tamponu:

- 9 g Tris (Bio-Rad, #161-0719)
- 43.2 g Glisin (Bio-Rad, #161-0718)
- 3g SDS (Sigma,# L4390)
- 600 ml Distile Su
- Distile su ile 1X şeklinde dilüe edilerek kullanıldı

Transfer Tamponu:

- 14.3 g Glisin (Bio-Rad, #161-0718)
- 3 g Tris (Bio-Rad, #161-0719)
- 700 ml bidistile su içerisinde çözüldü. Bu solüsyona 200 ml Metanol (Merck,#1.06.008.2500) eklendi ve toplam hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

Bloklama Solüsyonu (%5'lik süt tozu):

- 5g süt tozu (Bio-Rad) 100 ml TBS-T içerisinde çözüldü ve +4^{o}C'de en fazla 24 saat kalacak şekilde muhafaza edildi.

10X TBS Tamponu:

- 60.55 gr Tris (Bio-Rad, #161-0719)

- ❖ 87.66 gr NaCl
- ❖ 800 ml distile suda çözdürülür. PH HCl ile 7.4'e ayarlanır. PH ayarlandıktan sonra toplam hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

TBS-T Solüsyonu:

- ❖ 1 litre 1X TBS içerisine 1000µl Tween-20 (Sigma, P9416) eklendi ve oda ısısında saklandı.

- **Thick Blot Paper** (Bio-Rad,#165-0921)
- **Blotting-Grade Blocker nonfat dry milk (Süt tozu)** (Bio-Rad, # 170-6404)
- **West Pico Chemiluminescent substrates** (Pierce, #34080)
- **Nitroselüloz Membran** (Amersham,#RPN203D)
- **Kaleidoscope Prestained Standards, broad range** (Bio-Rad,#161-0324)
- **CL- Xposure film 18x24 cm** (Thermo Scientific,# 34089)
- **PQ Universal Developer 5L** (ILFORD,#1757314)
- **Hypam Fixer 5L** (ILFORD,#1758285)

Çalışılacak olan proteinin kilo dalton (kDa) ağırlığı dikkate alınarak uygun yüzdelerde jeller hazırlandı. Her kuyucuğa 20 mikrolitre numune yüklenerek jel elektroforezi gerçekleştirildi. Elektroforez sonrasında immunoblotting yapılarak jeldeki proteinlerin membrana geçmesi sağlandı. Proteinlerin nitrosellüloz membrana transferinden sonra, membran 1 saat süre ile oda ısında pH'sı 7.2-7.4 olan ,% 0.1 Tween-20 ilaveli Tris Buffer Solüsyonu ile hazırlanan % 5 lik yağsız süt tozu ile bloklandı. Membran mTOR, fosfo-mTOR, 4EBP1, fosfo-4EBP1, p70S6K, fosfo-p70S6K, Akt, fosfo-Akt, VEGF, VEGFR1, VEGFR2 ve Beta Aktin antikorları ile uygun sıcaklık ve sürede karıştırıcı üzerinde inkübe edildi. Kullanılan primer ve sekonder antikorlar liste halinde Tablo 3.9.1.'de görülmektedir. İnkübasyon sonrasında, 3 kez 10 dakika TBS-T ile yıkamanın ardından membran, sekonder antikorla oda ısısında karıştırıcı üzerinde 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında tekrar 3 kez 10 dakika TBS-T solüsyonu ile yıkandı. Membran SuperSignal Chemiluminisans'la uygun sürede geliştirilip, membrandaki protein bandları karanlık odada hiperfilme aktarıldı.

3.9.3. İnsan Plasenta Dokusundan Lizat Hazırlama

Kullanılan solüsyonlar

- **Lizis Buffer:**
  - ❖ 10ml 0,1M Tris (pH 7.4), (Bio-Rad, #161-0719)
  - ❖ 90ml distile su, 1ml 100X Na-orthovanadate (Sigma, #S6508)
  - ❖ 1gr SDS (Sigma,# L4390)
- **Proteaz inhibitör kokteyli** (Protease inhibitor coctail tablet, Roche, #1169749800120)

Doku temini esnasında kriyotüpler içine alınan ve sıvı nitrojende (-196°C) muhafaza edilen plasentalardan aşağıda anlatılan şekilde lizatlar hazırlandı. Plasenta örnekleri, içerisinde sıvı nitrojen bulunan havanda dövülerek dokuların tamamen parçalanması sağlandı. Toz haline gelen plasentalar eppendorf tüplerine alınarak ağırlıkları tartıldı. 0,2 gr doku başına 600 mikrolitre lizis buffer ve 24 mikrolitre proteaz inhibitör kokteyli olacak şekilde hesaplama yapılarak eppendorflara lizis buffer ve proteaz inhibitör kokteyli eklendi. Örnekler 10 dakika buz üzerinde bekledikten sonra sonikasyon ile homojenizasyonları sağlandı. 30 dakika daha buz üzerinde bekletilerek toplam 40 dakika lizis buffer ile inkübasyonu sağlandı. Ardından örnekler 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.

3.9.4. Protein miktarının belirlenmesi

Kullanılan solüsyonlar ve Cihazlar

- **Bovine Serum Albümin** (Sigma,# A 9647)
- **Lowry Solüsyonu:**
  Lowry A: 2gr NaOH + 10.6gr Na_2CO3, 500ml distile su,
  Lowry B:1gr $KNaC_4H_4O_6$ 100ml distile su,
  Lowry C: 1gr $CuSO_4$.5H2O, 100 ml distile su
- **Spektrofotometre:** µQuant BioTek Spectrophotometer

Lizatların içerdiği protein miktarının belirlenmesi için Lowry yöntemi [226] kullanıldı. Bu yöntemde standart olarak protein içeriği 1mg/ml olan BSA kullanıldı. BSA'nın (1000µg/ml), 1:1 (500µg/ml protein), 1:2 (250µg/ml), 1:3 (125µg/ml), 1:5 (62,5µg/ml) dilüsyonları yapılarak standart protein aralığı hazırlandı. Lizatlar, 1:30 ve 1:60 dilüsyonlar halinde çalışıldı. Hazırlanan standart ve lizat dilüsyonlarından 20 mikrolitre alınarak lowry tüplerine pipetlendi. Kör olarak distile su kullanıldı. Bu işlem her örnek için 2 kez tekrarlandı. Tüm lowry tüplerine 600 mikrolitre lowry solüsyonu konuldu. Lowry solüsyonu 100:1:1 oranında LowryA: LowryB: Lowry C solüsyonlarının karıştırılmasıyla hazırlandı. İlk önce Lowry B ve C solüsyonları karıştırılıp ardından Lowry A solüsyonu ilave edildi. Lowry solüsyonu ile 10 dakika inkübasyonun ardından tüm tüplere 60 mikrolitre folin pipetlendi. Folin solüsyonu 1:1 oranında distile su ile dilüe edilerek kullanıldı. Folin eklenmiş olan tüpler 30 dakika karanlıkta inkübe edildi. Ardından tüm tüplerden 200 mikrolitre örnek 96 kuyucuklu plate'lere pipetlendi ve spektrofotometrede 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.

Tablo 3.9. 1. Western Blot analizinde kullanılan primer ve sekonder antikorlar

Primer Antikor	**Dilüsyon**	**Katalog numarası**	**Sekonder Antikor**
VEGF	1:200	Santa Cruz sc152	1:2000 BioRad 170-6516
VEGFR1	1:1000	Cell signaling 2893	1:3000 BioRad 170-6516
VEGFR2	1:750	Cell Signaling 2479	1:3000 BioRad 170-6515
p-p70S6K	1:500	Cell Signaling 9206	1:2000 BioRad 170-6515
p70S6K	1:1000	Cell Signaling 2708	1:3000 BioRad 170-6515
p-4EBP1 (Thr37/46)	1:1000	Cell Signaling 2855	1:2000 BioRad 170-6515
4EBP1	1:1000	Cell Signaling 9644	1:3000 BioRad 170-6515
p-Akt	1:750	Cell Signaling 4060	1:2000 BioRad 170-6515
Akt	1:1000	Cell Signaling 4685	1:2000 BioRad 170-6515
p-mTOR	1:500	Cell Signaling 5536	1:3000 BioRad 170-6515
mTOR	1:1000	Cell Signaling 2983	1:3000 BioRad 170-6515
Beta Aktin	1:5000	Abcam ab-6276	1:5000 BioRad 170-6516

3.10. qRT-PCR (Kantitatif Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Protokolü

3.10.1. HUVEC hücrelerinde ve insan plasenta dokusunda hedef mRNA'larının kantitatif düzeylerinin belirlenmesi

Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar:

- **MagNAlyser Green Beads** (Doku parçalamak için kullanılan Bilye içeren tüpler) (Roche, #03358941001)
- **Trizol** (İnvitrogen, #15596-026)
- **BCP** (1-Bromo-3-chloropropane, Sigma, #B9673)
- **İzopropanol** (Sigma,# I-9516)
- **DNase/RNase içermeyen distile su** (Gibco, #10977-035)
- **MagNAlyser:** Roche
- **Thermomixer Comfort:** Eppendorf
- **MiniSpin**: Eppendorf

- **Soğutmalı Santrifüj**: Eppendorf, 5417R

1. HUVEC hücrelerinden mRNA eldesi için 24 saatin sonunda 75cm^{2}'lik flasklardaki hücrelerin medyumu uzaklaştırıldı ve hücreler 1ml Trizol ile kazındı ve steril eppendorf tüplerine aktarıldı. Tüm grupların kazıma işlemi tamamlandıktan sonra 5 dakika beklendi.
2. Eppendorfların üzerine 100 mikrolitre BCP eklenerek altüst etmek sureti ile karışması sağlandı ve ardından 10 dakika oda ısısında inkübe edildi.
3. İnsan plasenta dokusundan mRNA eldesi için, kontrol ve diyabet gruplarına ait plasenta dokusunun bir parçası, Magnalyzer bilyelerini içeren steril tüplere alındı ve üzerine 1 ml TRIzol eklenerek, MagNAlyzer cihazında 6500 devirde, 2x45 saniye muamele edilerek parçalandı. Bu işlem arasında tüpler 1 dakika buzda bekletildi.
4. Doku parçalarını içeren tüpler, oda ısısında 30 dakika inkübe edildikten sonra 13.000 rpm'de 3 saniye kısaca spin edilerek doku debrisinin dibe çökmesi sağlandı. Bilyelerin üzerinde kalan sıvı kısım yeni bir eppendorfa aktarıldı ve üzerine 100 mikrolitre BCP eklenerek altüst etmek sureti ile karışması sağlandı. Eppendorflar 10 dakika oda ısısında inkübe edildi.
(Bu aşamadan sonra hücre ve doku örnekleri için aynı protokol takip edildi.)
5. Bu sürenin sonunda tüpler, 15 dakika, +4°C'de, 11.000 rpm'de santrifüj edildi.
6. Santrifüj işleminden sonra tüpün üstünde RNA'nın bulunduğu şeffaf kısım, steril 1.5 ml'lik yeni bir tüpe alındı.
7. Tüpe 500 mikrolitre izopropanol eklenip altüst ederek karışması sağlandı ve oda ısısında 10 dakika inkübe edildi.
8. Bu sürenin sonunda, 8 dakika, +4°C'de, 11.000 rpm'de santrifüj edildi.
9. Santrifüj sonrası süpernatant atılıp geriye kalan pelet üzerine 1 ml %70'lik etanol konularak yıkama gerçekleştirildi ve ardından 5 dakika, +4°C'de, 8400 rpm'de santrifüj edilerek süpernant atıldı.
10. Elde edilen pelet oda ısısında etanolün uçması için en fazla 10 dakika bekletildikten sonra, 50 mikrolitre RNaz içermeyen distile su ile çözüldü.
11. Çözülmüş olan RNA'yı içeren tüpler, Thermomikser cihazında 55 derecede 10 dakika inkübe edildi ve ardından -80°C'de muhafaza edildi.

3.10.2. DNaz uygulaması

Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar:

- **UV Half Plate Area** (With UV Transparent Bottom, 96 well, Corning #3679)
- **DNase I (**İnvitrogen,# 18068-015)
- **DEPC su** (DEPC Treated water, Pyrogen Free, İnvitrogen, #46-2224)
- **Spektofotometre:** μQuant BioTek Spectrophotometer

İzole edilen total RNA'ların absorbans değerleri Spektrofotometre cihazında yapılan ölçüm ile belirlendi. RNA miktarı = (Absorbans değeri) x (dilüsyon faktörü) x (RNA

sabiti (40)) formülü ile hesaplandı. İşlem basamakları aşağıda belirtildiği gibi devam etti.

1. RNA konsantrasyonu 2 mikrogram olacak şekilde hesaplama yapılarak genomik DNA'nın ortamdan uzaklaştırılması için izole edilen total RNA ayrı bir tüpe alınarak DNaz uygulaması gerçekleştirildi. Bunun için;

Elde edilen RNA	2/ RNA konsantrasyonu işlemi sonucu elde edilen oran
DNaz I enzimi	1 mikrolitre
10X DNaz I tamponu	1 mikrolitre
DEPC su	10 mikrolitre'ye tamamlanacak şekilde hesaplama yapıldı

2. 0,2 ml'lik steril PCR tüpüne konulan içerikler, 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.
3. Bu sürenin sonunda 1 mikrolitre DNase stop solüsyonundan konuldu. Vorteks yardımı ile içeriğin tamamen karışması sağlandı ardından tüpler spin edildi ve 65 derecede 10 dakika inkübe edildi.
4. Bu sürenin sonunda tüpler buz üzerine alındı.

3.10.3. cDNA (Komplementer DNA) Eldesi

Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar:

- **Superscript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR** (Invitrogen, #18080-051)
- **PCR Cihazı**: MyCycler Thermocycler, BioRAD

1. DNase muamelesi yapılan RNA örneklerinden 8 mikrolitre 0.2 mikrolitre'lik yeni bir steril PCR tüpüne kondu. Üzerine 1 mikrolitre Random Hexamers ve 1 mikrolitre 10mM dNTPmix pipetlendi.
2. Bu karışım 65°C'de 5 dakika bekletilerek RNA'daki ikincil kıvrımların çözülmesi sağlandı.
3. Bu sürenin sonunda tüpler buza alınarak karışım üzerine, aşağıdaki tabloda belirtildiği gibi hazırlanmış olan 10 mikrolitre'lik cDNA sentez karışımı konuldu.

İçerik	**Hacim**
10X RT buffer	2.0 mikrolitre
25mM MgCl2	4.0 mikrolitre
0.1 M DTT	2.0 mikrolitre
RNase out	1.0 mikrolitre
Superscript III	1.0 mikrolitre
Toplam	10.0 mikrolitre

4. PCR cihazında kurulan reaksiyon ile tüpler, 25°C'de 10 dakika, 50°C'de 50 dakika ve

85°C'de 5 dakika inkübe edildi.
5. Bu sürenin sonunda tüpler buza alındı. Tüplere 1 mikrolitre RNase H kondu ve vorteks yardımı ile karıştırılarak ardından spin edildi.
6. Ardından tüpler 37°C'de 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüplere 80 mikrolitre DEPC su eklenerek toplam hacim 100 mikrolitreye tamamlandı. Vorteks-spin işleminden sonra elde edilen cDNA'lar -20°C'de saklandı.

3.10.4. qRT-PCR uygulaması

Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar:

- **QuantiFast SYBR Green PCR Kit** (Qiagen, # 204054)
- **PCR Strip Tüpleri** (Axygen, #PCR-0108-LP-RT-C)
- **Real Time PCR Cihazı:** StepONEplus Real Time PCR System , Applied Biosystems

1. Deney gruplarından yukarıda belirtildiği gibi elde edilen cDNA'lar qRT-PCR uygulamasında kullanıldı.
2. Aşağıdaki tabloda belirtilen içerikler konularak reaksiyon karışımı oluşturuldu.

İçerik	Miktarları (mikrolitre)
2X SybrGreen Mastermix	12.5
Primer ileri (10 mikroM)	1
Primer geri (10 mikroM)	1
cDNA	2
RNaz içermeyen su	8.5
Toplam hacim	25 mikrolitre

3. HIF-1α, VEGF, VEGFR1, VEGFR2 ve Beta Aktin için qRT-PCR uygulaması ikili (dublik) olarak gerçekleştirildi.

3.10.5. qRT-PCR uygulamasında planlanan PCR programı:

Denatürasyon: 95°C'de 5 dakika
Amplifikasyon: 35 siklus
95°C…10 saniye,
55°C…30 saniye,
72°C…30 saniye
Melting curve
1 siklus: 95°C…1 dakika, 55°C…1 dakika

HIF-1α, VEGF, VEGFR1, VEGFR2 ve Beta aktin için hazırlanmış strip tüpler qRT-PCR aletinde okundu ve software programı yardımıyla CT (siklus eşik değerleri) değerleri belirlendi. Elde edilen CT değerleri $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülünde kullanılarak her genin

(Tablo 3.10.1.) kontrol grubuna kıyasla göreceli değişim düzeyleri hesaplandı. Amplifikasyon, 35 siklusta gerçekleştirildi. Ayrıca, Melting Curve analizi ile ürünlerin beklenen ve gözlenen Tm değerleri karşılaştırılarak PCR ürünlerinin doğruluğu değerlendirildi.

Tablo 3.10. 1. qRT-PCR için kullanılan oligonükleotid sekansları

	Forward primer	**Reverse primer**	**Annealing sıcaklığı (°C)**	**Baz çifti sayısı**
HIF1-α	5'-CGTTCCTTCGATCAGTTGTC-3'	5'-GGTAGGAGATGGAGATGCAA-3'	50	213
VEGF	5'-GCAGAATCATCACGAAGTGG-3'	5'-CTGCATGGTGATGTTGGACT-3'	54	214
VEGFR1	5'-GCAAGATTCAGGCACCTATG-3'	5'-CGAGGTTCCTTGAACAGTGA-3'	53	373
VEGFR2	5'-GCATCGAGCTCTCATGTCTG-3'	5'-CTGGCTACTGGTGATGCTGT-3'	53	277
Beta Aktin	5'-CATGAAGATCCTGACCGAGC-3'	5'-CAGACAGCACTGTGTTGGCA-3'	55	335

3.11. İnsan Plasentası Doku Takibi ve Rutin Histolojik Boyamalar

Kontrol (n=12) ve diyabetik (n=10, pregestasyonel diyabet) plasentalar Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı ve Antalya Eğitim Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı aracılığıyla, gerekli etik kurul izinleri altında toplandı. Kontrol ve diyabetik plasentaların temin edildiği hastalara ait temel veriler (gebelik haftası, anne yaşı, bebek doğum ağırlığı, bebek cinsiyeti…) toplanarak not edildi. Diyabetik plasentalar gebelik öncesi mevcut T1DM ya da T2DM olan hastalardan alındı, gestasyonel diyabetik hastalar gruba dahil edilmedi. Buz üzerinde taşınarak hızla labratuvara ulaştırılan plasentaların ağırlıkları tartıldı ve ardından doku takibine başlandı.

%10 Formalin ile 24 saat fikse edilen dokular, 3 saat musluk suyunda yıkandı ve ardından sırası ile %70, %80, %90'lık alkol serilerinde 24'er saat ve %100'lük alkolde 3 saat tutularak dehidrasyon işleminden geçirildi. Ksilol içinde 3 defa 3'er dakika bekletilerek şeffaflaştırıldı. 58°C'ye ayarlı etüvde, dokular 3 defa 1'er saatlik parafin banyosunda tutuldu. 3. saatin sonunda içerisinde dokular bulunan temiz parafin etüvden çıkarılarak oda ısında donması sağlandı. Daha sonra, hazırlanan parafin bloklardan alınan 5 mikrometre kalınlığındaki kesitlere rutin ışık mikroskopik inceleme yapıldı.

3.11.1. Rutin Işık Mikroskopik Gözlemler

Her gruba ait plasenta örneklerinden 5 mikrometre kalınlığında kesitler alındı. Hematoksilen-Eozin boyaması yapılarak ışık mikroskobu (Axioplan Zeiss, Almanya) ile incelendi.

3.12. İstatistik

Kontrol ve diyabet gruplarına ait plasenta ağırlıkları hassas terazi ile ölçüldükten sonra SigmaStat 3.5 programı kullanılarak One Way ANOVA testleri uygulandı ve $p \leq 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

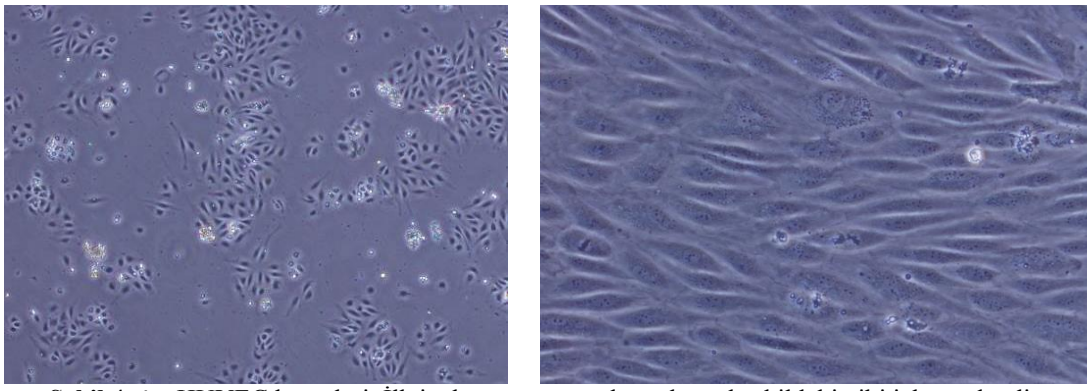
Western Blot bantların yoğunlukları DigiDog 1000 programında ölçüldü. Değerler Beta Aktin yoğunluklarına göre normalize edildi Elde edilen verilere SigmaStat 3.5 programı kullanılarak One Way ANOVA testleri yapıldı ve $p \leq 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

ELİSA analizi sonucu edilen konsantrasyon verileri, qRT-PCR sonucu elde edilen $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri, Matrijel Anjiyogenez testinde sayılan damar benzeri yapıların değerleri, Yara iyileşme analizinde İmage J programı ile ölçülen mesafelerin uzunlukları için One Way ANOVA Testinde Holm Sidak metodu ile çoklu karşılaştırma yapıldı ve $p \leq 0,001$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

4.1. HUVEC İzolasyonu ve Kültürü Bulguları

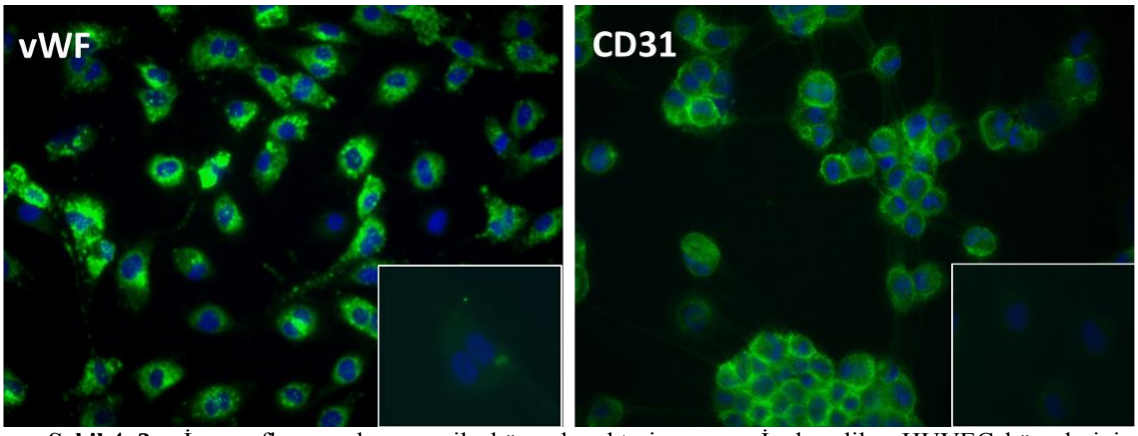
İnsan term plasentası göbek kordunundan izole edilen HUVEC hücreleri daha önce %1 jelatin ile kaplanan flasklarda 37°C ve %5CO_2 ortamında inkübasyona bırakılmış ve hücrelerin çoğalması takip edilmiştir. Elde edilen HUVEC hücreleri Şekil 4.1.'de görülmektedir.



Şekil 4. 1. HUVEC hücreleri. İlk izolasyon sonrası hücreler sol şekildeki gibi izlenmektedir. Hücreler çoğaldıktan sonra %85-90 konfluensi (doluluk) oranına ulaştığında sağ şekildeki gibi izlenmektedir.

4.2. Hücre Karakterizasyonu Bulguları

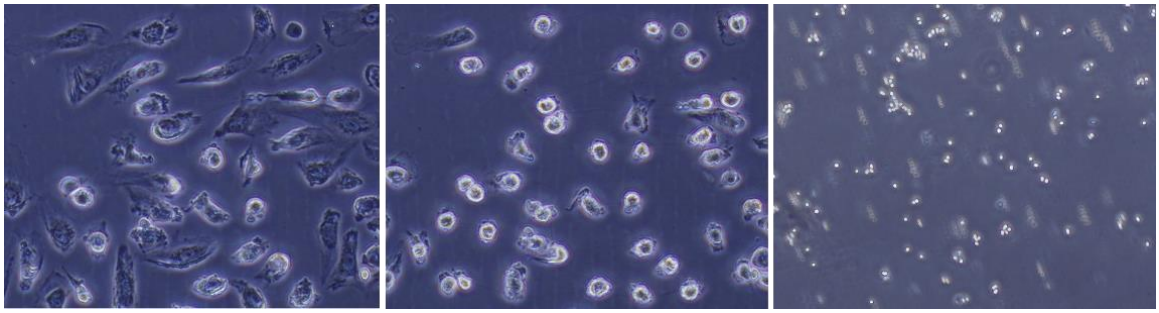
İzole edilen hücrelerde immünfloresan boyama ile CD31 ve vWF proteinlerinin varlığına göre karakterizasyon analizi gerçekleştirilmiş ve elde edilen hücrelerin saf endotel hücresi olduğu teyit edilmiştir. Gerçekleştirilen immünfloresan boyamalar sonucu elde edilen görüntüler Şekil 4.2.'de görülmektedir.



Şekil 4. 2. İmmunfloresan boyama ile hücre karakterizasyonu. İzole edilen HUVEC hücrelerinin endotel hücre belirteci olan vWF ve CD31 ile pozitif boyandığı izlemektedir. İzotip kontrol sağ alt köşede görülmektedir. Orijinal büyütme 20X

4.3. İnhibitör Uygulaması İçin Doz Belirleme Analizi Bulguları

Hücreler %80-85 doluluğa (konfluensi) ulaştığında 75cm^{2}lik flasklara pasajlanmıştır. Hücreler yeterli sayıya ulaşana kadar pasajlama (Şekil 4.3.1.) işlemine devam edilmiş ve yeterli sayıya ulaştıktan sonra uygulanması planlanan inhibitörler için doz belirleme çalışmaları yapılmıştır.



Şekil 4.3.1. Pasajlama esnasında hücre morfolojisinin değiştiği ve hücrelerin flask yüzeyi ile bağlantılarını kaybederek yuvarlak hale geldikleri ve medyum içerisinde yüzen hücreler halini aldıkları görülmektedir.

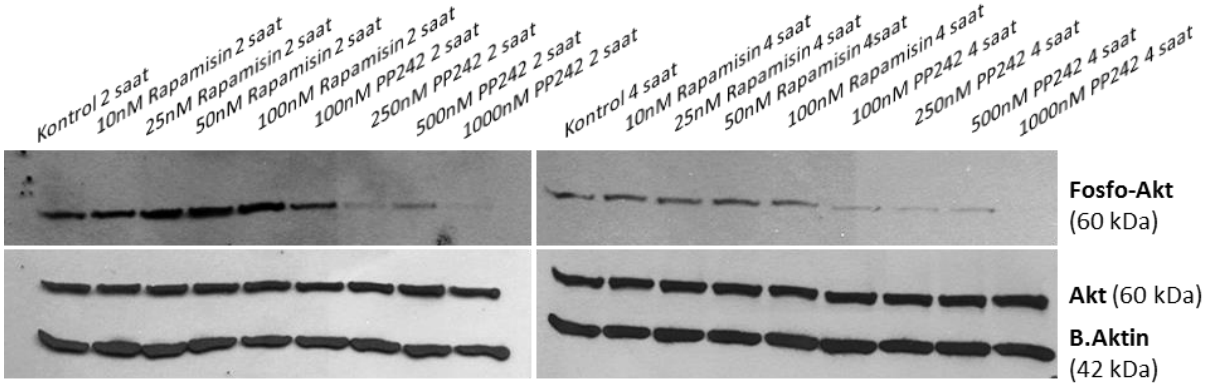
Kültür sonrasında gerçekleşen Western Blot analizleri ile uygulanan dozların etkinliği değerlendirilmiştir ve belirlenen inhibitör konsantrasyonlarının mTOR hedef proteinlerinden Akt (Şekil 4.3.2., 4.3.4.) ve 4EBP1 (Şekil 4.3.3 ve 4.3.4.) proteinlerinin fosforilasyon düzeylerindeki azalmaya neden olduğu gözlenmiştir.

Tüm Rapamisin dozlarının 4 saat inkübasyonun sonunda başarılı bir şekilde 4EBP1 ekspresyonunu baskıladığı gözlenmiştir. Literatüre uygun olarak 25nM Rapamisin konsantrasyonu deney modeline uygulamak üzere belirlenmiştir. Rapamisin verilen gruplarda beklendiği üzere Akt ekspresyonunun etkilenmediği görülmüştür

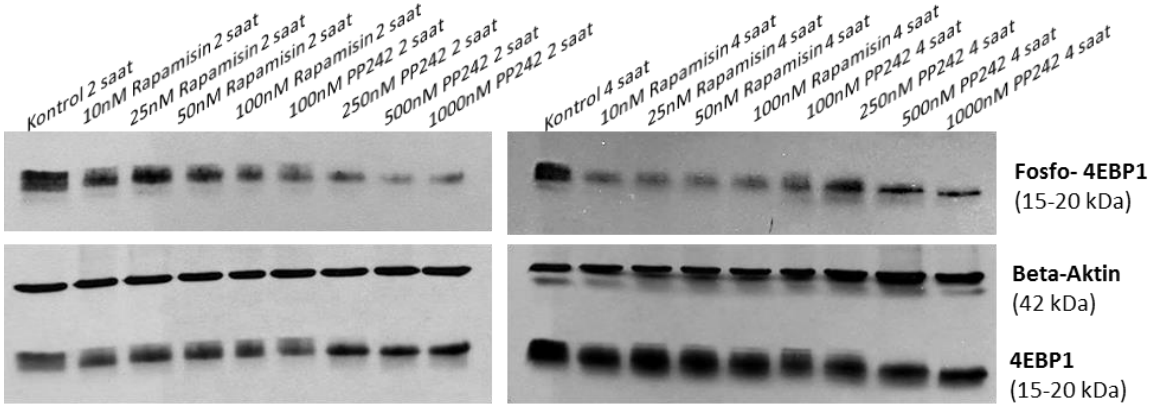
2 ve 4 saat PP242 ile inkübasyondan sonra Akt fosforilasyonunun azaldığı tespit edilmiştir. 250-500-1000 nM PP242 arasında her 3 dozunda Akt fosforilasyonunu inhibe

ettiği görülmüştür. Deney bütünlüğü açısından süre olarak 4 saat ve 500nM PP242 dozu uygulanmasına karar verilmiştir.

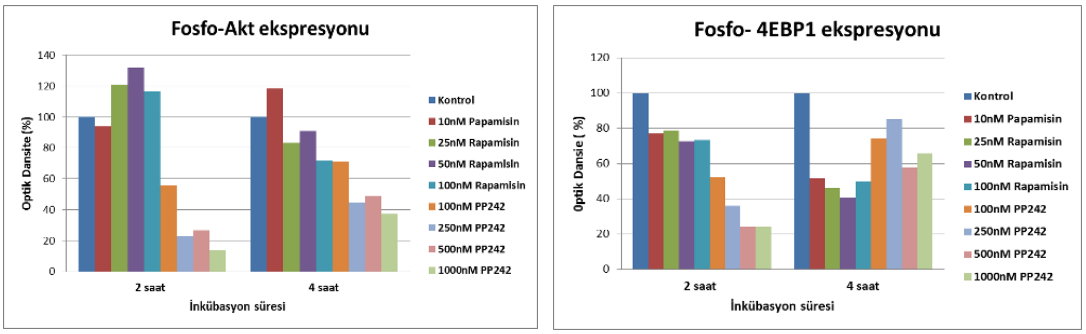
Buna göre 25nM Rapamisin ve 500nM PP242 konsantrasyonlarının 4 saat uygulanmasının uygun olduğuna karar verilmiştir.



Şekil 4.3. 2. Doz belirleme çalışmaları fosfo-Akt ekspresyon düzeyleri. Farklı konsantrasyon ve zaman aralıklarında uygulanan PP242 ve Rapamisin inhibitörlerinin Akt fosforilasyonu üzerindeki etkisi görülmektedir.



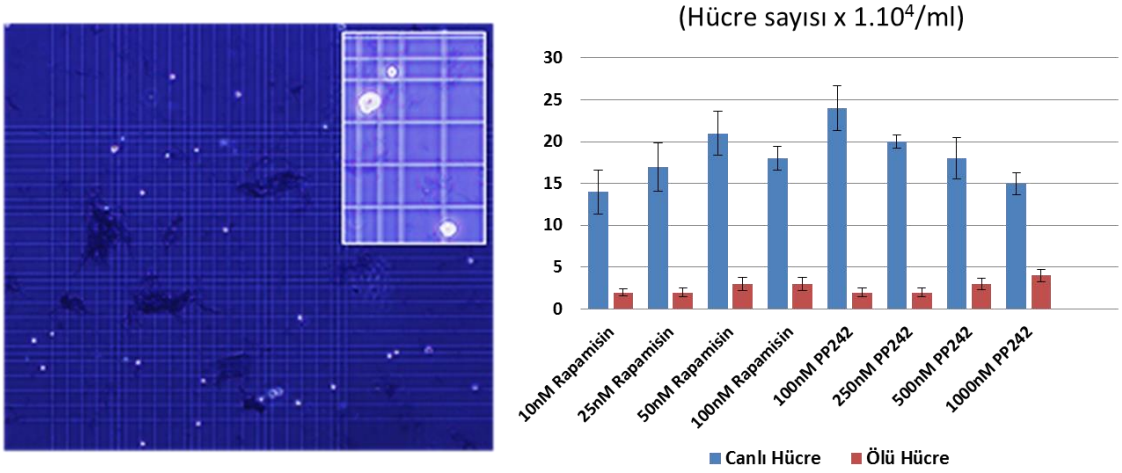
Şekil 4.3. 3. Doz belirleme çalışmaları fosfo-4EBP1 ekspresyon düzeyleri. Farklı konsantrasyon ve zaman aralıklarında uygulanan PP242 ve Rapamisin inhibitörlerinin fosfo-4EBP1 fosforilasyonu üzerindeki etkisi görülmektedir



Şekil 4.3. 4. Doz belirleme çalışmaları fosfo-Akt ve fosfo-4EBP1ekspresyon düzeylerine ait grafik.

4.4. Tripan Mavisi Boyaması İle Canlılık Oranları Değerlendirilmesi Bulguları

Hücreler için uygun dozlarda inhibitör belirleme analizlerine paralel olarak bu hücrelerin Tripan Mavisi ile boyanması gerçekleştirlerek ölü ve canlı (Şekil 4.4.1) hücreler sayılmış ve uygulanan dozların hücre canlılığı üzerindeki etkisi değerlendirimiştir. Tripan Mavisi boyamasında ölü hücreler hücre zarı bütünlüğünü kaybettikleri için maviye boyanmaktadır. Canlı hücreler ise boya almamakta ve beyaz renkte görülmektedir. Uygulanan dozların hücre canlılığı üzerinde olumsuz etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.4.1).

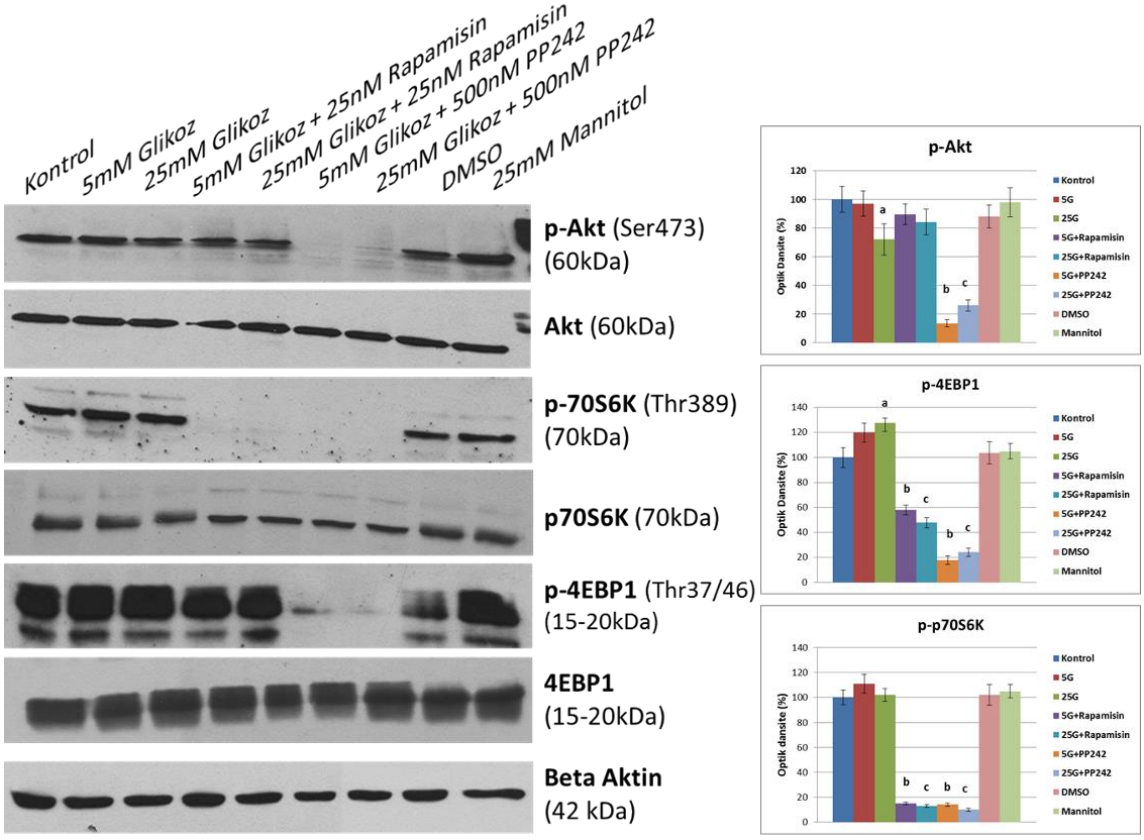


Şekil 4.4. 1. Thoma Lamında Tripan mavisi ile hücre sayımı. Thoma Lamı üzerinde canlı hücreler beyaz yuvarlak küreler olarak izlenmektedir. Farklı konsantrasyonlarda inhibitör dozlarının ölü hücre sayısını arttırmadığı izlenmektedir.

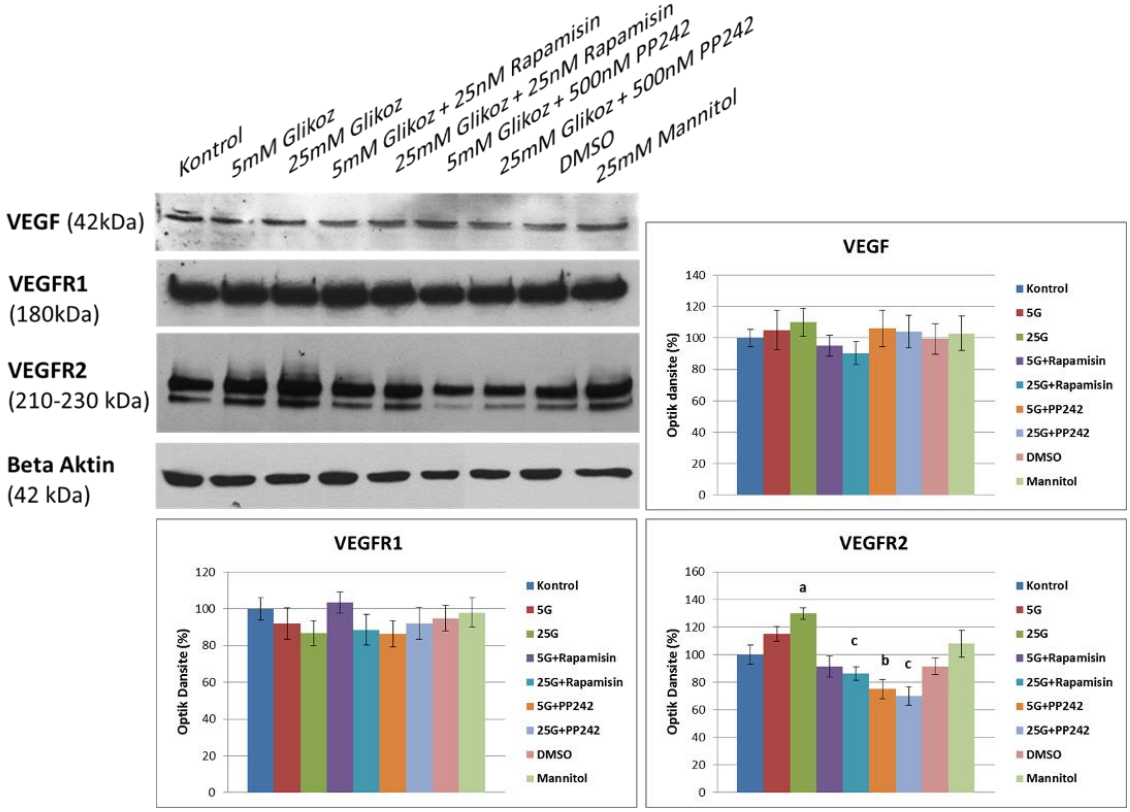
4.5. Hücre Kültürü Western Blot Analizi Bulguları

HUVEC hücre kültüründe deney grupları oluşturulmuş ve bu hücreler için mTOR yolağı proteinleri ve anjiyogenez ilişkili proteinlerin Western Blot analizleri yapılmıştır. Elde edilen bulgulara göre inhibitör uygulamalarının başarılı olduğu

p70S6K, 4EBP1 ve Akt fosforilasyonlarındaki azalma ($p \leq 0,05$) ile teyit edilmiştir. Hiperglisemik koşullarda (25mM Glikoz uygulaması) VEGF ve VEGFR1 ekspresyonlarının değişmediği ancak VEGFR2 ekspresyonunda artış olduğu ve bu artışın 4EBP1 fosforilasyonundaki artış ($p \leq 0,05$) ile korelasyon gösterdiği gözlenmiştir (Şekil 4.5.1, 4.5.2). 4 saat inhibitör uygulamasının ardından yine VEGF ve VEGFR1 ekpresyonlarında bir değişiklik olmadığı ancak hiperglisemik koşullarda artan ($p \leq 0,05$) VEGFR2 ekspresyonunun Rapamisin ve PP242 uygulamasının ardından anlamlı bir şekilde azaldığı ($p \leq 0,05$) gözlenmiştir. Ayrıca 5mM Glikoz ile inkübe edilen grupta da, PP242 uygulamasının VEGFR2 ekspresyonunda azalmayı ($p \leq 0,05$) sağladığı tespit edilmiştir (Şekil 4.5.1, 4.5.2).



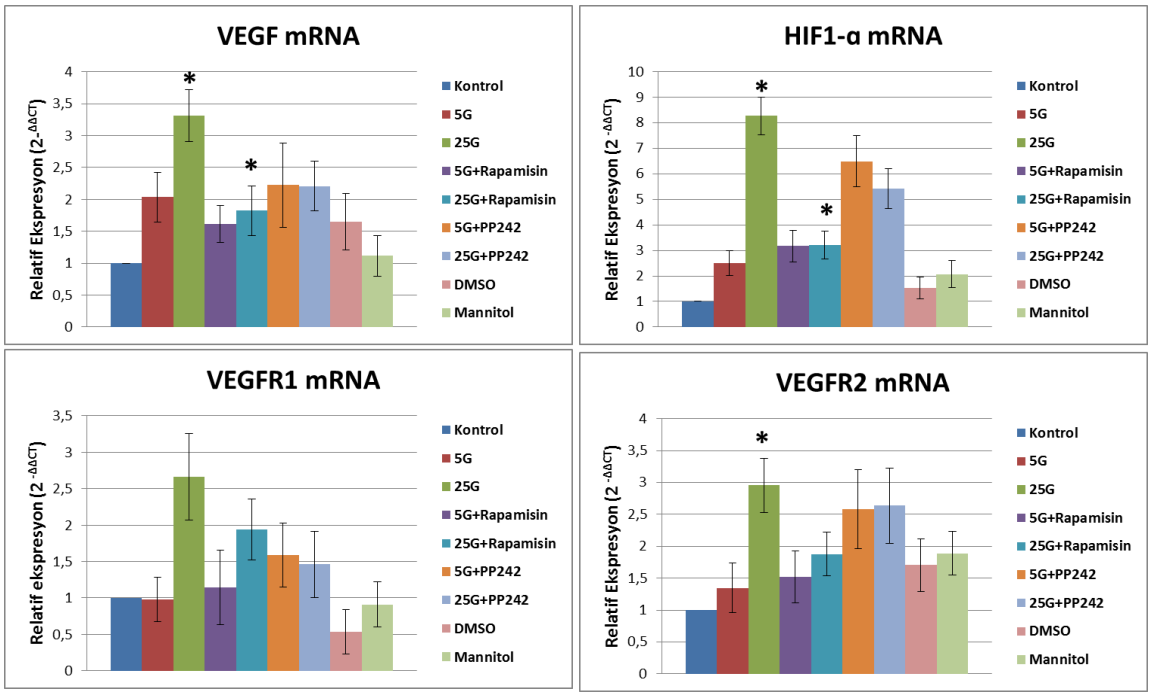
Şekil 4.5.1. Normoglisemik ve hiperglisemik koşullarda ve inhibitör uygulamasının ardından mTOR yolağı proteinlerinin ekspresyon düzeyleri. Hiperglisemik koşullarda Akt fosforilasyonunda azalma ($p \leq 0,05$) ancak 4EBP1 fosforilasyonunda artış ($p \leq 0,05$) olduğu gözlenmektedir. Rapamisin ve PP2424 uygulanan gruplarda hem normoglisemik hem de hiperglisemik koşullarda fosfo-p70S6K ve fosfo-4EBP1 ekspresyonunda azalma ($p \leq 0,05$) olduğu görülmektedir. Akt fosforilasyonunda azalma ($p \leq 0,05$) ise beklendiği üzere sadece PP242 uygulanan grupta gözlenmiştir. (a: kontrole kıyasla anlamlılık ($p \leq 0,05$), b: normoglisemiye kıyasla anlamlılık ($p \leq 0,05$), c: hiperglisemiye kıyasla anlamlılık ($p \leq 0,05$)).



Şekil 4.5.2. Normoglisemik ve hiperglisemik koşullarda ve inhibitör uygulamasının ardından anjiyogenez ilişkili proteinlerinin ekspresyon düzeyleri. HUVEC hücrelerinin 24 saat hiperglisemik koşullarda inkübasyonu VEGF ve VEGFR1 ekspresyon düzeylerini etkilemezken, VEGFR2 ekspresyonunda anlamlı bir artış ($p \leq 0,05$) gözlenmiştir. Hiperglisemik koşullardaki bu artış 4 saat Rapamisin ve PP242 inhibitör uygulamalarının ardından azalmıştır ($p \leq 0,05$). (a: kontrole kıyasla anlamlılık ($p \leq 0,05$), b: normoglisemiye kıyasla anlamlılık ($p \leq 0,05$), c: hiperglisemiye kıyasla anlamlılık ($p \leq 0,05$)).

4.6. Hücre Kültürü qRT-PCR Analizi Bulguları

Hücre kültüründe 24 saat inkübasyon süresinin sonunda hücreler Trizol ile kazınarak qRT-PCR analizleri yapılmıştır. Hiperglisemik koşullarda HIF-1α, VEGF ve VEGFR2 mRNA düzeylerinde anlamlı bir artış ($p \leq 0,001$) olduğu gözlenmiştir. Hiperglisemik koşullardaki bu artış, Rapamisin uygulamasının ardından VEGF ve HIF-1α mRNA'sında anlamlı bir azalma ($p \leq 0,001$) ile sonuçlanmıştır (Şekil 4.6.1.).



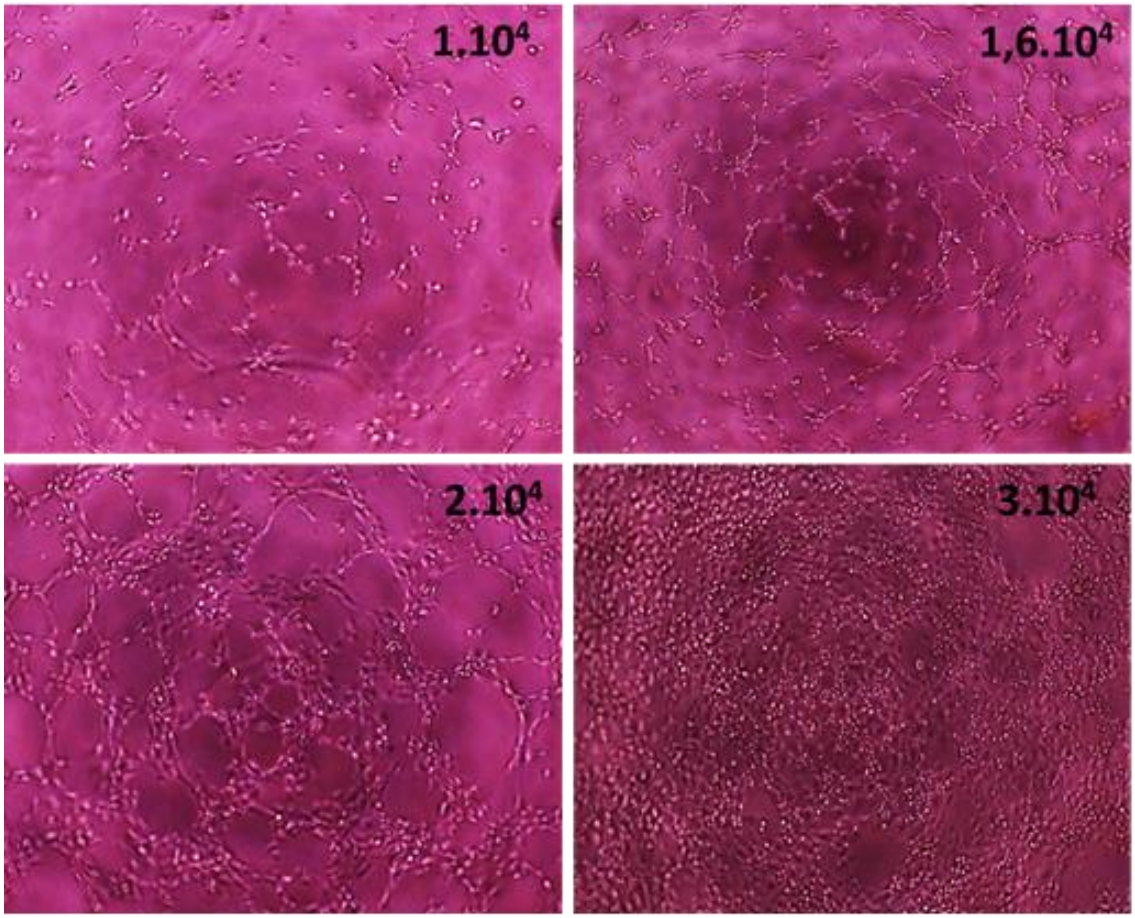
Şekil 4.6.1. Normoglisemik ve hiperglisemik koşullarda ve inhibitör uygulamasının ardından anjiyogenez ilişkili genlerin kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu sonrası mRNA ekspresyon düzeyleri. VEGF, HIF-1α ve VEGFR2 mRNA ekspresyonunda hiperglisemik koşullarda anlamlı bir artış ($p \leq 0{,}001$) gözlenmektedir. Rapamisin uygulamasının ardından bu genlerin ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir azalma ($p \leq 0{,}001$) olduğu görülmektedir.

4.7. Matrijel Analizi Bulguları

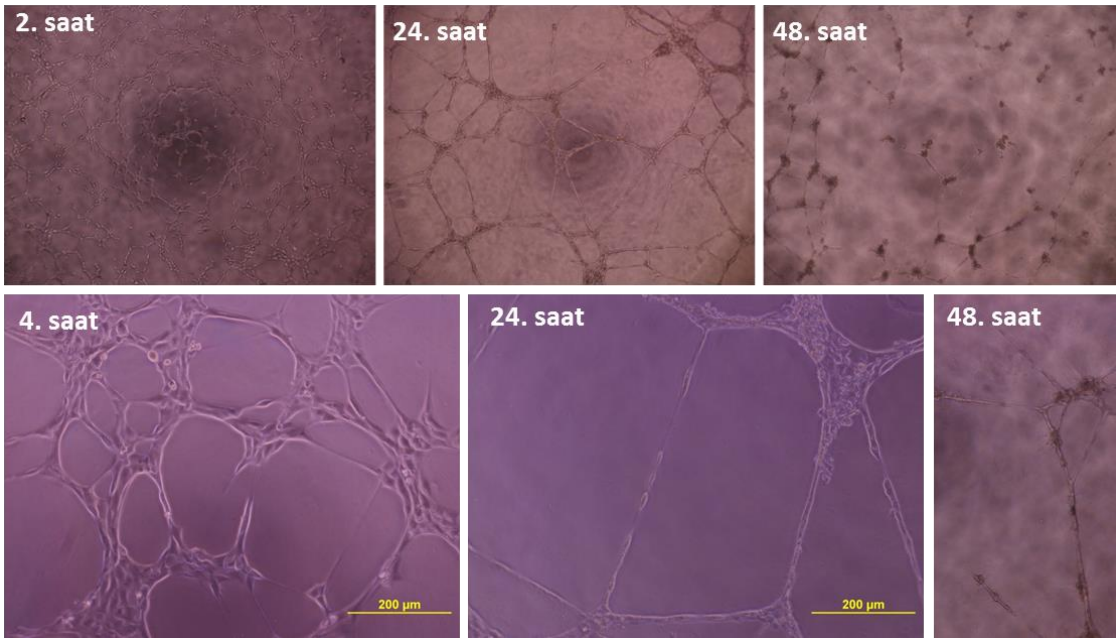
75cm^2'lik flasklardan Tripsin ile kaldırılan hücreler santrifüj edilmiş ve ardından 1ml ECM medyum ile resüspanse edilmiştir. Thoma lamında sayılan hücreler, Matrijel ile kaplı 96'lı kuyucuklara ekilmiştir. Anjiyogenik tüp oluşumunun en iyi gerçekleştiği hücre sayısının belirlenmesi için farklı konsantrasyonlarda hücreler ekilmiştir. Bu analizin sonucunda $1.6x10^4$ hücre sayısının tüp oluşumu açısından daha uygun olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.7.1.). Daha düşük hücre sayısı ile ekim yapıldığında damar benzeri yapıların oluşamadığı, daha yoğun hücre sayıları ile ekim yapıldığında ise hücre sayısının fazlalılığından dolayı düzensiz yapıların oluştuğu, hücrelerin adeta kuyucuğun ortasında üst üste bindiği gözlenmiştir. Matrijel analizinde tüm deney gruplarındaki hücre yoğunluğu $1.6x10^4$ hücre sayısına göre hesaplanmış ve matrijellere ekim yapılmıştır.

Deney grupları belirlenen hücre konsantrasyonunda matrijellere ekim yapıldıktan sonra, belirli aralıklarla hücreler gözlenmiştir. Hücrelerin damar benzeri yapıları oluşturmak üzere 2. saate organize oldukları, 4. saatte ideal şekilde damar tüpü yapılarını oluşturdukları, süre ilerledikçe 24. saatte oluşan damar benzeri yapıların genişlediği ve 48. saatte bu yapıların deforme olarak ortadan kalktığı gözlenmiştir (Şekil 4.7.2).

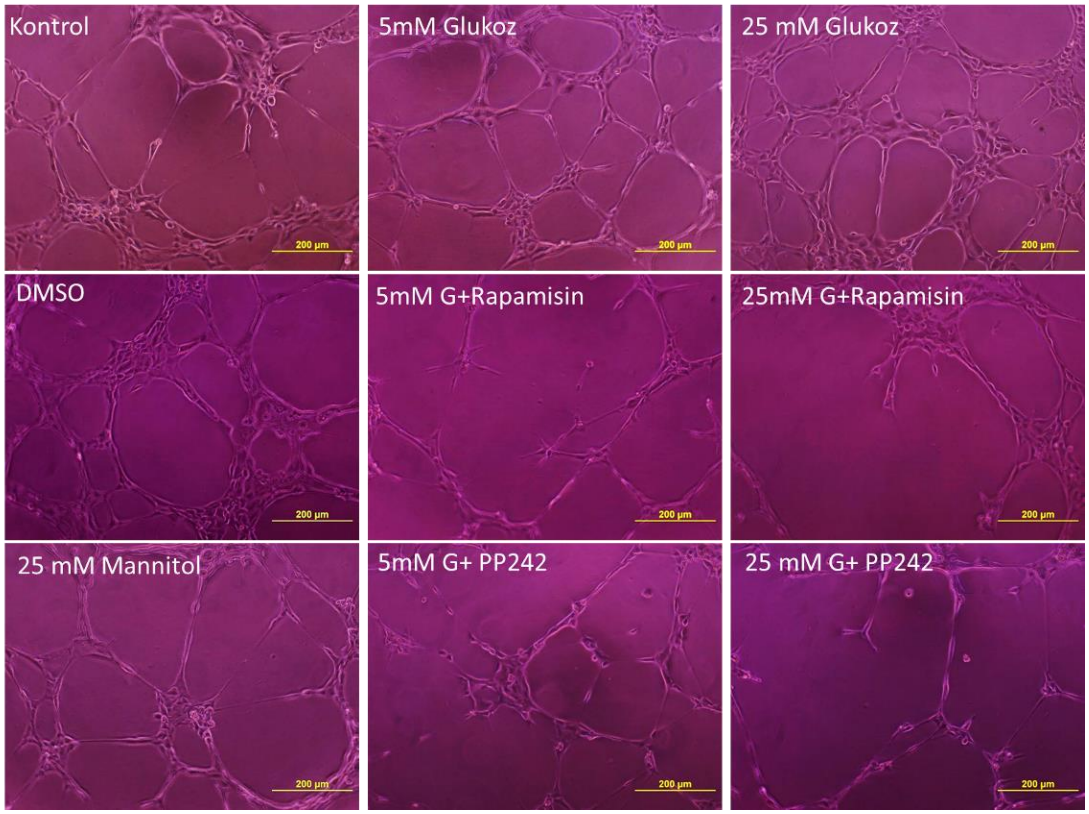
Hiperglisemik koşullarda oluşan damar benzeri yapıların sayısının normoglisemik koşullara kıyasla anlamlı bir şekilde arttığı ($p \leq 0,001$) gözlenmiştir. Bu artışın hem Rapamisin hem de PP242 uygulamasının ardından azaldığı belirlenmiştir ($p \leq 0,001$). Benzer şekilde normoglisemik koşullarda da damar benzeri yapıların oluşumunu azalttığı gözlenmiştir (Şekil 4.7.3, $p \leq 0,001$). DMSO ve Mannitol uygulamasının ise herhangi bir etkisi olmamıştır, kontrol grubu ile benzer sayıda damar tüpü oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.7.3).

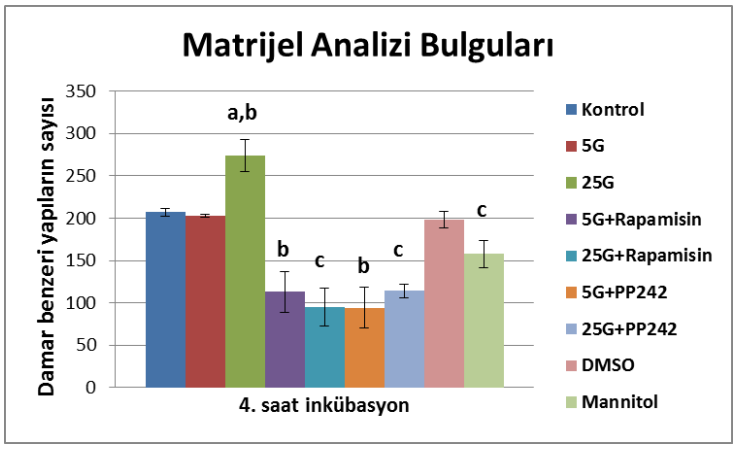


Şekil 4.7.1. Matrijel analizleri için uygun hücre sayısının belirlenmesine yönelik sonuçlar izlenmektedir. Damar benzeri yapıların oluşumu için en uygun hücre sayısı 1.6x104 olduğu görülmektedir. 1x104 hücre sayısının az geldiği ve damar benzeri yapıların oluşamadığı, bunun aksine 2x104 ve 3x104 hücre sayısının fazla geldiği ve düzensiz hücre yığınlarının oluştuğu izlenmektedir.



Şekil 4.7.2. Matrijel analizlerinde süreye bağlı olarak damar benzeri yapıların oluşum aşamaları izlenmektedir. 48 saat sonunda bu yapıların kendiliğinden ortadan kalktığı görülmektedir.

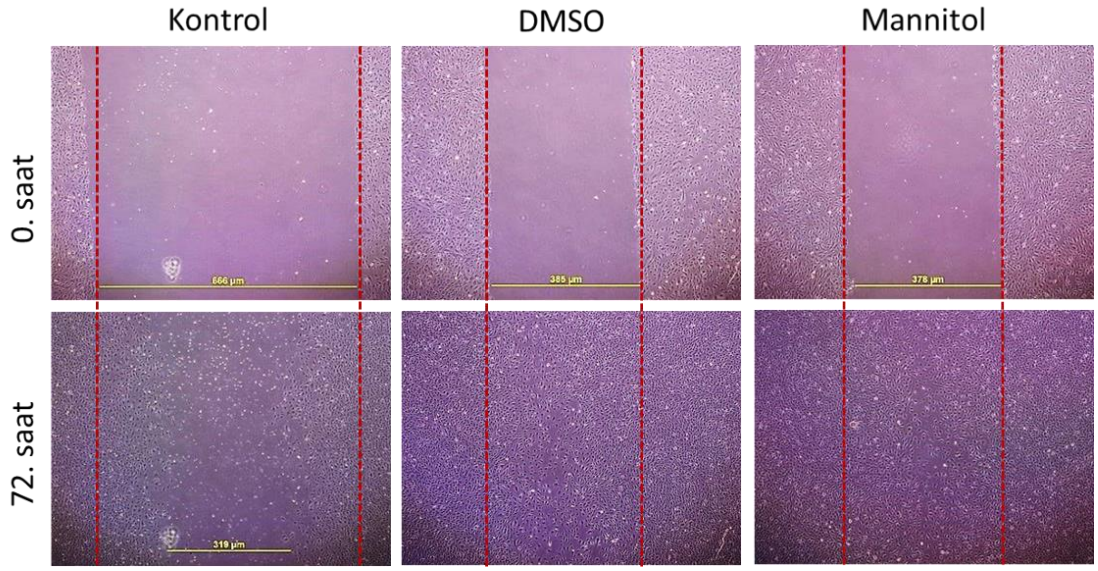




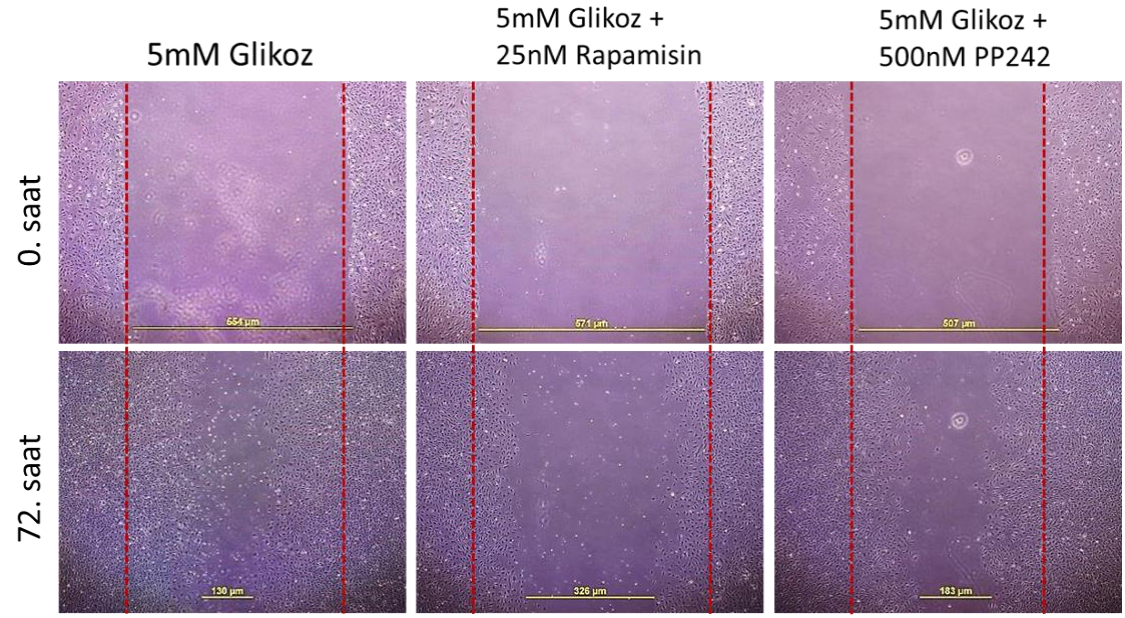
Şekil 4.7.3. Matrijel analizi sonucu oluşan damar benzeri yapıların gruplara göre dağılımı izlenmektedir. Hiperglisemik koşullarda damar benzeri yapıların sayısı artmıştır ($p \leq 0{,}001$). İnhibitör uygulaması hem normoglisemik koşullarda hem de hiperglisemik koşullarda damar benzeri yapıların sayısını azaltmıştır ($p \leq 0{,}001$). (a: kontrole kıyasla anlamlılık ($p \leq 0{,}001$), b: normoglisemiye kıyasla anlamlılık ($p \leq 0{,}001$), c: hiperglisemiye kıyasla anlamlılık ($p \leq 0{,}001$))

4.8. Yara İyileşme Analizi Bulguları

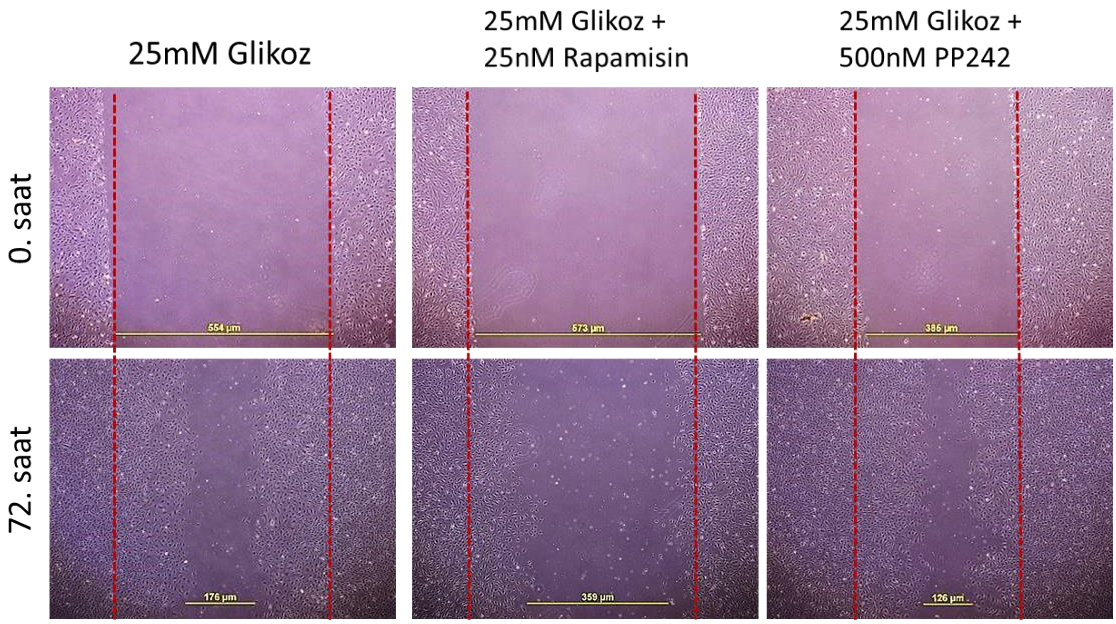
6 kuyucuklu plate'lere ekim yapılan $2x10^4$ hücre %70 konfluensi oranına ulaştıktan sonra, kuyucuğun ortası kazınmıştır ve 24, 48, 72 saat sonunda hücreler gözlemlenerek hücrelerin migrasyon (göç) oranı değerlendirilmiştir. İlk 24 saat serum içermeyen medyum içerisinde deney koşullarında inkübe olan hücreler, 24 saatin sonunda normal ECM medyum ile inkübasyona devam etmiştir. İmage J ile yapılan ölçümlerin analizi sonrası elde edilen verilere göre, DMSO ve Mannitol uygulamasının kontrole kıyasla hücre migrasyonu üzerinde herhangi bir etkisi olmamıştır (Şekil 4.8.1, 4.8.4.). Normoglisemik koşullarda herhangi bir değişim gözlenmezken (Şekil 4.8.2.), hiperglisemik koşullarda HUVEC hücrelerinin migrasyon oranı artmıştır (Şekil 4.8.3, 4.8.4, $p \leq 0{,}001$). Hem Rapamisin hem de PP242 uygulanan gruplarda normoglisemik ve hiperglisemik koşullarda migrasyon oranı azalmıştır (Şekil 4.8.2, 4.8.3., 4.8.4. $p \leq 0{,}001$).



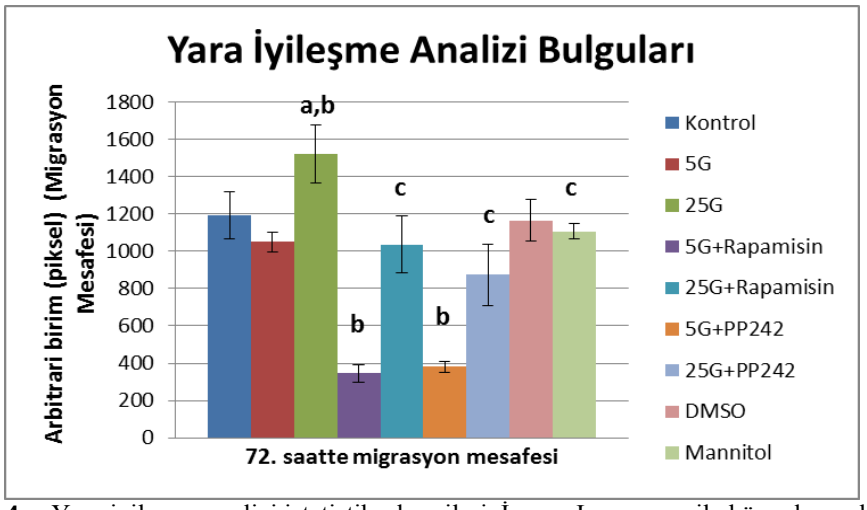
Şekil 4.8. 1. Kontrol gruplarında yara iyileşme analizi. Kontrol, DMSO ve Mannitol grupları arasında benzer migrasyon oranları olduğu gözlenmiştir



Şekil 4.8. 2. Normoglisemik koşullarda yara iyileşme analizi. Normoglisemik koşullarda hücre göçü oranının kontrole benzer olduğu gözlenmiştir. Rapamisin ve PP242 uygulaması hücre göçünü yavaşlatmıştır p(≤0,001).



Şekil 4.8. 3. Hiperglisemik koşullarda yara iyileşme analizi. Hiperglisemik koşullarda hücre göçü oranı kontrole ve normoglisemik koşullara oranla artmıştır p(≤0,001). Rapamisin ve PP242 uygulaması hiperglisemik koşullarda artan hücre göçünü azaltmıştır p(≤0,001).

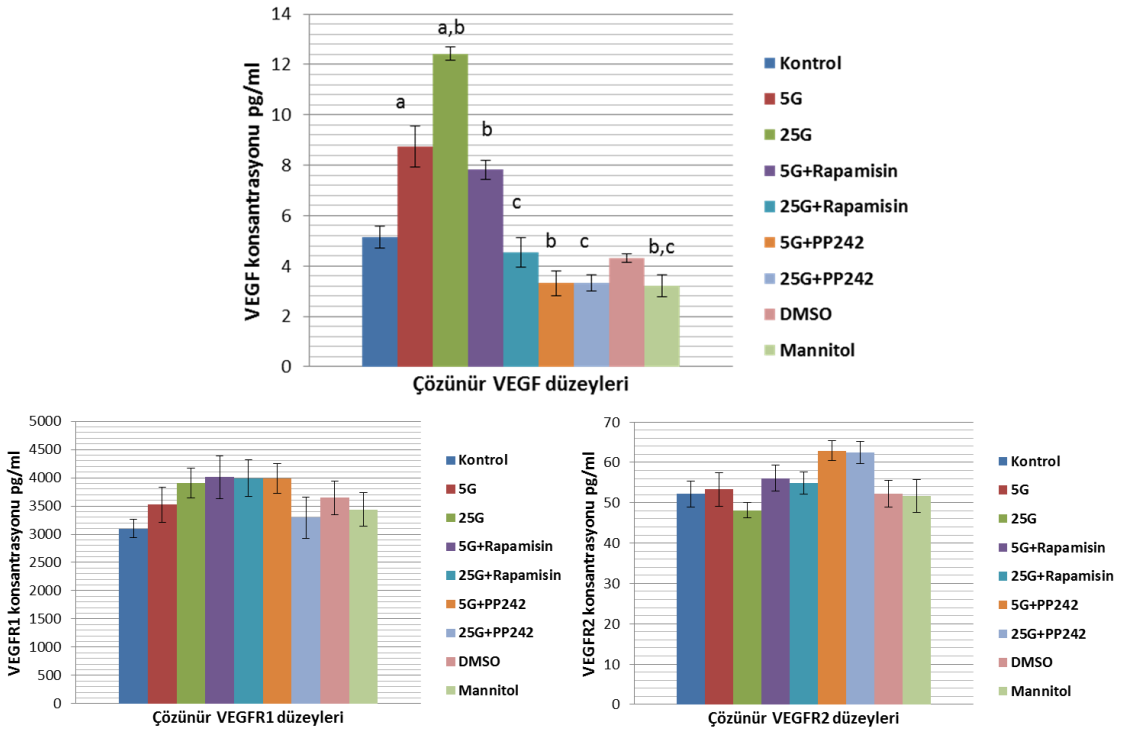


Şekil 4.8. 4. Yara iyileşme analizi istatistiksel verileri. İmage J programı ile hücreden yoksun alanın uzunluk mesafesi ölçülmüş ve 72. saatteki mesafe 0. saatteki mesafeden çıkarılmıştır. Elde edilen veriler kullanılarak gruplar arasında kıyaslama yapılmıştır. (a: kontrole kıyasla anlamlılık (p≤0,001), b:normoglisemiye kıyasla anlamlılık (p≤0,001), c: hiperglisemiye kıyasla anlamlılık (p≤0,001))

4.9. ELİSA Analizi Bulguları

ELISA analizi ile HUVEC hücrelerin ürettiği ve medyuma salgıladığı çözünür formdaki (souble) VEGF, VEGFR1 ve VEGFR2 proteini konsantrasyon düzeyleri belirlenmiştir. Bu analiz için ticari hazır ELISA kitleri kullanılmıştır ve analiz esnasında, üretici firmanın belirttiği protokol uygulanmıştır.

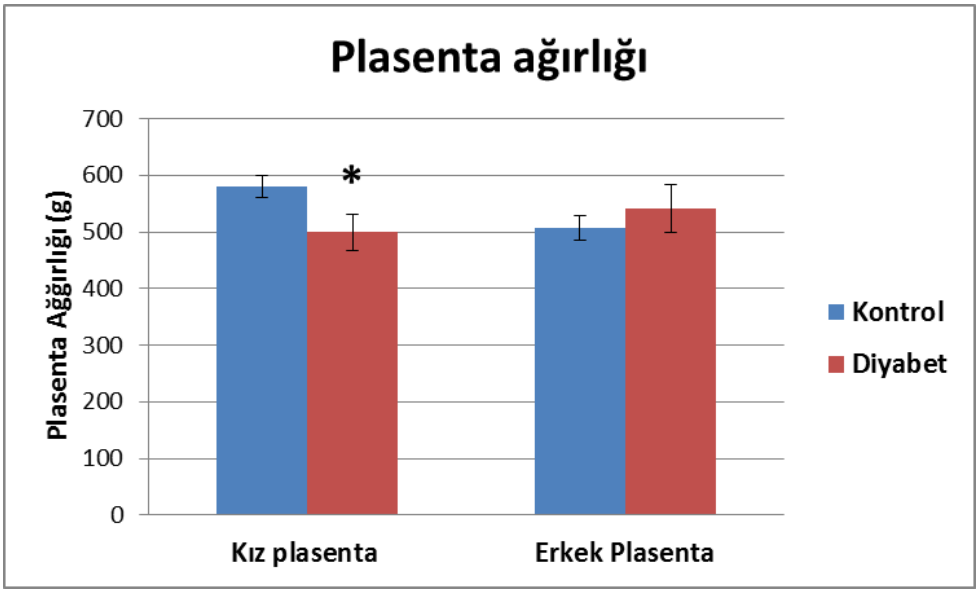
VEGF Reseptörlerinin düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık izlenmese de, VEGF konsantrasyonunun normoglisemik ve hiperglisemik koşullarda kontrole kıyasla anlamlı bir şekilde arttığı ($p \leq 0,001$) gözlenmiştir. Rapamisin ve PP242 inhibitörlerinin uygulanması hem normoglisemik hem de hiperglisemik koşullardaki artışın azalmasına ($p \leq 0,001$) neden olmuştur. DMSO uygulanan grupta kontrol ile benzer VEGF düzeyleri tespit edilse de, Mannitol uygulaması sonrası VEGF konsantrasyonunun normoglisemik ve hiperglisemik koşullara kıyasla azaldığı ($p \leq 0,001$) gözlenmiştir (Şekil 4.9.1).



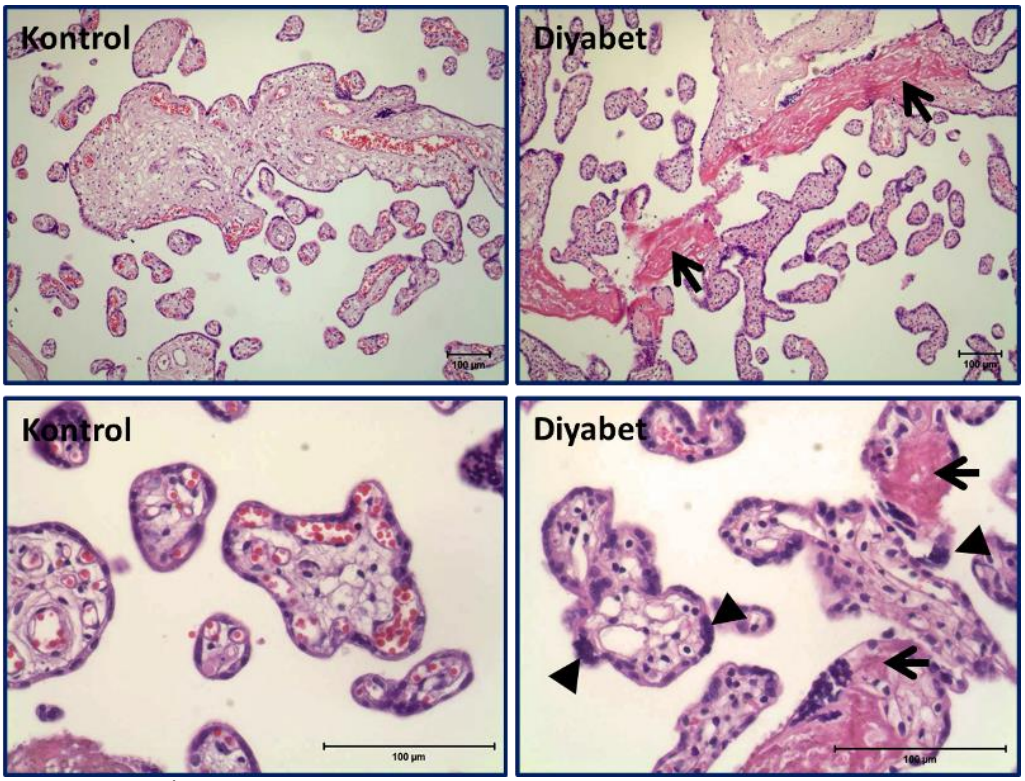
Şekil 4.9.1. ELİSA analizi sonuçları. VEGF konsantrasyonu normoglisemik ve hiperglisemik koşullarda kontrole kıyasla anlamlı bir şekilde artmıştır ($p \leq 0,001$). Her iki koşulda da inhibitör uygulaması sonucu VEGF konsantrasyonu azalmıştır ($p \leq 0,001$). Mannitol ile inkübasyon sonrası da VEGF ekspresyonunun azaldığı ($p \leq 0,001$) gözlenmiştir. (a: kontrole kıyasla anlamlılık ($p \leq 0,001$), b:normoglisemiye kıyasla anlamlılık ($p \leq 0,001$), c: hiperglisemiye kıyasla anlamlılık ($p \leq 0,001$))

4.10. Diyabetik İnsan Plasentası Işık Mikroskobi Analizi Bulguları

Sağlıklı ve gebelik öncesi Tip 1 Diyabet ya da Tip 2 Diyabet hastası olan kadınların doğum sonrası term plasentaları toplanmıştır. Hastaların yaşı, gebelik haftaları, bebeğin doğum ağırlığı ve cinsiyeti, alkol ve sigara bağımlılığı gibi temel bilgiler toplanmıştır (Tablo 4.10.1.). Diyabetik hastaların serum HbA1c düzeyleri dikkate alınarak HbA1c düzeyleri 5.7 ve üzeri olanlar diyabetik kabul edilerek deney grubuna dahil edilmişlerdir. Bebeğin cinsiyetine göre plasentalar kız ya da erkek olarak ayrılmış ve ayrı ayrı plasenta ağırlıkları tartılmıştır. Buna göre kontrol ve diyabetik plasentalar arasında kız bebeklere ait plasenta ağırlıklarının daha düşük olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.10.1). Rutin ışık mikroskobik analizlere göre diyabetik plasentalarda sinsisyal düğümlerin sayısında artış olduğu ve fibrotik alanların kontrole kıyasla daha fazla olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.10.2).



Şekil 4.10.1. Kontrol ve diyabetik plasenta ağırlıkları. Diyabetik kız bebeklere ait plasenta ağırlıklarının daha düşük olduğu görülmektedir ($p \leq 0,05$).



Şekil 4.10.2. İnsan plasentası rutin ışık mikroskobik analizi. Hematoksilen-Eozin boyaması sonrası diyabetik plasentalarda fibrotik alanların (ok) ve sinsisyal düğümlerin (ok başı) arttığı görülmektedir.

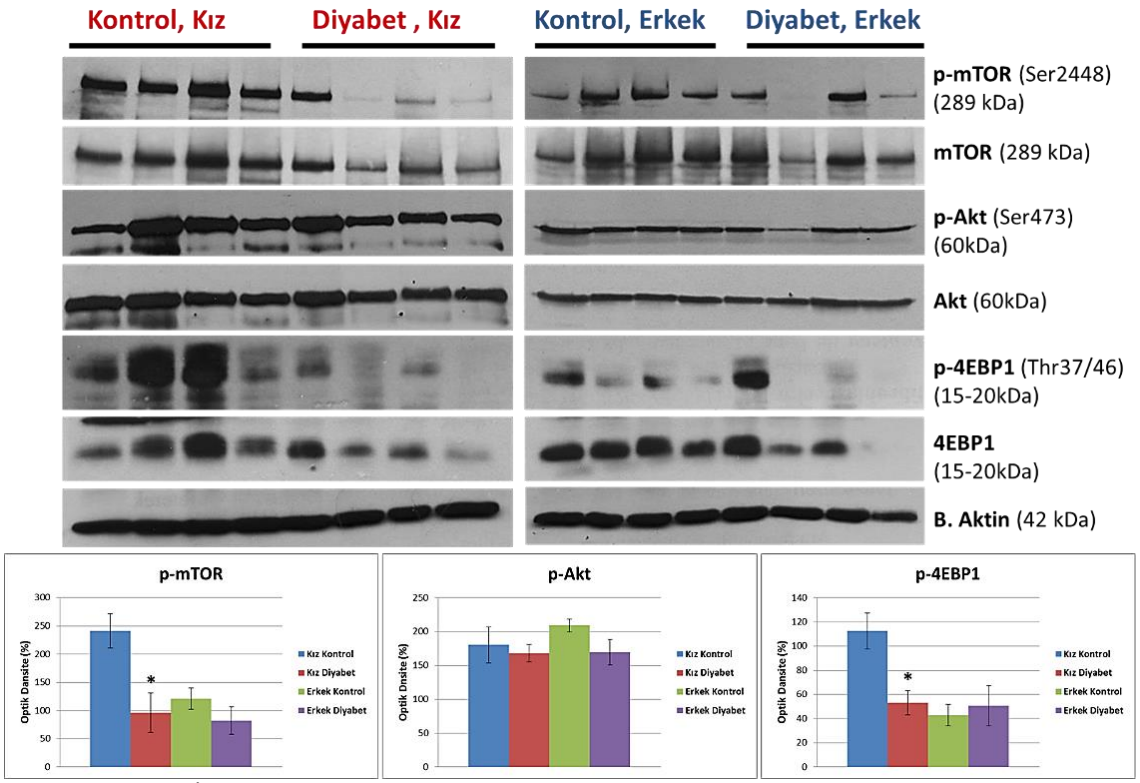
Tablo 4.10. 1. Diyabet ve kontrol gruplarına ait hasta verileri

	Kontrol	Diyabet
Anne yaşı	**27,3** (n=12)	**33,7** (n=10)
Gebelik haftası	**39,1** (n=12)	**37,7** (n=10)
Bebek doğum ağırlığı	**3501, 2** (Kız) (n=7) **3337,5** (Erkek) (n=5)	**3077** (Kız) (n=5) **4127,5** (Erkek) (n=5)
Plasental ağırlık	**580,1** (Kız) (n=7) **507** (Erkek) (n=5)	**499,6** (Kız)* (n=5) **541,7** (Erkek) (n=5)
Serum HbA1c düzeyleri	-	**≥5,7**

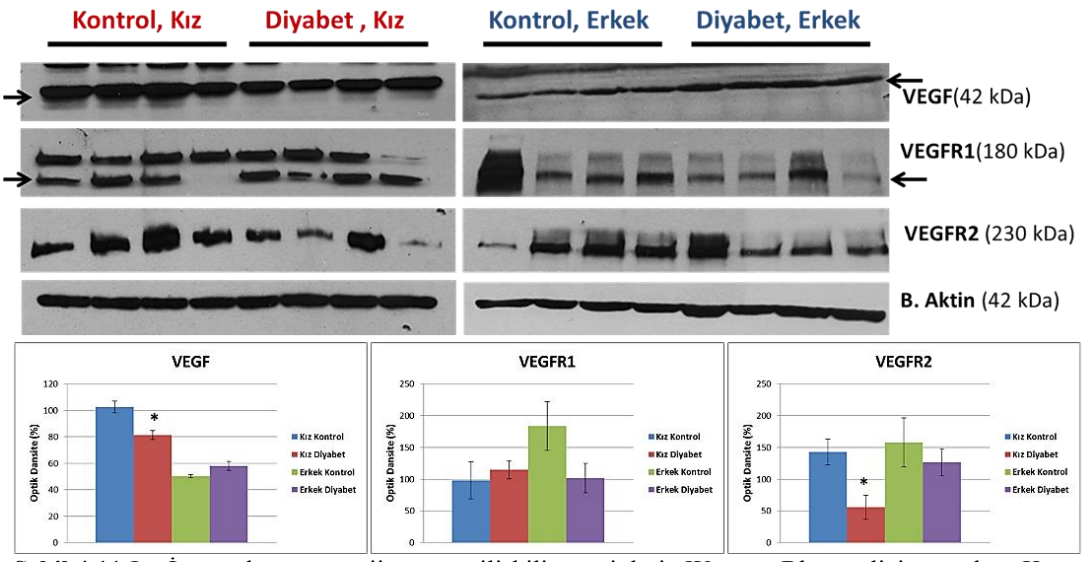
***p≤0,05**

4.11. İnsan Plasentası Western Blot Analizi Bulguları

Kontrol ve diyabetik plasentaların Western Blot Analizi sonuçlarına göre cinsiyete bağlı olarak kız bebeklere ait plasentalarda mTOR ve 4EBP1 fosforilasyonlarının anlamlı bir şekilde azaldığı (Şekil 4.11.1., p≤0,05) tespit edilmiştir. Bununla birlikte Akt fosforilasyonları gruplar arasında benzer bir ekspresyon düzeyi göstermiştir. Anjiyogenez ilişkili proteinlere bakıldığında ise VEGF ve VEGFR2 düzeylerinin yine cinsiyete bağlı olarak kız bebeklere ait plasentalarda anlamlı bir şekilde azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.11.2., p≤0,05). VEGFR1 düzeyi açısından gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.



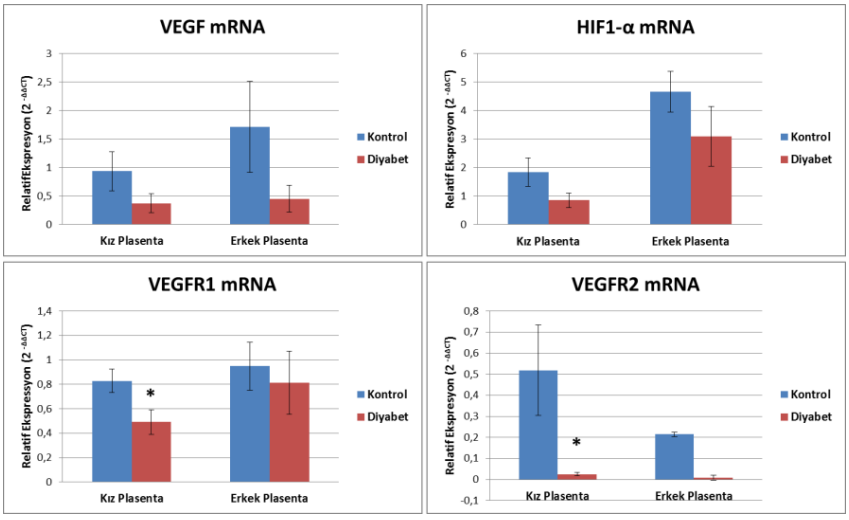
Şekil 4.11.1. İnsan plasentası mTOR yolağı ilişkili proteinlerin Western Blot analizi sonuçları. Kız bebeklere ait plasentalarda diyabet grubunda mTOR ve 4EBP1 fosforilasyonlarında anlamlı bir azalma (p≤0,05) olduğu görülmektedir. Fosfo-Akt ekspresyon düzeyinin ise gruplar arasında benzer olduğu görülmektedir.



Şekil 4.11.2. İnsan plasentası anjiyogenez ilişkili proteinlerin Western Blot analizi sonuçları. Kız bebeklere ait diyabet grubu plasentalarda VEGF ve VEGFR2 ekspresyonlarında anlamlı ($p \leq 0,05$) bir azalma olduğu görülmektedir. VEGFR1 ise gruplar arasında benzer ekspresyon düzeyine sahiptir.

4.12. İnsan Plasentası qRT-PCR Analizi Bulguları

Kız ve erkek bebeklere ait diyabetik plasentalarda HIF1-α, VEGF, VEGFR1 ve VEGFR2 mRNA düzeyleri karşılaştırıldığında genel olarak diyabetik gruplarda bir azalma olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.12.1.). Ancak sadece kız bebeklere ait plasentalarda VEGFR1 ve VEGFR2 mRNA'larında istatistiksel olarak anlamlı ($p \leq 0,05$) bir azalma olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.12.1. Kontrol ve diyabetik insan plasentası qRT-PCR analizi sonuçları. Kız bebeklere ait diyabetik plasentalarda VEGFR1 ve VEGFR2 mRNA'larında anlamlı bir azalma olduğu gözlenmektedir ($p \leq 0,05$).

TARTIŞMA

Diyabet, mikro ve makrovasküler anomaliler ile ilişkili kronik metabolik bir hastalıktır. Mikrovasküler hastalıklar düşük direnç arterlerini, arteriolleri ve kapillerleri içermektedir ve retinopati, nefropati ve nöropati gibi klinik sonuçlar olarak ortaya çıkmaktadır. Makrovasküler anomaliler ise, büyük ve orta çapta damarları içermekte ve ateroskleroz ve tromboembolizm gibi klinik tablolar olarak ortaya çıkmaktadır [227].

Hiperglisemik koşullara karşı yoğun bir tedavi izlendiğinde, mikrovasküler hastalıkların ilerlemesinde azalma olduğu ancak makrovasküler hastalıkların bu durumdan etkilenmediği görülmüştür [227-229]. Bu durum farklı büyüklükteki damarların, insülin ve glikoz düzeylerine karşı farklı tepkilerinin olması ile açıklanmıştır [230]. HbA1c düzeylerindeki artışa bağlı olarak (%5.5'den %9.5'e), makrovasküler hastalıkların oranında 2 kat artış olduğu gözlenmiştir. HbA1c düzeyindeki bu artış mikrovasküler hastalıkların oranına 10 kat artış olarak yansımaktadır. Bu durum, LDL düzeyleri ya da trigliserit düzeylerindeki değişimlerin hiperglisemiye eşlik etmelerinden doğacak farklılıklar olarak yorumlanabildiği gibi [169], farklı endotel hücrelerinin farklı davranışlar sergilemeleri olarak da yorumlanabilmektedir [230].

Hipergliseminin vasküler yapılar üzerindeki etkileri; pro-konstriktör [231, 232] , pro-koagültör [231, 233, 234], pro-inflamatuvar [235, 236], pro-anjiyogenik [237, 238] ve pro-permeabilite [239, 240] olarak ifade edilebilir [6].

Bununla birlikte diyabette anjiyogenezin, organ hatta hücre bağımlı olarak farklı yanıtlar verebildiği öne sürülmektedir [183]. Örneğin Retinada diyabet pro-anjiyogenik bir rol oynar ve diyabetik retinopatilerde anti-anjiyogenik terapilerle VEGF nötralize edilmeye çalışılır [184, 241]. Bu karşın kalpte, VEGF sinyalleri diyabette düzensizdir ve kollateral damar oluşumu aksar [186]. Kanser hücrelerinde ise, yüksek glikoz HIF-1α akümülasyonu dolayısıyla VEGF ekspresyonunu tetikler. Buna karşın normal hücrelerde yüksek glikoz HIF-1α ve VEGF ekspresyonunu inhibe eder [187-189].

Diyabetin hem pro-anjiyogenik hem de anti-antijogenik etkilerinin olması anjiyogenik paradoks olarak değerlendirilmektedir. Bu paradoks her organın kendi lokal mikroçevresinin çok önemli olduğunu işaret etmektedir [183]. Diyabetik koşulların neden olduğu endotel disfonksiyon çeşitli mekanizmalar ile açıklanabilir;

1) Endotel ve vasküler düz kas hücrelerinde aksaklıklar/hasarlar ile karakterize vasküler disfonksiyon
2) Kronik hiperglisemiye maruz kalma sonucu proteinlerin enzimatik olmayan glikasyonu ve yeni damar oluşum mekanizmalarında aksaklıklar
3) Büyüme faktörü sinyalinde anormallikler [242].

Diyabetik hastaların miyokardiyumunda VEGF ve reseptörlerinin ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir [243]. Benzer şekilde 20 mM D-Glikoz içeren kültür ortamında yani hiperglisemik koşullarda inkübe edilen konseptusta VEGF ve VEGFR2 ekspresyonunun azaldığı rapor edilmiştir [244]. Bunun aksine hipoksi, hiperglisemi ve çeşitli sitokinler gibi farklı etmenler sonucu VEGF transkripsiyonunun arttığını bildiren farklı çalışmalar da mevcuttur [245]. Bir diğer çalışmada ise diyabetik hastalarda VEGF ekspresyonunun arttığı buna karşın VEGFR1 ve VEGFR2 ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir [246].

Anjiyogenez ilişkili protein ekspresyonlarındaki değişimlerin hücre içi sinyal iletim yolakları ile ilişkili olabileceği ifade edilmiştir [186]. VEGFR-Tirozin Kinaz aktivasyonundan sonra, sinyal iletim yolakları devreye girerek çeşitli hücre içi mekanizmaları uyarmaktadır. Tirozin Kinaz aktivasyonunu deaktive eden Tirozin-Fosfataz Proteinler (PTPs), diyabette artmaktadır ve aktive olan sinyal iletim yolağını baskılayarak sinyal yolağının desensitizasyonuna neden olmaktadır. Bu bilgilerle uyumlu olarak diyabette Akt aktivasyonunun azaldığı bildirilmiştir [246, 247].

Benzer şekilde başka bir çalışmada hiperglisemik koşullarda Akt fosforilasyonun azaldığı bildirilmiştir [248, 249]. Endotel hücrelerinde PI3K-Akt sinyal yolağı canlılık, proliferasyon, mikrovasküler permeabilite ve anjiyogenez süreçlerinde önemli roller oynar [250, 251]. Dolayısıyla hiperglisemi indüklü PI3K-Akt sinyal iletiminin diyabette gözlenen vasküler komplikasyonların nedeni olabileceği ifade edilmiştir. Yüksek glikoz konsantrasyonun endotel hücre apoptozunu [252] ve permeabiliteyi [253] artırdığı daha önce bildirilmiştir. Buna karşın birbiri ile uyuşmayan veriler de rapor edilmiştir. Hiperglisemiye bağlı olarak endotel hücre proliferasyonunun hem azaldığı [254] hem de arttığı bildirilmiştir [255]. Endotel hücre proliferasyonun hiperglisemik koşullarda azaldığını rapor eden çalışmada, bu azalmanın kısa süreli kültür koşullarında (72 saat) gerçekleştiği ifade edilmiştir [254].

Anjiyogenik faktörlerde gözlenen bu değişime mTOR yolağı aracılık ediyor olabilir. mTOR yolağı besin, büyüme faktörleri, insülin, glikoz gibi faktörlerle aktive edilebilmektedir [256]. Diyabetik koşullarda mTOR aktivasyonunun hiperglisemiye bağlı olarak değiştiği çeşitli dokularda daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [257]. Ayrıca mTOR yolağının anjiyogenezle ilişkisi daha önce yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla ortaya konmuştur [146, 258]. mTOR yolağının Rapamisin ve türevleri (Rapaloglar) ile inhibisyonu sonucu anjiyogenezin baskılanması anjiyogenik faktörlerin ekspresyonlarında azalma [143, 144] ve matrijel damar tüpü benzeri yapıların oluşumunda azalma [259] gibi çeşitli analizlerle ortaya konmuştur.

Ancak bu çalışmayla birlikte ilk defa hiperglisemik koşulların anjiyogenez mekanizmaları üzerindeki etkisinin, mTOR yolağı aracılığıyla düzenlenip düzenlemediği sorgulanmıştır. Literatür ile uyumlu olarak bizim çalışmamızda da *in vitro* koşullarda 24 saat hiperglisemiye maruz kalmanın Akt fosforilasyonunu azalttığı gözlenmiştir. Buna karşın p70S6K fosforilasyonu değişmemiş ancak 4EBP1 fosforilasyonu hiperglisemik koşullarda artmıştır.

Western Blot analizi sonuçlarına göre VEGF ve VEGFR1 ekspresyonunda hiperglisemik koşullarda herhangi bir değişim gözlenmezken, VEGFR2 ekspresyonunda artış olduğu tespit edilmiştir. VEGFR2 ekspresyonundaki bu artış, mTOR yolağının inhibe edilmesi ile baskılanmıştır. Dolayısıyla hiperglisemik koşullarda anjiyogenik süreçlerde meydana gelen değişimlerde mTOR sinyal iletim yolağının rol oynadığı öne sürülebilir. Ancak mTORC2 hedef proteini olan Akt fosforilasyonu azalırken, mTORC1 hedef proteini olan 4EBP1 fosforilasyonunun artması, Akt'den bağımsız bir mTORC2 etkisini işaret edebilir. Bununla birlikte daha önce yapılan bazı çalışmalarda p70S6K fosforilasyonunun negatif geribildirim mekanizması aracılığıyla Akt fosforilasyonunu etkilediği gözlenmiştir [260, 261]. Dolayısıyla bizim çalışmamızda Akt fosforilasyondaki azalma 4EBP1 fosforilasyonun artması nedeniyle devreye giren geri bildirim mekanizması sebebiyle ortaya çıkmış olabilir.

Western Blot analizlerinde VEGF protein düzeyi deney grupları arasında değişmezken, ELİSA analizi sonuçlarına göre salgılanan VEGF düzeylerinin hiperglisemik koşullarda arttığı ve inhibitör uygulamaları sonucunda bu artışın azaldığı gözlenmiştir. Dolayısıyla çevresel faktörlerin hücrede eksprese olan ve salgılanan proteinler üzerinde farklı etkiler gösterebileceği, ya da hücrelerin bu koşullara farklı yanıtlar verebileceği söylenebilir.

qRT-PCR verilerine göre HUVEC hücrelerinde hiperglisemik koşullarda HIF-1α, VEGF ve VEGFR2 mRNA'larında kontrole kıyasla anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir. HIF-1α mRNA'sındaki artışın VEGF ve VEGFR2 mRNA'sındaki artış ile korele olması hiperglisemik koşullarda HIF-1α aracılı olarak anjiyogenezin düzenlenebileceği yönünde yorumlanabilir. Hiperglisemik koşullarda görülen bu artış Rapamisin uygulamasının ardından azalmıştır. VEGF mRNA'sında gözlenen artışın 24 saatte protein düzeyine yansımamış olması translasyon mekanizmaları ile ilişkili bir süreç olabilir.

HIF, hipoksi ile indüklenen heterodimerik bir transkripsiyon faktörüdür ve HIF-1α ve HIF-1β alt ünitelerinden oluşur [262]. Hücresel hipoksi koşullarında aktive olan HIF-1, eritropoetin [263], VEGF [264], glikolitik enzimler [265], glikoz taşıyıcılar [266] ve Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1(PAI-1) [267] kodlayan genlerin trankripsiyonunu indükler. HIF-1'nin oksijen ile düzenlenme mekanizması oldukça iyi bilinmektedir [268]. Ancak hipoksi ile aktivasyonun yanısıra, normoksik koşullarda dahi çeşitli uyaranlar aracılığıyla HIF'in aktive olabileceği gösterilmiştir. Örneğin TGF-β1 [269], Anjiyotensin-II [270], Sitrik asit döngüsü metabolitleri [271], ROS [272] ve PKC'nin [273] HIF-1α'yı aktive edebileceği bildirilmiştir. Bunun yanısıra 2010 yılında yapılan bir çalışmada normoksi ortamda ve hiperglisemik koşullarda, böbrek mezengial hücre kültüründe HIF-1α ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir [274]. Bizim çalışmamızda da hiperglisemik koşullarda HIF-1α mRNA'sında artış görülmesi verilen literatür bilgileri ile uyumlu görünmektedir. Bununla birlikte Rapamisin inhibisyonunun ardından HIF-1α mRNA'sında azalma olması, mTOR yolağı aracılı HIF aktivasyonunu işaret etmektedir. Bu sonuçlar diyabetik koşullarda anjiyogenez mekanizmalarında görülen değişikliklerin

mTOR yolağı üzerinden HIF-1α aracılı olarak gerçekleşiyor olma ihtimalini güçlendirmektedir.

Bunların yanısıra yapılan Matrigel analizi ve yara iyileşme analizi sonuçlarına göre hiperglisemik koşullar, yalnızca anjiyogenik faktör ekspresyonunu değil aynı zamanda hücrelerin migrasyon kapasitesini ve damar tüpü oluşturma kapasitesini de etkilemektedir. Hiperglisemik koşullarda artan migrasyon kapasitesinin ve damar tüpü oluşturma kapasitesinin inhibitör uygulamasına yanıt olarak azalması, mTOR yolağının etkisini teyit etmektedir.

Diyabetik gebelikler hem anne hem de fetüs için risk taşımaktadır. Diyabetik anneden doğan bebeklerin, yetişkin yaşamlarında obezite ve diyabete yatkınlık riskleri yüksektir. Bununla birlikte diyabetik gebelikler, konjenital malformasyon, fetal makrozomi, sıkıntılı solunum sendromu nedeniyle prematüre doğum, yenidoğanda sarılık, hipoglisemi ve polisistemi görülmesi ile karakterizedir. Kontrol edilmeyen diyabetik gebelikler spontan düşüklere neden olmaktadır. Diyabetik malformasyonlara genetik ve çevresel faktörler neden olmaktadır. Çevresel faktörlerin başında henüz açıklanamayan bir mekanizmayla glikoz yer almaktadır [5, 275, 276].

Feto-plasental damarların sağlıklı gelişimi, fetal gelişim için oldukça önemlidir. Üstelik feto-plasental vaskülatür fetal dolaşım ile devam etmektedir ve maternal dolaşımda ve plasentada meydana gelecek herhangi bir değişim, fetüsün vasküler fonksiyonuna yansıyabilir. Damarların gelişimi ve fonksiyonu diyabetik mikroçevreden doğrudan etkilenmektedir. T1DM hastalarda plasentada fetoplasental damarlarda anjiyogenezin arttığı gözlenmiştir [216, 219, 223, 277]. Ayrıca, Leach ve ark. VEGF-A ekspresyonunun T1DM plasentada arttığını ifade etmiştir. Diyabetik plasentalarda term, intermediat ve kök villuslarda hem endotel hem de trofoblast hücrelerinde VEGF ekspresyonuna rastlanırken, kontrol plasentalarda sadece term villuslarda boyanma gözlenmiştir [6]. 2010 yılında yapılan bir diğer çalışmada diyabetik gebeliklerde plasentada vasküler ve trofoblastik hücrelerdeki VEGF, VEGFR1 ve VEGFR2 ekspresyonlarında değişiklikler gözlenmiştir [18] ancak bu etkinin mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Yapılan bu çalışmada diyabetik hastalar OGTT sonuçlarına dayanarak diyabetin şiddetine göre gruplandırılmış ve her bir gruptaki plasental anjiyogenez ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Orta şiddette hiperglisemi olan grupta plasental VEGF ve VEGFR2 eskpresyonu artmıştır. Ancak T1DM ve T2DM hastalarının dahil olduğu şiddetli hiperglisemi grubunda VEGF ve Reseptörlerinin ekspresyonu normoglisemik grup ile benzer düzeyde gözlenmiştir. Ancak bu değişikliklerin etki mekanizması araştırılmamıştır. Bizim çalışmamızda diyabetik gebeliklerde gözlenen plasental vasküler değişimlere mTOR yolağının aracılık edebileceği hipotez edilmiş ve bu yönde sonuçlar ortaya konmuştur.

Daha önce yapılan çalışmalarda embriyonik gelişim için mTOR yolağının önemli olduğu bildirilmiştir [278]. Bir diğer çalışmada da heterozigot mTOR mutant embriyoların normal ve fertil olduğu ancak homozigot mutant embriyoların ise implantasyondan kısa süre sonra öldüğü bildirilmiştir. Bunun nedeninin ise embriyonik ve ekstraembriyonik kompartmanlardaki yetersiz hücre proliferasyonu olduğu ileri

sürülmüştür. Bu verilere dayanarak fare embriyonik gelişimi için mTOR yolağının önemli olduğu ifade edilmiştir [148].

Bunun yanısıra 2005 yılında yapılan bir diğer çalışmada plasental gelişimde önemli olan besin ve mitojenik faktörlerin hücre içinde etkili olduğu sinyal iletim yolakları sorgulanmıştır. Anjiyopoetin 2 ve glikozun trofoblast proliferasyonu üzerine olan etkisi incelenmiştir. Hücre proliferasyonunun Tie-2 reseptör aktivasyonunun ardından PI3K-mTOR sinyal iletimi aracılığıyla indüklendiği tespit edilmiştir. Glikoz da benzer şekilde mTOR aracılı olarak trofoblast proliferasyonunu tetiklemiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre Anjiyopoetin aktivasyonunun PI3K bağımlı mTOR aracılı olduğu ancak glikoz etkisinin PI3K bağımsız mTOR aracılı gerçekleştiği tespit edilmiştir [17].

mTOR'un plasentada özellikle sinsisyotrofoblastta eksprese olduğu bildirilmiştir [14] ve 2009 yılında yayınlanan bir çalışmada mTOR inhibisyonu ile plasental amino asit taşıyıcı sistemlerden sistem L, sistem A ve taurin transport aktivitesinin azaldığını ortaya konulmuştur [16]. Aynı ekibin yaptığı bir diğer çalışmada mTOR yolağında üst basamaklarda yer alan moleküller sorgulanarak hücre dışındaki hangi faktörlerin mTOR'u etkileyebileceği araştırılmıştır ve glikoz eksikliğinde (hipoglisemik koşullarda (0.5 mM Glikoz)) trofoblast hücrelerinde mTOR hedef proteinlerinden biri olan S6K1'in fosforilasyonunun azaldığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte doz bağımlı olarak amino asit taşıyıcı sistemlerden sistem L aktivitesi de azalmıştır. [15].

Yapılan çalışmalarla ortaya konduğu üzere mTOR plasentada mevcut ve fonksiyoneldir. Ancak mTOR'un plasental anjiyogenez mekanizmaları üzerindeki etkisi henüz aydınlatılmamıştır. Aynı zamanda diyabetik gebeliklerde mTOR aktivitesinin nasıl değiştiği de bilinmemektedir. Bu çalışma ile birlikte ilk kez, gebelik öncesi diyabet hastası olan (T1DM yada T2DM) hastaların term plasentalarında mTOR sinyal iletim yolağı proteinleri ve bunlarla ilişkili olabileceği düşünülen anjiyogenez ilişkili proteinler araştırılmıştır. Hastalar HbA1c düzeyleri dikkate alınarak HbA1c düzeyleri 5.7 ve üzeri olanlar diyabetik olarak kabul edilmiştir ve değerlendirmeye alınmıştır. Bununla birlikte bu çalışma ile birlikte ilk kez bebeğin cinsiyetine bağlı olarak plasentalar kız ve erkek olarak ayrılmak suretiyle değerlendirmeye tabi tutulmuştur.

Günümüzde yapılan çalışmalarda hastalıklara yatkınlığın cinsiyet temelli olarak araştırılması giderek daha yoğun ilgi görmektedir. Yetişkinlikte gözlenen pekçok hastalığın temelinin uterusda atıldığı ve fetal cinsiyetin, uterusda gelişimi etkilediği ifade edilmektedir. Örneğin erkek fetüslerin, peri ve post-natal mortaliteye yakalanma risklerinin dişilere göre daha yüksek olduğu ve erkek fetüslerin genellikle dişi fetüslerden daha büyük olduğu gözlenmiştir [279-282]. Ayrıca erkek fetüslerin gebelik hastalıklarına daha kötü yanıt verdikleri [283, 284] ve hipertansiyon, diyabet ve metabolik sendrom görülme risklerinin daha yüksek olduğu ifade edilmektedir [285, 286].

Murphy ve arkadaşları, uygun olmayan maternal çevreye karşı erkek fetüslerin maksimal fetal büyümeyi sağlayacak şekilde plasental yanıt oluşturduklarını ve buna göre plasenta fonksiyonlarını düzenlediklerini ancak dişi fetüslerin olumsuz koşullardan

daha az etkilenmek amacıyla büyümeyi azalttıklarını öne sürmüşlerdir [287]. Erkek ve dişi fetüslerin uterusda kazandıkları adaptasyonları, doğum sonrası ilk 48 saat içinde gözlenen yenidoğan adaptasyonları olarak devam etmektedir. Özellikle erken doğumlarda, dişi yenidoğanların erkek yenidoğanlara oranla gebelik sonrası hayata daha iyi adapte olabildikleri belirtilmiştir [288].

Bizim çalışmamızın sonuçlarına göre, kız bebek dünyaya gelen gebeliklerden elde edilen diyabetik plasenta ağırlıklarının, kontrole kıyasla daha düşük olduğu gözlenmiştir. Buna karşın istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmasa da erkek bebeklere ait diyabetik plasenta ağırlığının kontrole kıyasla artma eğiliminde olduğu gözlenmiştir. Dolayısıyla fetal cinsiyetin plasental gelişimde farklılıklara neden olabileceği söylenebilir. Bununla birlikte plasental ağırlıklar ile korele olarak, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da fetal ağırlıklarda kız bebeklerde azalma, erkek bebeklerde ise artma olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlara ve yukarıda belirtilen literatüre göre diyabetik gebeliklerde, cinsiyete göre plasental ve fetal gelişimde farklılıklar olabileceği öne sürülebilir.

2013 yılında yayınlanan bir çalışmada insan term plasentasında villöz damar endotel ve trofoblast epitel hücrelerinde cinsiyete dayalı değişimlerin görüldüğü tespit edilmiştir. Yapılan kapsamlı gen analizi sonuçlarında villöz endotelde cinsiyete bağlı olarak ekspresyonlarında farklılık olduğu ifade genlerden bazılarının mTOR yolağı ilişkili genler olduğu tespit edilmiştir [289]. Bu bilgilere dayanarak bizim çalışmamız sonucunda diyabetik gebeliklerde bebeğin cinsiyetine bağlı olarak plasental ve dolayısıyla fetal gelişimin farklılık gösterebileceği ve bu değişimde mTOR sinyal iletim yolağının rol oynadığı öne sürülebilir.

Sonuçlarımıza göre kız bebeklere ait plasentalarda mTOR ve hedef proteini 4EBP1 fosforilasyonunun anlamlı bir şekilde azaldığı, buna karşın erkek plasentalarda anlamlı bir değişim olmadığı gözlenmiştir. Bununla birlikte VEGF ve VEGFR2 ekspresyonunun yine kız plasentalarda anlamlı bir şekilde azaldığı ancak, erkek plasentalardaki değişimin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. Diyabetik plasentalarda gözlenen mTOR yolağındaki değişimler ile VEGF ve VEGFR2 ekspresyonlarındaki değişimlerin korele olmasına ve *in vitro* kültür sonuçlarına dayanarak, diyabetik mikroçevrenin mTOR yolağı aracılığıyla plasental anjiyogenezi düzenlediği öne sürülebilir.

Diyabetik plasentalarda VEGFR1 ekspresyonunda değişim gözlenmezken VEGF ve VEGFR2 ekspresyonlarında farklılıkların ortaya çıkması, VEGFR1'in pek çok yayında sahte reseptör olarak ifade edilmesi ile uyumludur [76]. Ayrıca çözünür formdaki (soluble) VEGFR1'in VEGF etkisini nötralize ettiği [189] ve hücre içi anjiyogenik etkilerin VEGF/VEGFR2 etkileşimi sonucu ortaya çıktığı bilinmektedir [290]. Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre diyabetik koşullarda VEGF ve VEGFR2 ekspresyonlarında benzer değişimlerin olduğu gözlenmiştir. Dolayısıyla ortaya çıkan anjiyogenik yanıtta VEGF/VEGFR1 etkileşiminden ziyade VEGF/VEGFR2 etkileşiminin önemli rol oynadığı söylenebilir.

İn vitro deneylerimiz sonucu hiperglisemik koşullarda artan mTOR aktivasyonu ve buna bağlı olarak artan anjiyogenik aktivite tespit etmemize rağmen, diyabetik

plasentalardan elde ettiğimiz bulgularımız *in vitro* sonuçlar ile korelasyon göstermemektedir. Ancak bu durum şaşırtıcı bir sonuç değildir. Çünkü kültür koşullarında sadece endotel hücreleri (HUVEC) hiperglisemik koşullarda inkübe edilmiştir. Oysa plasental doku lizatlarında sadece endotel hücreleri değil, trofoblastlar ve mezenkimal stromal hücreler gibi farklı hücre tiplerinden kaynaklanabilecek farklı ekspresyonlar analizlerin sonuçlarına yansımış olabilir. Ayrıca hücre kültüründe sadece 24 saat hiperglisemik koşullarda inkübasyon gerçekleşmişken, diyabetik plasentalar gebeliğin başından itibaren hiperglisemik mikroçevreye maruz kalmaktadır.

Hiperglisemiye maruziyet süresinin anjiyogenez mekanizmaları üzerinde farklı etkileri olduğu ifade edilmiştir. Hiperglisemik koşullar, orta şiddette iskemi ve hipoksiye neden olarak hiperkapillarizasyonu tetiklemektedir. Ancak uzun süreli kan glikoz düzeyi yüksekliği daha ciddi boyutlarda hipoksiye neden olmaktadır ve VEGF/VEGFR-2 etkileşimini inhibe ederek ve hiperkapillarizasyonu baskılamaktadır [18, 291, 292]. Dolayısıyla hücresel farklılıklar ve bununla birlikte heterojen bir mikroçevrenin olması ve hiperglisemiye maruziyet süresinin farklı olması bulgularımızın birbiri ile örtüşmemesinin ama literatür verileri ile uyumlu olmasının temel nedeni olabilir.

İnsanlarda diyabetik gebeliklerde çeşitli plasental patolojiler ortaya çıkmaktadır. Bunlardan biri vasküler homeostazın bozulmasıdır. Bu çalışma ile birlikte diyabette bozulan plasental vasküler homeostazda mTOR yolağının rol oynayabileceği ve cinsiyete bağlı olarak farklılıkların gözlenebileceği ilk kez ortaya konmuştur. Rapamisin ve türevleri kullanılarak mTOR yolağının inhibisyonu klinikte immünsupresif ya da kemoterapotik bir tedavi şekli olarak kullanılıyor olsa da, gebelikte mTOR yolağının düzenlenmesine yönelik bir tedavi şekli önerebilmek için bu çalışma yetersizdir. Bunun için daha detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır. Yetişkin yaşamda gözlenen hastalıkların temelinin prenatal dönemde atıldığı ve plasental disfonksiyonun da ikincil sebep olduğu günümüzde kabul gören bir yaklaşımdır ve "Sağlık ve Hastalık Koşullarının Gelişimsel Orjinleri" (Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD)) olarak adlandırılır. Bu yaklaşım göz önüne alındığında, sağlıklı fetal gelişimin sağlanabilmesi için plasenta odaklı çalışmaların önemini korumaya devam edeceği ifade edilebilir.

SONUÇLAR

Bu tezde hiperglisemik koşullarda ve diyabetik plasentalarda anjiyogenik süreçlerde mTOR sinyal iletim yolağının olası rolleri araştırılmış ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

1. Hiperglisemik koşullarda VEGF ekspresyonu mRNA düzeyinde artmıştır. Protein düzeyinde ise çözünür formda VEGF ekspresyonunda artış gözlenmiştir. VEGFR2 hem mRNA hem de protein düzeyinde artış göstermiştir. VEGFR1 sadece mRNA düzeyinde artmıştır.

2. mTORC1'in hedef proteinlerinden biri olan 4EBP1'in hiperglisemik koşullarda fosforilasyonu artmıştır. Akt fosforilasyonu azalmış, p70S6K fosforilasyonu ise değişmemiştir.

3. HIF1-α ekspresyonu mRNA düzeyinde artmıştır.

4. Rapamisin ve PP242 inhibisyonu ile sırasıyla p70S6K ve Akt fosforilasyonlarında azalma olduğu gözlenmiş, dolayısıyla mTOR sinyal iletim yolağının baskılandığı teyit edilmiştir.

5. Hiperglisemik koşullarda artan 4EBP1 ve VEGFR2 ekspresyonu, inhibitör uygulamasının ardından azalmıştır.

6. Matrijel ve yara iyileşme analizi sonuçlarına göre hiperglisemik koşullarda endotel hücre migrasyonunun ve damar tüpü oluşturma kapasitesinin arttığı, mTOR yolağı inhibisyonu ile bu artışın baskılandığı gözlenmiştir.

7. Diyabetik gebeliklerde bebeğin cinsiyetine bağlı olarak plasental ağırlıkta ve mTOR yolağı proteinleri ile anjiyogenez ilişkili proteinlerde farklılıklar olduğu ortaya konmuştur. Kız bebeklere ait diyabetik plasentalarda ağırlık kontrole kıyasla azalmıştır. Diyabetik kız plasentalarda mTOR, 4EBP1, VEGF ve VEGFR2 ekspresyonunda azalma olduğu, erkek plasentalarda anlamlı bir değişim olmadığı gözlenmiştir.

8. Bu çalışma hiperglisemik koşullarda ve diyabetik plasentalarda mTOR sinyal iletim yolağının anjiyogenez mekanizmalarında rolü olabileceğini ortaya koyan ve cinsiyete bağlı olarak plasental anjiyogenez mekanizmalarında farklılıkların olabileceğini öne süren ilk çalışmadır.

KAYNAKLAR

1. Page, N.M., et al., Placental peptides as markers of gestational disease. Reproduction, 2002. **123**(4): p. 487-95.

2. Myatt, L., Placental adaptive responses and fetal programming. J Physiol, 2006. **572**(Pt 1): p. 25-30.

3. Benirschke Kurt , K.P., Baergen Rebecca, Pathology of the Human Placenta, 2006, Springer: New York.

4. Forbes, K. and M. Westwood, The IGF axis and placental function. a mini review. Horm Res, 2008. **69**(3): p. 129-37.

5. Scobie, I.N., Diabetes and Pregnancy, in Atlas of DIABETES MELLITUS2007, Informa UK Ltd: Abingdon, OXON. p. 111-114.

6. Leach, L., A. Taylor, and F. Sciota, Vascular dysfunction in the diabetic placenta: causes and consequences. J Anat, 2009. **215**(1): p. 69-76.

7. Tonini, T., F. Rossi, and P.P. Claudio, Molecular basis of angiogenesis and cancer. Oncogene, 2003. **22**(42): p. 6549-56.

8. Dormond, O., J.C. Madsen, and D.M. Briscoe, The effects of mTOR-Akt interactions on anti-apoptotic signaling in vascular endothelial cells. J Biol Chem, 2007. **282**(32): p. 23679-86.

9. Guba, M., et al., Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. Nat Med, 2002. **8**(2): p. 128-35.

10. Jacot, J.L. and D. Sherris, Potential Therapeutic Roles for Inhibition of the PI3K/Akt/mTOR Pathway in the Pathophysiology of Diabetic Retinopathy. J Ophthalmol, 2011. **2011**: p. 589813.

11. Karar, J. and A. Maity, PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. Front Mol Neurosci, 2011. **4**: p. 51.

12. Phung, T.L., et al., Pathological angiogenesis is induced by sustained Akt signaling and inhibited by rapamycin. Cancer Cell, 2006. **10**(2): p. 159-70.

13. Wouters, B.G. and M. Koritzinsky, Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(11): p. 851-64.

14. Roos, S., et al., Mammalian target of rapamycin in the human placenta regulates leucine transport and is down-regulated in restricted fetal growth. J Physiol, 2007. **582**(Pt 1): p. 449-59.

15. Roos, S., et al., Regulation of placental amino acid transporter activity by mammalian target of rapamycin. Am J Physiol Cell Physiol, 2009. **296**(1): p. C142-50.
16. Roos, S., et al., Regulation of amino acid transporters by glucose and growth factors in cultured primary human trophoblast cells is mediated by mTOR signaling. Am J Physiol Cell Physiol, 2009. **297**(3): p. C723-31.
17. Wen, H.Y., et al., mTOR: a placental growth signaling sensor. Placenta, 2005. **26 Suppl A**: p. S63-9.
18. Pietro, L., et al., Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-receptor expression in placenta of hyperglycemic pregnant women. Placenta, 2010. **31**(9): p. 770-80.
19. Maltepe, E., A.I. Bakardjiev, and S.J. Fisher, The placenta: transcriptional, epigenetic, and physiological integration during development. J Clin Invest, 2010. **120**(4): p. 1016-25.
20. Huppertz, B., The anatomy of the normal placenta. J Clin Pathol, 2008. **61**(12): p. 1296-302.
21. Genbacev, O., et al., Regulation of human placental development by oxygen tension. Science, 1997. **277**(5332): p. 1669-72.
22. Moser, G., et al., Endoglandular trophoblast, an alternative route of trophoblast invasion? Analysis with novel confrontation co-culture models. Hum Reprod, 2010. **25**(5): p. 1127-36.
23. Kingdom, J., et al., Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2000. **92**(1): p. 35-43.
24. Risau, W., Mechanisms of angiogenesis. Nature, 1997. **386**(6626): p. 671-4.
25. Demir, R., et al., Fetal vasculogenesis and angiogenesis in human placental villi. Acta Anat (Basel), 1989. **136**(3): p. 190-203.
26. Bushway, M.E., et al., Morphological and Phenotypic Analyses of the Human Placenta Using Whole Mount Immunofluorescence. Biology of Reproduction, 2014. **90**(5).
27. Benirschke K. Implantation, p.d., uteroplacental blood flow. in Reid DE, Ryan KJ, Benirschke K: Principles and Manegement of Human Reproduction. Philadelphia, WB Saunders, 1992.
28. De Wolf, F., et al., The human placental bed: electron microscopic study of trophoblastic invasion of spiral arteries. Am J Obstet Gynecol, 1980. **137**(1): p. 58-70.
29. Kaufmann P., C.M.O.a.G.P.V., 4th edition, New York, Churchill Livingstone, 1995

30. Baergen, R.N., Manual of Benirschke and Kaufmann's Pathology of the Human Placenta, 2005, Springer: New York.
31. Cunningham F., G., Mac Donald P., C., Gant N., F., The placenta and fetal membranes. Chapter 5. in: Williams Obstetrics:1994.
32. Kingdom, J.C. and P. Kaufmann, Oxygen and placental vascular development. Adv Exp Med Biol, 1999. **474**: p. 259-75.
33. Mayhew, T.M. and R.A. Simpson, Quantitative evidence for the spatial dispersal of trophoblast nuclei in human placental villi during gestation. Placenta, 1994. **15**(8): p. 837-44.
34. http://www.embryology.ch/anglais/fplacenta/villosite05.html.
35. Burton, G.J. and E. Jauniaux, Sonographic, stereological and Doppler flow velocimetric assessments of placental maturity. Br J Obstet Gynaecol, 1995. **102**(10): p. 818-25.
36. Dempsey, E.W., The development of capillaries in the villi of early human placentas. Am J Anat, 1972. **134**(2): p. 221-37.
37. Tertemiz, F., et al., Apoptosis contributes to vascular lumen formation and vascular branching in human placental vasculogenesis. Biol Reprod, 2005. **72**(3): p. 727-35.
38. Zhang, E.G., et al., Placental vessel adaptation during gestation and to high altitude: changes in diameter and perivascular cell coverage. Placenta, 2002. **23**(10): p. 751-62.
39. Heinrich, D., et al., Ultrastructure of perfusion-fixed fetal capillaries in the human placenta. Cell Tissue Res, 1976. **172**(2): p. 157-69.
40. Jones, C.J. and H. Fox, Ultrastructure of the normal human placenta. Electron Microsc Rev, 1991. **4**(1): p. 129-78.
41. Leach, L., The phenotype of the human materno-fetal endothelial barrier: molecular occupancy of paracellular junctions dictate permeability and angiogenic plasticity. J Anat, 2002. **200**(6): p. 599-606.
42. Jauniaux, E., et al., Development of the early human placenta: a morphometric study. Placenta, 1991. **12**(3): p. 269-76.
43. Mayhew, T.M., Fetoplacental angiogenesis during gestation is biphasic, longitudinal and occurs by proliferation and remodelling of vascular endothelial cells. Placenta, 2002. **23**(10): p. 742-50.
44. Kaufmann, P., et al., The fetal vascularisation of term human placental villi. II. Intermediate and terminal villi. Anat Embryol (Berl), 1985. **173**(2): p. 203-14.
45. Kaufmann, P., T.M. Mayhew, and D.S. Charnock-Jones, Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy. Placenta, 2004. **25**(2-3): p. 114-26.

46. Jirkovska, M., et al., Three-dimensional arrangement of the capillary bed and its relationship to microrheology in the terminal villi of normal term placenta. Placenta, 2008. **29**(10): p. 892-7.
47. Kaufmann, P., Basic morphology of the fetal and maternal circuits in the human placenta. Contrib Gynecol Obstet, 1985. **13**: p. 5-17.
48. Chen, D.B. and J. Zheng, Regulation of placental angiogenesis. Microcirculation, 2014. **21**(1): p. 15-25.
49. Poole, T.J., E.B. Finkelstein, and C.M. Cox, The role of FGF and VEGF in angioblast induction and migration during vascular development. Dev Dyn, 2001. **220**(1): p. 1-17.
50. Levine, R.J., et al., Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. N Engl J Med, 2004. **350**(7): p. 672-83.
51. Holmes, K., et al., Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. Cell Signal, 2007. **19**(10): p. 2003-12.
52. Vincenti, V., et al., Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. Circulation, 1996. **93**(8): p. 1493-5.
53. Robinson, C.J. and S.E. Stringer, The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 5): p. 853-65.
54. Tischer, E., et al., The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. J Biol Chem, 1991. **266**(18): p. 11947-54.
55. Houck, K.A., et al., The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. Mol Endocrinol, 1991. **5**(12): p. 1806-14.
56. Dvorak, H.F., et al., Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. Curr Top Microbiol Immunol, 1999. **237**: p. 97-132.
57. Ferrara, N., Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. Curr Top Microbiol Immunol, 1999. **237**: p. 1-30.
58. Conn, G., et al., Amino acid and cDNA sequences of a vascular endothelial cell mitogen that is homologous to platelet-derived growth factor. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(7): p. 2628-32.
59. Keck, P.J., et al., Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. Science, 1989. **246**(4935): p. 1309-12.
60. Leung, D.W., et al., Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. Science, 1989. **246**(4935): p. 1306-9.

61. Ferrara, N. and W.J. Henzel, Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun, 1989. **161**(2): p. 851-8.
62. Carmeliet, P., VEGF gene therapy: stimulating angiogenesis or angioma-genesis? Nat Med, 2000. **6**(10): p. 1102-3.
63. Carmeliet, P., et al., Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. Nature, 1996. **380**(6573): p. 435-9.
64. Ferrara, N., et al., Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. Nature, 1996. **380**(6573): p. 439-42.
65. Clark, D.E., et al., Localization of VEGF and expression of its receptors flt and KDR in human placenta throughout pregnancy. Hum Reprod, 1996. **11**(5): p. 1090-8.
66. Tsoi, S.C., et al., Co-expression of vascular endothelial growth factor and neuropilin-1 in ovine feto-placental artery endothelial cells. Mol Cell Endocrinol, 2002. **196**(1-2): p. 95-106.
67. Charnock-Jones, D.S., P. Kaufmann, and T.M. Mayhew, Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation. Placenta, 2004. **25**(2-3): p. 103-13.
68. Zygmunt, M., et al., Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2003. **110 Suppl 1**: p. S10-8.
69. Soker, S., et al., Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. Cell, 1998. **92**(6): p. 735-45.
70. Shibuya, M., et al., Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. Oncogene, 1990. **5**(4): p. 519-24.
71. Ferrara, N., Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. Endocr Rev, 2004. **25**(4): p. 581-611.
72. Ferrara, N. and T. Davis-Smyth, The biology of vascular endothelial growth factor. Endocr Rev, 1997. **18**(1): p. 4-25.
73. Quinn, T.P., et al., Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(16): p. 7533-7.
74. Sawano, A., et al., Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. Blood, 2001. **97**(3): p. 785-91.
75. Vieira, J.M., C. Ruhrberg, and Q. Schwarz, VEGF receptor signaling in vertebrate development. Organogenesis, 2010. **6**(2): p. 97-106.

76. Shibuya, M., Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. J Biochem Mol Biol, 2006. **39**(5): p. 469-78.
77. Fong, G.H., et al., Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. Nature, 1995. **376**(6535): p. 66-70.
78. Fong, G.H., et al., Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. Development, 1999. **126**(13): p. 3015-25.
79. Gerber, H.P., et al., VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. Nature, 2002. **417**(6892): p. 954-8.
80. Hattori, K., et al., Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. Nat Med, 2002. **8**(8): p. 841-9.
81. Barleon, B., et al., Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. Blood, 1996. **87**(8): p. 3336-43.
82. Clauss, M., et al., The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. J Biol Chem, 1996. **271**(30): p. 17629-34.
83. Katoh, O., et al., Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. Cancer Res, 1995. **55**(23): p. 5687-92.
84. Shalaby, F., et al., Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. Nature, 1995. **376**(6535): p. 62-6.
85. Cross, M.J., et al., VEGF-receptor signal transduction. Trends Biochem Sci, 2003. **28**(9): p. 488-94.
86. Shibuya, M. and L. Claesson-Welsh, Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. Exp Cell Res, 2006. **312**(5): p. 549-60.
87. Shibuya, M., Vascular endothelial growth factor (VEGF)-Receptor2: its biological functions, major signaling pathway, and specific ligand VEGF-E. Endothelium, 2006. **13**(2): p. 63-9.
88. Harper, S.J. and D.O. Bates, VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? Nat Rev Cancer, 2008. **8**(11): p. 880-7.
89. Burgering, B.M. and P.J. Coffer, Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. Nature, 1995. **376**(6541): p. 599-602.

90. Franke, T.F., et al., The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. Cell, 1995. **81**(5): p. 727-36.
91. Bellacosa, A., et al., A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. Science, 1991. **254**(5029): p. 274-7.
92. Brodbeck, D., P. Cron, and B.A. Hemmings, A human protein kinase Bgamma with regulatory phosphorylation sites in the activation loop and in the C-terminal hydrophobic domain. J Biol Chem, 1999. **274**(14): p. 9133-6.
93. Alessi, D.R., et al., 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the Drosophila DSTPK61 kinase. Curr Biol, 1997. **7**(10): p. 776-89.
94. Sarbassov, D.D., et al., Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. Science, 2005. **307**(5712): p. 1098-101.
95. Brazil, D.P., Z.Z. Yang, and B.A. Hemmings, Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. Trends Biochem Sci, 2004. **29**(5): p. 233-42.
96. Dummler, B. and B.A. Hemmings, Physiological roles of PKB/Akt isoforms in development and disease. Biochem Soc Trans, 2007. **35**(Pt 2): p. 231-5.
97. Whiteman, E.L., H. Cho, and M.J. Birnbaum, Role of Akt/protein kinase B in metabolism. Trends Endocrinol Metab, 2002. **13**(10): p. 444-51.
98. Woodgett, J.R., Recent advances in the protein kinase B signaling pathway. Curr Opin Cell Biol, 2005. **17**(2): p. 150-7.
99. Wang, X. and C.G. Proud, The mTOR pathway in the control of protein synthesis. Physiology (Bethesda), 2006. **21**: p. 362-9.
100. Sengupta, S., T.R. Peterson, and D.M. Sabatini, Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. Mol Cell, 2010. **40**(2): p. 310-22.
101. Yang, H., et al., mTOR kinase structure, mechanism and regulation. Nature, 2013. **497**(7448): p. 217-23.
102. Yang, Q. and K.L. Guan, Expanding mTOR signaling. Cell Res, 2007. **17**(8): p. 666-81.
103. Hara, K., et al., Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. Cell, 2002. **110**(2): p. 177-89.
104. Kim, D.H., et al., mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. Cell, 2002. **110**(2): p. 163-75.
105. Sarbassov, D.D., et al., Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. Curr Biol, 2004. **14**(14): p. 1296-302.

106. Benirschke, K., Kaufmann, P., Baergen, R. N. Pathology of The Human placenta. Fifth edition, 2006, New York: Springer.
107. Zoncu, R., A. Efeyan, and D.M. Sabatini, mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(1): p. 21-35.
108. Cargnello, M., J. Tcherkezian, and P.P. Roux, The expanding role of mTOR in cancer cell growth and proliferation. Mutagenesis, 2015. **30**(2): p. 169-76.
109. Ma, X.M. and J. Blenis, Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(5): p. 307-18.
110. Kamada, Y., et al., Tor2 directly phosphorylates the AGC kinase Ypk2 to regulate actin polarization. Mol Cell Biol, 2005. **25**(16): p. 7239-48.
111. Schmidt, A., et al., The yeast phosphatidylinositol kinase homolog TOR2 activates RHO1 and RHO2 via the exchange factor ROM2. Cell, 1997. **88**(4): p. 531-42.
112. Facchinetti, V., et al., The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C. EMBO J, 2008. **27**(14): p. 1932-43.
113. Garcia-Martinez, J.M. and D.R. Alessi, mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). Biochem J, 2008. **416**(3): p. 375-85.
114. Ikenoue, T., et al., Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling. EMBO J, 2008. **27**(14): p. 1919-31.
115. Sarbassov, D.D., S.M. Ali, and D.M. Sabatini, Growing roles for the mTOR pathway. Curr Opin Cell Biol, 2005. **17**(6): p. 596-603.
116. Jacinto, E., et al., Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. Nat Cell Biol, 2004. **6**(11): p. 1122-8.
117. Loewith, R., et al., Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. Mol Cell, 2002. **10**(3): p. 457-68.
118. Yip, C.K., et al., Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition. Mol Cell, 2010. **38**(5): p. 768-74.
119. O'Reilly, K.E., et al., mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. Cancer Res, 2006. **66**(3): p. 1500-8.
120. Carracedo, A., et al., Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. J Clin Invest, 2008. **118**(9): p. 3065-74.
121. Zhang, H., et al., PDGFRs are critical for PI3K/Akt activation and negatively regulated by mTOR. J Clin Invest, 2007. **117**(3): p. 730-8.

122. Thoreen, C.C., et al., An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. J Biol Chem, 2009. **284**(12): p. 8023-32.
123. Choo, A.Y., et al., Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(45): p. 17414-9.
124. Feldman, M.E., et al., Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. PLoS Biol, 2009. **7**(2): p. e38.
125. McMahon, L.P., et al., The rapamycin-binding domain governs substrate selectivity by the mammalian target of rapamycin. Mol Cell Biol, 2002. **22**(21): p. 7428-38.
126. Shor, B., et al., A new pharmacologic action of CCI-779 involves FKBP12-independent inhibition of mTOR kinase activity and profound repression of global protein synthesis. Cancer Res, 2008. **68**(8): p. 2934-43.
127. Sarbassov, D.D., et al., Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. Mol Cell, 2006. **22**(2): p. 159-68.
128. Chresta, C.M., et al., AZD8055 is a potent, selective, and orally bioavailable ATP-competitive mammalian target of rapamycin kinase inhibitor with in vitro and in vivo antitumor activity. Cancer Res, 2010. **70**(1): p. 288-98.
129. Garcia-Martinez, J.M., et al., Ku-0063794 is a specific inhibitor of the mammalian target of rapamycin (mTOR). Biochem J, 2009. **421**(1): p. 29-42.
130. Yu, K., et al., Biochemical, cellular, and in vivo activity of novel ATP-competitive and selective inhibitors of the mammalian target of rapamycin. Cancer Res, 2009. **69**(15): p. 6232-40.
131. Zhou, H., Y. Luo, and S. Huang, Updates of mTOR inhibitors. Anticancer Agents Med Chem, 2010. **10**(7): p. 571-81.
132. Janes, M.R., et al., Effective and selective targeting of leukemia cells using a TORC1/2 kinase inhibitor. Nat Med, 2010. **16**(2): p. 205-13.
133. Inoki, K., M.N. Corradetti, and K.L. Guan, Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease. Nat Genet, 2005. **37**(1): p. 19-24.
134. Fingar, D.C., et al., Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. Genes Dev, 2002. **16**(12): p. 1472-87.
135. Gingras, A.C., et al., 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. Genes Dev, 1998. **12**(4): p. 502-13.
136. Jiang, Y. and R.J. Muschel, Regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) by translational efficiency in murine prostate carcinoma cells. Cancer Res, 2002. **62**(6): p. 1910-4.

137. Jones, R.M., et al., An essential E box in the promoter of the gene encoding the mRNA cap-binding protein (eukaryotic initiation factor 4E) is a target for activation by c-myc. Mol Cell Biol, 1996. **16**(9): p. 4754-64.
138. Kevil, C.G., et al., Translational regulation of vascular permeability factor by eukaryotic initiation factor 4E: implications for tumor angiogenesis. Int J Cancer, 1996. **65**(6): p. 785-90.
139. Rosenwald, I.B., et al., Elevated levels of cyclin D1 protein in response to increased expression of eukaryotic initiation factor 4E. Mol Cell Biol, 1993. **13**(12): p. 7358-63.
140. Liao, Y.M., C. Kim, and Y. Yen, Mammalian target of rapamycin and head and neck squamous cell carcinoma. Head Neck Oncol, 2011. **3**: p. 22.
141. Zhong, H., et al., Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. Cancer Res, 2000. **60**(6): p. 1541-5.
142. Bohm, A., et al., Targeting of mTOR is associated with decreased growth and decreased VEGF expression in acute myeloid leukaemia cells. Eur J Clin Invest, 2009. **39**(5): p. 395-405.
143. Xue, Q., et al., Rapamycin inhibition of the Akt/mTOR pathway blocks select stages of VEGF-A164-driven angiogenesis, in part by blocking S6Kinase. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(8): p. 1172-8.
144. Miyazawa, M., et al., Granulosa cell tumor with activated mTOR-HIF-1alpha-VEGF pathway. J Obstet Gynaecol Res, 2010. **36**(2): p. 448-53.
145. Dada, S., N. Demartines, and O. Dormond, mTORC2 regulates PGE2-mediated endothelial cell survival and migration. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **372**(4): p. 875-9.
146. Moss, S.C., et al., Rapamycin regulates endothelial cell migration through regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1. J Biol Chem, 2010. **285**(16): p. 11991-7.
147. Gangloff, Y.G., et al., Disruption of the mouse mTOR gene leads to early postimplantation lethality and prohibits embryonic stem cell development. Mol Cell Biol, 2004. **24**(21): p. 9508-16.
148. Murakami, M., et al., mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells. Mol Cell Biol, 2004. **24**(15): p. 6710-8.
149. Martin, P.M. and A.E. Sutherland, Exogenous amino acids regulate trophectoderm differentiation in the mouse blastocyst through an mTOR-dependent pathway. Dev Biol, 2001. **240**(1): p. 182-93.

150. Yung, H.W., et al., Evidence of placental translation inhibition and endoplasmic reticulum stress in the etiology of human intrauterine growth restriction. Am J Pathol, 2008. **173**(2): p. 451-62.
151. Economides, D.L. and K.H. Nicolaides, Blood glucose and oxygen tension levels in small-for-gestational-age fetuses. Am J Obstet Gynecol, 1989. **160**(2): p. 385-9.
152. Lassarre, C., et al., Serum insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in the human fetus. Relationships with growth in normal subjects and in subjects with intrauterine growth retardation. Pediatr Res, 1991. **29**(3): p. 219-25.
153. Nieto-Diaz, A., et al., Intrauterine growth retardation at term: association between anthropometric and endocrine parameters. Acta Obstet Gynecol Scand, 1996. **75**(2): p. 127-31.
154. Mirlesse, V., et al., Placental growth hormone levels in normal pregnancy and in pregnancies with intrauterine growth retardation. Pediatr Res, 1993. **34**(4): p. 439-42.
155. Roos, S., T.L. Powell, and T. Jansson, Placental mTOR links maternal nutrient availability to fetal growth. Biochem Soc Trans, 2009. **37**(Pt 1): p. 295-8.
156. Association, A.D., (2) Classification and diagnosis of diabetes. Diabetes Care, 2015. **38 Suppl**: p. S8-S16.
157. Alemzadeh R, W.D.T., Diabetes Mellitus. 17th Edition. ed. Nelson Textbook of Pediatrics, ed. K.R.M. Behrman R.E, Jenson H.B2004., Pennsylvania: Elsevier Saunders.
158. Norris A.W., W.J.I., Diabetes Mellitus. 5th Edition ed. Clinical Pediatric Endocrinology, ed. C.P.E. Brook G.D.C, Brown RS, Savage M.O2005, Massachussetts: Blackwell Publishing Ltd.
159. Pickup JC., W.G., Textbook of diabetes. 2nd Edition ed. Vol. 1. 1997: Blackwell science DLD.
160. Gündoðdu S, A.O., Tip 2 diabetin evreleri ve takip kriterleri. Aktüel týp Dergisi, 1996. **8**: p. 557-559.
161. Isselbacher DL., B.E., Wilson JD, Martin JB et al. . Harrison's Principles of Internal Medicine. 13th Edition ed. Vol. 2. 1994: Mc Graw Hill.
162. BUYURAN, A., Tip II Diabetes Mellituslu Hastalarda Diabet Baslangýc Yasýnýn Komplikasyon Gelisme Süresine Etkisi, in Ok Meydaný Egitim ve Arastýrma Hastanesi2007: Istanbul. p. 46.
163. Coustan DR, C.M., The diagnosis of gestational diabetes mellitus. Diabetes Care, 1998. **21**: p. B5-8.
164. Cheung, N.W. and K. Byth, Population health significance of gestational diabetes. Diabetes Care, 2003. **26**(7): p. 2005-9.

165. Basha, B., et al., Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: possible involvement of endoplasmic reticulum stress? Exp Diabetes Res, 2012. **2012**: p. 481840.
166. Campos, C., Chronic hyperglycemia and glucose toxicity: pathology and clinical sequelae. Postgrad Med, 2012. **124**(6): p. 90-7.
167. Association, A.D., Standards of medical care in diabetes--2011. Diabetes Care, 2011. **34 Suppl 1**: p. S11-61.
168. Kawahito, S., H. Kitahata, and S. Oshita, Problems associated with glucose toxicity: role of hyperglycemia-induced oxidative stress. World J Gastroenterol, 2009. **15**(33): p. 4137-42.
169. Brownlee, M., The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. Diabetes, 2005. **54**(6): p. 1615-25.
170. Brownlee, M., A radical explanation for glucose-induced beta cell dysfunction. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1788-90.
171. Verkhratsky, A. and P. Fernyhough, Mitochondrial malfunction and Ca2+ dyshomeostasis drive neuronal pathology in diabetes. Cell Calcium, 2008. **44**(1): p. 112-22.
172. Brasacchio, D., et al., Hyperglycemia induces a dynamic cooperativity of histone methylase and demethylase enzymes associated with gene-activating epigenetic marks that coexist on the lysine tail. Diabetes, 2009. **58**(5): p. 1229-36.
173. Vlassara, H. and M.R. Palace, Diabetes and advanced glycation endproducts. J Intern Med, 2002. **251**(2): p. 87-101.
174. Schalkwijk, C.G. and C.D. Stehouwer, Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. Clin Sci (Lond), 2005. **109**(2): p. 143-59.
175. Grundy, S.M., et al., Prevention Conference VI: Diabetes and Cardiovascular Disease: executive summary: conference proceeding for healthcare professionals from a special writing group of the American Heart Association. Circulation, 2002. **105**(18): p. 2231-9.
176. Bakker, W., et al., Endothelial dysfunction and diabetes: roles of hyperglycemia, impaired insulin signaling and obesity. Cell Tissue Res, 2009. **335**(1): p. 165-89.
177. Jude, E.B., I. Eleftheriadou, and N. Tentolouris, Peripheral arterial disease in diabetes--a review. Diabet Med, 2010. **27**(1): p. 4-14.
178. Geraldes, P. and G.L. King, Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. Circ Res, 2010. **106**(8): p. 1319-31.
179. Miao, F., et al., In vivo chromatin remodeling events leading to inflammatory gene transcription under diabetic conditions. J Biol Chem, 2004. **279**(17): p. 18091-7.

180. El-Osta, A., et al., Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia. J Exp Med, 2008. **205**(10): p. 2409-17.
181. Tanaka, J., et al., Foxo1 links hyperglycemia to LDL oxidation and endothelial nitric oxide synthase dysfunction in vascular endothelial cells. Diabetes, 2009. **58**(10): p. 2344-54.
182. Ding, H. and C.R. Triggle, Endothelial dysfunction in diabetes: multiple targets for treatment. Pflugers Arch, 2010. **459**(6): p. 977-94.
183. Waltenberger, J., VEGF resistance as a molecular basis to explain the angiogenesis paradox in diabetes mellitus. Biochem Soc Trans, 2009. **37**(Pt 6): p. 1167-70.
184. Rishi, P. and P.S. Bhende, Images in clinical medicine. Proliferative diabetic retinopathy. N Engl J Med, 2009. **360**(9): p. 912.
185. Smith, S.K., Angiogenesis, vascular endothelial growth factor and the endometrium. Hum Reprod Update, 1998. **4**(5): p. 509-19.
186. Sasso, F.C., et al., Increased vascular endothelial growth factor expression but impaired vascular endothelial growth factor receptor signaling in the myocardium of type 2 diabetic patients with chronic coronary heart disease. J Am Coll Cardiol, 2005. **46**(5): p. 827-34.
187. Dehne, N., G. Hintereder, and B. Brune, High glucose concentrations attenuate hypoxia-inducible factor-1alpha expression and signaling in non-tumor cells. Exp Cell Res, 2010. **316**(7): p. 1179-89.
188. Lu, H., et al., Reversible inactivation of HIF-1 prolyl hydroxylases allows cell metabolism to control basal HIF-1. J Biol Chem, 2005. **280**(51): p. 41928-39.
189. Xu, L., et al., Diabetic angiopathy and angiogenic defects. Fibrogenesis Tissue Repair, 2012. **5**(1): p. 13.
190. Cvitic, S., G. Desoye, and U. Hiden, Glucose, insulin, and oxygen interplay in placental hypervascularisation in diabetes mellitus. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 145846.
191. Casey, B.M., et al., Pregnancy outcomes in women with gestational diabetes compared with the general obstetric population. Obstet Gynecol, 1997. **90**(6): p. 869-73.
192. Kuhl, C., Glucose metabolism during and after pregnancy in normal and gestational diabetic women. 1. Influence of normal pregnancy on serum glucose and insulin concentration during basal fasting conditions and after a challenge with glucose. Acta Endocrinol (Copenh), 1975. **79**(4): p. 709-19.
193. Persson, B. and U. Hanson, Neonatal morbidities in gestational diabetes mellitus. Diabetes Care, 1998. **21 Suppl 2**: p. B79-84.

194. Kc, K., S. Shakya, and H. Zhang, Gestational diabetes mellitus and macrosomia: a literature review. Ann Nutr Metab, 2015. **66 Suppl 2**: p. 14-20.
195. Hunter, D.J., et al., Influence of maternal insulin-dependent diabetes mellitus on neonatal morbidity. CMAJ, 1993. **149**(1): p. 47-52.
196. Buchanan, T.A., et al., Insulin sensitivity and B-cell responsiveness to glucose during late pregnancy in lean and moderately obese women with normal glucose tolerance or mild gestational diabetes. Am J Obstet Gynecol, 1990. **162**(4): p. 1008-14.
197. Catalano, P.M., et al., Carbohydrate metabolism during pregnancy in control subjects and women with gestational diabetes. Am J Physiol, 1993. **264**(1 Pt 1): p. E60-7.
198. Kuhl, C., Insulin secretion and insulin resistance in pregnancy and GDM. Implications for diagnosis and management. Diabetes, 1991. **40 Suppl 2**: p. 18-24.
199. Desoye, G.S., E., The Human Placenta in Diabetic Pregnancy. Diabetes Reviews, 1996. **4**(1): p. 70-89.
200. Thomsen, K. and G. Lieschke, [Findings on placenta morphology in diabetes mellitus]. Acta Endocrinol (Copenh), 1958. **29**(4): p. 602-14.
201. Burstein, R., et al., A comparative histo- and immunopathological study of the placenta in diabetes mellitus and in erythroblastosis fetalis. Am J Obstet Gynecol, 1963. **86**: p. 66-76.
202. Liebhart, M., [Connective tissue in placenta from pregnancies complicated by diabetes]. Ginekol Pol, 1968. **39**(12): p. 1353-62.
203. Jones, C.J. and H. Fox, Placental changes in gestational diabetes. An ultrastructural study. Obstet Gynecol, 1976. **48**(3): p. 274-80.
204. Iioka, H., et al., [Nonenzymatic glucosylation of human placental trophoblast basement membrane collagen (relation to diabetic placenta pathology)]. Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi, 1987. **39**(3): p. 400-4.
205. Laureti, E., A. De Galateo, and F. Giorgino, [The concentration of hydroxyproline, lipids and hexoses in normal and diabetic placentas in the 3d month of pregnancy]. Boll Soc Ital Biol Sper, 1982. **58**(11): p. 702-7.
206. Leushner, J.R., et al., Analysis of the collagens of diabetic placental villi. Cell Mol Biol, 1986. **32**(1): p. 27-35.
207. Teasdale, F., Histomorphometry of the placenta of the diabetic women: class A diabetes mellitus. Placenta, 1981. **2**(3): p. 241-51.
208. Bjork, O. and B. Persson, Villous structure in different parts of the cotyledon in placentas of insulin-dependent diabetic women. A morphometric study. Acta Obstet Gynecol Scand, 1984. **63**(1): p. 37-43.

209. Laurini, R.N., G.H. Visser, and E. van Ballegooie, Morphological fetoplacental abnormalities despite well-controlled diabetic pregnancy. Lancet, 1984. **1**(8380): p. 800.

210. Jones, C.J. and G. Desoye, Glycogen distribution in the capillaries of the placental villus in normal, overt and gestational diabetic pregnancy. Placenta, 1993. **14**(5): p. 505-17.

211. Yu, Y., et al., Influence of murine maternal diabetes on placental morphology, gene expression, and function. Arch Physiol Biochem, 2008. **114**(2): p. 99-110.

212. Baergen, R.N., Manual of Benirschke and Kaufmann's Pathology of the Human Placenta2005, New York: Springer.

213. Moshe Hod, L.J., Gian Carlo Di Renzo, Alberto de Leiva, Oded Langer, The Placenta in Diabetic Pregnancy, in Text Book of Diabetes and Pregnancy, S.H.-d.M. Gernot Desoye, Eleazar Shafrir, Editor 2003, Martin Dunitz Taylor&Francis Group: United Kingdom. p. 126-147.

214. Helske, S., et al., Expression of vascular endothelial growth factor receptors 1, 2 and 3 in placentas from normal and complicated pregnancies. Mol Hum Reprod, 2001. **7**(2): p. 205-10.

215. Leach, L., Placental vascular dysfunction in diabetic pregnancies: intimations of fetal cardiovascular disease? Microcirculation, 2011. **18**(4): p. 263-9.

216. Jauniaux, E. and G.J. Burton, Villous histomorphometry and placental bed biopsy investigation in Type I diabetic pregnancies. Placenta, 2006. **27**(4-5): p. 468-74.

217. Jirkovska, M., et al., Topological properties and spatial organization of villous capillaries in normal and diabetic placentas. J Vasc Res, 2002. **39**(3): p. 268-78.

218. Jirkovska, M., et al., The branching pattern of villous capillaries and structural changes of placental terminal villi in type 1 diabetes mellitus. Placenta, 2012. **33**(5): p. 343-51.

219. Mayhew, T.M., Enhanced fetoplacental angiogenesis in pre-gestational diabetes mellitus: the extra growth is exclusively longitudinal and not accompanied by microvascular remodelling. Diabetologia, 2002. **45**(10): p. 1434-9.

220. Nelson, S.M., et al., Placental structure in type 1 diabetes: relation to fetal insulin, leptin, and IGF-I. Diabetes, 2009. **58**(11): p. 2634-41.

221. Rizzo, G., et al., First trimester placental volume and three dimensional power doppler ultrasonography in type I diabetic pregnancies. Prenat Diagn, 2012. **32**(5): p. 480-4.

222. Gonzalez Gonzalez, N.L., et al., Effect of pregestational diabetes mellitus on first trimester placental characteristics: three-dimensional placental volume and power Doppler indices. Placenta, 2014. **35**(3): p. 147-51.

223. Leach, L., et al., Vascular endothelial cadherin and beta-catenin in human fetoplacental vessels of pregnancies complicated by Type 1 diabetes: associations with angiogenesis and perturbed barrier function. Diabetologia, 2004. **47**(4): p. 695-709.
224. Babawale, M.O., et al., Effects of gestational diabetes on junctional adhesion molecules in human term placental vasculature. Diabetologia, 2000. **43**(9): p. 1185-96.
225. Morrish, D.W., J. Dakour, and H. Li, Functional regulation of human trophoblast differentiation. J Reprod Immunol, 1998. **39**(1-2): p. 179-95.
226. Lowry, O.H., et al., Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
227. Madonna, R. and R. De Caterina, Cellular and molecular mechanisms of vascular injury in diabetes--part I: pathways of vascular disease in diabetes. Vascul Pharmacol, 2011. **54**(3-6): p. 68-74.
228. Ahmad, F.K., Z. He, and G.L. King, Molecular targets of diabetic cardiovascular complications. Curr Drug Targets, 2005. **6**(4): p. 487-94.
229. Vazzana, N., et al., Diabetes mellitus and thrombosis. Thromb Res, 2012. **129**(3): p. 371-7.
230. Wang, X.H., et al., Differential analyses of angiogenesis and expression of growth factors in micro- and macrovascular endothelial cells of type 2 diabetic rats. Life Sci, 2009. **84**(7-8): p. 240-9.
231. Boden, G., et al., Circulating tissue factor procoagulant activity and thrombin generation in patients with type 2 diabetes: effects of insulin and glucose. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(11): p. 4352-8.
232. Singh, V.P., et al., Intracellular angiotensin II production in diabetic rats is correlated with cardiomyocyte apoptosis, oxidative stress, and cardiac fibrosis. Diabetes, 2008. **57**(12): p. 3297-306.
233. Kario, K., et al., Activation of tissue factor-induced coagulation and endothelial cell dysfunction in non-insulin-dependent diabetic patients with microalbuminuria. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. **15**(8): p. 1114-20.
234. Kwaan, H.C., Changes in blood coagulation, platelet function, and plasminogen-plasmin system in diabetes. Diabetes, 1992. **41 Suppl 2**: p. 32-5.
235. Sweet, I.R., et al., Endothelial inflammation induced by excess glucose is associated with cytosolic glucose 6-phosphate but not increased mitochondrial respiration. Diabetologia, 2009. **52**(5): p. 921-31.
236. Yang, Z., et al., Acute hyperglycemia enhances oxidative stress and exacerbates myocardial infarction by activating nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase during reperfusion. J Thorac Cardiovasc Surg, 2009. **137**(3): p. 723-9.

237. Ejaz, S., et al., Importance of pericytes and mechanisms of pericyte loss during diabetes retinopathy. Diabetes Obes Metab, 2008. **10**(1): p. 53-63.
238. Ettelaie, C., et al., Tissue factor-containing microparticles released from mesangial cells in response to high glucose and AGE induce tube formation in microvascular cells. Microvasc Res, 2008. **76**(3): p. 152-60.
239. Chiarelli, F., et al., Increased circulating nitric oxide in young patients with type 1 diabetes and persistent microalbuminuria: relation to glomerular hyperfiltration. Diabetes, 2000. **49**(7): p. 1258-63.
240. Sung, S.H., et al., Blockade of vascular endothelial growth factor signaling ameliorates diabetic albuminuria in mice. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(11): p. 3093-104.
241. Smith, J.M. and D.H. Steel, Anti-vascular endothelial growth factor for prevention of postoperative vitreous cavity haemorrhage after vitrectomy for proliferative diabetic retinopathy. Cochrane Database Syst Rev, 2011(5): p. CD008214.
242. Di Marco, G.S., et al., Angiogenesis and diabetes: different responses to pro-angiogenic factors in the chorioallantoic membrane assay. Mol Med, 2008. **14**(11-12): p. 705-14.
243. Chou, E., et al., Decreased cardiac expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in insulin-resistant and diabetic States: a possible explanation for impaired collateral formation in cardiac tissue. Circulation, 2002. **105**(3): p. 373-9.
244. Madri, J.A., J. Enciso, and E. Pinter, Maternal diabetes: effects on embryonic vascular development--a vascular endothelial growth factor-A-mediated process. Pediatr Dev Pathol, 2003. **6**(4): p. 334-41.
245. Williams, B., A potential role for angiotensin II-induced vascular endothelial growth factor expression in the pathogenesis of diabetic nephropathy? Miner Electrolyte Metab, 1998. **24**(6): p. 400-5.
246. Simons, M., Angiogenesis, arteriogenesis, and diabetes: paradigm reassessed? J Am Coll Cardiol, 2005. **46**(5): p. 835-7.
247. Simons, M., Angiogenesis: where do we stand now? Circulation, 2005. **111**(12): p. 1556-66.
248. Varma, S., et al., Hyperglycemia alters PI3k and Akt signaling and leads to endothelial cell proliferative dysfunction. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **289**(4): p. H1744-51.
249. Yu, P., et al., [High D-glucose alters PI3K and Akt signaling and leads to endothelial cell migration, proliferation and angiogenesis dysfunction]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2006. **86**(48): p. 3425-30.

250. Franke, T.F., et al., Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. Science, 1997. **275**(5300): p. 665-8.
251. Jiang, B.H., et al., Phosphatidylinositol 3-kinase signaling mediates angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor in endothelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(4): p. 1749-53.
252. Liu, B., M. Bhat, and R.H. Nagaraj, AlphaB-crystallin inhibits glucose-induced apoptosis in vascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **321**(1): p. 254-8.
253. Dang, L., J.P. Seale, and X. Qu, Reduction of high glucose and phorbol-myristate-acetate-induced endothelial cell permeability by protein kinase C inhibitors LY379196 and hypocrellin A. Biochem Pharmacol, 2004. **67**(5): p. 855-64.
254. McGinn, S., et al., High glucose-mediated effects on endothelial cell proliferation occur via p38 MAP kinase. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. **285**(4): p. E708-17.
255. Sank, A., et al., Human endothelial cells are defective in diabetic vascular disease. J Surg Res, 1994. **57**(6): p. 647-53.
256. Panieri, E., et al., Nutrient withdrawal rescues growth factor-deprived cells from mTOR-dependent damage. Aging (Albany NY), 2010. **2**(8): p. 487-503.
257. Lopez, R., et al., Hyperglycemia enhances the proliferation of non-tumorigenic and malignant mammary epithelial cells through increased leptin/IGF1R signaling and activation of AKT/mTOR. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e79708.
258. Frost, P., et al., AKT activity regulates the ability of mTOR inhibitors to prevent angiogenesis and VEGF expression in multiple myeloma cells. Oncogene, 2007. **26**(16): p. 2255-62.
259. Chen, W., et al., Macrophage-induced tumor angiogenesis is regulated by the TSC2-mTOR pathway. Cancer Res, 2012. **72**(6): p. 1363-72.
260. Kwiatkowski, D.J., et al., A mouse model of TSC1 reveals sex-dependent lethality from liver hemangiomas, and up-regulation of p70S6 kinase activity in Tsc1 null cells. Hum Mol Genet, 2002. **11**(5): p. 525-34.
261. Ma, A., et al., Tsc1 deficiency-mediated mTOR hyperactivation in vascular endothelial cells causes angiogenesis defects and embryonic lethality. Hum Mol Genet, 2014. **23**(3): p. 693-705.
262. Wang, G.L., et al., Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(12): p. 5510-4.
263. Jiang, B.H., et al., Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. J Biol Chem, 1996. **271**(30): p. 17771-8.

264. Forsythe, J.A., et al., Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. Mol Cell Biol, 1996. **16**(9): p. 4604-13.
265. Riddle, S.R., et al., Hypoxia induces hexokinase II gene expression in human lung cell line A549. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **278**(2): p. L407-16.
266. Wood, S.M., et al., Selection and analysis of a mutant cell line defective in the hypoxia-inducible factor-1 alpha-subunit (HIF-1alpha). Characterization of hif-1alpha-dependent and -independent hypoxia-inducible gene expression. J Biol Chem, 1998. **273**(14): p. 8360-8.
267. Kietzmann, T., U. Roth, and K. Jungermann, Induction of the plasminogen activator inhibitor-1 gene expression by mild hypoxia via a hypoxia response element binding the hypoxia-inducible factor-1 in rat hepatocytes. Blood, 1999. **94**(12): p. 4177-85.
268. Schofield, C.J. and P.J. Ratcliffe, Oxygen sensing by HIF hydroxylases. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(5): p. 343-54.
269. McMahon, S., et al., Transforming growth factor beta1 induces hypoxia-inducible factor-1 stabilization through selective inhibition of PHD2 expression. J Biol Chem, 2006. **281**(34): p. 24171-81.
270. Richard, D.E., E. Berra, and J. Pouyssegur, Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells. J Biol Chem, 2000. **275**(35): p. 26765-71.
271. Isaacs, J.S., et al., HIF overexpression correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer: novel role of fumarate in regulation of HIF stability. Cancer Cell, 2005. **8**(2): p. 143-53.
272. Haddad, J.J. and S.C. Land, A non-hypoxic, ROS-sensitive pathway mediates TNF-alpha-dependent regulation of HIF-1alpha. FEBS Lett, 2001. **505**(2): p. 269-74.
273. Page, E.L., et al., Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha by transcriptional and translational mechanisms. J Biol Chem, 2002. **277**(50): p. 48403-9.
274. Isoe, T., et al., High glucose activates HIF-1-mediated signal transduction in glomerular mesangial cells through a carbohydrate response element binding protein. Kidney Int, 2010. **78**(1): p. 48-59.
275. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. N Engl J Med, 1993. **329**(14): p. 977-86.
276. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes

(UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Lancet, 1998. **352**(9131): p. 837-53.

277. Teasdale, F., Histomorphometry of the human placenta in Class B diabetes mellitus. Placenta, 1983. **4**(1): p. 1-12.

278. Chen, X., et al., The role of MTOR in mouse uterus during embryo implantation. Reproduction, 2009. **138**(2): p. 351-6.

279. Bekedam, D.J., et al., Male predominance in fetal distress during labor. Am J Obstet Gynecol, 2002. **187**(6): p. 1605-7.

280. Bracero, L.A., S. Cassidy, and D.W. Byrne, Effect of gender on perinatal outcome in pregnancies complicated by diabetes. Gynecol Obstet Invest, 1996. **41**(1): p. 10-4.

281. Cui, W., et al., Sex differences in birth defects: a study of opposite-sex twins. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2005. **73**(11): p. 876-80.

282. Zeitlin, J., et al., Fetal sex and indicated very preterm birth: results of the EPIPAGE study. Am J Obstet Gynecol, 2004. **190**(5): p. 1322-5.

283. Di Renzo, G.C., et al., Does fetal sex affect pregnancy outcome? Gend Med, 2007. **4**(1): p. 19-30.

284. Engel, P.J., et al., Male sex and pre-existing diabetes are independent risk factors for stillbirth. Aust N Z J Obstet Gynaecol, 2008. **48**(4): p. 375-83.

285. Mingrone, G., et al., Influence of maternal obesity on insulin sensitivity and secretion in offspring. Diabetes Care, 2008. **31**(9): p. 1872-6.

286. van Abeelen, A.F., et al., The sex-specific effects of famine on the association between placental size and later hypertension. Placenta, 2011. **32**(9): p. 694-8.

287. Murphy, V.E., et al., Maternal asthma is associated with reduced female fetal growth. Am J Respir Crit Care Med, 2003. **168**(11): p. 1317-23.

288. Stark, M.J., V.L. Clifton, and I.M. Wright, Sex-specific differences in peripheral microvascular blood flow in preterm infants. Pediatr Res, 2008. **63**(4): p. 415-9.

289. Cvitic, S., et al., The human placental sexome differs between trophoblast epithelium and villous vessel endothelium. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e79233.

290. Claesson-Welsh, L. and M. Welsh, VEGFA and tumour angiogenesis. J Intern Med, 2013. **273**(2): p. 114-27.

291. Kumazaki, K., et al., Expression of vascular endothelial growth factor, placental growth factor, and their receptors Flt-1 and KDR in human placenta under pathologic conditions. Hum Pathol, 2002. **33**(11): p. 1069-77.

292. Zhao, B., J. Cai, and M. Boulton, Expression of placenta growth factor is regulated by both VEGF and hyperglycaemia via VEGFR-2. Microvasc Res, 2004. **68**(3): p. 239-46.

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Antalya'da doğdu. 1991 yılında Merkez Aşağıoba Köyü İlkokulu'ndan, 1995 ve 1998 yıllarında Antalya Koleji Orta ve Lise Bölümlerinden mezun oldu. 2003 yılında Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun olarak lisans eğitimini tamamladı. 2006 yılında Anadolu Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsünde Tezsiz Yüksek Lisans eğitimini tamamlayarak Ortaöğretim Alan Öğretmenliği diplomasını aldı. 2006 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda Üreme Biyolojisi Programında yüksek lisans eğitimine başladı ve 2009 yılında bilim uzmanı ünvanı ile mezun oldu. Daha sonra aynı yıl Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı. 2012 yılında Erasmus faaliyeteri aracılığıyla 3 ay süre ile Avusturya Graz Tıp Üniversitesi'ne giderek burada plasental mezenkimal kök hücre izolasyonu ve kültürü başta olmak üzere çeşitli teknikleri öğrendi. Aslı ÖZMEN'in Science Citation Index'te kayıtlı 11 makale, 1 uluslarası kitap bölümü yazarlığı ve yurtiçi-yurtdışı kongrelerde sunulmuş 25'i aşkın kongre bildirisi bulunmaktadır. 2014 yılında Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği Ulusal Kongresinde yaptığı sözlü sunu ile Yener Aytekin birincilik ödülünü kazanmıştır. Yine 2014 yılında katıldığı bir kongrede (FIMS: Frontiers In Medical Sciences: Diabetes, Cancer And Their Connection) Genç Katılımcı Destek Ödülü'nü kazanmıştır. Aslı ÖZMEN evli ve bir kız çocuk annesidir. Aslı Özmen iyi düzeyde İngilizce bilmektedir.