

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**EKZOJEN GHRELİN VERİLEN YENİ DOĞAN
STZ-DİYABETİK SIÇAN PANKREASINDA OBESTATİN
VE İNSÜLİN PEPTİDLERİNİN İNCELENMESİ**

NESLİHAN TÜRK

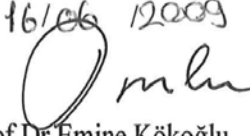
**DANIŞMAN
PROF.DR. SEMA BOLKENT**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2009

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.






16/06 12009


Prof.Dr.Emine Kökoğlu
 Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
 Program Adı : Tıbbi Biyoloji Programı
 Programın seviyesi : Yüksek Lisans Doktora
 Anabilim Dalı : Tıbbi Biyoloji
 Tez Sahibi : Neslihan Türk
 Tez Başlığı : Ekzojen ghrelin verilen yeni doğan STZ-diyabetik sıçan pankreasında obestatin ve insülin peptidlerinin incelenmesi
 Sınav Yeri : İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fk. Tıbbi Biyoloji A.D.
 Sınav Tarihi : 11 / 06 / 2009

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı _____

- 1.Prof.Dr.Sema Bolkent (Tez danışmanı), İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fk. Tıbbi Biyoloji A.D. 
- 2.Prof.Dr.Turgut Ulutin (Tez izleme komitesi), İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fk. Tıbbi Biyoloji A.D. 
- 3.Prof.Dr.Selma Yilmazer (Tez izleme komitesi),İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fk. Tıbbi Biyoloji A.D. 
- 4.Prof.Dr.Filiz Aydın (Tez izleme komitesi), İ.Ü İstanbul Tıp Fk. Tıbbi Biyoloji A.D. 
- 5.Doç.Dr.Sibel Özyazgan (Tez izleme komitesi), İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fk. Farmakoloji A.D. 

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Neslihan Türk(İmza)



İTHAF

Aileme ithaf ediyorum,

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresindeki destekleri için, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Turgut ULUTİN'e, lisansüstü eğitimim süresince ihtiyaç duyduğum her an yanımda olan, en umutsuz anlarımda beni yönlendirip motive eden danışmanım Prof.Dr. Sema BOLKENT'e, lisansüstü eğitimim süresince geniş bilgi birikiminden yararlanma fırsatı bulduğum Prof.Dr. Selma YILMAZER'e, değerli bilgilerini esirgemeyen Prof.Dr.Melek ÖZTÜRK'e, her konuda tecrübelerini paylaşan Dr. Fatma KAYA-DAĞISTANLI'ya, pratik çözümleriyle her zaman yanımda olan Dr. Matem TUNÇDEMİR'e, lisansüstü eğitimim süresince farklı yöntemleri öğrenmemdeki katkılarından dolayı M.Sc. Duygu GEZEN AK'a, M.Sc. Erdinç DURSUN'a ve lisansüsti eğitimimim hüznü,sevinçli her anını paylaştığım, değerli arkadaşım M.Sc. Mehtap VAFAİ MASTANABAD'a, her türlü katkıları için anabilim dalındaki tüm öğretim üyelerine ve asistan arkadaşlarıma, istatistik analizlerdeki yardımları için İstatistik Bilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Ahmet DİRİCAN'a, bu süreçte bana gösterdiği anlayıştan ötürü Fatih M. ÖZİÇLİ'ye, tüm eğitim hayatım boyunca beni hep destekleyen anneme, babama ve kardeşime sonsuz teşekkürler...

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:T-1867

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	Xİ
ABSTRACT.....	Xİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1.Pankreas.....	3
2.2.Diyabet.....	9
2.3.İnsülin.....	16
2.4.Obestatin.....	20
2.5.İmmünohistokimya Yöntemi.....	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
3.1.Histolojik inceleme.....	33
3.2.İmmünohistokimyasal boyama.....	34
3.3.İstatistiksel yöntemler.....	36
3.4.Kullanılan kimyasal maddeler.....	37
3.5.Kullanılan çözeltiler.....	37
3.6.Kullanılan aletler.....	38
4. BULGULAR.....	39
4.1.Vücut ağırlık değerleri.....	39
4.2.Kan glukoz değerleri.....	40
4.3.Adacık boyutu.....	41
4.4.Histolojik bulgular.....	42
4.5.İmmünohistokimya bulguları.....	44

5. TARTIŞMA.....	54
KAYNAKLAR.....	58
ETİK KURUL KARARI.....	69
ÖZGEÇMİŞ.....	70

TABLULAR LİSTESİ

1.Tablo 4-1:	38
2.Tablo 4-2:.....	39
3.Tablo 4-3:.....	40
4.Tablo 4-4:	43
5.Tablo 4-5:.....	43
6.Tablo 4-6:.....	44
7.Tablo 4-7:.....	48
8.Tablo 4-8:.....	48

ŞEKİLLER LİSTESİ

1.Şekil 2-1:.....	3
2.Şekil 2-2:.....	5
3.Şekil 2-3:.....	8
4.Şekil 2-4:.....	17
5.Şekil 2-5:.....	18
6.Şekil 2-6:.....	21
7.Şekil 2-7:.....	23
8.Şekil 2-8:.....	25
9.Şekil 2-9:.....	26
10.Şekil 4-1:.....	37
11.Şekil 4-2:.....	39
12.Şekil 4-3:.....	43
13.Şekil 4-4:.....	44
14.Şekil 4-5:.....	47
15.Resim 4-1:.....	41
16.Resim 4-2:.....	45
17.Resim 4-3:.....	45
18.Resim 4-4:.....	46
19.Resim 4-5:.....	46
20.Resim 4-6:.....	49
21.Resim 4-7:.....	49
22.Resim 4-8:.....	50
23.Resim 4-9:.....	50
24.Resim 4-10:.....	51
25.Resim 4-11:.....	51

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

µg: mikrogram

µm : mikrometre

ADA: Amerikan diyabet cemiyeti

ADP : Adenozin difosfat

AEC : 3-Amino-9 etil karbazole

AMCA: Amino-metil-kumarin asetik asit

ATP: Adenozin trifosfat

DM: Diabetes Mellitus

EC: Enterokromafin hücresi

FITC : Fluoresin izotiyosiyanat

GDM: Gestasyonel diabetes Mellitus

GH : Büyüme hormonu

Gln14: Glutamin 14

GLUT-2: Glukoz taşıyıcısı 2

GPCR: G-protein bağlı reseptör

IP₃: inositol 1,4,5-trisfosfat

i.p. : İntraperitoneal

kDa : Kilo dalton

kg : kilogram

ng: nanogram

OGTT: Oral glukoz tolerans testi

PP: Pankreatik polipeptid

RT-PCR :Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu

s.c.: subkutanöz

Ser :Serin

STZ : Streptozotosin

T1DM: Tip 1 Diabetes Mellitus

T2DM: Tip 2 Diabetes Mellitus

ÖZET

TÜRK N. Ekzojen ghrelin verilen yeni doğan STZ-diyabetik sıçan pankreasında obestatin ve insülin peptidlerinin incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul 2009

Tip 2 diyabet insüline karşı periferel direncin gelişmesi ile birlikte görülen kompleks bir metabolik hastalıktır. Preproghrelinin posttranslasyonel işlenmesinden türevlenen 23 amino asit içeren obestatin ilk kez 2005 yılında keşfedildi. Ekzojen ghrelin verilen diyabetik sıçanlarda obestatin peptid değişiklikleri gösterilmemiştir. Bu çalışmada yeni doğan diyabetik sıçanlara ekzojen ghrelin verilmesinin insülin ve obestatin peptidlerine, kan glukozuna ve vücut ağırlıklarına etkilerinin incelenmesi amaçlandı. Wistar tipi albino yeni doğan sıçanlar 4 gruba ayrıldı. Grup I: Kontrol (K) (n=13): Yeni doğan sıçan grubuna fizyolojik su intraperitoneal (i.p) olarak verildi. Grup II: Ghrelin (GHR) kontrol (n=13): Sıçanlara üçüncü günden itibaren 100 µg/kg/gün ghrelin uygulandı. Grup III: Streptozotosin (STZ) verilen grup (n=9): Doğumu izleyen ikinci günde 100 mg/kg STZ tek doz i.p. olarak verildi. Grup IV: STZ+GHR (n=7): Diyabetik sıçanlara 100 µg/kg/gün ghrelin dört hafta süre ile verildi. Dördüncü haftanın sonunda pankreas doku örnekleri alınarak parafine gömüldüler. Rutin inceleme için kesitler Hematoksilen & Eozin ile boyandı. Obestatin ve insülin peptidleri immünohistokimya yöntemi ile gösterildi. Dört hafta boyunca yeni doğan sıçanlarda STZ -diyabetik ve STZ+GHR gruplarının vücut ağırlıkları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmadı. STZ ve STZ+GHR gruplarına ait 1., 2. ve 4. hafta kan glukoz değerleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptandı. STZ-diyabetik ile STZ+GHR grupları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmamasına rağmen STZ+GHR verilen grubun insülin ve obestatin immün pozitif hücre sayılarında artış gözlemlendi. Bulgularımız, yeni doğan sıçanlara ghrelin verilmesinin STZ diyabet etkilerini azaltabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Ghrelin, yeni doğan-STZ diyabetik, obestatin, insülin, pankreas

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-1867

ABSTRACT

TURK N. Investigation of obestatin and insulin peptides by exogenous ghrelin administrated in newborn STZ-diabetic rat pancreas. Istanbul University, Institute of Health Science, Medical Biology Department. Master thesis. Istanbul. 2009.

Type 2 diabetes is a complex and metabolic disease that characterizes with development of peripheral resistance against insulin. Obestatin is a 23 amino acid peptide that derived posttranslational processing of proghrelin which discovered in 2005. The aims of the study are to evaluate the effect of ghrelin treatment on body weight, blood glucose levels, obestatin and insulin peptides in pancreas of neonatal streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. In this study, Wistar type albino newborn rats divided into 4 groups. Group I (n=13): The saline administrated intraperitoneally (i.p.). Group II (n=13): Newborn control rats were treated 100 µg/kg/day ghrelin for four weeks from the day three. Group III (n=9): Second day after the birth 100 mg/kg STZ was injected a single dose to the newborn rats to induce neonatal STZ diabetes (n2-STZ). Group IV (n=7): The n2-STZ animals were treated with ghrelin given for four weeks. End of the fourth week, pancreas samples were taken from animals and embedded in paraffin wax. The blood glucose levels and body weights were measured. Pancreas sections examined for histological changes and by immunohistochemistry for expression of obestatin and insulin. During the experimental period, the administration of ghrelin had no statistically significant effect on body weights in STZ-induced diabetic rats compared to ghrelin treated diabetic rats. There was a significant difference in blood glucose levels in STZ-induced diabetic rats compared to ghrelin treated diabetic rats at 1.,2. and 4. week. Insulin and obestatin immune positive cell numbers per islet showed an increase in ghrelin treated diabetic rats compared to the STZ-induced diabetic rats but this increase was not statistically significant. These results suggest that administration of ghrelin to neonatal rats may prevent effects of diabetes.

Key Words: Ghrelin, new born STZ-diabetic, obestatin, insulin, pancreas

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No: T-1867

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetes mellitus (DM), hiperglisemi, dislipidemi, glikozüri ve bunlara eşlik eden birçok klinik ve biyokimyasal bulgu ile seyreden sistemik ve erken ölüm riski yüksek kronik bir metabolizma hastalığıdır. DM kan glukoz konsantrasyonlarında artış ile karakterize olan multifaktöriyel bir hastalıktır. Diabetes mellitus, glukoz düzensizliklerine yol açan değişik derecelerdeki insülin üretimi ve periferel kullanımındaki eksiklikle tanımlanır. İnsülin üretimindeki eksiklik hiperglisemik etkilere neden olur (13, 59, 122).

Tip 2 diyabet, kompleks ve heterojen bir hastalık olarak dünyada 100 milyondan fazla insanı etkileyerek ciddi sosyo-ekonomik sonuçlara neden olmaktadır (106). Tip 2 diyabet, insülin üretimi eksikliğinden ziyade üretilen insülinin salgılanma fonksiyonlarının artarak kötüleşmesi ve insüline karşı periferel direncin gelişmesi ile karakterizedir (28).

Streptozotosin (STZ) pankreastaki beta hücreleri üzerine toksik etki yaratarak diyabete neden olan bir antibiyotiktir (11). STZ ile oluşturulan diyabet modelleri hastalık tiplerinin araştırılmasında sıklıkla kullanılmaktadır (33, 79, 81, 89, 91, 119, 120, 124). Yeni doğan hayvanlara STZ uygulanan modellerde, hiperglisemi gelişir, bozulmuş glukoz toleransı ile birlikte tip 2 diyabet görülmektedir (2, 68, 79, 106, 111, 125).

Ghrelilin 28 amino asitlik, büyüme hormonu salgılatıcı (secretagogue) reseptörünün endojen ligandıdır. Ghrelilin 117 amino asit uzunluğunda preproghrelilin olarak sentezlenir. Preproghrelilin 23 amino asitlik sinyal peptid ve 94 amino asitlik proghrelinden oluşur. Proghrelilin ise 28 amino asit uzunluğunda olgun ghrelini ve 66 amino asitlik kuyruk kısmını içerir (70). Ghrelilin peptidi pankreas, mide, barsak, karaciğer, akciğer, böbrek, ovaryum, hipofiz, plasenta, prostat, deri, testis ve kolonda incelenmiştir (38, 46, 49, 72, 75, 78, 118). Hayashida ve ark. neonatal sıçan gelişiminde ghrelinin önemli bir rol oynadığını göstermişlerdir (49). Tip 2 diyabetli hastalarda dolaşımdaki ghrelilin seviyesinin azaldığı bildirilmiştir (66, 92). Açık ghrelinin yüksek konsantrasyonunun doza bağlı olarak insülin salınımını uyardığı, düşük

konsantrasyonunun ise baskıladığı bildirilmiştir (94). Farklı sürelerde erişkin sıçanlara ghrelin verilmesinin insülin seviyeleri üzerine farklı etkileri gösterilmiştir (75, 94).

Preproghrelinin posttranslasyonel işlenmesinden türevlenen 23 amino asitlik obestatin 2005 yılında Zhang ve arkadaşları tarafından sıçan midesinde izole edilmiştir. Obestatin peptidinin gastrointestinal fonksiyonlar, enerji dengesi ve vücut ağırlığı üzerine etkilerinin ghrelinin tersi olduğu bildirilmiştir (95, 128). Dun ve ark. 2006 yılında ilk kez obestatin immünreaktivitesini sıçan mide ve testisinde saptamışlardır (30). İnsan pankreas kültür hücrelerinde de obestatin immünreaktivitesi bildirilmiştir (43). İmmünfluoresan işaretlemeyle obestatin sinyalleri erişkin sıçan pankreası ve gastrointestinal kanalında gösterilmiştir (129). Tip 2 diyabetli hastalarda plazma obestatin seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir (95), buna karşılık obestatin peptidinin lokalizasyonu ve immünreaktivitesi diyabet tiplerinde çalışılmamıştır.

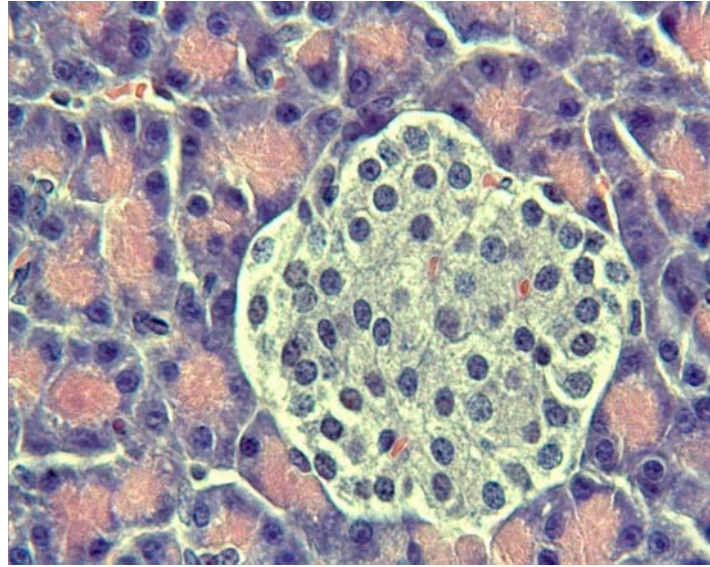
Postnatal pankreas obestatin ve ghrelin konsantrasyonları arasında pozitif bir ilişki bildirilmiştir (18). Sıçanlara in vivo ve in vitro şartlarda glukozla birlikte obestatin verilmesinin insülin salgılanmasını baskıladığı rapor edilmiştir (97). Yeni doğan STZ-diyabetik sıçanlara bir hafta süre ile yüksek doz ghrelin verilmesinin insülin ekspresyonunu arttırdığı ileri sürülmektedir (58). Tip 2 diyabetli hastalarda aktif ghrelin plazma seviyelerinin azaldığı bildirilmiştir (34).

Diyabet etkilerinin iyileştirilmesinde ekzojen ghrelin verilmesi yeni bir tedavi modeli olabilir. Fakat ghrelin tedavisinin etkileri henüz tam olarak açıklanamamıştır. Yapılan literatür taramalarında ekzojen ghrelin verilen yeni doğan streptozotosin diyabetik sıçan pankreasında obestatin peptid ekspresyonunu inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle çalışmada dört hafta süre ile ekzojen ghrelin verilen normal ve diyabetik pankreaslarda obestatin ve insülin peptidlerini incelemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 PANKREAS

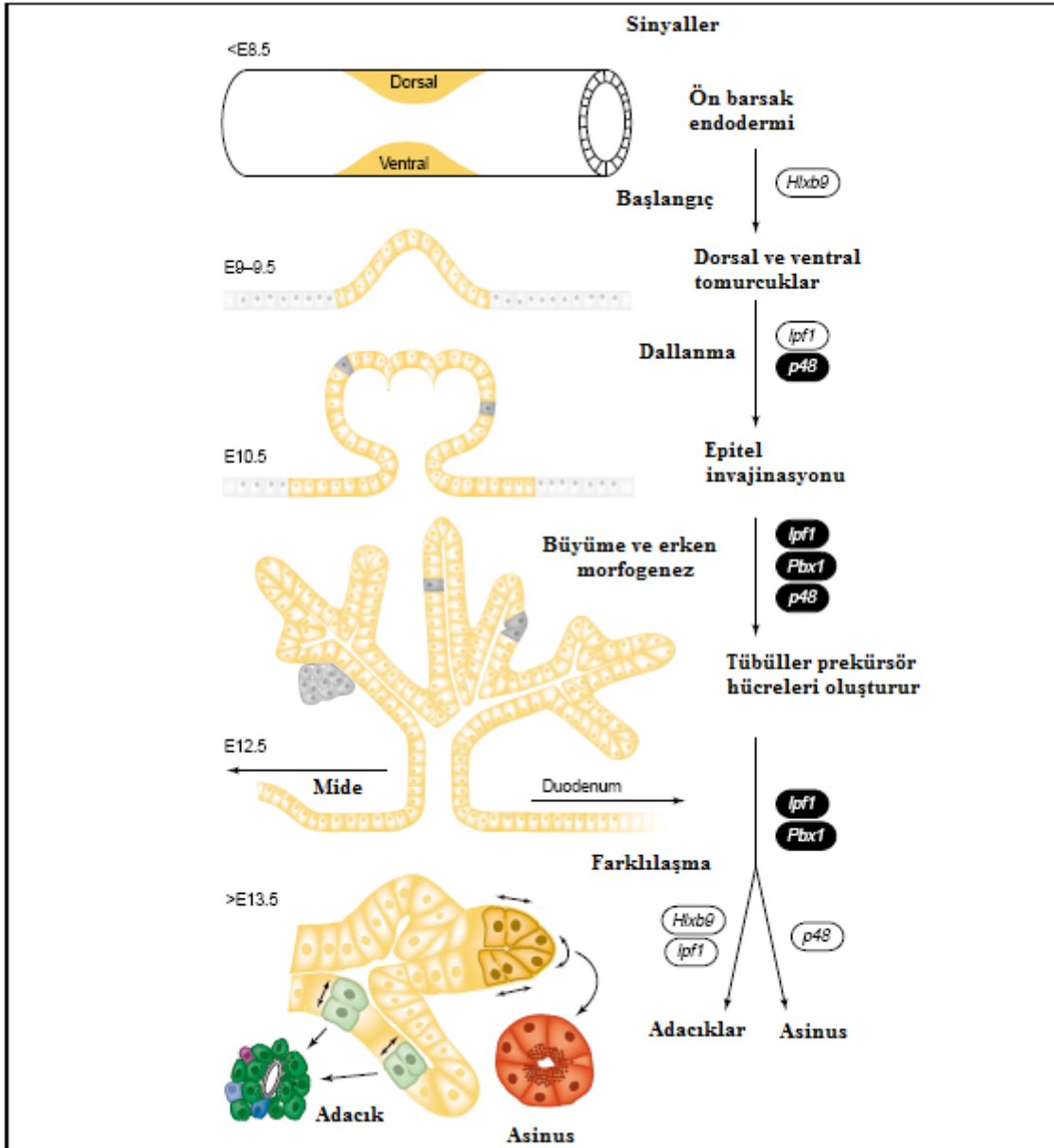
Pankreas (yunanca all flesh) sindirim enzimleri ve hormon salgılayan önemli ekzokrin ve endokrin fonksiyonları olan karma bir bezdir. Pankreas, başlıca ekzokrin, endokrin ve kanal hücrelerinden oluşmaktadır (4,55). İnsan pankreası salkım şeklinde, ortalama olarak 13-25 cm uzunluğunda ve 60-170 g ağırlığında çok loblu bir bezdir (64). Pankreas baş, gövde ve kuyruk olmak üzere üç bölüme ayrılır. Baş (proksimal) kısmı duodenum kıvrımı boyunca uzanır, kuyruk (distal) kısmı ise dalakla temastadır. Aort, inferior vena cava, superior mezenterik ven ve arter gibi birçok büyük kan damarına bitişik pozisyonda konumlanmış, portal ve dalak venleri ile direkt temastadır. Adacıklar genellikle fibroblast ve kollajen liflerden oluşan bir kapsül ile çevrelenmişlerdir (64).



Şekil 2-1: Langerhans adacığı H&E

2.1.1 Embriyonik Gelişim

Embriyonik fare pankreasında ilk olarak glukagon hücresi döllenen sonraki 9.5 günde, onu takiben insülin salgılayan β hücresi 10.5 günde, son olarak somatostatin ve pankreatik polipeptit ekspresyon eden hücreler 15.5 günde farklılaşmaktadır (64). Pankreas organogenezinde birçok transkripsiyon faktörü görev almaktadır (Şekil 2-2). Erken kemirici embriyosunda pancreas ön barsak duvarında dorsal ve ventral endodermal evaginasyonlardan köken alır (29, 47, 99). Daha sonra oluşan dorsal ve ventral tomurcuklar büyüyerek çok loblu yapıya farklılaşmaktadır (61, 99). Barsak rotasyonu esnasında dorsal ve ventral tomurcuklar kaynaşmaktadırlar. Ventral tomurcuk duodenum etrafında rotasyon yapıp barsak tübünün dorsal bölümünde dorsal tomurcuğa bağlanmaktadır. Dorsal tomurcuk pankreasın en geniş parçasını yani pankreas başının bir parçasını, tüm gövdesini ve kuyruğunu oluştururken; ventral tomurcuk ise pankreas başının posterior parçasını oluşturmaktadır. Ekzokrin, endokrin ve kanal hücreleri endodermal epitelden köken almaktadırlar (51, 53, 64). Doğumda β hücreleri adacığın ancak %50'sini kaplarken, postnatal çoğalma sonucu hücre sayısı artmaktadır (64).



Şekil 2-2: Pankreas organogenezini (53).

2.1.2. Doğum sonrası (Postnatal) Adacık Gelişimi

Adacık kütlesi fetusten erişkinliğe doğru oldukça artmaktadır. Yeni doğan insanlarda adacıklar pankreasın % 20'sini oluştururken, çocuklarda (1,5 - 11 yaş) % 7,5 ini, erişkinlerde ise % 1'ini oluşturmaktadır. Benzer veriler sıçan ve sığırlar içinde verilmiştir. β hücre kütlesi erişkin sıçan ve farelerde vücut ağırlığı ile doğrusal bir ilişki göstermektedir. Yeni adacık hücreleri, neogenez ya da kanal epitel hücrelerinin adacık endokrin hücrelerine farklılaşması veya çoğalması ile meydana gelmektedir (5, 64).

Birçok yeni adacık doğumdan sonraki ilk birkaç günde oluşur ve emzirme dönemi bitiminde tekrar neogenez görülmektedir. β hücre çoğalması geç gebelik ve yeni doğan (neonatal) evrelerinde oldukça yüksektir. Sütten kesme döneminde ufak değişiklikler olsa da çoğalma 30-40 güne kadar görülür. Sıçanlarda β hücre sayısı 15 aya kadar artış göstermektedir. Sonrasında ise hacimce artış yani hipertrofi görülmektedir. Doğumdan sonraki 2. haftada β hücre kütlesi, β hücrelerinde yüksek oranda çoğalma görülmesine rağmen aynı zamanda yüksek seviyede apoptoz olmasından dolayı artış göstermez. Sıçanlarda yeni doğan evrede endokrin pankreas oluşumu devam etmektedir.

β hücrelerinin büyümesinde birçok uyarıcı olmasına rağmen, bilinen 3 ana faktör: glukoz, büyüme hormonu ve prolaktindir. β hücre kütlesi değişen ihtiyaçlara göre artışlar ve azalışlarla dinamiktir. Hamilelik, obezite ve insülin direnci durumlarında çoğalma, neogenez, apoptoz ve hücre boyutu (hipertrofi veya atrofi) kütledeki bu değişimlere katkıda bulunur (64).

2.1.3.Ekzokrin Pankreas

Pankreasın ekzokrin fonksiyonları sindirim enzimleri ve diğer bileşenleri duodenuma salan asiner hücreleri tarafından gerçekleştirilir. Asiner hücreler apikal kutbunda yerleşmiş amilaz, proteaz ve lipaz gibi birçok sindirim enzimi içeren zimojen granülleri bulunan ve lümenlerin etrafında yerleşen piramid şekilli hücrelerdir. Bu lümenler büyük kanallarla birleşerek Wirsung kanalına açılır (10, 64). Wirsung kanalı kuyruk ve ana gövde boyunca ilerler ve kanal dalları boyunca salgıları toplar. Pankreasın baş kısmına ulaştığında aşağı doğru döner ve safra kanalı ile birleşerek Vater ampullasından duodenuma boşalır (10, 24, 64).

2.1.4.Endokrin Pankreas

Pankreasın endokrin fonksiyonu Langerhans adacık hücreleri tarafından gerçekleştirilir. Bu yapılar Alman doktor Paul Langerhans tarafından 1869 yılında tanımlanmıştır (71).

2.1.4.1.Langerhans adacıkları

Langerhans adacıkları pankreasın multihormonal endokrin mikroorganlarıdır. Ekzokrin pankreas dokusu içine gömülmüş yuvarlak hücre toplulukları şeklinde görülürler. Metabolik düzenlemeden sorumlu olan pankreas bölümü, endokrin salgı yapan ve insan pankreasında sayıları 1-2 milyon kadar olan Langerhans adacıklarıdır (86). Adacık sayısı erişkin farelerde yaklaşık olarak 100-200 arasında bazı balıklarda ise tektir. Toplam pankreas ağırlığının %1-2 kadarını oluşturan bu adacıklar, erişkin insanlarda 1-1.5 g arasında bir ağırlıkta, 100-200 µm çapında ve birkaç yüz hücre içerir. Adacık içeriği birkaç hücreden 10,000 hücreye kadar değişen boyutlarda ve 40 µm den 400 µm ye kadar değişen çaplarda olabilir. Ortalama bir sıçan adacığı 150 µm çapında ve 45 ng insülin içermektedir (64). Buna karşın ekzokrin pankreas hücreleri arasına serpiştirilmiş küçük endokrin hücre adacıkları da bulunur. İnsan ve sıçan pankreasında kuyruk bölgesinde biraz daha fazla olmak üzere bir milyondan fazla adacık bulunabilir. Her adacık açık boyanan poligonal ya da yuvarlak hücrelerin oluşturduğu kordonlar ile bu kordonları birbirinden ayıran pencereci kapiller ağdan oluşur. (4, 55, 64, 67). Langerhans adacıklarında boyanma özellikleri granüllerin ultrastrüktürel morfolojisi ve hormon içerikleri ile birbirinden ayrılan 4 esas hücre tipleri bulunur. Bunlara ek olarak diğeri bazı hücre tipleri de saptanmıştır.

Dört ana hücre tipi:

Beta (β) hücresi (% 68); hormonu insülin dir. Çeşitli dokuları etkileyerek besin fazlalığında enerji depolanmasına yol açar. Kan glukoz düzeyini azaltır. β hücreleri 250-300 nm çapında granüller içeren poligonal hücrelerdir. Her bir fare β hücresinin yaklaşık 100.000 granül içerdiği tahmin edilmektedir. İnsülin granülleri elektron yoğun bir merkez içeren olgun ve elektron yoğun bir merkez içermeyen olgunlaşmamış olmak üzere iki tiptir.

Alfa (α) hücresi (% 20); hormonu glukagondur. Çeşitli dokuları etkileyerek glikojen ve yağda depolanan enerjiyi glikojenoliz ve lipoliz yolu ile açığa çıkarır. Kan glukoz

düzeyini artırır. Alfa hücreleri genellikle β hücrelerinden daha küçük, ve 200-250 nm çaplı granüllere sahip hücrelerdir.

Delta (δ) hücresi (% 10); hormonu somatostatindir. Lokal parakrin etkisiyle insulin ve glukagon hormonlarının salgılanmasını durdurur. Sigma hücreleri genellikle α ve β hücrelerinden daha küçük ve sıklıkla dendritik şekilli, 200-250 nm çaplı granüllere sahip hücrelerdir.

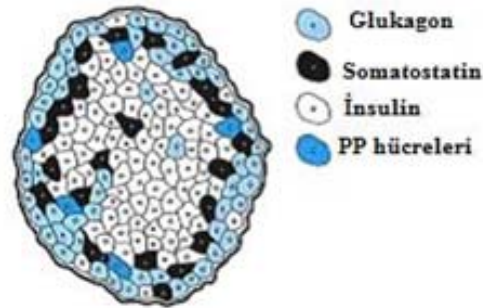
Pankreatik Polipeptid (PP) hücresi (% 2); hormonu pankreatik polipeptiddir. Birçok gastrointestinal etkileri olan bir polipeptiddir. Gastrik ve intestinal enzimlerin salınımını uyarırken intestinal hareketliliği durdurur. PP hücreleri en değişken tip endokrin hücreleridir. İnsan PP hücre granülleri 120-160 nm çapında, çok elektron yoğun ve uzun şekilli iken, köpek ve kedilerde yaklaşık 300 nm çapında küreseldir (64).

Diğer hücre tipleri:

D_1 hücresi; hormonu vasoaktif intestinal polipeptiddir. Glikojenolizi ve hiperglisemi uyarır.

Enterokromafin hücresi (EC); hormonu seratonindir (4, 55, 100, 114).

Ghrelin hücresi (G); İnsan pankreasında ghrelin üreten hücreler klasik pankreas hormonlarından hiçbirisini üretmemekte ve yeni adacık hücre tipi olarak ileri sürülmektedir (123, 124).



Şekil 2-3: Langerhans adacık düzeni (85).

Pankreas adacıklarında diğer adacık hormonlarının salınımını etkileyen hormonların bulunması adacığın gıda-madde homeostazının düzenlenmesinde salgılatıcı bir birim

olarak görev yaptığını gösterir. Somatostatin; insülin, glukagon ve PP salgılanmasını inhibe eder; insülin glukagon salgılanmasını inhibe eder; ve glukagon insülin ve somatostatin salgılanmasını uyarır. Birçok memelide glukagon ve somatostatin ile PP salgılayan hücreler genelde adacıkların periferinde, insülin salgılayan β hücreleri ise merkeze yerleşmişlerdir (67). Özgün bir dağılım modeli gösteren hücreler arasındaki yakın iletişim, adacıkların bir bütün olarak fonksiyon göstermelerine neden olmaktadır (86).

2.2 DİYABET

Diabetes (Yunancada) ilk olarak MÖ 250 de vücuttan sıvı kaybını vurgulamak amacıyla kullanılmıştır. Mellitus (Latince) diyabetiklerin ürelerini bala ve şekere daldırılmış olarak tanımlamak için Thomas Willis tarafından, Diabetes mellitus terimi ise ilk olarak 1674 te Willis tarafından kullanılmıştır (8, 67, 74). 1889 yılında Mering ve Minkowski pankreası çıkarılan köpeklerde diyabet geliştiğini göstermişlerdir. Pankreas bezi ve diyabet arasında bağ olduğu gösterilmiştir. (67, 74). Diabetes mellitus (DM), karbonhidrat , yağ ve protein metabolizmasındaki anormalliklerin ve çeşitli mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonların eşlik ettiği, kan glukoz konsantrasyonlarında artış ile karakterizedir. Bütün diyabetik durumlar yetersiz insülin desteğinden veya bunun etkisine yetersiz doku yanıtından kaynaklanmaktadır (25, 55).

DM, hayvan türlerinde de görülmekle beraber insanlarda sıktır. ABD’de toplumun %5-7 sinde DM olduğu hesaplanmıştır. Bazen asidoz ve komaya yol açarak uzun süren diyabette mikrovasküler (diabetik retinopati, diabetik nefropati), makrovasküler (inme ve miyokard infarktüs insidanslarında artışa yol açan hızlanmış ateroskleroz) ve nöropatik anormallikler (diabetik nöropati; otonom sinir sistemi ile periferik sinirleri tutar ve ekstremitelerdeki nöropati ile birlikte aterosklerotik dolaşım yetmezliği sonucu özellikle ayaklarda gangren) ek komplikasyonlar olarak gelişir (67).

Tip 1 diyabette pankreas adacıklarındaki insülin üreten β hücrelerinin otoimmün yıkılımı ile insülin eksikliği görülür. Tip 2 diyabet ise hatalı insülin reseptörü veya daha sık olarak post reseptör yolaklarındaki genetik ve/veya edinsel defektlerin fizyolojik

yanıtı azalttığı zaman ortaya çıkar. Tip 2 diyabet insülin eksikliği ile kombine şekilde periferik insülin direncinden kaynaklanan kompleks bir bozukluktur (55, 86, 100).

Diabetes mellitus: 1997 Amerikan Diyabet Cemiyeti/American Diabetes Association = ADA tanı kriterleri:

1.Diyabet semptomlarına (poliüri, polidipsi, kilo kaybı) ilave olarak rastgele bakılan plasma glukoz konsantrasyonlarının ≥ 200 mg/dl (11.1 mmol/L) olması.

2. Açlık kan şekeri* ≥ 126 mg/dL (7.0 mmol/L). *Açlık demek en az 8 saattir kalori alımı olmamasıdır.

3.Oral glukoz tolerans testi=OGTT de 2.saat plazma glukoz=PG ≥ 200 mg/dl (11.1 mmol/L)

Emilim sonrası memelilerde kan glukoz konsantrasyonu 4.5-5.5 mmol/L arasında değişmektedir. Karbonhidratlı bir yemeğin sindiriminden sonra 6.5-7.2 mmol/L ye yükselebilir ve açlık durumunda ise 3.3-3.9 mmol/L ye kadar düşebilir (25, 55, 82, 85, 86, 122).

2.2.1.Diabetes mellitus'un etyolojik sınıflandırılması

1-Tip 1 diyabet (=T1DM)

2-Tip 2 diyabet (=T2DM)

3- β hücre fonksiyonunun genetik defektleri:

(MODY=Maturity Onset of the Young, MODY1, MODY2, MODY3, MODY4, MODY5, MODY6) Gençlerin geç başlangıçlı diyabeti klinik olarak heterojen bir grup hiperglisemik bozukluktur. Hastalığın başlangıcı tipik olarak 25 yaşından öncedir, sıklıkla çocukluk çağında ya da adolesen dönemdedir. Günümüze kadar, MODY 1 den MODY6 ya kadar altı farklı genetik mutasyon tarif edilmiş ve numaralandırılmıştır. Mutant genler anormal glukoz oluşumuna veya insülin sekresyon bozukluğuna veya her ikisine birden neden olabilir.

4- İnsülin etkisinin genetik defektleri

İnsülin molekülü veya onun reseptörünün anormallikleri diyabete yol açabilir.

5- Ekzokrin pankreas hastalıkları

Adacık dışındaki pankreas bölümünün hastalıkları da sıklıkla glukoz toleransı bozuklukları ile birlikte görülmektedir. Hiperglisemi sık olarak pankreas kanseri olan hastalarda görülmektedir.

6- Endokrinopatiler

Diğer hormonal bozukluklar (akromegali, Cushing sendromu, hiperiroidizm) sıklıkla glukoz intoleransı ve bazen de diyabet ile birlikte görülür.

7- İlaç veya Kimyasal İlişkili Diyabet

Birçok ilaç diyabet gelişimine katkıda bulunur. Çoğu durumda ilacın kullanımı glukoz intoleransına karşı altta yatan eğilimi açığa çıkarır. Bu ilaçlar sıklıkla kilo alınımına sebep olabilir ayrıca direkt olarak insülin duyarlılığını da değiştirebilir. Diğer diyabetojenik ilaçlar veya kimyasal ajanlar insülin sekresyonunu azaltırlar veya β hücre yıkımına yol açarlar. (Nikotinik asit, glukokortikoidler, tiroid hormonu, α -interferon)

8- İnfeksiyonlar

Bazı viral ajanlar, rubella, kabakulak ve adenovirüs dahil olmak üzere, T1DM da immün yanıtı etkileyen 'çevresel' faktör olarak dahil edilmişlerdir.

9- Diyabete eşlik eden diğer genetik sendromlar

Diyabet veya bozulmuş glukoz toleransı artan sıklıkla birçok sayıda konjenital bozuklukla (Down sendromu, Huntington hastalığı, Klinifelter sendromu, Miyotonik distrofi, Prader-Willi sendromu, Turner sendromu) birlikte görülmektedir. Çoğu vakada diyabet insülin gerektirmez.

10- Gestasyonel Diabetes Mellitus

Gebelik sırasında tanı konulan diyabete gestasyonel diyabet denir (GDM) (25, 64, 85, 122).

2.2.2. Tip 1 Diabetes Mellitus

DM olgularının yaklaşık %10 kadarı bu sınıfta yer almaktadır. Tip 1 diabetes mellitus (T1DM) β hücre yıkımından kaynaklanan ciddi insülin eksikliği ile

karakterizedir. Dolaşan insülin konsantrasyonları ihmal edilecek kadar azdır veya tamamen yoktur. T1DM lu hastalarda sadece hiperglisemi ile değil, ketoz eğilimi de görülmektedir. Bu sebeple bu bireyler yaşamak için insüline bağımlıdırlar (86). T1DM de otoimmün β hücre yıkımı görülmektedir. Adacık inflamasyonu (insülitis) diyabet gelişmeden önce bu bireylerin pankreas dokularında görülür.

T1DM klinik başlangıcı birkaç gün veya hafta içinde gelişen belirgin hiperglisemi ile görülür, sıklıkla kilo kaybı, halsizlik, poliüri, polidipsi, görme bulanıklığı ile karakterizedir. Ketoasidoz varlığı ağır insülin eksikliğini işaret eder hiperglisemiye yol açar. T1DM sıklıkla 30-40 yaşından önce tanınır (25).

2.2.2.1.Genetik Faktörler

Çoğu otoimmün hastalıkta olduğu gibi T1DM de major doku uygunluk kompleksindeki (MHC) genlerle ilişkilidir (96). Kalıtsal olan T1DM yatkınlık mekanizması oldukça karmaşıktır. Multigenik bir özellik taşımakta ve ana lokus 6.kromozomdaki major histokompatibilite kompleksinde (MHC) yer almakta ve 9.kromozomda en az 11 lokus daha olaya katılmaktadır (86). T1DM da bazı HLA ların prevalansı artmıştır (DR3, DQ2 veya DR4, DQ8) veya bazılarınıninki azalmıştır (DR2, DQ6) (25). T1DM da kalıtsal bir yatkınlık söz konusudur. Tek yumurta ikizlerinden birinde hastalığın gelişmesi durumunda ikizin diğerinde de üçte bir olasılıkla hastalık gelişir. Diğer bir deyişle konkordansı yaklaşık %33'tür. (67).

2.2.2.2.Çevresel Faktörler

Mendel kalıtımını izlemeyen ve poligenik bir hastalık olan T1DM başlamasında çevresel faktörler rol oynamaktadır (25, 86). Virüsler; viral enfeksiyonlar bireylerde otoimmunitiyi başlatırlar. Adacık otoantikörleri enteroviral, rotavirüs, kabakulak, rubella kızamık ve suçiçeği enfeksiyonlarından sonra tespit edilmiştir (25, 55). İlaçlar; alloxan, streptozotosin, pentamidin ve vacor gibi kimyasallar β hücre toksisitesine ve hasarına sebep olmaktadır (25, 86).

Diyetsel faktörler; epidemiyolojik ve deneysel kanıtlar erken yaşamda diyetle inek sütü proteini alınmamasının genetik olarak T1DM'a yatkın çocuk ve hayvanlarda koruyucu olduğunu ileri sürmektedir. Coğrafi Farklılık; İskandinavya ve Sardunya da

bütün dünyadaki en yüksek insidans ve Asyalı popülasyonda ise en düşük değer saptanmaktadır.Soy ve Irk; Irk farklılıkları coğrafi farklılıklar kadar önem taşımamakla beraber dikkat çekicidir. Amerikada İspanyol olmayan beyazlarda T1DM gelişme insidansı Afrikalı-Amerikalılar veya İspanyolların birbuçuk katıdır. Yaş ve Cinsiyet; T1DM 2, 4-6 ve 10-14 yaşlarında pik yapar. Genelde erkeklerde ve kadınlarda T1DM riski benzerdir (25).

2.2.3.Tip 2 Diabetes Mellitus

Tip 2 diyabet, kompleks ve heterojen bir hastalık olarak dünyada 100 milyondan fazla insanı etkileyerek ciddi sosyo-ekonomik sonuçlara neden olmaktadır (106).

Tip 2 diabetes mellitus (T2DM) önceleri insülin bağımlı olmayan diyabet olarak bilinmekteydi, diabetes mellitusun bütün dünyada en sık görülen formudur. 2000 yılında bu hastalığı taşıyan 150 milyon kişi olduğu belirlenmişti, bu sayının 2025 yılında iki katına çıkması tahmin edilmektedir (25, 64).

Tüm dünyada diyabet vakalarının % 90 ından fazlasından sorumludur. T1DM tan farklı olarak aile hikayesi siktir, ama bu hastalığın kalıtımı biraz komplekstir ve poligenik olduğundan şüphelenilmektedir (25). T2DM da otoimmün β hücre yıkımı görülmez. Diyabetin bu formunda diyabet süresi arttıkça artan β hücre kaybı görülür. T2DM hastalarının çoğu obezdir ve obezite insülin direncini ağırlaştırır (64). Hastalık ilerledikçe, pankreas adacık hücre fonksiyonu duraksamaya başlar ve periferik ihtiyaçları karşılayamaz hale gelir. Sonuç olarak insülin seviyeleri ihtiyaçlara yetişemez ve hiperglisemi meydana gelir. Plasma glukoz konsantrasyonları T2DM da tipik olarak 250-350 mg/ dl aralığındadır (25). T2DM olan hastalarda santral obezite, hipertansiyon, dislipidemi (yüksek trigliserid, düşük HDL-kolesterol, ve artmış LDL-kolesterol) endotelial disfonksiyon ve prematüre kardiyovasküler morbidite için artmış risk yer alır (96). Bu bulguların toplamına sıklıkla ‘metabolik sendrom’ denir. İnsülin direnci bu kompleksin kökenindeki sebep olarak kabul edilmektedir (25).

2.2.3.1.Risk Faktörleri

Ailesel birikim: T2DM olmanın riski eğer bir ebeveyn veya akrabada hastalık varsa 2 ila 6 kat artar (25). Yaş ve cinsiyet: T2DM prevelans ve insidansı cinsiyetler arasında

bir popülasyondan diğerine göre değişkendir. T2DM prevalansı yaşla artar. Gestasyonel diyabet hikayesi olan kadınlarda daha sık görülür (64). Obezite: Obez olmayan bireylerde T2DM insidansı düşüktür ve bu ilişki diğer risk faktörleri ile değişir. T2DM hastalarının yaklaşık %60-80 kadarı obezdir. Obezite diyabet insidansı için kuvvetli bir öncüdür (25, 64, 85, 86). Fiziksel aktivite: Ekolojik çalışmalar, fiziksel aktivite ile T2DM riski arasında ters bir ilişki olduğunu göstermiştir (64). Günlük enerji harcamasının 500 kcal artması ile T2DM riski %6 azalmaktadır (86). Düzenli egzersizin T2DM a karşı koruyucu bir etkisi olduğu gösterilmiş (64, 86). Genetik faktörler: Genomik taramalar genomda yatkınlık yarattığı varsayılan genlerin yerleştiği birçok bölge tanımlamıştır (25). Tek yumurta ikizlerinde T2DM konkordansı %100 civarındadır (67). T2DM un anne ve babası diyabetik olan obezlerde görülme olasılığı, ailesinde diyabet öyküsü bulunmayan obezlere göre 10 kat fazladır (86). T2DM olan ve β hücre disfonksiyonu ile ilgili tanımlanmış gen defektleri olan iki grup hasta tarif edilmiştir. Birinci grup maternal olarak kalıtılmış mitokondriyal sendromlar ve diyabetten oluşur, ikinci grup ise glukoz intoleransı veya T2DM kalıtım şekli farklıdır ve gençlerin ergenlikte başlayan diyabeti (MODY) olarak adlandırılmıştır (25). Diğer risk faktörleri: Genler ve obezite T2DM için en önemli risk faktörlerindedir, bunların yanında fiziksel inaktivite, düşük doğum ağırlığı, intrauterin diyabetik çevreye maruz kalması gibi faktörlerde risk teşkil etmektedir.

2.2.3.2.T2DM da β hücre bozukluğu

T2DM da β hücre bozukluğu bu hücrelerin periferik insülin direncine ve artmış insülin salgısına karşı uzun süreli talebi karşılamak için kendilerini adapte edememelerini gösterir. (55, 90). İnsülin direncinde başlangıçta insülin salınımı, kontrollere göre glukozun her seviyesinde yüksektir. Bu hiperinsülinemik durum periferik direnci karşılar ve uzun yıllar normal plasma glukoz düzeyini koruyabilir. β hücre yetersiz hale gelince diyabet ilerler. β hücre adaptasyonunun bozulmasının altında yatan nedenler henüz tam bilinmemekle beraber serbest yağ asitlerinin yüksek miktarda dolaşması 'lipotoksisite' ya da kronik hiperglisemi 'glukoz toksisitesi' nin rolleri olduğu düşünülmektedir (55). T2DM da β hücre bozukluğu kendisini hem kalite hem de sayısal hasarlarla göstermektedir (62).

Kaliteli β hücrelerin bozukluğu: başlangıçta hafiftir ve insülinin normal dolaşımında azalması, insülin salgılanmasındaki dalgalı patern ve insülinin ilk fazdaki salınımının azalması değişen plazma glukoz seviyeleriyle tetiklenmektedir. Salgı bozuklukları her fazdaki insülin salgılanmasını etkiler (55).

Hücre sayısının değişikliği: β hücre kütleindeki azalma, adacık dejenerasyonu ve adacık amyloidlerinin depolanması ile kendini gösterir. Adacık amyloid proteini (amylin) T2DM un karakteristik bulgularındandır. Diyabetik adacıkların %90 ından fazlasında bulunur. Adacıklarda amyloid bulunması azalmış β hücre kütleyle ilişkilidir (55).

T2DM da adacık disfonksiyonu varlığı net olsa da, insülin sekresyonundaki defektlerin β hücre kütleinde azalmanın mı, normal sayıdaki β hücrelerinin disfonksiyonunun mu yoksa kombinasyonunun mu olduğu henüz netleşmemiştir. T2DM da β hücre lezyonu eğer kompanse edilmemişse, azalmış plazma insülin düzeylerine yol açar. β hücre disfonksiyonu hiperglisemiden önce gelişir (25).

β hücrelerinin diğer endokrin hücreler gibi uyarılmaya hipertrofi ile yanıt vermelerine karşın bu uyarının belirgin veya uzun süreli olması halinde bu hücreler tükenir ve salgılamaya durur. Uyarılma hücreler salgılamayı durdurduktan hemen sonra durursa bu hücreler düzelebilir; fakat uyarım sürerse bu hücreler en sonunda ölür ve yok olurlar (67).

2.2.3.3.Glukoz toksisitesi

Kronik hiperglisemi β hücre fonksiyonunda değişimlere sebep olmakta buna da glukoz toksisitesi denmektedir. Kronik hiperglisemi glukozla indüklenen insülin salınımını ve insülin gen ekspresyonunu bozmaktadır (88).

2.2.3.4.İnsülin direnci

İnsülin direnci, insülinin glukoz alınımı, metabolizması ya da depolanması üzerine olan direnci olarak tanımlanmaktadır. İnsülin direnci T2DM lu hastaların karakteristik özelliğidir (55). İnsülin direnci glukozun kas ve yağ dokularına daha az alınmasını ve

insülin hormonunun hepatik glukoneogenezini yetersiz kılar. İnsülin direnci kompleks bir olaydır (55,96).

2.2.4.Streptozotosin

Streptozotosin (2-deoksi-2-[3-metil-e-nitrosourido]-D-glucopyranose) ilk kez 1960 yılında *Streptomyces achromogenes* bakterisinden ekstre edilen bir glikoz analogudur (111).

Streptozotosin (STZ), pankreas β hücreleri üzerine spesifik diyabetojenik hasar oluşturur. Diyabetojenik özelliğinin yanında mutajenik ve karsinojenik özelliğindedir ve broadspektrumlu antibiyotik özelliği göstermektedir (11).

STZ aynı zamanda glukoz transporterı GLUT-2 tarafından pankreas β hücresine taşınan, β hücre toksisitesine ve insülin eksikliğine sebep olan bir N-acetylglucosamine (GlcNAc) analogudur. STZ seçici olarak O-GlcNAc 1 proteinden ayıran β hücre O-GlcNAkaz aktivitesini inhibe eder. Bu, hücre içi proteinlerin geri dönüşsüz O-glikolizasyonuna sebep olur ve β hücre apoptozuyla sonlanır (113). STZ serbest alkilleyici radikallerin oluşmasına sebep olup, DNA fragmantasyonuna, nukleotidlerin ve bileşenlerinin özellikle nikotinamid adenin dinukleotidin oksidize formunun hücre içi seviyelerinin azalmasına ve böylece ani hücre nekrozuna sebep olmaktadır (111).

STZ ile uyarılmış diyabet modelleri diyabet patofizyolojisinin araştırılmasında sıklıkla kullanılan modellerdendir. Neonatal hayvanlara STZ uygulanan modellerde, hiperglisemi gelişir, bozulmuş glukoz toleransı görülmektedir. Neonatal periyotta β hücre yıkımı çok fazla değildir ve diğer farklılaşmamış hücreler tarafından kompanse edilebilir. Bu glukoz seviyesini referans aralığında korumak ve hiperglisemi oluşumunu önlemek için insülin salınımı arttırabilir. Fakat belli bir periyottan sonra bu hücrelerinde tükenmesi ve pankreas β hücrelerinin fonksiyonunun azalmasıyla kan glukoz seviyesinde bozulma görülür. Neonatal hayvanlara STZ enjeksiyonundan birkaç gün ya da haftalar sonra bile hiperglisemi, değişen glukoz toleransı ve azalmış insülin salınımı bildiren birçok rapor vardır (111).

STZ'nin diyabetojenik özellikleri ilk kez sıçanlarda ve köpeklerde Rakieten tarafından 1963 de keşfedilmiştir. Tek doz 80-100 mg /kg STZ doğumdan sonraki 1., 2. ya da 5. günde Wistar ya da Sprague Dawley neonatal sıçanlarda intravenöz (iv) ya da

intraperitoneal (ip) enjeksiyonu ile tip 2 diyabet olduğu birçok literatürde bildirilmiştir (2, 68, 79, 106, 111, 125).

STZ hem tip 1 hem de tip 2 diyabeti indükler. Tek doz enjeksiyonda 40 mg/kg in altındaki dozların etkisiz kalabildiği bildirilmiştir. Bunun yanında düşük doz multiple enjeksiyonların uygulandığı diyabet modelleri oluşturulmaktadır. Tip 2 diyabet sıçanlara doğdukları gün 100 mg/kg i.v ya da i.p STZ enjeksiyonu ile kolaylıkla oluşturulabilmektedir. Enjeksiyondan 2 saat sonra kan insülinindeki ani düşüşle hiperglisemi görülür, 6 saat sonra ise insülin seviyesinin kanda yükselmesiyle hipoglisemi görülür. En son süreçte kandaki insülin seviyesinin azalmasıyla hiperglisemi gelişir. Kan glukoz ve insülin seviyelerindeki bu değişimler β hücre fonksiyonundaki anormallikleri göstermektedir. STZ ilk olarak β hücrelerinin glukozu cevabını bozmakta, ardından cevap yeteneğinin geçici bir süre geri gelmesinden sonra ise yeteneğinin kalıcı kaybı ve hücrelerin hasarlanmasına neden olmaktadır. STZ hücre içine GLUT-2 transporterı ile alınmaktadır. GLUT-2 ekspresyonunun azalmasının STZ nin diyabetojenik aktivitesini önlediği gösterilmiştir (110).

Neonatal Wistar sıçanlar, doğdukları gün ya da doğumdan sonraki 2.günde 90–100 mg/kg STZ enjeksiyonu ile kan glukoz seviyesindeki ani spontan azalmalarla 6-8 haftaya kadar devamlı bir hiperglisemiye girerler. Plasma glukoz düzeylerinin STZ nin doğdukları gün enjekte edilen hayvanlarda 170–200 mg/dl, doğumdan sonraki 2.günde enjekte edilen hayvanlarda ise 200–350 mg/dl arasında değişerek tokluk kronik hiperglisemisinin geliştiği görülmektedir. STZ ile indüklenen hipergliseminin azalması kısmi β hücre ve insülin depolarının yeniden düzenlenmesiyle oluşur. Birçok yeni β hücresi farklılaşmamış kanal hücrelerinden kökenlenir. STZ verilmesi sırasında 20% si azalan β hücre kütlesi rezüdlere, çoğalma ve/veya neogenez ile 50% ye ulaşır (9, 79).

2.3.İNSÜLİN

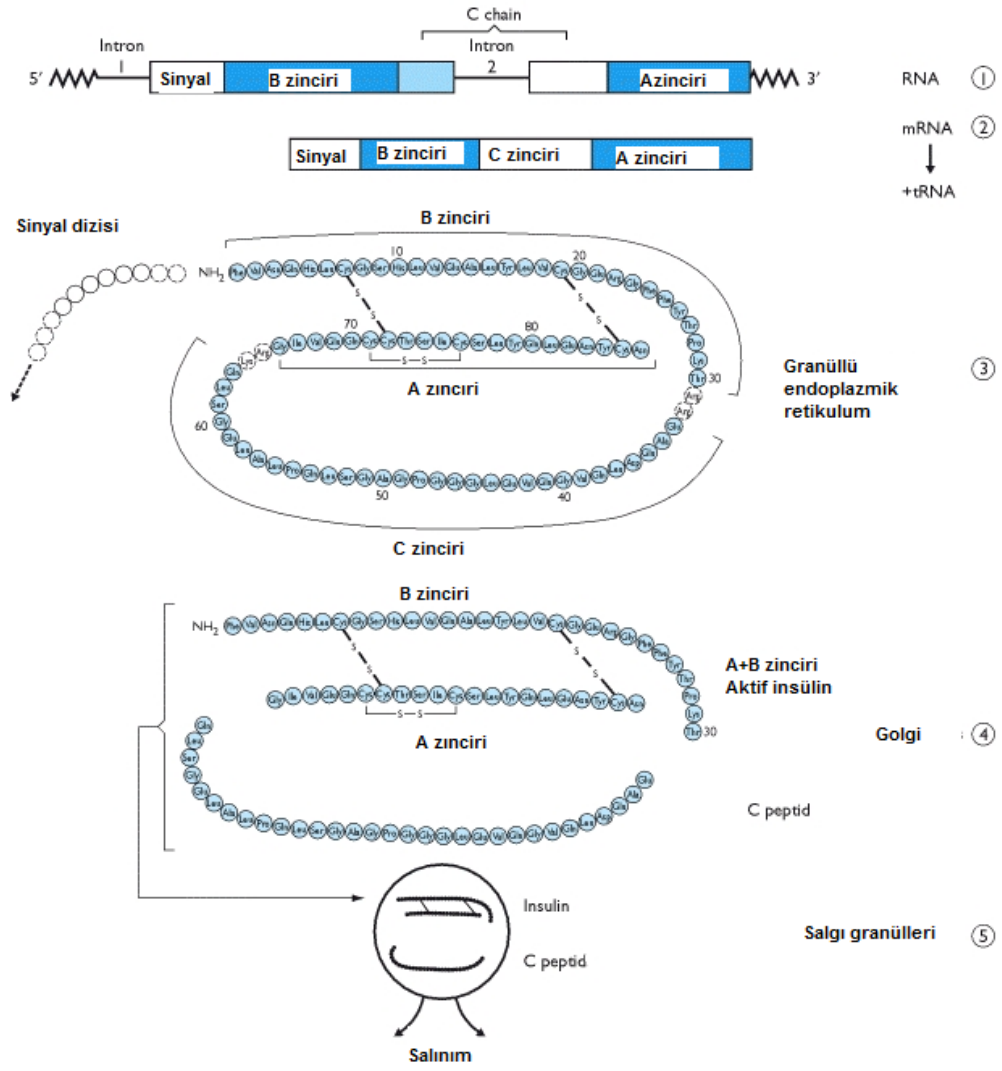
Saflaştırılıp kristallize edilen ve sentezlenen ilk hormon insülin hormonudur. 1921 yılında Banting ve Best adlı araştırmacılar tarafından asit-etanol karışımı kullanılarak pankreas dokusundan hipoglisemik etkili insülin adı verilen bir adacık faktörü izole edilmiştir (86). 1958 yılında ise Frederick Sanger insülinin amino asit dizisini açıklayarak Nobel ödülünü almıştır (74).

2.3.1.İnsülinin Yapısı

Molekül ağırlığı 5.7 kDa olan insan insülini globüler bir proteindir. A ve B zincirleri A7' yi B7'ye ve A20'yi B19'a bağlayan iki tane disülfid köprüleriyle birbirine bağlanmıştır. Üçüncü bir zincir içi disülfid köprüsü A zincirinin 6 ve 11. aminoasitlerini birbirine bağlar. İnsülinin yapısındaki disülfid köprüleri biyolojik aktivite için gereklidir (64, 82, 86).

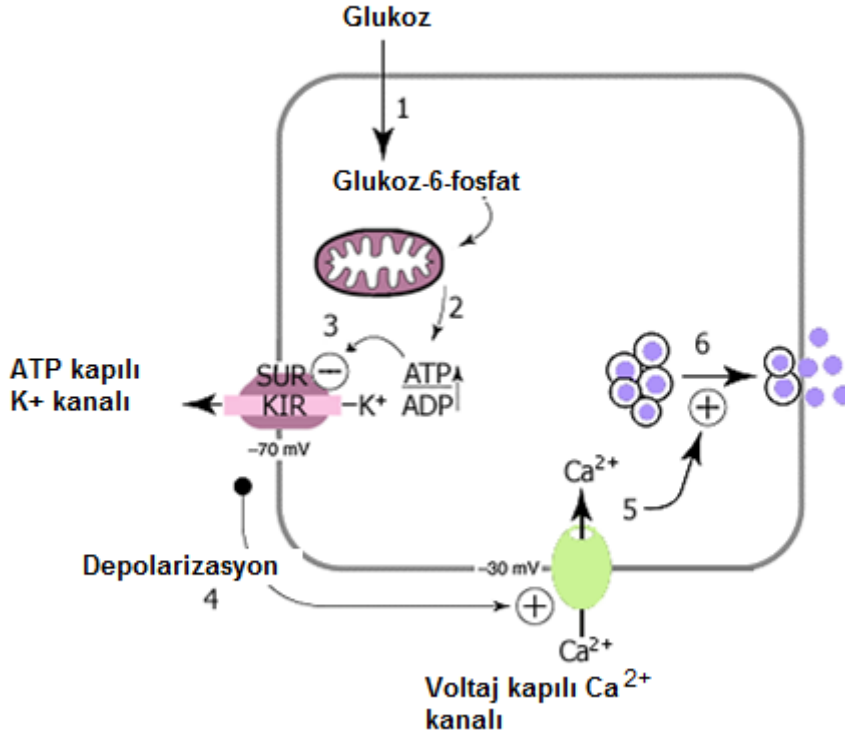
2.3.2İnsülin Biyosentezi

İnsülin sentezi 11.kromozomun kısa kolundaki insülin geninin translasyonu ile başlar. İnsülin geni iki intron ve üç ekzon içerir (67). Translasyonla 110 aminoasit uzunluğundaki bir proteini kodlayan mRNA ürünü oluşur. Bu molekül preproinsülin olarak adlandırılır ve inaktiftir. 11.5 kDa ağırlığındaki preproinsülinin amino ucunda 23 amino asitten oluşmuş bir sinyal dizisi bulunmaktadır. Sinyal dizisinin ayrılması ile 9 kDa molekül ağırlıklı, biyolojik aktivitesi insülininden %5 daha az olan proinsülin oluşur (86, 82). Proinsülin insüline çevrilirken bağlayıcı peptid olan C-peptid açığa çıkar. Normal olarak β hücrelerinde salınan ürünün %90-97 si insülin ve buna eşdeğer molaritede C peptididir. Geri kalanın çoğu proinsüлиндir (şekil 2-4) (55,67).



Şekil 2-4: Hücrede insülin biyosentezi (85).

2.3.3.İnsülin salınımı



Şekil 2-5: Hücre içinden insülin salınımı (74).

1. Glukoz β hücrelerine glukoz taşıyıcısı 2 (GLUT-2) ile taşınır. Glukoz metabolizmasındaki ilk adım glukozun glukoz-6-fosfata fosforilasyonudur. Bu adım glukokinaz tarafından katalize edilir.
2. Glukoz metabolizması işlerken, mitokondride ATP üretilir.
3. ATP/ADP oranının artması β hücre membranındaki ATP kapılı potasyum (K) kanallarının kapanmasına neden olur. Pozitif yüklü K^+ iyonlarının β hüresinden ayrılması engellenmiş olur.
4. β hücrelerinin içindeki pozitif yükün artması depolarizasyona sebep olur.
5. Voltaj kapılı Ca^{2+} kanalları açılır ve Ca^{2+} iyonlarının hücre içine geçişine izin verilir.
6. Hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunun artması insülinin ekzositozla salınımını tetikler (Şekil 2-5) (74).

Glukozdaki artışa cevap olarak insülinin salınımının iki fazı vardır. İlki, insülinin ani salınımı: salgı granüllerinde depolanan önceden şekillenmiş insülinin sitoplazmadaki Ca^{2+} artışı ile salınmasıdır. Kısa bir aradan sonra ise yeni sentezlenmiş insülinin daha uzun süreli salınımı görülür. İnsülin enzimleri tarafından yıkılmadan ancak kısa bir süre aktiftir. İnsülinaz karaciğer ve böbreklerde bulunur ve plazmada dolaşan insülini yıkıma uğratar. İnsülin yarı ömrü yaklaşık 6 dakikadır (74, 67, 55, 35).

İnsülinin anabolik faaliyetlerindeki ana hedefleri, karaciğer, yağ doku ve kaslardır. İnsülin karaciğerde glikojen sentetazı stimüle edip, glikojen fosforilazı inhibe ederek glikojen sentezini ilerletir. İnsülin, kaslara ve yağ dokuya glukoz alınımını indükler. Kaslarda glukoz glikojene, yağ dokuda trigliserit olarak depolanmak üzere yağ asitlerine dönüşür. İnsülin amino asitlerin kaslara alınımını da stimüle eder. Aynı zamanda karaciğerde glikojenin yıkımını, kaslardan amino asitlerin, yağ dokudan serbest yağ asitlerinin salınımını inhibe eder. Bu da DM hastalarındaki normal ya da artan açlık durumuna rağmen görülen kilo kaybını bir anlamda açıklamaktadır (85).

İnsülinin, glukozun karaciğere alınımını arttırarak hiperglisemi üzerindeki direkt etkisine ek olarak kan glukozunun düzenlenmesinde önemli bir rolü vardır. İnsülin β hücrelerinde hiperglisemiye cevap olarak üretilirler. β hücreleri glukozu GLUT-2 taşıyıcısı ile geçirendirler. Kan glukozunun artması glikolizis ve sitrik asit döngüsü yoluyla metabolik sıvının artmasına ve ATP üretimine sebep olur. ATP deki artış, ATP-bağımlı K^+ kanallarını inhibe eder β hücre membranında depolarizasyona sebep olur, böylece Ca^{2+} un voltaj-bağımlı Ca^{2+} kanallarından akmasını arttırarak insülinin ekzositozunu stimüle eder. Kandaki insülin konsantrasyonu, glukoz konsantrasyonuna paraleldir. İnsülinin β hücrelerinden salınımını sağlayan diğer maddeler, amino asitler, serbest yağ asitleri, keton cisimcikleri, glukagon, sekretin dir (82).

2.3.4.T2DM da insulin

İnsülin yetersizliğinin anahtar bulgularından bir tanesi çeşitli dokulara glukoz girişindeki azalmadır. Kısmen glukagon fazlalığına da bağlı olarak karaciğerden glukozun net salınımı artar. Bunun sonucu hiperglisemi oluşur ve glikozüri ve dehidratasyon yapan osmotik diürece yol açar. Dehidratasyon polidipsiye yol açar. Hücre içi glukoz eksikliğinden iştah kamçılanır, proteinden glukoz yapılır

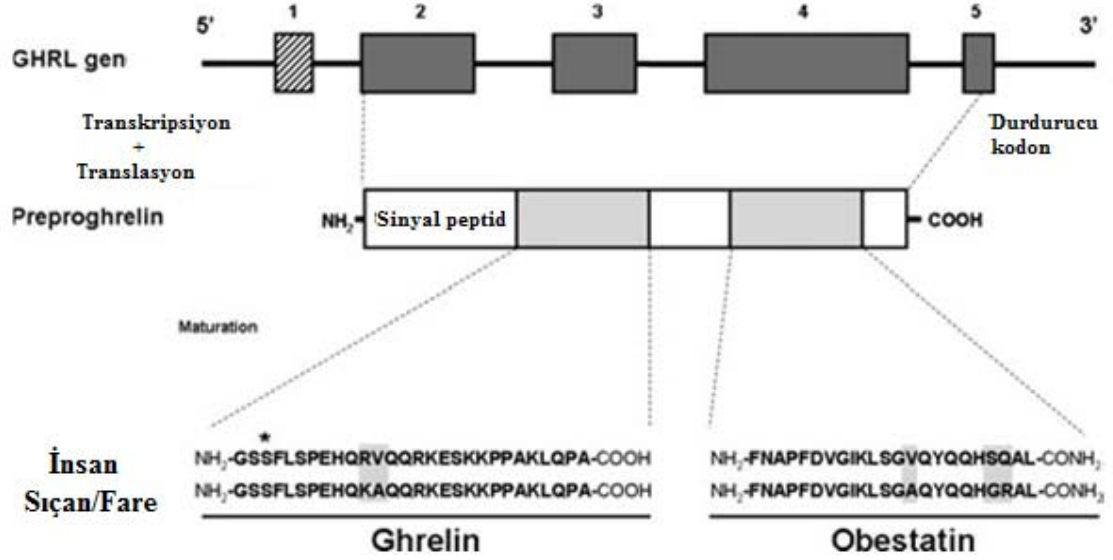
(glukoneogenez) ve enerji sağlanması protein ve yağların metabolizması ile sürdürülür. Sonuç olarak kilo kaybı, zayıf düşürücü protein eksikliği görülür (67).

2.4.OBESTATİN

Zhang ve arkadaşları 2005 yılında, yeni keşfedilmiş insan ghrelin geninin 11 memeli türünde preproghrelin dizilerini karşılaştırırken ghrelin ilişkili olarak obestatin ismini verdikleri yeni bir peptid keşfetmişlerdir (45). Anoreksi oluşturan etkilerinden dolayı bu peptide Latince ‘obedere’ yemeği bir çırpıda silip süpürmek ve ‘statin’ baskılamak kelimelerinin birleşiminden oluşturulmuş obestatin ismi verilmiştir (128, 78). Obestatin ghrelin geni tarafından kodlanan, preproghrelinin konvertaz enzimi ile kesilerek sentezlenen, ve sıçan mide mukozasından izole edilen 23 aminoasitli yeni bir hormondur (39, 40, 44, 65, 73, 95). Ghrelin geni 3. kromozoma (3p25–26) yerleşmiş (56) 5 kb uzunluğunda beş ekzon içeren 117 aminoasitlik preprohormonu kodlar. Preprohormon sinyal peptidi ikinci ekzondan, ghrelin peptidi üçüncü ekzondan ve obestatin dördüncü ekzondan kodlanmaktadır (Şekil 2-6) (104). Obestatin preproghrelin peptidinin 76-98 amino asitlerinin posttranslasyonel işlemleriyle oluşur (97, 98). Proghrelinin karboksil ucundan obestatin, N- terminal ucundan ghrelin türevlenir (44). Obestatin dizilerinin sıçan ve farelerde %100 identik olduğu ileri sürülmektedir (98). Kemiricilerde ve insanlarda obestatin %87 ve GPR-39 (%93) dizileri homologtur (12, 78, 95).

Ghrelinin amino ucunun açılmesi gibi posttranslasyonel modifikasyonlara benzer olarak obestatinin biyolojik aktivitesi de karboksil ucunun glisin kalıntısının amidasyonuna bağlıdır (78, 95, 98, 128). Obestatinin aktif (amitlenmiş) ve inaktif olmak üzere 2 formu vardır (12, 73). Dolaşımdaki amitlenmiş ve amitlenmemiş obestatin seviyeleri henüz saptanamamıştır (78). Mideden salınan obestatinin endokrin düzenleyici görevleri bildirilmiştir. (65). Hayvan deneyleri obestatinin ghrelinin tersine etkileri olduğunu göstermiştir (Şekil 2-7) (52). Sıçanların mideleri çıkarıldığında dolaşımdaki ghrelin ve obestatin miktarların %50-80 arasında azaldığı gözlenmiştir (98). Obestatinin yarı ömrü iki dakikadır, dolaşımda çok hızlı yıkılır (12, 39, 98). Sıçan

plazmasında obestatin seviyesi yaklaşık olarak 0.32 ng/ml dir (98). Obestatinin kan beyin bariyerini geçemediği bildirilmiştir (87).



Şekil 2-6: Ghrelin geninden obestatin sentezlenmesi (39).

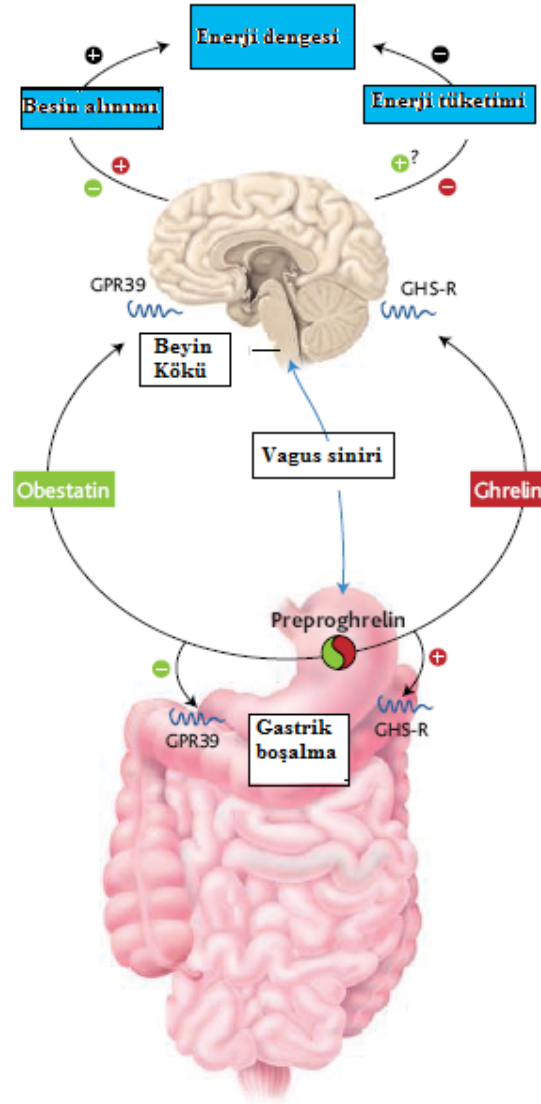
Son çalışmalar G-protein bağlı reseptör (GPCR) ailesinde yeni bir alt aile göstermiştir. Bu yeni alt aile, neurotensin 1 ve 2, neuromedin U 1 ve 2 ,büyüme hormonu salgı reseptör (GHS-R1) ghrelin reseptörü olarak adlandırılan (GHS-R), motilin (GPR-38) ve GPR-39 dan oluşmaktadır. Bu ailede en az bilinen GPR-39 reseptörüdür. (105). Obestatin rodopsin reseptörleri ailesinden GPR-39 reseptörüne karakteristik olarak bağlanmaktadır (39, 56, 65, 109). GPR39 bir G protein ilişkili ve yedi trans membran bölgesi olan büyüme hormonu salgı reseptörü olarak tanımlanmıştır. (44, 126). GPR-39 insan ve sıçanda mide, ince barsak, hipofiz, hipotalamus, yağ dokuda jejunum,duodenum, ileum, karaciğer ve serebral kortekste eksprese olmaktadır (44, 109, 126, 128). GPR-39 jejunum ve duodenumda bol miktarda, oldukça az miktarda kalp, pankreas, serebellum, serebrum, böbrek, kolon ve akciğerde de bulunmaktadır (65, 126).

GPR39 un endojen ligandı Zhang ve ark. obestatinini keşfedene dek bilinmemekteydi (16). Çalışmaların çoğu obestatinin GPR39 ligandı olduğunu bildirirse de obestatinin

GPR-39 reseptörüne bağlanmadığını bildiren çalışmalarda vardır (19). Obestatin GPR-39 reseptörüyle etkileşime geçerek ghrelinin uyarıcı etkisini ters etki eder (39). Holst ve ark. GPR39 un ligandının Zn^{2+} olduğunu ileri sürmektedirler (52). Obestatinin GPR39 ligandı olup olmadığı konusunda henüz kesin bir fikir birliğine varılamamıştır (126).

Obestatin mide, pankreas, duodenum, jejunum, kolon, ve testislerde gösterilmiştir (30, 43, 44, 129). Gastrointestinal sistemde obestatin immünreaktivitesi mide mukoza hücrelerinde, ve myenterik pleksus da saptanmıştır (30). Obestatin mide mukozasında A benzeri hücrelerden salgılandığı bildirilmiştir (32). Testiste obestatin Leyding hücrelerinde gösterilmiştir (98). Obestatin erişkin sıçan midesinde bol miktarda bulunur ve açlığı durdurucu etkilerinin GPR-39 reseptörü ile gerçekleştiği ileri sürülmüştür (18). Obestatinin alınımının mide boşalmasını yavaşlattığı ve ghrelinin beslenmeye olan uyarıcı etkisine karşı ters etki yarattığı belirtilmiştir (39).

Obestatin immünreaktivitesi sıçan ve insan pankreasında adacık hücrelerinin sitoplazmalarında bildirilmiştir (42, 98, 129). Çift immunohistokimya yöntemi ile obestatin ve ghrelinin adacıkların periferinde ko-lokalize, somatostatin, glukagon ve insülin ile ko-lokalize olmadıkları gösterilmiştir (98).



Şekil 2-7: Obestatin ve ghrelin peptid hormonlarının zıt fonksiyonlarının şematik gösterilimi (78).

Obestatin fizyolojik işlevleri olan bir peptid olmasına rağmen obestatinin insanlar üzerindeki etkileri tam olarak bilinmemektedir (56). Ghrelin açlığı uyaran bir peptid iken, obestatin açlığı baskılayan anoreksijenik bir peptid olarak görünmektedir (45). Obestatinin gastrointestinal hareketin düzenlenmesinde rolü olduğu ve enerji dengesi bakımından ghrelinle ters çalıştığı gösterilmiştir. (7, 15, 128). Moechars ve ark. GPR-39 geni delesyona uğratılmış farelerde mide boşalma hızının arttığını bildirmişlerdir (80). Obestatinin dozuna bağlı olarak insan retina epitel hücrelerinde farklılaşmaya (14), bellek ve endişe üzerinde çeşitli etkilere neden olduğu (15), kortikal nöronlarda

sitozolik kalsiyum konsantrasyonlarını arttırdığı (30) ve su içme isteğini engellediği bildirilmiştir (101). Obestatinin glukoz homeostazı (117), hormon salınımları, uyuma (30), vücut ağırlığı ve enerji tüketimi üzerine etkileri gösterilmiştir. Plazma obestatin konsantrasyonları obezite, yüksek karbonhidratlı besin alınımı ve açlık-tokluk durumlarında değişmektedir (40).

2.5.GHRELİN

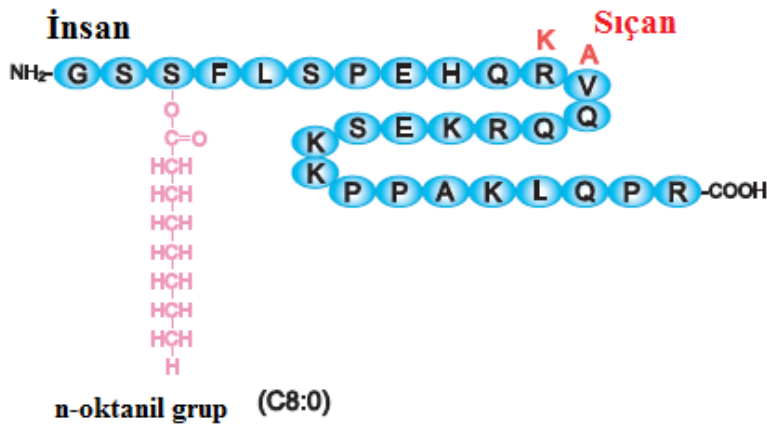
Kojima ve ark.tarafından büyüme hormonu salgılatıcı (secretagogue) (GHS) reseptörünün endojen ligandı olan ghrelini 1999 yılında tanımlamışlardır (70). Ghre kelimesi büyüme anlamına gelen Hint-avrupa kökenli ve bir kelimedir (57). Ghrelin sıçan midesinden izole edilen 28 amino asitlik bir peptiddir. Ghrelin peptidi, memeliler dışında amfibilerde, kuşlarda, balıklarda da saptanmıştır (78). Memelilerde ghrelin homologları insan, sıçan, rhesus maymunu, fare, gerbil, inek, domuz, koyun ve köpeklerde tanımlanmıştır. Memelilerde ghrelin amino asit dizileri yüksek oranda korunmuştur. İnsan ve sıçan ghrelinleri arasında sadece iki aminoasit fark bulunur (78).

İnsan ghrelin geni 3. kromozom üzerinde 3p25-26 üzerinde bulunur (56) ve 117 aminoasitlik preprohormonu oluşturur (104). İnsan ve fare ghrelin geni 5 ekzon içermektedir. Kısa olan ilk ekzon 20 bp uzunluğundadır ve translasyona uğramaz (40, 54). Ghrelin geninde birisi -80 diğeri ise ATG başlangıç kodonuna yakın olan -555 bölgesinde olmak üzere iki tane transkripsiyon başlangıç bölgesi bulunur. A ve B olmak üzere iki ayrı mRNA transkripti oluşur (78) (Şekil 2-9). Sıçan ve fare ghrelin genlerinde glutamin 14 (Gln14) CAG kodonu iki ayrı ghrelin mRNA sını oluşturmada alternatif kesim sinyali olarak kullanılır. Ghrelin ve des Gln 14 –ghrelin öncülleri oluşur. Des-Gln14, ghrelinle Gln14 delesyonu hariç benzerdir (78).

Ghrelin peptidinin hem aktif hem de aktif olmayan formları insan vücudunda bulunmaktadır (69). Ghrelinin dokularda ve plazmada iki ana formu bulunur; ghrelin peptidinin üçüncü aminoasiti olan Serinin (Ser) n-oktanoik asitle modifikasyona uğrayan biyolojik olarak aktif formu ve inaktif des-açıl ghrelin formudur (Şekil 2-8) (54). İnsan plazmasında n-oktanyl ghrelin 10–20 fmol/ml, total ghrelin ise 100–150 fmol/ml konsantrasyonlarda saptanmıştır (20). Plazma ghrelin konsantrasyonları açlık durumunda artar (20). Kanda ghrelinin des-açıl formu açillenmiş ghrelininden çok daha

yüksek düzeylerde bulunur (69). Tüm omurgalı türlerinde ghrelinin esas olarak mide fundus bölgesinde üretilmektedir (1, 23). Ghrelinin immunreaktif hücreler mide, pankreas, duodenum, jejunum, ileum, kolon, böbrek, testis, hipofiz, hipotalamus, akciğer, plasenta, ovaryum, dalak, meme bezleri ve tümör dokularında tespit edilmiştir (78, 104, 115, 129).

Sıçan pankreasında HPLC ve ghrelinin RIA analizleriyle ghrelinin ve des-asetil formunun bulunduğu saptanmıştır (54). Pankreas adacığında ghrelinin salgılayan hücre tipi henüz tanımlanamamıştır (93). Wierup ve ark. ise tanımlamıştır (123,124). Pankreatik ghrelinin ekspresyonu prenatal ve neonatal evrede oldukça fazladır. Oysa mideden salgılanan ghrelinin seviyeleri prenatal evrede düşükken doğumdan sonra artış göstermektedir (49).



Şekil 2-8: İnsan ve sıçan ghrelininin n-oktanoik asitle modifikasyona uğramış formların şematik gösterimi (78).

göstermiştir. Ghrelin GHS-R ile etkileşime girerek hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunu inositol 1,4,5-trisfosfat (IP_3) aracılığıyla artırır ve büyüme hormonu (GH) salgılanır (78).

Ghrelinin büyüme hormonu salınımı düzenlenmesinde açlık-tokluk ve karbonhidrat mekanizmasında önemli rolleri vardır (48). Ghrelin GH salınımını doza bağlı olarak in vitro ve in vivo da tetikler. Ghrelinin iv enjeksiyonu ile insan ve sıçanlarda GH salınması artar (78). Ghrelin hipofiz hormonlarının salınımını, besin alımının artışı, mide hareketliliğini ve pankreatik polipeptid salınımını kontrol eder (1, 78). Ghrelinin insülin salınımı üzerindeki etkileri henüz netlik kazanmamıştır. Ghrelinin insülin salınımını tetiklediğini (22, 31, 43, 75) gösteren yayınların yanında durdurduğunu (27, 98, 123,) bildirenler de vardır. Plazma ghrelin ve insülin seviyeleri kan glukoz seviyesinden etkilenmektedir. Ghrelinin kültürdeki adacık hücrelerinde glukozun yüksek konsantrasyonlarının (8.3 Mm) insülin salınımını uyardığını bildirmişlerdir (22).

2.6.İMMUNOHİSTOKİMYA YÖNTEMİ

İmmunohistokimya, işaretlenmiş antikolar kullanılarak doku antijenlerinin buldukları yerde mikroskopik gösterilmesini sağlayan bir yöntemdir. Bu yöntem için genellikle parafin kesitler tercih edilir kriyostat ve rezin kesitler de kullanılmaktadır. Bu yöntemde dokuda gösterilmek istenilen antijene karşı geliştirilmiş monoklonal ya da poliklonal antikolar kullanılarak antijen-antikor kompleksi oluşur. Bu kompleksin mikroskop altında görünür olması için birtakım işaretleyiciler kullanılmaktadır. Bu işaretleyicilere göre yöntem üçe ayrılır (112).

1-İmmunfluoresan Yöntemi : Bu yöntemde uygun dalga boyundaki ışıkta, fluoresan yayan fluorokromların antikolara bağlanabilen çeşitli tipleri vardır. En çok kullanılanlar fluoresin izotiyosiyanat (FITC) yeşil, Teksas kırmızısı ve rodamin ile kırmızı, amino-metil-kumarin asetik asit (AMCA) ise mavi renkte fluoresan yayarlar.

2-İmmunenzim Yöntemi : Bu yöntemde işaret maddesi olarak bir enzim kullanılır.Bu enzim antikolara kolayca bağlanan düşük molekül ağırlıklıdır. Enzimlerle sinyal

oluşturan sistemler, antijen-antikor kompleksinde görülebilen bir ürünün çökmesini sağlamaktadır.

En sık kullanılan enzimler peroksidaz ve alkali fosfotazdır. Kullanılacak enzimin seçimi materyale bağlıdır. Enzimlerle saptama yöntemlerinin temel üstünlüğü preparatlarda reaksiyon ürününün uzun süre saklanabilmesidir. Ayrıca morfoloji daha iyi görüldüğü için antijen-antikor kompleksinin kesin yerleşim yerinin belirlenebilmesi ve sinyalin mikroskopla gözlenebilmesidir (112, 127).

3-İmmunmetal Yöntemi : Bu yöntemde antikorlar işaret maddesi olarak Fe, Ag, Au ile bağlanırlar. Antijen-antikor kompleksi hem ışık hem de elektron mikroskop düzeyinde görülebilir.

İmmunohistokimya ile antijen yerleşimi iki metod ile gösterilir:

I-Direkt metod: Belli bir antijeni taşıyan doku kesiti işaretli antikor ile inkübe edilir ve oluşan işaretli kompleks mikroskopta antijenin yeri olarak gözlenir.

II- İndirekt metod: Bu metotta işaretli primer antikor normal dokuda bulunan antijenle reaksiyona sokulur. Sonra işaretli ikinci antikor ile inkübe edilir ve antijenin yeri işaretlenmeye uygun mikroskopta görülür (17).

II-I. Streptavidin Biotin Yöntemi

Avidin, yumurta akından elde edilen bir glikoproteindir. Avidin suda eriyen vitaminlerden biotine karşı yüksek affinite gösterir. Avidin, biotinle bağlanan dört bölge içerir. Biotin, işaretleme maddesi olarak birinci veya ikinci antikore bağlanabilir. İşaretin ortaya çıkarılması için avidin kullanılır. Bu yöntemin dezavantajları; avidin,yüksek bir izoelektrik noktaya sahiptir. Nötr pH da pozitif yüklenir. Bu nedenle dokudaki nukleus gibi negatif yüklü moleküllere bağlanabilir. Yüzey lektinleri gibi karbonhidrat molekülleriyle reaksiyona girebilir. Avidinin yerine kullanılabilen bir molekül olan streptavidin ise *Streptomyces avidinii* adlı bakteriden izole edilen bir proteindir. Avidinden farklı olarak yüksüz bir moleküldür ve özgün olmayan elektrostatik bağlanmalar daha az görülür (112, 127).

Kromojenler:

İmmunohistokimya yönteminde enzim-substrat kompleks ürününün mikroskopta renkli gözlenebilmesi için bazı maddeler kullanılır. Çoğunlukla kullanılan AEC (3-Amino-9 etil karbazole) reaksiyon ürünü kırmızı renklidir. AEC ışığa karşı çok hassas olduğundan boyama işlemi ve saklama karanlıkta olmalıdır. Diğer kromojenlerden DAB (3-3' Diaminobenzidine); reaksiyon ürünü kahverengi, CN (4-Chloro-1-Naphthol); ve Tetrametil benzidin reaksiyon ürünleri mavidir (50, 112).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Laboratuvar'ından temin edilen Wistar tipi albino gebe sıçanların yeni doğan yavruları kullanıldı. Doğumu takiben yeni doğan sıçanlar 48 saatlik olduklarında deney gruplarına alındılar. Toplam dört grup oluşturuldu.

Grup I (n=13): Fizyolojik su verilen kontrol (K) grubu

Dört hafta süre ile intraperitoneal olarak serum fizyolojik verilen sıçanlardan oluşturuldu.

Grup II (n=13): Ghrelin (GHR) verilen kontrol grubu

Yeni doğan sıçan grubuna üçüncü günden itibaren 100 µg/kg/gün ghrelin (AnaSpec cat no: 24160) fizyolojik suda çözündürülüp subkutan enjeksiyon ile dört hafta süresince verildi.

Grup III (n=9): Yeni doğan- streptozotosin (n2- STZ) diyabetik grup

Doğumu izleyen ikinci günde serum fizyolojik içinde eritilmiş 100 mg/kg STZ tek doz i.p olarak verildi.

Yeni doğan (doğumun ikinci günü) sıçanlara 100 mg/kg STZ enjeksiyonu takiben kronik hiperglisemi ile tip 2 diyabet olduğu ve plasma glukoz konsantrasyonlarının 200-350 mg/dl olduğu bildirilmiştir (9). Sıçanların STZ enjeksiyonundan sonraki ikinci günde kan glukoz düzeyleri 200 mg/dl ve üzeri olan hayvanlar diyabetik olarak kabul edildi.

Grup IV (n=7): Ghrelin verilen n2- STZ-diyabetik grup (STZ+GHR)

Yeni doğan sıçan grubuna doğumun ikinci gününde 100 mg/kg STZ fizyolojik suda çözündürülüp tek doz i.p olarak verildi. Diyabetik sıçanlara 100 µg/kg/gün ghrelin s.c enjeksiyon ile fizyolojik suda çözündürülmüş olarak dört hafta süre ile verildi.

0.gün, 1., 2., 3. ve 4. haftalarda tüm gruptaki hayvanların kan glukoz düzeyi ölçümleri kuyruk veninden alınan kan kullanılarak glukometre ile yapıldı (Accu-check, Roche). Aynı zaman aralıklarında hayvanların vücut ağırlıkları da ölçüldü. STZ-diyabetik ve STZ+GHR gruplarındaki hayvanların diyabet olduğunun tespit edildiği ikinci gün, deneyin 0. günü olarak alındı.

Sıçanlar *ad libitum* ve çeşme suyu ile beslendiler. Dört hafta sonra bir gece aç bırakılan hayvanlardan eter anestezi altında iken pankreas doku örnekleri alındı. Alınan doku örnekleri %10'luk nötral formalin ile 16 saat +4°C'de tespit edildikten sonra rutin ışık mikroskopi takip yöntemleri kullanılarak parafine gömüldü. Mikrotom ile 5µm kalınlığında alınan parafin doku kesitleri lamlara (Thermo Scientific, Menzel Glaser , Superfrost Plus) alındı. Alınan kesitler bir gece +37°C'lik etüvde bekletilerek dokuların lamlara yapışması sağlandı.

3.1.HİSTOLOJİK İNCELEME

Hematoksilen & Eozin Boyası

1. 5 µm kesitlerin 30 dakika toluolde parafini giderildi ve inen alkol serisinden (%100 - %70) geçirilerek saf suya indirildiler.
2. Hematoksilenle 8 dakika muamele edildi.
3. Asit alkolden geçirildi.
4. Çeşme suyunda 15 dakika morartmaya bırakıldı.
5. Eozinle 1 dakika boyandı.
6. Saf suda çalkalanan kesitler çıkan alkol serisinden (%70 - %100) geçirildi.
7. Toluole alındı ve entellan kapama medyumu ile kapatıldılar.

3.2.İMMUNOHİSTOKİMYASAL BOYAMA

İmmünohistokimyasal boyama için toluolde parafini giderilen 5 µ luk kesitler inen alkol serisinden geçirilip distile suya alındılar. Kesitler fare monoklonal insülin (Sigma I-2018) ve tavşan obestatin (Phoenix H-031-90) antikoları ile inkübe edilerek streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemine göre boyandılar. Histostain Plus Bulk boyama kiti kullanıldı (Zymed Lab.Inc. Cat. No: 85-9043). 3, aminoetil 9, karbazol (AEC) substrat kit (Zymed Lab.Inc. Cat.No:00-2007) ile renk reaksiyonu alındıktan sonra Mayer's hematoksilen zıt boyama yapılarak peptid sinyalleri ışık mikroskopunda incelendi. Boyanma yoğunluğu zayıf (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak birden üçe kadar skorlandı.

Boyama özgüllüğü için kullanılan negatif kontrol kesitlerde, insülin ve obestatin antikoları yerine PBS koyularak işleme devam edildiğinde renk reaksiyonu görülmedi. Obestatin pozitif kontrol olarak ise obestatin ekspresyonunun yüksek olduğu sıçan mide kesitleri kullanıldı.

3.2.1.İNSÜLİN İÇİN İMMUNOHİSTOKİMYASAL OLARAK BOYANMA PROTOKOLÜ

1. Kesitler 30 dakika toluolde parafini giderilmesi için tutuldu ve inen alkol serilerinden (% 100 -%70) geçirilip distile suya alındılar.
2. % 0,3 H₂O₂-methanol'de 10 dakika muamele edildi.
3. PBS ile 3 kez 5 dakika yıkandı.
4. Normal keçi serumu ile 10 dakika tutuldu.
5. İnsülin antikoru kullanılarak (1:1250) kesitler bir gece +4°C nemli ortamda bırakıldılar.
6. PBS ile 3 kez 5 dakika yıkandı.
7. Biotin ile işaretlenmiş ikinci antikor ile 10 dakika muamele edildi.
8. PBS ile 3 kez 5 dakika yıkandı.
9. Streptavidin-Peroksidaz kompleksinde 10 dakika tutuldu edildi.

10. PBS ile 3 kez 5 dakika yıkandı
11. Substrat- kromojen solusyonu ile 1 dakika inkübe edildi.
12. Distile suda çalkalandı.
13. Kesitlere Mayer's hematoksilen zıt boyası yapıldı (10 sn.).
14. Çeşme suyunda yıkandı.
15. PBS de 30 sn. bekletildi.
16. Distile suda yıkandı.
17. Gliserin jel kapama ortamı damlatılarak lamel ile kapatıldı.

3.2.2.OBESTATİN İÇİN İMMUNOHİSTOKİMYASAL OLARAK BOYANMA PROTOKOLÜ

1. Kesitlerin 30 dakika toluolde parafini giderildi ve inen alkol serilerinden (% 100 -%70) geçirilip distile suya alındı.
2. Antijen iyileştirilmesi sitrat tamponu (Lab Vision Cat.No:AP 9003-125) kullanılarak (4 kez 5 dakika) mikrodalgada yapıldı.
3. Kesitler oda sıcaklığına gelene kadar bekletildi ve 5 dakika distile suda yıkandı.
4. % 0,3 H₂O₂-methanol'de 10 dakika muamele edildi.
5. Fosfat tuz tamponu (PBS) ile 3 kez 5 dakika yıkandı.
6. Normal keçi serumu ile 10 dakika muamele edildi.
7. Obestatin antikoru (1:1000) ile kesitler 48 saat +4°C nemli ortamda muamele edildi.
8. PBS ile 3 kez 5 dakika yıkandı.
9. Biotin ile işaretlenmiş 2. antikor ile 10 dakika muamele edildi.
10. PBS ile 3 kez 5 dakika yıkandı.
11. Streptavidin-Peroksidaz kompleksinde 10 dakika tutuldu edildi.
12. PBS ile 3 kez 5 dakika yıkandı.
13. Substrat- kromojen solüsyonu ile 4 dakika inkübe edildi.
14. Distile suda çalkalandı.
15. Kesitlere Mayer's hematoksilen zıt boyası yapıldı (10 sn.)
16. Çeşme suyunda yıkandı.
17. PBS de 30 sn. bekletildi.
18. Distile suda yıkandı.

19. Gliserin jel kapama ortamı damlatılarak lamel ile kapatıldı.

3.3.İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER

İmmunohistokimya uygulanan kesitlerde her bir sıçana ait tek bir kesitteki tüm Langerhans adacıklarında insülin ve obestatin için immun pozitif olan hücreler sayıldı ve her bir grup için toplam immun pozitif hücre sayısı elde edildi. Bu sayı her bir grupta değerlendirilen Langerhans adacığı sayısına bölünerek ortalama değerler bulundu. Leica DM 2500 model ışık mikroskobu kullanılarak fotoğrafları çekilen (x40) pankreas adacıklarının “Leica IM50 Version 4.0” ölçüm programı yardımı ile adacık toplam alanı (μm^2) ve insülin immün pozitif hücrelerin kapladığı alan (μm^2) ölçüldü. Birbirlerine oranlanarak insülin pozitif hücrelerin adacık içerisinde kapladığı alanın yüzdesi hesaplandı. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildi.

İstatistiksel analizler için SPSS 17.0 yazılım programı kullanıldı. İstatistiksel analizler için one-way ANOVA, Kruskal Wallis, Post Hoc Tukey HSD ve Dunn testleri kullanıldı. p değerleri, $p < 0.05$ ‘ten küçük ise anlamlı, $p < 0.01$ ’den küçük ise ileri derecede anlamlı ve $p < 0.001$ ’den küçük ise çok ileri derecede anlamlı olarak kabul edildi.

Adacık Boyut Ölçümü

Tüm gruplarda pankreas doku kesitlerindeki Langerhans adacıklarının “Leica DM 2500” model ışık mikroskobu kullanılarak çeşitli büyütme oranlarında (x20 ve x40) fotoğrafları çekilerek, “Leica IM50 Version 4.0” programı yardımı ile alanları hesaplanıp büyüklüklerine göre küçük, orta ve büyük olarak sınıflandırıldılar. Büyük adacıklar $> 10000\mu\text{m}^2$, Orta büyüklükteki adacıklar $>5000-10000\mu\text{m}^2$, Küçük adacıklar $<5000\mu\text{m}^2$ olarak alındı.

3.4.KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Diethyl eter , Lachema 30128
Toluen, Merck 1.08323.2500
Parafin, Merck 1.07337.1000
Asetik asit, Atabay AA 002 L50
Gliserol, Atabay AS040L50
Jelatin, Sigma G-8150
Ethanol, Merck 1.00986.2500
Streptozotosin, Sigma S0130
Ghrelin, AnaSpec 24160
Na₂HPO₄, Fluka 71640
NaH₂PO₄ Fluka 71496
NaH₂PO₄H₂O, Merck 6345.1000
Na₂HPO₄2H₂O, Merck 1.06576.1000
NaCl, Merck 6400.1000

3.5.KULLANILAN ÇÖZELTİLER

Fosfat Tuz Tamponu (PBS)

NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	2.6 g
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	15.46 g
NaCl	8.41 g
Distile su	1000 ml

%10 luk Nötral formalin

%37 Formaldehid	100 ml
Na ₂ HPO ₄	6.5 g
NaH ₂ PO ₄	3.5 g
Distile su	900 ml

Gliserin jel

Gelatin	1 g
Gliserol	7 ml
Distile su	6 ml

3.6.KULLANILAN ALETLER

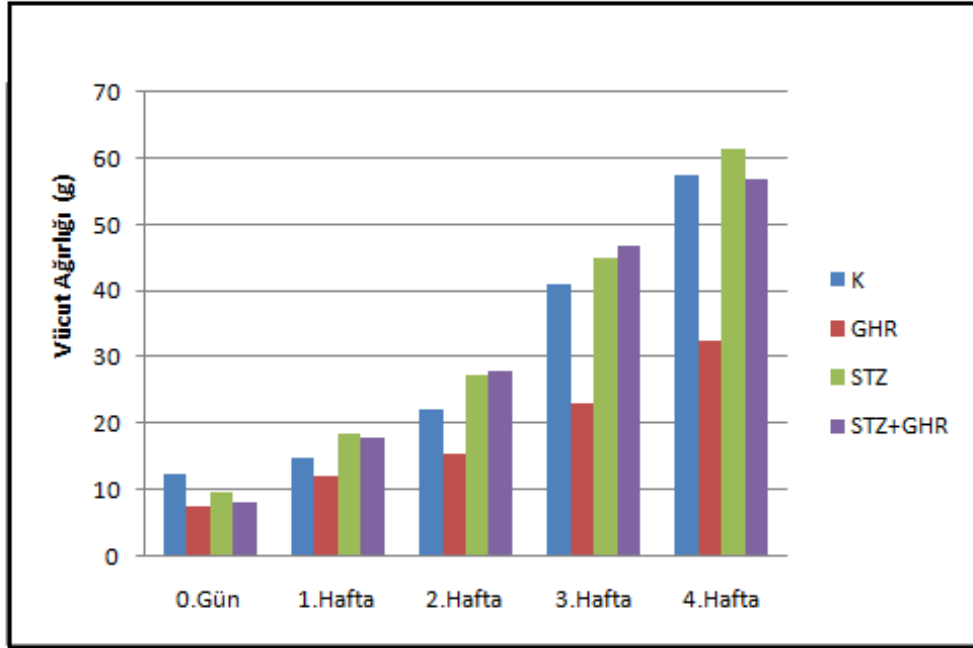
- 1.Etöv, Elektro-Mag M420B
2. Hassas terazi, Ohaus Galaxy 4000
3. Manyetik karıştırıcı, Elektro-Mag M21
4. Mikrodalga fırın, Beko 1550
5. Mikropipetler, Ependorf, Thermo
6. pH metre, Scheat pH-meter CG825
7. Saf su cihazı, Millipore Elix3
8. Isık Mikroskobu- Leica (DM 2500)
9. Isık mikroskobu kamerası, Leica (DFC 280)
10. Su banyosu, Köttermann
11. Mikrotom, Reichert 390965
12. Boyama kabı
13. Buzdolabı, Profilo

4.BULGULAR

4.1 Vücut Ağırlık Değerleri

Kontrol (K), ghrelin kontrol (GHR), STZ-diyabetik (STZ) ve STZ+GHR gruplarına ait sıçanların 0.gün, 1.,2.,3. ve 4. hafta vücut ağırlık değerleri Tablo 1 de verildi. Yeni doğan sıçanların STZ enjeksiyonundan iki gün sonrası 0.gün olarak alındı.

K ve GHR grubu arasında 1.haftada ileri derecede anlamlı ($p<0.01$), 2., 3. ve 4. haftalarda ise çok ileri derecede anlamlı bir fark saptandı ($p<0.001$). K ve STZ grupları arasında 0.gün, 1. ve 2. hafta ölçümlerinde çok ileri derecede anlamlı bir fark görüldü ($p<0.001$). Buna karşılık 3. ve 4. haftalarda ise anlamlı bir fark görülmedi. GHR ve STZ+GHR grupları arasında 0.günde anlamlı bir fark yoktu. 1.,2.,3. ve 4. hafta ölçümlerinde ise iki grup arasında çok ileri derecede anlamlı bir fark bulundu ($p<0.001$). STZ ve STZ+GHR grupları arasında 1.,2.,3. ve 4 hafta ölçümlerinde anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 4-1), (Tablo 4-1).



Şekil 4-1: Dört gruba ait yeni doğan hayvanların vücut ağırlıkları.

Gruplar	Hayvan sayısı (n)	0*.Gün (g)	1.Hafta (g)	2.Hafta (g)	3.Hafta (g)	4.Hafta (g)
K	13	12.34±0.55	14.77±0.73	22.15±0.74	41±6.37	57.38±2.31
GHR	13	7.76±0.38	12.19±0.85	15.42±0.93	23.11±2.45	32.61±3.33
STZ	9	9.66±0.75	18.50±2.52	27.33±1.56	45.11±2.71	61.38±4.15
STZ+GHR	7	8.28±1.11	18.07±2.96	27.92±4.46	46.78±10.89	56.85±7.38

Tablo 4-1: Dört gruba ait ortalama vücut ağırlık değerleri.

Değerler Ortalama ± Standart sapma olarak verildi.

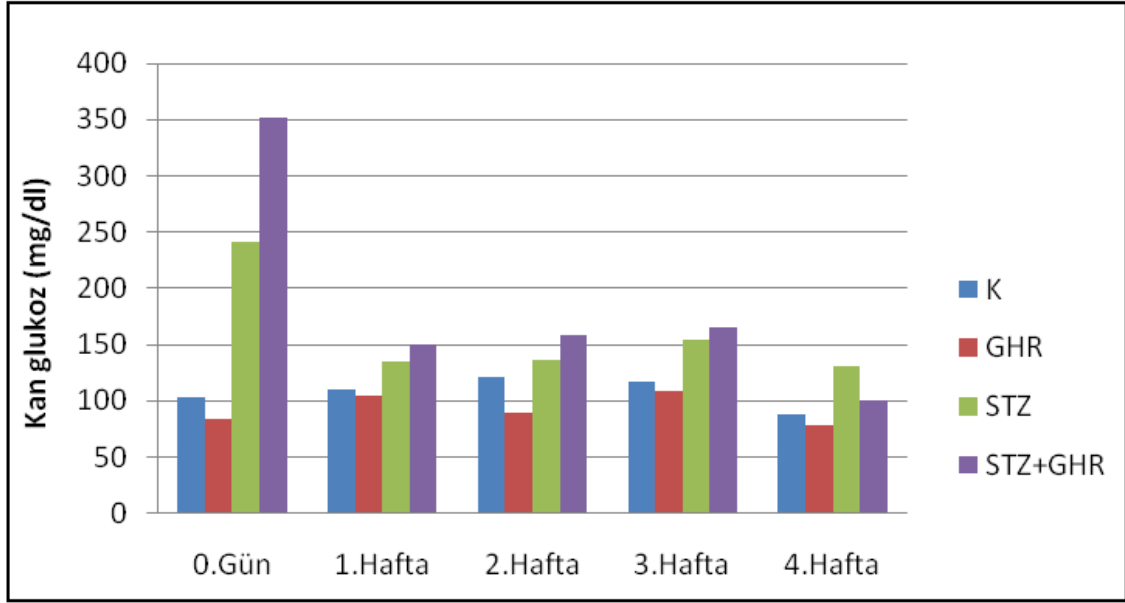
0 . gün; STZ enjeksiyonundan sonraki ikinci gün olarak alındı.

4.2 Kan Glukoz Değerleri

K, GHR, STZ ve STZ+GHR gruplarına ait sıçanların 0.gün, 1.,2.,3. ve 4. hafta kan glukoz değerleri Tablo 2 de verildi. Yeni doğan sıçanların STZ enjeksiyonundan iki gün sonrası 0.gün olarak alındı.

K ve GHR grupları arasında 2. haftada çok ileri derecede anlamlı ($p<0.001$) bir fark bulundu. K ve STZ grupları kan glukoz değerleri bakımından karşılaştırıldığında 0.gün ve 1. , 3. ve 4. hafta ölçümlerinde çok ileri derecede anlamlı iken ($p<0.001$), 2.hafta ölçümlerinde ileri derecede anlamlı ($p<0.01$) bir fark saptandı. K ve STZ+GHR grupları arasında 0.günde 1., 2. ve 3.hafta ölçümlerinde çok ileri derecede anlamlı fark bulundu ($p<0.001$). GHR ve STZ+GHR grupları arasında 0.gün, 1., 2. ve 3.hafta ölçümlerinde çok ileri derecede anlamlı bir fark görüldü.

STZ ve STZ+GHR grupları arasında 1.hafta ölçümlerinde anlamlı bir fark saptandı ($p<0.01$). Bu grubun 2.hafta ölçümlerinde ise çok ileri derecede anlamlı ($p<0.001$) bir fark gözlemlendi, 3. hafta ölçümlerinde anlamlı bir fark saptanmadı ve 4. hafta ölçümlerinde ise ileri derecede anlamlı bir fark bulundu ($p<0.01$). (Şekil 4-2), (Tablo4-2).



Şekil 4-2:Dört gruba ait yeni doğan sıçanların kan glukoz ölçümleri.

Gruplar	Hayvan sayısı (n)	0*.Gün (mg/dl)	1.Hafta (mg/dl)	2.Hafta (mg/dl)	3.Hafta (mg/dl)	4.Hafta (mg/dl)
K	13	103±3.76	110.84±4.43	121.53±7.80	117.76±6.22	88.69±8.82
GHR	13	83.76±8.31	104.30±8.12	89.76±9.20	109±9.59	78.15±4.91
STZ	9	241.44±32.79	134.55±11.47	135.88±9.64	155±25.10	130.44±20.60
STZ+GHR	7	352±37.69	151±21.27	159.14±7.24	165.28±30.33	100.57±26.01

Tablo 4-2: Dört gruba ait ortalama kan glukoz değerleri. Ortalama ± Standart sapma.

0 . Gün STZ enjeksiyonundan sonraki ikinci gündür.

4.3 Adacık Boyutu

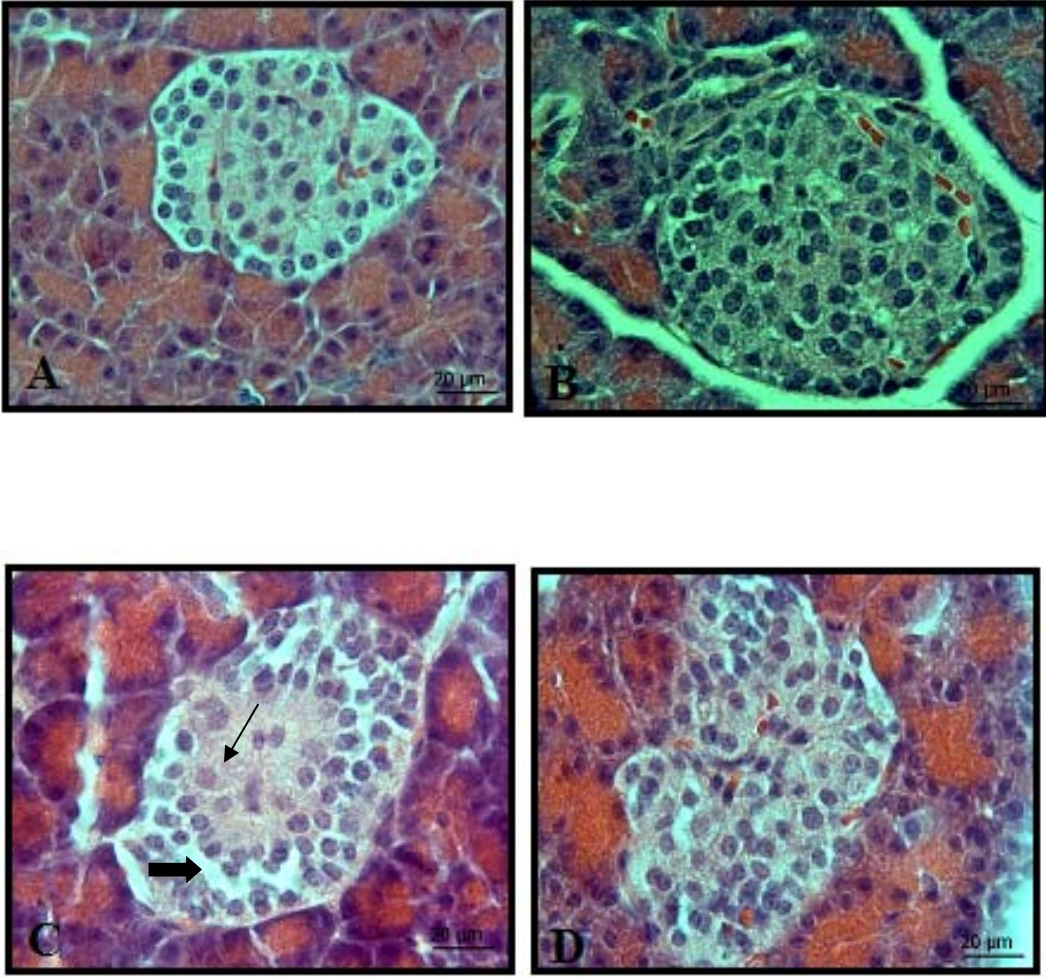
Kontrol grubu hayvanların diğer gruplara kıyasla en fazla büyük boyuttaki adacıklara sahip olduğu gözlemlendi. STZ-diyabetik grup diğer gruplarla karşılaştırıldığında küçük boy adacık yüzdesinin en fazla olduğu gözlemlendi. Adacık boyutları bakımından STZ-diyabetik grup STZ+GHR verilen grup ile kıyaslandığında, STZ+GHR verilen grupta büyük boyuttaki adacıkların fazla olduğu gözlemlendi (Tablo 4-3).

Langerhans adacıkları	K %	GHR %	STZ %	STZ+GHR %
Büyük	18,5	14,5	2,4	7
Orta	21,3	12,5	20,8	14
Küçük	60,2	73	76,8	79

Tablo 4-3: Langerhans adacıklarının boyutlarına göre dağılım yüzdeleri.

4.4 Histolojik Bulgular

Dört grupta her bir hayvana ait pankreas kesitlerine Hematoksilen & Eosin (H&E) boyası uygulandı. Her iki kontrol grubuna ait pankreas kesitleri H&E ile incelendiğinde genel adacık düzeninde ve yapısında belirgin bir fark gözlenmedi (Resim 4-1A, 4-1B). STZ –diyabetik grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında Langerhans adacıklarında dejeneratif değişiklikler gözlemlendi. Ayrıca bu grupta hipertrofik hücrelere rastlanıldı (Resim 4-1C). STZ + GHR verilen gruba ait kesitlerde, Langerhans adacıklarında dejeneratif değişikliklerin azaldığı ve normal görünümüne yaklaştığı tespit edildi.(Resim 4-1D).



Resim 4-1: Kontrol (A) , Ghrelin kontrol (B), STZ-diyabetik (C), STZ-diyabetik + GHR verilen (D) sıçan pankreasları. Dejeneratif değişikler (**→**). Hipertrofik hücreler (**→**). Hematoksilen & Eozin.

4.5 İmmunohistokimya Bulguları

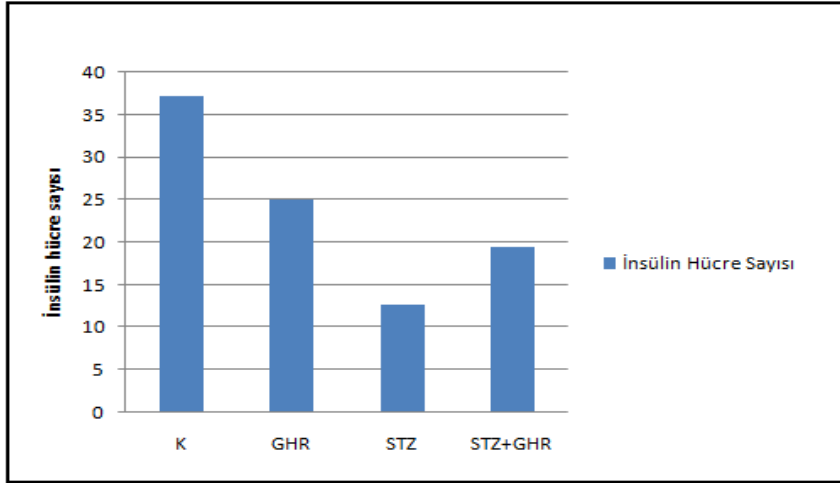
4.5.1 İnsülin

Pankreas kesitlerine insülin antikoruna ile streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi uygulandığında, sitoplazmaları boyanan hücreler insülin immün pozitif hücreler olarak değerlendirildi. Dört grup arasında one-way ANOVA ile anlamlı bir fark bulundu.

Kontrol ile GHR gruplarına ait kesitler insülin immün pozitif hücre sayısı bakımından istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptandı ($p < 0.05$). Kontrol ile STZ –diyabetik grup karşılaştırıldığında çok ileri derecede anlamlı bir fark görüldü ($p < 0.001$). STZ –diyabetik grup ile STZ+GHR verilen grup karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamasına rağmen STZ+GHR verilen grupta insülin immün pozitif hücre sayısının arttığı gözlemlendi (Tablo 4-4) (Şekil 4-3) (Resim 4-2,3,4,5).

İnsülin immün pozitif hücreler reaksiyon şiddetine göre değerlendirildiğinde STZ-diyabetik grubun diğer gruplara göre daha zayıf immünreaksiyona sahip olduğu görüldü (Tablo 4-5).

Ortalama adacık alanı bakımından iki kontrol grubu arasında anlamlı bir fark saptanmadı. Oysa kontrol ile STZ –diyabetik grubu arasında anlamlı bir fark saptandı ($p < 0.05$). STZ -diyabetik grup STZ+GHR verilen grupla karşılaştırıldığında Langerhans adacıklarında insülin pozitif hücre alanında artış görülmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Beta hücre alanı bakımından iki kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı ($p < 0.05$). Kontrol ile STZ –diyabetik grubu istatistiksel olarak karşılaştırıldığında insülin pozitif hücre alanının STZ-diyabetik hayvanlarda azaldığı bulundu ($p < 0.001$). (Şekil 4-4) (Tablo 4-6).



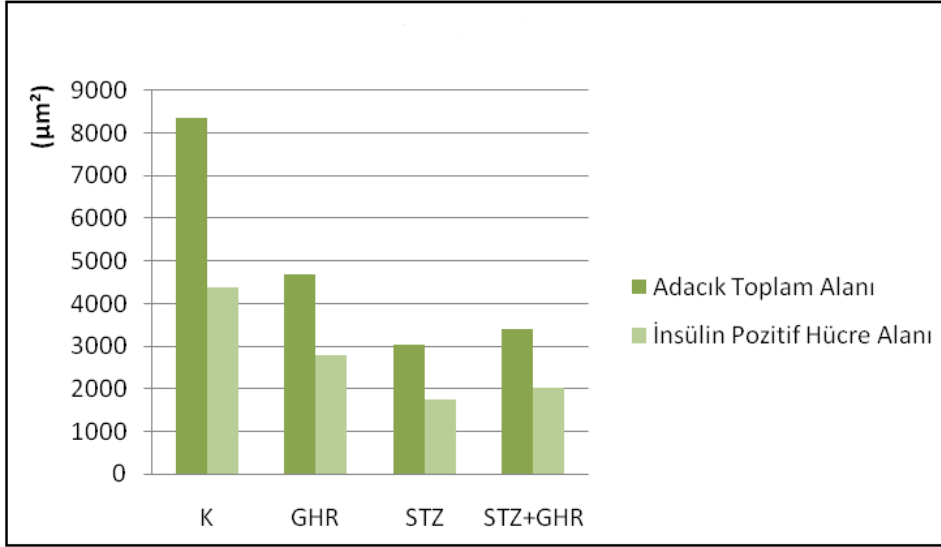
Şekil 4-3: Kontrol, GHR kontrol, STZ-diyabetik ve STZ+GHR verilen gruplara ait pankreas dokusunda insülin pozitif hücrelerin ortalama değerleri.

Gruplar	n*	Toplam β hücre sayısı	Ortalama değer \pm Standart sapma
K (n=8)	104	3866	37.17 \pm 44.10
GHR (n=8)	104	2615	25.13 \pm 31.77
STZ (n=8)	83	1061	12.78 \pm 9.21
STZ+GHR (n=7)	86	1673	19.45 \pm 14.33

Tablo 4-4: Dört gruba ait Langerhans adacıklarındaki ortalama insülin immün pozitif hücre sayıları. n= hayvanı sayısı, n*= değerlendirmeye alınan toplam adacık sayısı.

Gruplar	K	GHR	STZ	STZ+GHR
İmmünreaksiyon şiddeti	++	++	+	++

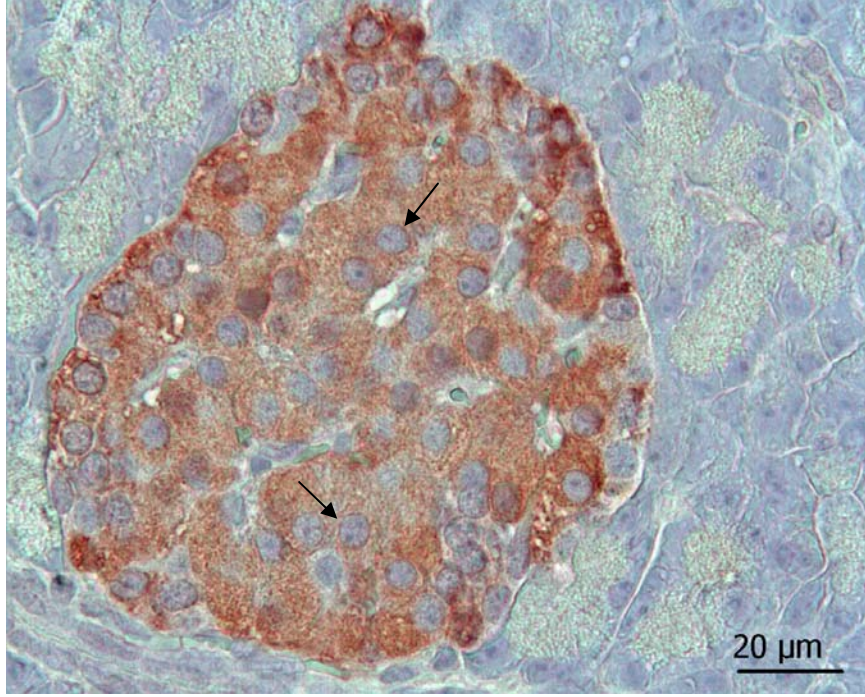
Tablo 4-5: İmmunohistokimya uygulanan kesitlerde immünreaksiyon yoğunluğu. Zayıf (+), orta (++) ve şiddetli (+++).



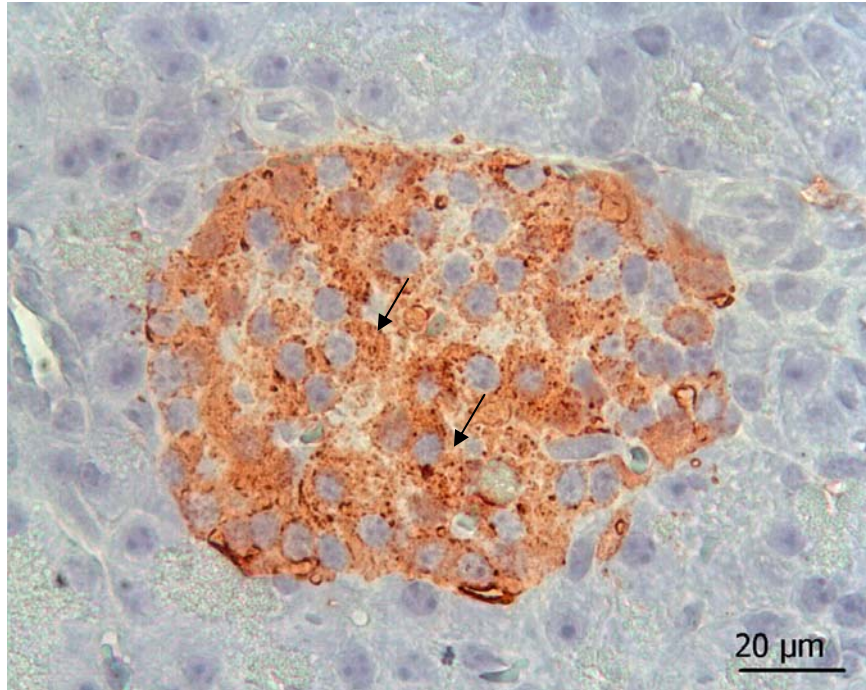
Şekil 4-4: İmmünohistokimya uygulanan kesitlerde adacık ve insülin pozitif hücre alanlarının karşılaştırılması.

Gruplar	n*	Adacık alanı (μm ²)	İnsülin pozitif hücre alanı (μm ²)
K (n=8)	104	8360.44±22233.94 Φ	5472.95±5668.32
GHR (n=8)	104	4688.03±6065.02	3827.62±5322.91
STZ (n=8)	83	3038.17±2445.20	2140.50±1775.86
STZ+GHR (n=7)	86	3403.17±3048.59	2516.03±2358.38

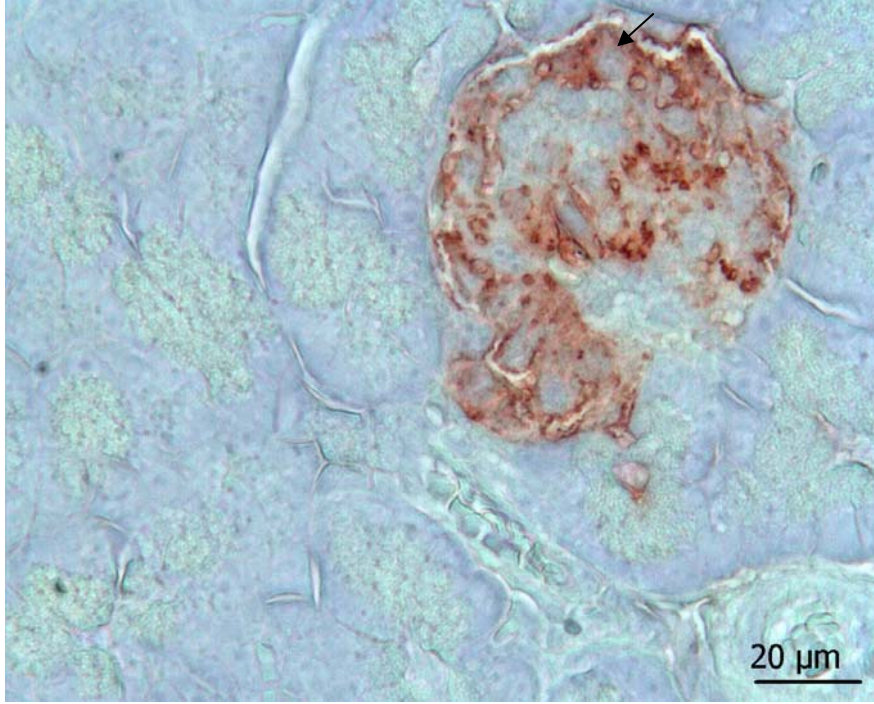
Tablo 4-6: Dört gruba ait Langerhans adacık alanları ve insülin hücre alanlarının karşılaştırılması. n= hayvan sayısı, n*= toplam adacık sayısı. Φ Ortalama değer±Standart sapma



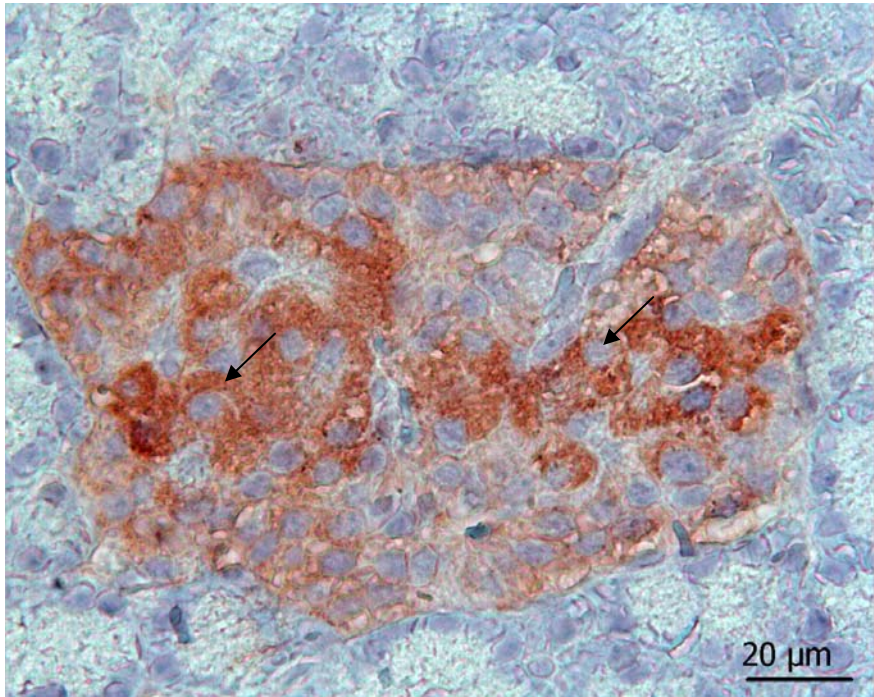
Resim 4-2: Kontrol grubuna ait dört haftalık sıçan pankreas kesiti. Langerhans adacığında insülin immünreaktif hücreler (→). Streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi. Zıt boyama: Mayer's Hematoksilen. Bar; 20μm



Resim 4-3: GHR kontrol grubuna ait pankreas dokusuna ait Langerhans adacığında insülin immünreaktif hücreler (→). Streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi. Zıt boyama: Mayer's Hematoksilen. Bar; 20μm



Resim 4-4: STZ -diyabetik grup pankreas doku kesiti. Langerhans adacığında insülin immünreaktif hücreler (→). Streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi. Zıt boyama: Mayer's Hematoksilen. Bar; 20μm



Resim 4-5: STZ+GHR verilen gruba ait sıçan pankreas doku kesiti. Langerhans adacıklarında insülin immünreaktif hücreler (→). Streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi. Zıt boyama: Mayer's Hematoksilen. Bar; 20μm

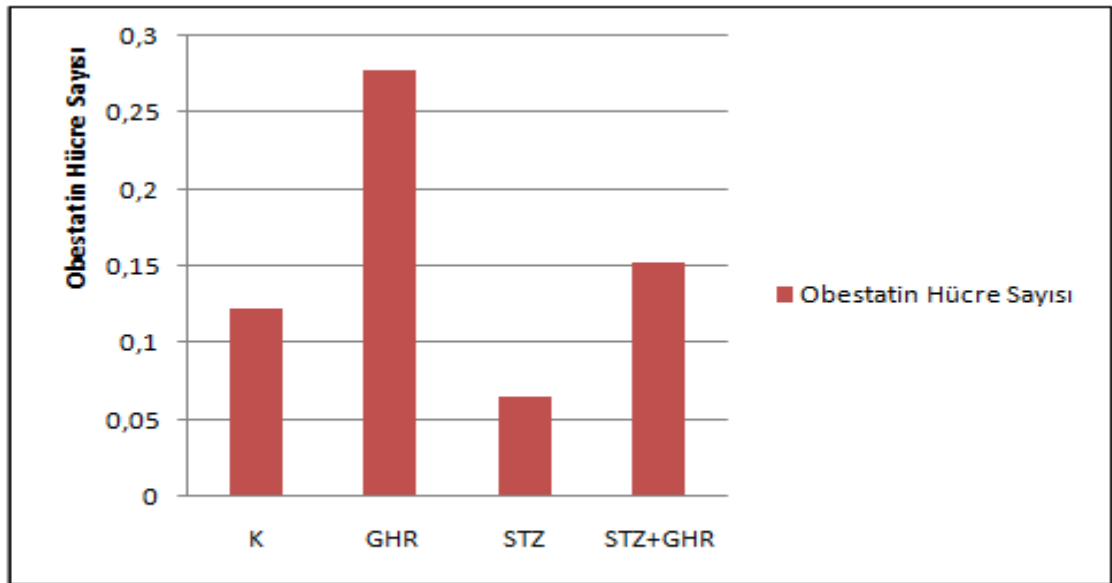
4.5.2.Obestatin

Pankreas kesitlerinde obestatin antikoru kullanılarak streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi ile obestatin pozitif sinyal veren hücreler değerlendirildi.

Sıçan kontrol pankreas doku kesitleri, GHR ve STZ grupları ile istatistiksel olarak karşılaştırıldığında obestatin immün pozitif hücre sayısı bakımından anlamlı bir fark saptanmadı. Oysa GHR ile STZ –diyabetik grupları arasında anlamlı bir fark bulundu ($p=0,014$). STZ ile STZ+GHR verilen grup istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmamasına rağmen STZ+GHR verilen grupta obestatin pozitif hücre sayısının arttığı gözlemlendi (Şekil 4-5) (Tablo 4-7).

Obestatin pozitif hücelere genellikle Langerhans adacıklarının periferinde, oval şekilli ve her adacıkta 1-3 pozitif hücreye rastlanıldı. Obestatin pozitif sinyaller sitoplazma ve/veya nukleusta görüldü (Resim 4-6, 7, 9, 10, 11). Dört gruba ait her bir kesit incelendiğinde, tüm Langerhans adacıklarının veya bazılarının hiç obestatin immün pozitif hücre içermediği gözlemlendi.

İmmünohistokimyasal yöntemle incelenen kesitlerde immün pozitif hücreler reaksiyon şiddetine göre değerlendirildiğinde STZ-diyabetik grubunun diğer gruplara göre daha zayıf sinyale sahip olduğu gözlemlendi (Tablo 4-8). Obestatin immün pozitif hücelere yer yer ekzokrin pankreas dokusunda rastlanıldı (Resim 4-8).



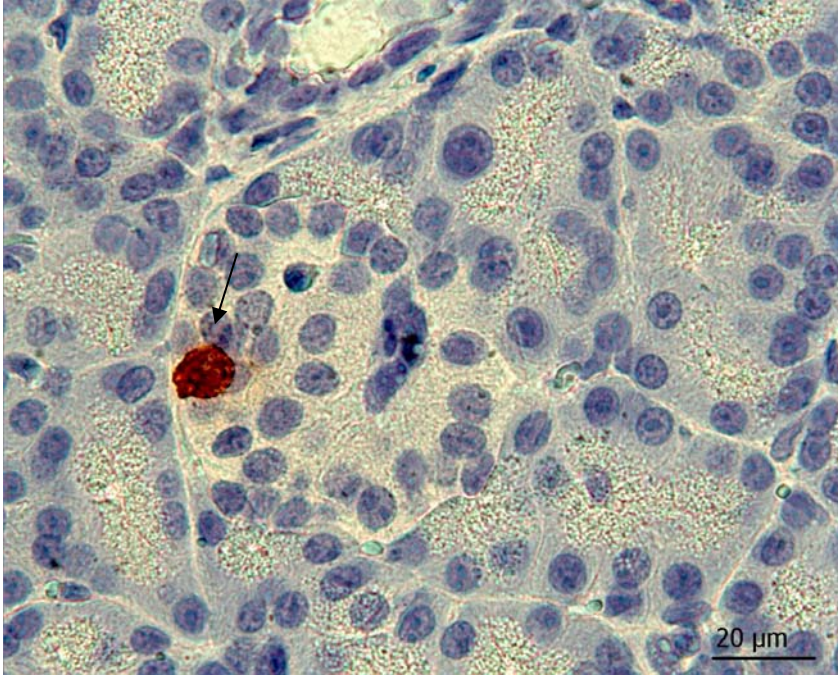
Şekil 4-5: Dört gruba ait sıçan pankreas dokusunda obestatin pozitif hücre ortalamaları.

Gruplar	n*	Toplam hücre sayısı	Ortalama değer±Standart sapma
K (n=8)	81	10	0,123±0,33
GHR (n=8)	79	22	0,278±0,37
STZ (n=8)	91	6	0,006±0,44
STZ+GHR (n=7)	98	15	0,153±0,62

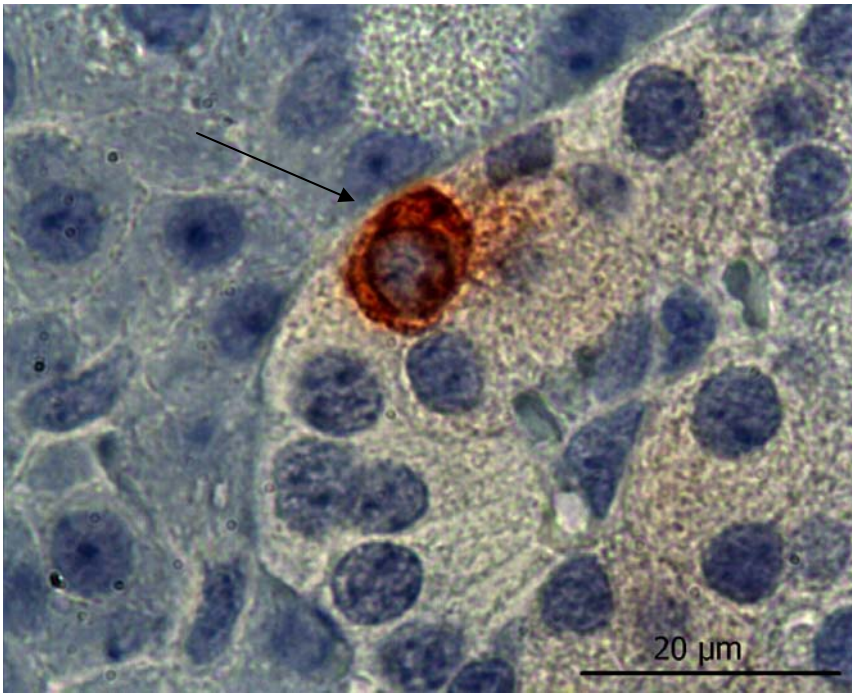
Tablo 4-7: Dört gruba ait Langerhans adacıklarındaki ortalama obestatin immün pozitif hücre sayıları. n= hayvanı sayısı, n*= değerlendirmeye alınan toplam adacık sayısı.

Gruplar	K	GHR	STZ	STZ+GHR
İmmünreaksiyon şiddeti	+++	+++	++	+++

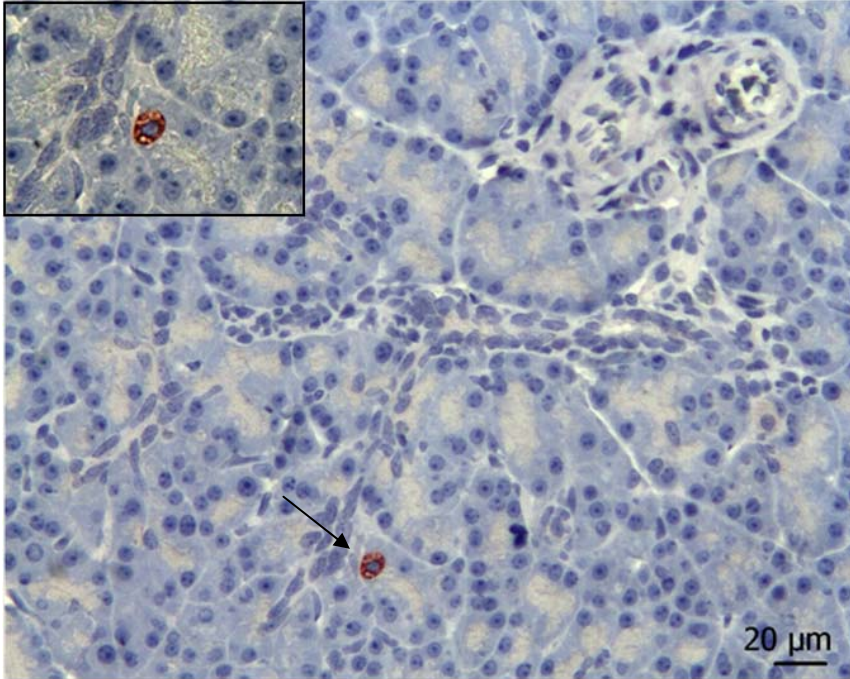
Tablo 4-8: İmmunohistokimya uygulanan kesitlerde obestatin immünreaksiyon yoğunluğu. Zayıf (+),orta (++) ve şiddetli (+++).



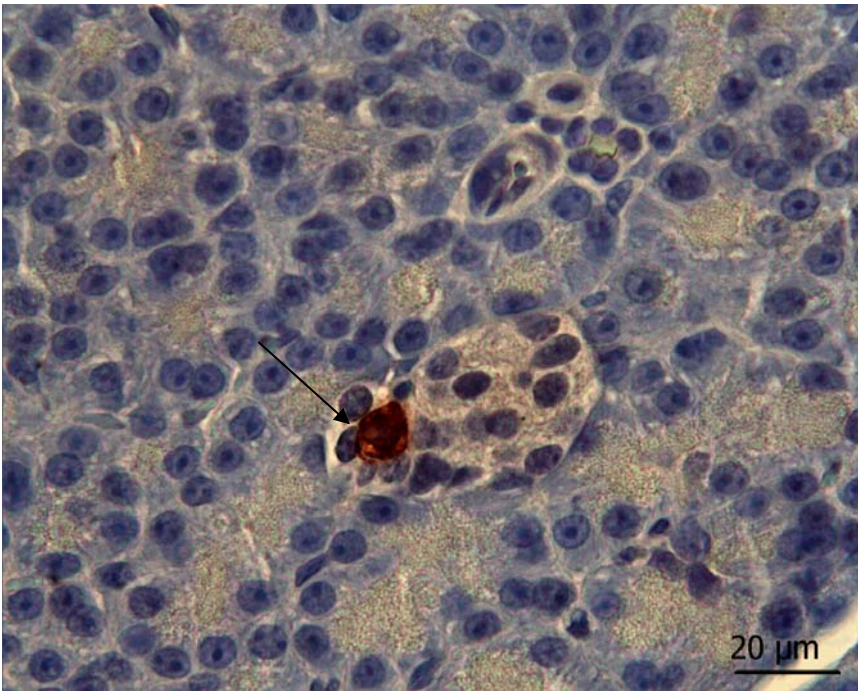
Resim 4-6: Kontrol sıçana ait Langerhans adacığında obestatin immünreaktif hücre (↪). Streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi. Zıt boyama: Mayer's Hematoksilen. Bar; 20μm



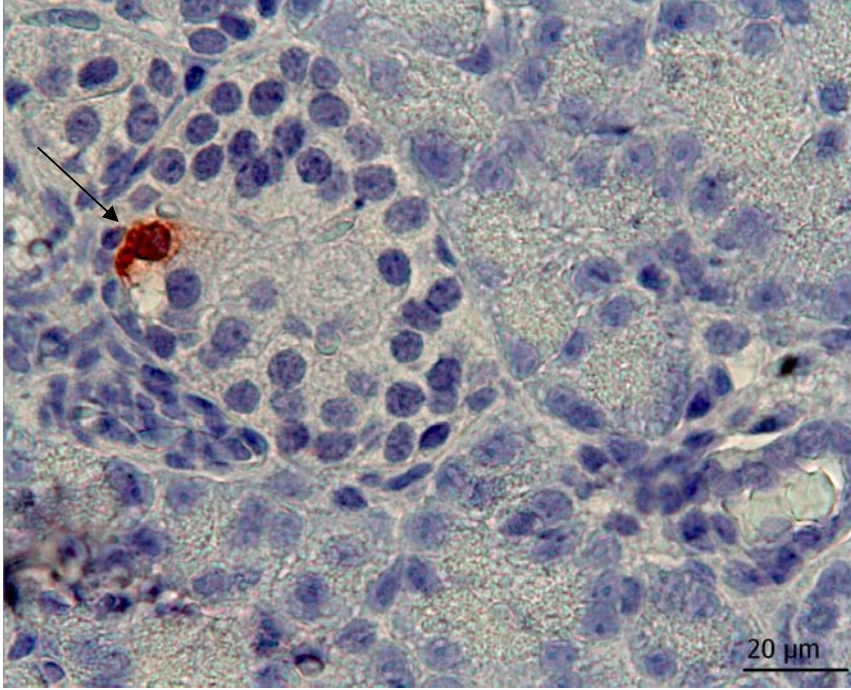
Resim 4-7:Kontrol sıçan pankreas doku kesiti. Langerhans adacığında obestatin pozitif sinyal (→) hücrenin hem sitoplazma hemde nukleusta görülmekte. Streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi. Zıt boyama: Mayer's Hematoksilen. Bar; 20μm



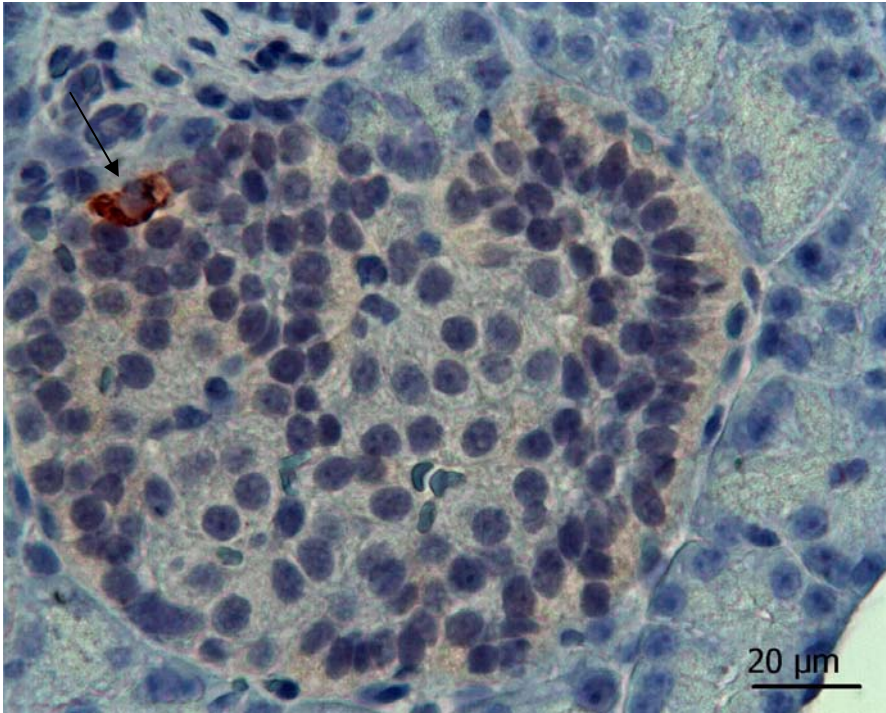
Resim 4-8: Kontrol pankreas ekzokrin dokusunda obestatin pozitif hücre (→). Küçük resimde obestatin pozitif hücre x400 büyütmede görülmekte. Streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi. Zıt boyama: Mayer's Hematoksilen. Bar; 20μm



Resim 4-9: GHR kontrol grubuna ait Langerhans adacığında obestatin pozitif hücre (→) Streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi. Zıt boyama: Mayer's Hematoksilen. Bar; 20μm



Resim 4-10: STZ –diyabetik sıçan Langerhans adacığında obestatin pozitif hücre (→). Streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi. Zıt boyama: Mayer's Hematoksilen. Bar; 20μm



Resim 4-11: STZ+GHR verilen sıçana ait Langerhans adacığında obestatin pozitif hücre (→). Streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi. Zıt boyama: Mayer's Hematoksilen. Bar; 20μm

5.TARTIŞMA

Ekzojen ghrelin verilen yeni doğan STZ-diyabetik sıçanların pankreasları, kan glukozu, insülin ve obestatin peptid ekspresyonları bakımından incelendi.

Kontrol ve STZ-diyabetik yeni doğan sıçanların 3 haftalık vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında anlamlı bir fark olmadığı bildirilmiştir (58). Oysa erişkin STZ-diyabetik hayvanların vücut ağırlıklarında kontrol sıçanlara göre azalma gözlenmiştir (60). Bu çalışmada üçüncü ve dördüncü haftanın sonunda kontrol ve STZ –diyabetik sıçanlar arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Bunun nedeni yeni doğan diyabetik sıçanların büyümelerini sürdürmeleri olabilir. Ghrelin geni delesyona uğratılmış farelerin büyümelerinin değişmediği ve bunun sebebinin ghrelinin ve obestatinin yokluğu olduğu bildirilmektedir (107, 128).

STZ –diyabetik ve yedi gün süre ile ghrelin verilen STZ-diyabetik sıçanların üçüncü hafta vücut ağırlık değerleri arasında anlamlı bir fark olmadığı bildirilmiştir (58). Buna paralel olarak bu çalışmada üçüncü haftada vücut ağırlıkları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmadı. Sato ve ark. ghrelinin farelerde besin alımını üzerine bir etkisi olmadığını ileri sürmüşlerdir (103). Süt emen ve süten kesilen yavrulara beş gün süreyle farklı dozlarda ghrelin enjeksiyonunun vücut ağırlığına etkisinin olmadığı gösterilmiştir (26). Lagaud ve ark sıçanlara ghrelin verilmesinin doza bağlı olarak besin alımını arttırdığını bildirmişlerdir (73).

Bu çalışmada, STZ ve STZ+GHR grupları arasında 1.,2.,3. ve 4 hafta ölçümlerinde anlamlı bir fark bulunmadı. Oysa erişkin sıçanlarda ve insanlarda ekzojen ghrelin verilmesinin besin alımını arttırdığı, erişkinliğe ulaşmamış sıçanlarda ise azalttığı bildirilmiştir (121, 26). Erişkin sıçanlara ghrelin verilmesinin vücut ağırlığını arttırdığını bildirmişlerdir (6, 128). GHR ve STZ+GHR gruplarının vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında 1.,2.,3. ve 4. hafta ölçümlerinde anlamlı bir fark bulundu. Bu anlamlılık ghrelinin sıçanların büyümesinde etkili olduğunu desteklemektedir.

Doğumdan sonraki 2.günde STZ enjekte edilen sıçanlarda kan glukozunun 200–350 mg/dl arasında değişerek kronik hipergliseminin geliştiği bildirilmiştir. (3, 9, 125). Yeni doğan STZ- diyabetik sıçanların kan glukoz değerlerinin kontrol grupları ile karşılaştırıldığında arttığı gösterilmiştir (9, 111, 125). Bu çalışmada diğer çalışmalara paralel olarak dört haftalık deney süresince kontrol ve STZ- diyabetik sıçanlar arasında anlamlı bir fark saptandı.

Yeni doğan diyabetik sıçanlara yedi gün süre ile ghrelin verilmesinin erişkin dönemde hiperglisemi gelişimini engellediğini bildirmişlerdir (58). Kontrol gruba ekzojen ghrelin verilmesinin kan glukoz seviyelerinde anlamlı bir değişime sebep olmadığı buna karşılık STZ-diyabetik sıçanlara ghrelin verilmesinin kan glukoz değerlerinde anlamlı bir düşüşe sebep olduğu görüldü. Dezaki ve ark doza bağlı olarak i.p. ghrelin alınımının farelerde kan glukoz seviyelerini arttırdığını belirtmişlerdir (27). İzole edilmiş sıçan pankreas adacıklarına ghrelin verilmesinin beta hücrelerinde serbest Ca²⁺ konsantrasyonunu arttırarak insülin salınmasını uyardığını bildirmişlerdir (22) . İn vitro şartlarda pankreas adacıklarına ghrelin verilmesinin insülin salınımını etkilediği gösterilmiştir (93).

Çalışmamızda STZ+GHR grubunun 4. hafta kan glukoz ölçümleri kontrol grubuna yakın değerlere yaklaşmıştır. Ayrıca STZ+GHR grubuna ait kan glukoz seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüşün görülmesine insülin peptid artışı da eşlik etmektedir. Diyabetik sıçanlara 4 haftalık ghrelin tedavisi hipergliseminin azaldığına işaret etmektedir ve STZ+GHR grubunda STZ grubuna göre adacıklardaki dejeneratif değişikliklerin azalması da kan glukoz değerlerindeki düşüşle ilgili olabilir.

Tip1 ve tip2 diyabet tedavisinde beta hücre yaşam süresini, sayısını ve insülin salınımını arttırmak için yeni tedavi stratejileri geliştirmek önemlidir. Son çalışmalar ghrelinin, insülin ve glukoz salınımı üzerinde önemli rolleri olduğunu düşündürmektedir. Tip2 diyabetli hastalarda dolaşımdaki ghrelin seviyesinin düştüğü bildirilmiştir (34, 66, 92).

Ghrelin gen delesyonu olan ob/ob farelerde glukozu bağımlı insülin salınımının arttığı gösterilmiştir (107). Tip 2 diyabet modeli olarak kullanılan yenidoğan sıçanlara yedi gün süre ile ghrelin verilmesinin beta hücre rejenerasyonuna yardımcı olduğu ve insülin ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir (58). Yeni doğan sıçanlara ekzojen ghrelin verilmesinin insülin salınımını arttırdığı gösterilmiştir (75). İzole sıçan adacıklarında farklı ghrelin konsantrasyonlarına bağlı olarak insülin salınımının değiştiğini göstermişlerdir (27, 94). Ghrelinin ortamdaki glukoz dozuna bağlı olarak INS-1 (832/13) hücre soyunda insülin salınımını etkilediğini belirtmişlerdir (123). İzole sıçan adacıklarına ghrelin ile birlikte verilen yüksek glukoz konsantrasyonunun insülin salınımında istatistiksel olarak anlamlı bir artışa yol açtığını bildirmişlerdir (22). Erişkin sıçanlara ghrelin verilmesinden sonraki bir saatte serum insülin seviyesini arttığı bildirilmiştir (75). Bunun aksine erişkin diyabetik hayvanlarda serum insülin seviyelerinin azaldığı belirtilmiştir (77). Hem açillenmiş hem açillenmemiş ghrelinin Langerhans adacıklarındaki beta hücre çoğalmasını desteklediği kültür ortamında gösterilmiştir (42). Hem açillenmiş hem de açillenmemiş ghrelinin insan adacık beta hücrelerinde apoptozu engellediğini bildirmişlerdir (42, 128, 129). Bu çalışmada STZ – diyabetik grup ile STZ+GHR verilen grup karşılaştırıldığında, STZ+GHR verilen grupta insülin immün pozitif hücre sayısının ve alanının arttığı gözlemlendi. İstatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen bu artışın nedeni ghrelinin apoptozu önleyici etkisinden dolayı olabilir.

İnsülin peptid sinyalleri reaksiyon yoğunluğuna göre değerlendirildiğinde STZ+GHR grubunda STZ-diyabetik grubuna göre sinyaller daha yoğun gözlemlendi. Bu da tip 2 diyabette düşük olduğu ile sürülen ghrelinin ekzojen alınımının insülin peptid seviyelerini arttırdığını düşündürmektedir.

Yeni bir peptid olan obestatinin insülin biyosentezi, glukoz metabolizması ve beta hücre ekspresyonu ile ilgili yolları düzenleyebileceği düşünülmektedir . Beta hücre salgılarının kontrolünde obestatin peptidinin rolü olabileceği ileri sürülmüştür (32). İzole edilmiş fare adacıklarında obestatinin insülin salınımı üzerine etkisi olmadığı bildirilmiştir (116). Tip 2 diyabetli hastalarda plazma obestatin seviyeleri ilk kez Qi ve ark tarafından gösterilmiştir (95).

Granata ve ark. çift immünohistokimya yöntemi ile insan pankreas adacıklarının periferinde obestatin ve ghrelinin aynı hücrede yerleştiğini göstermişlerdir (43). Bu çalışmada da obestatin immünreaktif hücreler Langerhans adacıklarının periferinde yerleşim göstermekte idi. Ayrıca obestatin pozitif sinyaller çoğunlukla sitoplazmada bazende hem nukleusta hem de sitoplazmada görüldü. Fetal ve yetişkin insan adacıklarında obestatin peptidinin sitoplazmada yerleştiğini ve ghrelin ile aynı hücrede ko-lokalize olduğunu göstermişlerdir (43).

Zhao ve ark (129) erişkin sıçan pankreasında immünflorasan yöntemi ile obestatin peptidi salgılayan hücrelerin hem oval hem de uzamış şekilli olduklarının bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise hücreler genellikle oval şekilli olarak görüldü. Dört gruba ait her bir kesit incelendiğinde, obestatin immün pozitif hücre içermeyen çok sayıda Langerhans adacıkları gözlemlendi. Ekzojen ghrelin verilmesinin obestatin üreten hücre sayısında istatistiksel olarak olmasa da artışa neden olduğunu söyleyebiliriz. STZ+GHR ve GHR kontrol grupları arasında obestatin peptid ekspresyonu bakımından istatistiksel olarak bir fark saptanamamasının nedeni peptidin çok hızlı yıkılması veya preproghrelinden oluşan obestatinin translasyon sonrası işlemlerinde hata oluşması olabilir.

Bu çalışmada streptavidin-biotin peroksidaz yöntemi ile ilk kez kontrol ve diyabetik yeni doğan sıçan pankreaslarında obestatin peptidi gösterilmiştir. Ayrıca ilk kez obestatin immün pozitif hücreler ekzokrin pankreas dokusunda görüldü.

Sonuç olarak, yeni doğan diyabetik sıçanlara erken evrede ghrelin verilmesinin kan glukoz seviyesini düşürmesi sebebi ile diyabetin etkilerini önleyebileceğini söyleyebiliriz. Işık mikroskopik bulgularımız STZ ile oluşan pankreas hasarı üzerinde ghrelinin koruyucu bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

- 1-Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T ve ark. Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocr Metab* 2001; **86**: 4753–4758
- 2-Arnés L, Moreno P, Nuche-Berenguer B, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML. Effect of exendin-4 treatment upon glucose uptake parametals in rat liver and muscle in normal and type 2 diabetic state. *Regul Peptides* 2009; **153**: 88-92
- 3-Ashokkumar N, Pari L, Rao ChA. Effect of N-benzoyl-D-phenylalanine and metformin on insulin receptors in neonatal streptozotocin-induced diabetic rats: Studies on insulin binding to erythrocytes. *Arch Physiol Biochem* 2006; **112**: 174 – 181
- 4-Aytekin Y editör. *Temel Histoloji*. 8th ed. İstanbul: Barış kitabevi; 1998.
- 5-Banerjee M, Kanitkar M, Bhonde RR. Approaches towards endogenous pancreatic regeneration. *Rev Diabetic Stud* 2005; **2**: 165-176
- 6-Barozzoni R, Bosutti A, Stebel M, Cattin MR, Roder E, Visintin L ve ark. Ghrelin regulates mitochondrial-lipid metabolism gene expression and tissue fat distribution in liver and skeletal muscle. *AJP-Endocrinol Metab* 2005; **28**: 228-235
- 7-Bassil AK , Haglund Y, Brown J, Rudholm T, Hellstrom PM, Naslund E ve ark. Little or no ability of obestatin to interact with ghrelin or modify motility in the rat gastrointestinal tract. *Brit J Pharmacol* 2007; **150**: 58–64
- 8-Bhatnagar S, Srivastava D, Jayadev MSK, Dubey AK. Molecular variants and derivatives of insulin for improved glycemic control in diabetes. *Prog Biophys Mol Bio* 2006; **91**: 199–228
- 9-Bonner WS, Trent DF, Honey RN, Weir GC. Responses of neonatal rat islets to streptozotocin: limited B-cell regeneration and hyperglycemia. *Diabetes* .1981; **30**: 64-9
- 10- Botton Anne-Grapin. Ductal cells of the pancreas. *The Int J Biochem Cell B* 2005; **37**: 504–510
- 11-Bolzán AD, Bianchi MS. Genotoxicity of streptozotocin. *Mutat Res* 2002; **512**: 121–134
- 12-Butler MG, Bittel DC. Plasma obestatin and ghrelin levels in subjects with Prader–Willi syndrome. *Am J Med Genet* 2007; **143A**: 415–421

- 13-Büyükdevrim A.S. *Diabetes Mellitus I*. İstanbul: T.C. İstanbul Üniv.Sağlık Bilimleri Enst.Yayımları; 1989.
- 14-Camina JP, Campos JF, Caminos JE, Dieguez J, Casanueva FF. Obestatin-mediated proliferation of human retinal pigment epithelial cells regulatory mechanism. *J Cell Physiol* 2007; **211**: 1-9
- 15-Carlini VP, Schioth HG, Debarioglio RS. Obestatin improves memory performance and causes anxiolytic effects in rats. *Biochem Bioph Res Co* 2007; **352**: 907–912
- 16-Catalan V , Gómez-Ambrosi J, Rotellar F, Silva C, Gil MJ, Rodríguez A ve ark. The obestatin receptor (GPR39) is expressed in human adipose tissue and is down-regulated in obesity-associated type 2 diabetes mellitus. *Clin Endocrinol* 2007; **66**: 598–601
- 17-Celis JE, editör. *Cell Biology A Laboratory Handbook Third Edition Volume I*. Academic Press; 2006.
- 18-Chanoine JP, Wong AC, Barrios V. Obestatin, acylated and total ghrelin concentrations in the perinatal rat pancreas. *Horm Res*. 2006; **66**: 81-8.
- 19-Chartrel N, Alvear-Perez R, Leprince J, Iturrioz X, Reaux-Le Goazigo A, Audinot V ve ark. Comment on "obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake". *Science* 2007; **315**: 766c
- 20-Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 2001; **50**: 1714–1719
- 21-Dardennes RM, Zizzari P, Tolle V, Foulon C, Kipman A, Romo L ve ark. Family trios analysis of common polymorphisms in the obestatin/ghrelin, BDNF and AGRP genes in patients with Anorexia nervosa: Association with subtype, body-mass index, severity and age of onset. *Psychoneuroendocrinolo* 2007; **32**: 106–113
- 22-Date Y, Nakazato M, Hashiguchi S, Dezaki K, Mondal MH, Hosoda H ve ark. Ghrelin is present in pancreatic α -cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes* 2002; **15**: 124-129
- 23-Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T ve ark. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine Cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 2000; **141**: 4255–4261

- 24-Demir R, editör. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Patolojiye Giriş*. Ankara: Pamle Yayıncılık; 2006.
- 25-Demiriz Ş ve Demiriz B, editör. Inzucchi S E. *Diabetes Mellitus El Kitabı*. 6th ed. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri; 2009.
- 26-Dembinski A, Warzecha Z, Ceranowicz P, Bielanski W, Cieszkowski J, Dembinski M ve ark. Variable effects of ghrelin administration on pancreatic development in young rats. Role of insulin-like growth factor-1. *J Physiol Pharmacol* 2005; **56**: 555-570
- 27-Dezaki K, Sone H, Koizumu M, Nakata M, Kakei M, Hosoda H ve ark. Blockade of pancreatic islet-derived ghrelin enhances insulin secretion to prevent high-fat diet-induced glucose intolerance. *Diabetes* 2006; **55**: 3486–3493
- 28-Dickson LM, Rhodes CJ. β -cell growth and survival in the onset of type 2 diabetes: a role for protein kinase B in the Akt?. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; **287**: E192-E198
- 29-DJ Hill, Duvillie B. Pancreatic development and adult diabetes. *Pediatr Res* 2000; **48**: 269-274
- 30-Dun SL, Brailoiu GC, Brailoiu E, Yang J, Kang Chang G, Dun NJ. Distribution and biological activity of obestatin in the rat. *J Endocrinol* 2006; **191**: 481–489
- 31-Edeghate E, Ponery AS. Ghrelin stimulates insulin secretion from the pancreas of normal and diabetic rats. *J Neuroendocrinol* 2002; **14**: 555–560
- 32-Egido EM, Hernández R, Marco J, Silvestre AR. Effect of obestatin on insulin, glucagon and somatostatin secretion in the perfused rat pancreas. *Regul Peptides* 2009; **152**: 61–66
- 33-Ferrand N, Astesano A, Phan HH, Lelong C, Rosselin G. Dynamics of pancreatic cell growth and differentiation during diabetes reversion in STZ-treated newborn rats. *Am J Physiol* 1995; **269**: C1250-6339
- 34-Ferzli GS, Dominuque E, Ciaglia M, Bluth MH, Gonzales A, Fingerhut A. Clinical improvement after duodenojejunal bypass for nonobese type 2 diabetes despite minimal improvement in glycemic homeostasis. *World J Surg* 2009; **33**: 972–979
- 35-Fowden AL, Hill DJ. Intra-uterine programming of the endocrine pancreas. *Brit Med Bull* 2001; **60**: 123–142
- 36-Garcia J.M, Cata JP, Dougherty PM, Smith RG. Ghrelin prevents cisplatin-induced mechanical hyperalgesia and cachexia. *Endocrinology* 2008; **149**: 2347-4

- 37-Ghanbari-Niaki A, Jafari A, Abednazari H, Nikbakht H. Treadmill exercise reduces obestatin concentrations in rat fundus and small intestine. *Biochem Bioph Res Co* 2008; **372**: 741–745
- 38-Gnanapavan S, Kola B, Bustin AS, Morris DG, Mcgee P ve ark.Fairclough P. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 ; **87**:2988-2991
- 39-Gourcerol G, St-Pierre DH, Tache Y. Obestatin – a ghrelin-associated peptide that does not hold its promise to suppress food intake and motility. *Neurogastroenterol Motil* 2007; **19**: 161–165
- 40-Gourcerol G, Million M, Adelson DW, Wang Y, Wang L, Rivierve J ve ark. Lack of interaction between peripheral injection of CCK and obestatin in the regulation of gastric satiety signaling in rodents. *Peptides* 2006 ;**27**: 2811-2819
- 41-Granata R, Settanni F, Biancone L, Trovato L, Nano R, Bertuzzi F ve ark. Acylated and unacylated ghrelin promote proliferation and inhibit apoptosis of pancreatic β -cells and human islets: Involvement of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A, extracellular signal- regulated kinase 1/2, and 3-kinase/akt signaling. *Endocrinology* 2007; **148**: 512–529
- 42- Granata R, Settanni F, Trovato L, Destafanis S, Gallo D, Muccioli G ve ark. Unacylated as well as acylated ghrelin promotes cell survival and inhibit apoptosis in HIT-T15 pancreatic beta-cells. *J Endocrinol Invest* 2006; **29**: 19-22
- 43-Granata R, Settanni F, Gallo D, Trovato L, Biancone L, Cantaluppi V ve ark. Obestatin promotes survival of pancreatic β -cells and human islets and induces expression of genes involved in the regulation of β -cell mass and function *Diabetes* 2008; **57**: 967-979
- 44-Grönberg M, Tsolakis AV, Magnusson L, Janson ET, Saras J. Distribution of obestatin and ghrelin in human tissues- immunoreactive cells in the gastrointestinal tract, pancreas and mammary glands. *J Histochem Cytochem* 2008; **56**: 793–801
- 45-Gualillo O, Lago F, Casanueva FF , Dieguez C. One ancestor, several peptides Post-translational modifications of preproghrelin generate several peptides with antithetical effects. *Mol Cell Endocrinol* 2006; **256**: 1–8
- 46-Guo ZF, Zheng X, Qin YW, Hu JQ, Chen SP, Zhang Z. Different responses of circulating ghrelin, obestatin levels to fasting, re-feeding and different food compositions, and their local expressions in rats. *Peptides* 2008; **29**: 1247-1254

- 47-Hammermann R M. Windows of opportunity for organogenesis. *Transpl Immunol* 2005; **15**: 1 – 8
- 48-Harada T, Nakahara T, Yasuhara Y, Kojima S, Sagiya KI, Amitani H ve ark. Obestatin, Acyl Ghrelin, and Des-acyl Ghrelin responses to an oral glucose tolerance test in the restricting type of Anorexia Nervosa. *Biol Psychiatry* 2007;1-3
- 49-Hayashida T , Nakahara T, Mondal MS, Date Y, Nakazato M, Kojima M ve ark. Ghrelin in neonatal rats: distribution in stomach and its possible role. *J Endocrinol* 2002; **173**: 239–245
- 50-Hayat M A. *Immunohistochemistry, and Antigen Retrieval Methods For Light and Electron Microscopy*. New York: Kluwer Academic Publishers; 2002.
- 51-Helena Edlund. Section 1: β -cell differentiation and growth –Developmental biology of the pancreas. *Diabetes* 2001; **50**: S5-9
- 52-Holst B, Egerod KL, Schild E, Vickers SP, Cheetham S, Gerlach LO, Storjohann L ve ark. GPR39 Signaling is stimulated by zinc ions but not by obestatin. *Endocrinology* 2007; **148**: 13–20
- 53-Homo-Delarche F, Drexhage HA. Immune cells, pancreas development, regeneration and type 1 diabetes. *Trends Immunol* 2004; **25**: 222-229
- 54-Hosoda H, Kojima M, Mizushima T, Shimizu S, Kangawa K . Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Comm* 2000; **79**: 909–913
- 55- Hruban RH, Wilentz RE. The Pancreas. Kumar V, Abbas, Fausto. Robbins & Cotran *Pathologic Basis of Diseases*. 7.th ed. Elsevier; 2005 .pp. 939-1207.
- 56-Huda MSB, Durham BH, Wong SP, Deepak D, Kerrigan D , McCulloch P ve ark. Plasma obestatin levels are lower in obese and postgastrectomy subjects, but do not change in response to a meal. *Int J Obesity* 2007; 1–7
- 57-Inui A, Asakawa A, Bowers CY, Mantovani G, Laviano A, Meguid MM ve ark. Ghrelin, appetite, and gastric motility: the emerging role of the stomach as an endocrine organ. *The FASEB J* 2004; **18**: 439-456
- 58-Irako T, Akamizu T, Hosoda H, Iwakura H, Ariyasu H, Tojo K ve ark. Ghrelin prevents development of diabetes at adult age in streptozotocin-treated newborn rats. *Diabetologia* 2006; **49**: 1264–1273
- 59-İlkova H, editor. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri , Diabetes Mellitus Sempozyumu, 1997 ; 9-18.

- 60-Ishii S, Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Sugihara H, Oikawa S. Role of ghrelin in streptozotocin-induced diabetic hyperphagia. *Endocrinology* 2002; **143**: 4934–4937
- 61-Jensen J. Gene regulatory factors in pancreatic development. *Dev Dynam* 2004; **229**: 176–200
- 62-Jones LC, Clark A. Beta cell neogenesis in type 2 diabetes. *Diabetes* 2001; **50**: 186–763
- 63-Kaiya H, Mori T, Miyazato M, Kangawa K. Ghrelin receptor (GHS-R)-like receptor and its genomic organisation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comp Biochem Physiol* 2009; **153**: 438–450
- 64-Kahn CR, Weir GC, King GL, Jacobson AM, Moses AC, Smith RJ, editor. *Joslin's Diabetes Mellitus*. 14th ed. Boston: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
- 65-Kapıca M, Zabielska M, Puzio I, Jankowska A, Kato I, Kuwahara A ve ark. Obestatin stimulates the secretion of pancreatic juice enzymes through a vagal pathway in anaesthetized rats—preliminary results. *J Physiol Pharmacol* 2007; **58**: 123–130
- 66-Katsuki A, Urakawa H, Gabazza EC, Murashima S, Nakatani K, Togasaki K ve ark. Circulating levels of active ghrelin is associated with abdominal adiposity, hyperinsulinemia and insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol*. 2004; **151**: 573–7.
- 67- Kaymak K. Pankreasın Endokrin İşlevleri ve Karbonhidrat Metabolizmasının Düzenlenmesi. William F. Ganong. *Ganog Tıbbi Fizyoloji*. 5th ed. Ankara: Barış Kitabevi; 1999. pp. 352–375.
- 68-Kim JO, Lee GD, Kwon JH, Kim KS. Anti-diabetic effects of new herbal formula in neonatally streptozotocin –induced diabetic rats. *Biol Pharm Bull* 2009. **32**: 421–426
- 69-Kitamura K, Kato J, Kawamoto M, Tanaka M, Chino N, Kangawa K ve ark. The intermediate form of glycine-extended adrenomedullin is the major circulating molecular form in human plasma. *Biochem Biophys Res Comm* 1998; **244**: 551–555
- 70-Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; **402**: 656–660
- 71-Korec R. From Langerhans islets to pancreas transplantation over the past 30 years: A review with personal contributions. *Cell and Tissue Bank* 2004; **5**: 177–183
- 72-Kotunia A, Zabielski R. Ghrelin in the postnatal development of the gastrointestinal tract. *J Physiol Pharmacol* 2006; **57**: 97–111

- 73-Lagaud GJ, Young A, Acena A, Morton MF, Barrett TD, Shankley NP. Obestatin reduces food intake and suppresses body weight gain in rodents. *Biochem Biophys Res Comm* 2007; **357**: 264–269
- 74-Laura ve ark. *The Genetic Landscape of Diabetes*. US: National library of medicine.; 2004
- 75-Lee HM, Wang G, Englander EW, Kojima M, Greeley GH. Ghrelin, A new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations. *Endocrinology* 2002; **143**: 185–190
- 76-Mandrup-Poulsen T. Apoptotic signal transduction pathways in diabetes. *Biochem Pharmacol* 2003; **66**: 1433–1440
- 77-Masaoka T, Suzuki H, Hosoda H, Ota T, Migenshi Y, Nagata H ve ark. Enhanced plasma ghrelin levels in rats with streptozotocin-induced diabetes. *FEBS Letters* 2003; **541**: 64-68
- 78-Masayasu Kojima, Kenji Kangawa. Ghrelin: Structure and Function. *Physiol Rev* 2005; **85**: 495-522
- 79-Masiello P. Animal models of type 2 diabetes with reduced pancreatic β -cell mass. *Int J Biochem Cell B* 2006; **38**: 873–893
- 80-Moechars D, Derpoortere I, Moreaux B, De Smet B, Goris I, Hoskens L ve ark. Altered gastrointestinal and metabolic function in the GPR-39-obestatin receptor-knock-out Mouse. *Gastroenterology* 2006; **131**: 1131-41
- 81-Movassat J, Saulnier C, Portha B ve ark. Insulin administration enhances growth of the β cell mass in streptozotocin –treated newborn rats. *Diabetes* 1997; **46**: 1444-1452
- 82-Murray RK. *Harper's Illustrated Biochemistry*. 26th ed. ABD: Lange Medical Books/McGraw-Hill; 2003.
- 83-Nogueiras R Pfluger P, Tovar S, Arnold M, Mitchell S, Morris A ve ark. Effects of obestatin on energy balance and growth hormone secretion in rodents.. *Endocrinology* 2007; **148**: 21–6.
- 84-Nogueiras R, Tschöp M. Separation of conjoined hormones yields appetite rivals. *Science* 2005; **310**: 985-986
- 85-Nussey SS, Whitehead SA. *Endocrinology: An Integrated Approach*. London: Taylor & Francis; 2001.

- 86-Onat T, Emerk K, Sözmen EY, editör. *İnsan Biyokimyası*. Ankara: Palme Yayıncılık; 2006
- 87-Pan W, Tu H, Kastin AJ. Differential BBB interactions of three ingestive peptides: Obestatin, ghrelin, and adiponectin. *Peptides* 2006; **27**: 911–916
- 88-Poitout V, Robertson R P. Secondary β -Cell failure in type 2 diabetes—A convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology* 2002; **143**: 339–342
- 89-Portha B ve ark. Diabetofenic effect of streptozotocin in the rat during the perinatal period. *Diabetes* 1974; **23**: 889-95
- 90-Portha B. Programmed disorders of β -cell development and function as one cause for type 2 diabetes ? The GK rat paradigm. *Diabetes Metab Res Rev* 2005; **21**: 495–504
- 91-Portha B, Kergoat M. Dynamics of glucose-induced insulin release during the spontaneous remission of streptozotocin diabetes induced in the newborn rat. *Diabetes* 1985; **34**: 574-79
- 92-Pöykkö SM, Kellokoski E, Hörkkö S, Kauma H, Kesaniemi YA, Ukkola O. Low plasma ghrelin is associated with insulin resistance, hypertension, and the prevalence of type 2 diabetes. *Diabetes* 2003; **52**: 2546–255
- 93-Prado CL, Pugh-Bernard AE, Elghazi L, Sosa-Pineda B, Sussel L. Ghrelin cells replace insulin-producing β cells in two mouse models of pancreas development. *Dev Biol* 2004; **101**: 2924–2929
- 94-Qader SS, Håkanson R , Rehfeld RF, Lundquist I , Salehi A. Proghrelin-derived peptides influence the secretion of insulin, glucagon, pancreatic polypeptide and somatostatin: A study on isolated islets from mouse and rat pancreas. *Regul Peptides* 2008; **146**: 230–237
- 95-Qi X, Li L, Yang G, Liu J, Li K, Tang Y ve ark. Circulating obestatin levels in normal subjects and in patients with impaired glucose regulation and type 2 diabetes mellitus. *Clin Endocrinol* 2007; **66**: 593–597
- 96-Rane SG. Cell cycle control of pancreatic beta cell proliferation. *Front Biosci* 2000; **5**: D1-19
- 97-Ren AJ, Guo ZF, Wang YK , Wang LG , Wang WZ , Lin L ve ark. Inhibitory effect of obestatin on glucose-induced insulin secretion in rats. *Biochem Biophys Res Comm* 2008; **369**: 969-72
- 98-Ren AJ, Guo ZF , Wang YK, Lin L , Zheng X , Yuan WJ. Obestatin, obesity and diabetes. *Peptides* 2009; **30** 439-444

- 99-Reusens B, Remacle C. Programming of the endocrine pancreas by the early nutritional environment. *Int J Biochem Cell B* 2006 ; **38**: 913–922
- 100-Robertson P R. Diabetes, glucose toxicity, and oxidative stress: A case of double jeopardy for the pancreatic islet β cell. *Free Radical Bio Med* 2006; **41**: 177–184
- 101-Samson WK, White MM, Price C, Ferguson AV. Obestatin acts in brain to inhibit thirsty. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; **292**: R37-43
- 102-Sato N, Knai S, Takano S, Kurosawa M, Miyasaka K, Funakoshi A. Central administration of ghrelin stimulates pancreatic exocrine secretion via the vagus conscious rats. *Jpn J Physiol* 2003; **53**: 443-449
- 103-Sato T, Kurokawa M, Nakashima Y, Ida T, Takahashi T, Fukue Y ve ark. Ghrelin deficiency does not influence feeding performance. *Regul Peptides* 2008; **145**: 7–11
- 104-Seim I, Collet C, Herington AC, Chopin LK. Revised genomic structure of the human ghrelin gene and identification of novel exons, alternative splice variants and natural antisense transcripts. *BMC Genomics* 2007; **8**: 1-45
- 105-Smet BD, Thijs T, Peeters TL, Depoortere I. Effect of peripheral obestatin on gastric emptying and intestinal contractility in rodents. *Neurogastroent Motil* 2007; **19**: 211–217
- 106-Srinivasan K, Ramarao P. Animal models in type 2 diabetes research: An overview. *Indian J Med Res* 2007; **125**: 451-472
- 107-Sun Y, Asnicar M, Saha PK, Chan L, Smith RG. Ablation of ghrelin improves the diabetic but not obese phenotype of ob/ob mice. *Cell metab* 2006; **3**: 379–386
- 108-Sun Y, Ahmed S, Smith RG. Deletion of ghrelin impairs neither growth nor appetite. *Mol Cell Biol* 2003; **22**: 7973-81
- 109-Szentirmai E, Krueger JM. Obestatin alters sleep in rats. *Neurosci Lett* 2006; **404**: 222–226
- 110- Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 2001; **50**: 536-546
- 111-Takada J, Machado MA, Peres SB, Brito LC, Borges-Silva CN, Cecília EM ve ark. Neonatal streptozotocin-induced diabetes mellitus: a model of insulin resistance associated with loss of adipose mass. *Metabolism* 2007; **56**: 977–984
- 112-Temizkan G, Arda N, editör. *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*. 2nd ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2004

- 113-Tesch GH, Allen TJ. Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Nephrology* 2007; **12**: 261–266
- 114-Trucco M. Regeneration of the pancreatic β cell. *J Clin Invest* 2005; **115**: 5–12
- 115-Trudel L, Tomasetto C, Rio MC, Bouin M, Plourde V, Eberling P ve ark. Ghrelin/motilin-related peptide is a potent prokinetic to reverse gastric postoperative ileus in rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; **282**: G948–G952
- 116-Uniappan S, Speck M, Kieffer TJ. Metabolic effects of chronic obestatin infusion in rats. *Peptides* 2008; **29**: 1354-1361
- 117-Vicennati V, Genghini S, De Iasio R, Pasqui F, Pagotto U, Pasquali R. Circulating obestatin levels and the ghrelin/obestatin ratio in obese women. *Eur J Endocrinol* 2007; **157**: 295–301
- 118-Walia P, Asadi A, Kieffer TJ, Johnson JD, Chanoine JP. Ontogeny of ghrelin, obestatin, preproghrelin, and prohormone convertases in rat pancreas and stomach. *Pediatr res* 2008; **65**: 39-44
- 119-Wang RN, Bouwens L, Klöppel G. Beta-cell proliferation in normal and streptozotocin-treated newborn rats: site, dynamics and capacity. *Diabetologia* 1994; **37**: 1088-1096
- 120-Wang RN, Bouwens L, Klöppel G. Beta cell growth in adolescent and adult rats treated with streptozotocin during the neonatal period. *Diabetologia* 1996; **39**: 548-557
- 121-Warzecha Z, Dembinski A, Cernowicz P, Dembinski M, Cieszkowski J, Konturek SJ. ve ark. Influence of ghrelin on gastric and duodenal growth and expression of digestive enzymes in young mature rats. *J Physiol Pharmacol* 2006; **57**: 425-437
- 122-WHO. Definition, diagnosis and classification of Diabetes mellitus and its complications. 1999
- 123-Wierup N, Yang S, McEvelly RJ, Mulder H, Sundler F. Ghrelin is expressed in a novel endocrine cell type in developing rat islets and inhibits insulin secretion from INS-1 (832/13) cells. *J Histochem Cytochem* 2004; **52**: 301–310
- 124-Wierup N, Svensson H, Mulder H, Sundler. The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regul Peptides* 2002; **107**: 63–69
- 125-Weir GC, Clore ET, Zmachinski CJ, Bonner-Weir S. Islet secretion in a new experimental model for non-insulin dependent diabetes. *Diabetes* 1981; **30**: 590-595

126-Yamamoto I, Numao M, Sakaguchi Y, Tsushima N, Tanaka M. Molecular characterization of sequence and expression of chicken GPR39. *Gen Comp Endocr* 2007; **151**: 128–134

127-Yılmaz S, Öztürk M. Uygulamalı ultrastruktürel immunohistokimya kurs kitapçığı. İstanbul; 1998

128-Zhang JV, Ren PG, Avsian-Kretchmer O, Luo CW, Rauch R, Klein C, ve ark. Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* 2005; **310**: 996-999

129-Zhao CM, Furnes MV, Stenström B, Kulseng B, Chen D. Characterization of obestatin- and ghrelin-producing cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rats: an immunohistochemical and electron-microscopic study. *Cell Tissue Res* 2008; **331**: 575-87

ETİK KURUL KARARI



T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayı: 60

28.11.2007

Sn. Prof. Dr. Sema Bolkent, İ. Ü. Cerrahpaşa Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji AB Dalı.

Karar No: 33

Başvuru Tarihi: 21.11.2007

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, Neslihan Türk'e ait "Eksojen ghrelin verilen yeni doğan STZ-diyabetik sıçan pankreasında obestatin ve insülin peptidlerinin incelenmesi" isimli proje Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul İlkelerine uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Mehmet KAYA
İ. Ü. HADYEK Başkanı

Prof. Dr. Müjdat UYSAL
Üye

Prof. Dr. Nuriye AKEV
Üye

Prof. Dr. Gülderen ŞAHİN
Üye

Prof. Dr. Cüneyt K. ORAL
Üye

Doç. Dr. Alper YILMAZ
Üye

Uzm. Vet. Hek. Fatma TEKELİ
Üye

Avukat Safiye ALTUN
Üye

Mak. Müh. Seyfettin AVCI
Üye

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Neslihan	Soyadı	Türk
Doğ.Yeri	Bakırköy	Doğ.Tar.	29.01.1984
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	56350025354
Email	nes.trk@gmail.com	Tel	05352788932

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi	2009
Lisans	Marmara Üniversitesi	2006
Lise	Bayrampaşa Anadolu Lisesi	2002

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Çağrı Merkezi Agent	VKV Amerikan Hastanesi	2007-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi	KPDS/67	
Almanca	Zayıf	Zayıf	Zayıf		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Office	İyi düzeyde

Yayımları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

- 1) Alterations in ghrelin cells induced by short and long-term omeprazole treatment in the rat fundus mucosa. Bolkent S., Yilmazer S., Türk N. Folia Histochemica et Cytobiologica Vol 46, Suppl 2, P1.53, 2008
- 2) Transgenik hayvan yetiştirme metodları ve uygulama alanları. Türk G., Sarı P., Yerli S., Türk N. X. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi. 05-08 Ekim 2005. Süleyman Demirel Üniv./Isparta
- 3) Uygulamalı Temel Hücre Kültürü Teknikleri Kursu. 21-22 Şubat 2008 Hacettepe Üniv. Tıp Fak./ Ankara
- 4) Apoptozis hastalıklarıyla ilişkisi ve güncel belirleme yöntemleri teorik kursu. 07-08 Aralık 2006. Dokuz Eylül Üniv./İzmir
- 5) Deney Hayvanları kullanım sertifikası kursu. 27-29 Kasım 2006 İst. Üniv. Cerrahpaşa Tıp Fak. Deney hayvanları laboratuvarı/İstanbul

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Latin dansları,

