

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

ORAL KARVAKROL UYGULAMASININ İZOLE SIÇAN PANKREAS
ADACIK HÜCRELERİNDE H₂O₂ İLE OLUŞTURULAN HASARA KARŞI
ETKİLERİ

Arş. Gör. Dr. Aslı Şan DAĞLI GÜL

Fizyoloji Programı
UZMANLIK TEZİ

ANKARA
2010

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

ORAL KARVAKROL UYGULAMASININ İZOLE SIÇAN PANKREAS
ADACIK HÜCRELERİNDE H₂O₂ İLE OLUŞTURULAN HASARA KARŞI
ETKİLERİ

Arş. Gör. Dr. Aslı Şan DAĞLI GÜL

Fizyoloji Programı
UZMANLIK TEZİ

Doç. Dr. Ersin FADILLIOĞLU
TEZ DANIŞMANI

ANKARA
2010

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığına,

Dr. Aslı Şan Dağlı Gül'ün 18 Mayıs 2010 tarihinde jürimiz önünde savunmasını yaptığı "Oral Karvakrol Uygulamasının İzole Sıçan Pankreas Adacık Hücrelerinde H₂O₂ ile Oluşturulan Hasara Karşı Etkileri" başlıklı çalışma, jürimiz tarafından Fizyoloji Programında Tıp'ta Uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof.Dr.Neslihan Hacer DİKMENOĞLU
Hacettepe Üniversitesi



Danışman:

Doç.Dr.Ersin FADILLIOĞLU
Hacettepe Üniversitesi



Üye:

Doç.Dr.Dicle BALKANCI
Hacettepe Üniversitesi



Üye:

Doç.Dr.Meltem TUNCER
Hacettepe Üniversitesi



Üye:

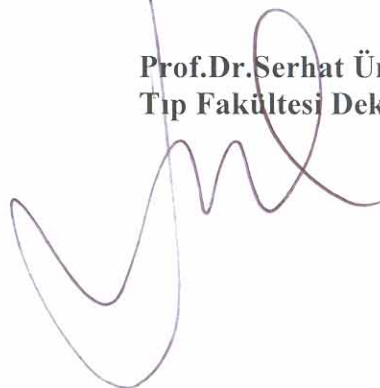
Doç.Dr.Ayşen ERDEM
Hacettepe Üniversitesi



ONAY:

Bu tez Tababet/Tıp'ta Uzmanlık Tüzüğü'nün ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüriler tarafından uygun görülmüş ve Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı tarafından kabul edilmiştir.

**Prof.Dr.Serhat Ünal
Tıp Fakültesi Dekanı**



TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın tüm aşamaları boyunca yönlendirmeleri ve yoğun desteği için tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Ersin Fadıllıoğlu'na çok teşekkür ederim. Vermiş oldukları tüm emeklerinden dolayı Doç. Dr. Tuncay Delibaşı'na, Dr. İsmail Karabulut'a, DNA analizlerindeki yardımlarından dolayı Dr. Ahmet Yeşilyurt'a, deneylerim boyunca desteğini eksik etmeyen çalışma arkadaşlarım Gülbahar Böyük, Meltem Ateş, Sercan Mercan'a, anlayışı için Fizyoloji AD. Başkanı Sayın Prof. Dr. Neslihan Dikmenoğlu'na, H.Ü.T.F. Fizyoloji ailesindeki tüm saygıdeğer hocalarıma ve arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman yanımda olan annem, babam ve kardeşlerime, sabrı için kızım İnci'ye ve hem desteği hem de floresan resimlerinin canlılık analiz programı için eşim Bahtiyar'a çok teşekkür ederim.

Bu tez DPT tarafından desteklenen "Pankreas Adacık Hücre İzolasyon Merkezi Altyapı Projesi (No: 2008K120370)" kapsamında gerçekleştirilmiştir.

ÖZET

Dağılı Gül A.Ş., Oral Karvakrol Uygulamasının İzole Sıçan Pankreas Adacık Hücrelerinde H₂O₂ ile Oluşturulan Hasara Karşı Etkileri, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Uzmanlık Tezi, Ankara, 2010. Diabetes Mellitus (DM), akut ve kronik komplikasyonları ile tüm dünya popülasyonunun yaklaşık % 6'sını etkileyen kronik metabolik bir hastalıktır. DM'ta, pankreas adacıkları beta hücrelerinden insülin salgılanması bozulur, bu durum glikoz intoleransı ve hiperglisemi ile sonuçlanır. Adacık nakli, diyabet tedavisindeki insülin replasman terapisine alternatif bir tedavi yöntemidir, ancak pankreas adacık hücrelerinin izolasyonu ve saflaştırılması sırasında kimyasal, mekanik hasarlar ve oksidatif stres oluşur. Birçok farmakolojik madde, işlemler sırasında oksidatif strese bağlı hücresel hasarın önlenmesi ve adacık fonksiyonlarının korunması için incelenmektedir. Karvakrol, antioksidan, antimikrobiyal, antifungal ve antiinflamatuvar özellikleriyle bilinen bir uçucu yağdır. Bu çalışmanın amacı izolasyon öncesinde oral olarak uygulanan karvakrolün sıçanlardan nakil amacıyla elde edilen pankreas adacıkları üzerine olası koruyucu etkisini incelemektir. Sıçanlara 9 gün karvakrol (20, 40 ve 80 mg/kg/gün) uygulandıktan sonra pankreas adacıkları elde edildi. Elde edilen adacıklar 0, 150 ve 300 µM H₂O₂ içeren ortamlarda +4°C'de 15 dakika bekletildi. Bu işlemlerin sonrasında adacıkların canlılığı florescein diasetat (FDA) ve propidyum iyot (PI) kullanılarak floresan mikroskop ile değerlendirildi. Bir miktar adacık süspansiyonu lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve apoptoz göstergesi olan DNA fragmentasyonu analizleri için saklandı. Sonuçlara göre sıçanlara 20 mg/kg/gün karvakrol uygulanması H₂O₂'in etkisine karşı koruyucu oldu. Karvakrol 20mg/kg/gün grubunun canlılık oranları kontrol ve DMSO gruplarına kıyasla anlamlı olarak daha iyi idi ($P<0,05$). Ayrıca, adacıklara 20 mg/kg/gün karvakrol uygulanması H₂O₂'in yol açtığı lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonundan hücreleri korumuştur ($P<0,05$). H₂O₂ uygulanması adacıkların hasara uğramasına ve DNA fragmentasyonuna yol açmıştır. 20 mg/kg/gün karvakrol uygulanan gruptaki adacık hücrelerinde ise çok az DNA fragmentasyonu gözlenmiştir. Sonuç olarak, karvakrol tedavisi H₂O₂'in sebep olduğu adacık hücre hasarını düzeltmektedir. Ancak, karvakrol dozu önemlidir ve bizim sonuçlarımız 20 mg/kg/günlük dozun 40 ya da 80 mg/kg/gün dozlarına kıyasla daha etkili olduğunu göstermektedir. Sıçanlara 20 mg/kg/gün karvakrol dozu uygulanması adacıkların hücre canlılığını korumuştur. Adacık hücrelerini erken hasara karşı korumak amacıyla izolasyon işlemi öncesinde donöre karvakrol uygulanması önerilebilir. Ancak, izolasyon işlemi ve hücre canlılığını transplantasyon öncesi iyi hale getirebilmek için daha ileri araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Pankreas, Langerhans adacıkları, Oksidatif Stres, Karvakrol.

Destekleyen Kurumlar: DPT Projesi No: 2008K120370.

ABSTRACT

Dağlı Gül A.Ş., The Effects of Oral Carvacrol Treatment Against H₂O₂ Induced on Isolated Pancreas Islet Cells in Rats, Hacettepe University Faculty of Medicine, Thesis in Physiology, Ankara, 2010.

Diabetes mellitus (DM) is a chronic metabolic disorder affecting about 6% of population worldwide with its acute and chronic complications. In DM, insulin secretion from the pancreatic islet beta cells is impaired, resulting in glucose intolerance and hyperglycemia. Islet transplantation is an alternative treatment of insulin replacement therapy in diabetes mellitus, but many chemical, mechanical damages and oxidative stress occur during isolation and purification of pancreatic islet cells. Many pharmacological materials are investigated to prevent cellular damage due to oxidative damage during the process and protect islet function. Carvacrol is a well known essential oil for its antioxidant, antimicrobial, antifungal and antiinflammatory properties. The aim of this study is to investigate the possible protective effects of carvacrol on isolated pancreas islets for transplanting purposes from rats after oral carvacrol treatment. After carvacrol (20, 40 and 80 mg/kg/day) application to rats, pancreas islets were isolated. The isolated islets were incubated within 0, 150 and 300 μ M H₂O₂ containing medium at +4°C for 15 min. Then, the islets were examined with fluorescein diacetate (FDA) and propidium iodide (PI) mixture for islet viability by using a fluorescence microscope. A number of islets were stored for lipid peroxidation, protein oxidation and DNA fragmentation analysis, an index for apoptosis. According to the results, 20 mg/kg/day carvacrol treatment to rats prevented against the effect of H₂O₂. Carvacrol 20mg/kg/day group had better cell viability ratio in comparison to control and DMSO groups ($P<0,05$). In addition, carvacrol application protected the cells from lipid peroxidation and protein oxidation induced by H₂O₂ ($P<0,05$). H₂O₂ caused tissue injury and DNA fragmentation. Very little DNA fragmentation is observed on islet cells from 20 mg/kg/day carvacrol treated group. In conclusion, carvacrol treatment ameliorates islet cell injury induced by H₂O₂. However, the dose of carvacrol is important and our results suggest that 20 mg/kg/day dose is more effective than 40 or 80 mg/kg/day doses. The islet cell viability is protected with carvacrol 20 mg/kg/day dosage in rats. Application of carvacrol to the donor before isolation process may be suggested to protect islet cells from early damage. However, further investigation is needed to improve the isolation procedure and cell viability before transplantation.

Key words: Pancreas, Islets of Langerhans, Oxidative Stress, Carvacrol.

Supported by DPT Project Nr: 2008K120370.

İÇİNDEKİLER

	<u>sayfa</u>
TEŞEKKÜR	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER	viii
TABLolar	ix
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Pankreas ve Endokrin Fonksiyonu	3
2.1.1. Pankreasın Morfolojik Özellikleri	3
2.1.2. Pankreasın Endokrin İşlevi ve Langerhans Adacıkları	4
2.1.3. Tipik Langerhans Adacık Organizasyonu	5
2.1.4. Pankreasın morfogenezi	8
2.1.5. Bir Pankreas Beta Hücresinin Yaşam Döngüsü	10
2.1.6. İnsülin	12
2.1.7. Beta Hücresi İşlev Bozukluğu ve Diabetes Mellitus	22
2.2. Primer Sıçan Adacıklarında ve Beta Hücre Serilerinde HücreSEL Canlılık Değerlendirme Yöntemleri	27
2.2.1. Primer Adacık Hücrelerinde Canlılık Değerlendirme Yöntemleri	27
2.2.2. Klonal İnsülinoma Hücre Serilerinde Canlılık Ölçümleri	28
2.3. Karvakrol	30
2.3.1. Uçucu Yağlar Hakkında Genel Bilgi	30
2.3.2. Uçucu Yağların Elde Edilme Yöntemleri	30
2.3.3. Kekik ve Temel Uçucu Yağ Bileşenleri	32
2.3.4. Karvakrolün Etkileri	33
3. GEREÇ ve YÖNTEM	37
3.1. Deney Düzenegi	37

3.2. Pankreas Adacık İzolasyon Prosedürü	38
3.2.1. Kimyasalların Temini ve Solüsyonların Hazırlanması	38
3.2.2. Pankreasın Çıkarılması	39
3.2.3. Adacıkların Saflaştırılması	41
3.3. Pankreas Adacıklarının Sayımı	41
3.4. Adacıkların H ₂ O ₂ ile Muamele Edilmesi	43
3.5. Pankreatik Adacık Canlılığının Propidiyum İyot (PI) ve Floresein Diasetat (FDA) Kullanılarak Floresan Mikroskop ile Değerlendirilmesi	44
3.6. Lipit Peroksidasyonu ve Protein Oksidasyonu Analizi	45
3.7. DNA Fragmantasyonu Tayini	45
3.8. İstatistiksel Analizler	46
4. BULGULAR	47
4.1. Floresan (PI/FDA) Boyama ile Canlılık Düzeyleri	47
4.2. Protein Oksidasyonu ve Lipit Peroksidasyonu	52
4.3. DNA Fragmantasyon Düzeyleri	55
5. TARTIŞMA	59
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	65
KAYNAKLAR	67

SİMGELER ve KISALTMALAR

ACh	Asetilkolin
ADA	Amerikan Diyabet Birliği
ATP	Adenozin trifosfat
CAMs	Hücre adezyon molekülleri
CAT	Katalaz
cm	Santimetre
DAG	Diaçilgliserol
dL	Desilitre
DM	Diabetes mellitus
DNA	Deoksiribonükleik asit
DTZ	Ditizon
Ep-CAM	Epitelyal hücre adezyon molekülü
FBS	Fetal sięır serumu
FDA	Floresein diasetat
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
g	Gram
GIP	Gastrik inhibitör peptid
GLP	Glukagon benzeri peptid
GLUT	Glukoz taşıyıcı
GTP	Guanozin trifosfat
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HBSS	<i>"Hank's Buffered Salt Solution Medium"</i>
HDL	Yüksek dansiteli lipoprotein
IEQ	Adacık eşdeğeri
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IP3	İnozitol 1,4,5-trifosfat

IRS	İnsülin reseptör substrat
kg	Kilogram
L	Litre
LDL	Düşük dansiteli lipoprotein
LPM	Lateral plak mezoderm
m	Metre
MAPK	Mitojen ile aktiveleşen protein kinaz
MDA	Malondialdehit
mg	Miligram
mL	Mililitre
MTS	" <i>Methanethiosulphonate</i> "
NIDDM	İnsüline bağımlı olmayan diabetes mellitus
OGTT	Oral glukoz tolerans testi
PBS	Fosfatla tamponlanmış salin
PC	Protein karbonil
PI	Propidyum iyot
RPMI	" <i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i> "
SOD	Süperoksit dismutaz
SUR	Sülfanilüre reseptörü
TC	Toplam kolesterol
TG	Trigliserit
TGF- β	Transforme edici büyüme faktörü-beta
VLDL	Çok düşük dansiteli lipoprotein

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Langerhans adacıklarında tipik hücresel dağılımın şematik gösterimi.	6
Şekil 2.2. Adacıkların kanlanması.	7
Şekil 2.3. Proinsülinin primer yapısı ve aminoasit dizilimi.	12
Şekil 2.4. İnsülinin hekzamerik yapısı.	14
Şekil 2.5. Olgun insülin vezikülleri.	15
Şekil 2.6. Bir pankreas beta hücresinden insülin salgılanmasının şematik gösterimi.	18
Şekil 2.7. Karvakrol ve timolün kimyasal yapıları.	33
Şekil 3.1. Pankreas dokusunun cerrahi olarak çıkarılma aşamaları.	40
Şekil 3.2. Işık mikroskopunda DTZ boyası ile boyanmış adacıklar.	43
Şekil 4.1. Floresan boyama ile canlılık düzeylerinin grafiği.	49
Şekil 4.2. PI/FDA ile boyanmış kontrol grubu adacık resimleri.	50
Şekil 4.3. PI/FDA ile boyanmış karvakrol 20 mg/kg/gün grubunun adacık resimleri.	51
Şekil 4.4. Protein karbonil düzeylerinin grafiği	53
Şekil 4.5. Malondialdehit düzeylerinin grafiği	55
Şekil 4.6. Kontrol gruplarının DNA fragmentasyonu.	56
Şekil 4.7. DMSO gruplarının DNA fragmentasyonu.	57
Şekil 4.8. Karvakrol 20 mg/kg/gün gruplarının DNA fragmentasyonu.	58

TABLÖLAR

Tablo 4.1. Deney gruplarının canlılık düzeyleri	47
Tablo 4.2. Protein karbonil düzeyleri (nmol/mg prot)	52
Tablo 4.3. Malondialdehit düzeyleri (nmol/mg prot)	54

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Tüm dünyada 200 milyondan fazla insanı etkilemekte olan Diabetes Mellitus (DM), adacık kaybı ve/veya işlev bozukluğu sonucu kan şekerinin kontrol edilememesi ile tanımlanan kronik bir hastalıktır. DM hastalığının etiyolojisinde genetik yatkınlık, otoimmünite, beslenme alışkanlıkları, stres ve viral enfeksiyonlar gibi birçok etken yer almaktadır. Etiyolojisinde hangi etken rol oynarsa oynasın sonuç, beta hücre yıkımı ve işlev yetersizliğidir.

Kan glikoz düzeyinin kontrol edilememesi uzun dönemde aterosklerotik kalp hastalığı, retinopati, nöropati ve nefropati gibi komplikasyonların oluşmasına sebep olur. Bu yüzden DM'un tedavisinde öncelikle kan şekerinin düzenlenmesi hedeflenmektedir. Tedavi, genellikle hastalığın başlangıç döneminde oral antidiyabetiklerle; ilerleyen dönemlerde ilaçlara cevapsızlığın gelişmesi ile beraber insülin replasman terapisi şeklinde yapılmaktadır. İnsülin replasman tedavisinde her gün belirli aralıklarla enjeksiyon yapılmasının gerekliliği ve fizyolojik geribildirim mekanizmalarının yetersiz oluşu, hastaların yaşam kalitesini olumsuz etkilemektedir. Bu nedenle replasman tedavisine alternatif yöntemler geliştirilmektedir. Pankreas nakli ve son yıllarda Langerhans adacık nakli de bu amaçla tedavi protokollerinde yerini almaya başlamıştır; ancak adacık izolasyonu ve nakli sırasındaki bazı problemler insülinsiz geçirilen dönemin bir veya birkaç yılla sınırlı kalmasına neden olmaktadır. İnsan beta hücre serileri, kültürde hızla dediferansiye olmaları ve özelliklerinin değişmesi nedeni ile henüz nakilde kullanılamamaktadır (1).

İzolasyon, saflaştırma ve kültür aşamaları sırasında adacıklar başta oksidatif stres olmak üzere çeşitli streslere maruz kalarak hasarlanırlar. Nakil öncesi adacıkların gördüğü zarar ile apoptoz oranının arttığı ve naklin başarısının düştüğü gösterilmiştir (2, 3, 4). Bu nedenle sınırlı sayıda elde edilebilen adacıkların nakil öncesi canlılık düzeyleri oldukça önemli bir araştırma konusu olmuştur.

Pankreas beta hücresi, antioksidan savunma sistemini oluşturan superoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerce fakir

olduğu için serbest radikallere karşı dayanıksızdır (5). İzolasyon sırasında meydana gelen oksidatif hasara çevre ekzokrin dokunun salgıladığı sitokin ve kemokinlerle oluşan inflamatuvar cevabın da eklenmesi ile beta hücrelerinin apoptozu artmaktadır. Bu yüzden adacıkların canlılığını etkileyebilecek birçok antioksidan, antiapoptotik, antiinflamatuvar madde araştırılmıştır.

Karvakrol, antioksidan, antiinflamatuvar, antifungal, antitümöral antispazmodik, etkileri olan bir kekik uçucu yağı bileşenidir. Karvakrolün düşük dozlarının insan lenfositlerini, testis ve karaciğer hücrelerini oksidatif DNA hasarına karşı koruduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (6, 7).

İzole edilen pankreas adacıkların canlılığının artırılması, transplantasyonda kullanılacak adacıkların etkili olabilmesini kolaylaştıracaktır. Karvakrol uygulanması sonrası elde edilen adacıkların değerlendirilmesine yönelik bir çalışma henüz yayınlanmamıştır. Bunlardan dolayı, biz de bu çalışmamızda sıçanlara 9 gün boyunca oral olarak karvakrol verilmesini takiben izole Langerhans adacıklarında canlılık, oksidatif hasar ve DNA fragmentasyonu gibi parametreler ile karvakrolün adacıklar üzerindeki muhtemel koruyucu etkilerini değerlendirmeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pankreas ve Endokrin Fonksiyonu

2.1.1. Pankreasın Morfolojik Özellikleri

Pankreas, sindirimde, karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında, enerji substratlarının kullanımı ve depolanmasında önemli rol oynayan endokrin ve ekzokrin işlevlere sahip bir organdır. Ekzokrin asiner hücreler sindirim için gerekli pro-enzimleri sentezler ve duodenuma drene olan duktal sisteme boşaltır. Ekzokrin doku içinde dağılmış olarak iç salgı hücrelerinden oluşmuş Langerhans adacıkları bulunur.

Erişkin insan pankreası, 65-125 g ağırlığında, 12-15 cm uzunluğundadır. "*Regio epigastica*" ve "*regio hypochondriaca sinistra*"da yer alır. "*Planum transpyloricum*" yüksekliğinde, midenin arkasında, karın arka duvarını enine çaprazlayarak duodenumdan dalağa doğru uzanır. "*Caput pancreatis*" (baş), "*corpus pancreatis*" (gövde) ve "*cauda pancreatis*" (kuyruk) olmak üzere üç parçaya ayrılır.

Pankreatik Kanallar

"*Ductus pancreaticus*" (Wirsung kanalı)

Pankreası soldan sağa doğru çaprazlar. Pankreasın kuyruk bölümünde bulunan lobuluslara ait küçük kanalların birleşmesiyle başlar (8). Duodenumun ikinci bölümünün ortası hizasındaki "*papilla major duodeni*"ye "*ductus choledochus*" ile beraber açılır.

"*Ductus pancreaticus accessorius*"

Mevcut ise pankreas başının üst bölümünü drene eder ve sonra "*ductus pancreaticus*"un biraz üstünde "*papilla duodeni minor*" üzerinden duodenuma açılır. "*Ductus pancreaticus accessorius*" sıklıkla "*ductus pancreaticus*" ile bağlantı kurar (9).

Pankreasın Kanlanması

Arterler

Dorsal lob, esas olarak çölyak trunkusun gastroduodenal ve splenik arter dalları tarafından beslenirken ventral lob, superior mezenterik arterin inferior pankreatikoduodenal dallarıyla beslenmektedir (10).

Venler

"*Vena portae*", "*vena splenica*" ve "*vena mesenterica superior*"a dökülür.

Lenfatikler

Lenf damarları arterleri izleyerek "*nodi lymphatici pancreatici*", "*nodi lymphatici pancreaticoduodenales*"e ve bu lenf düğümlerinden "*nodi lymphatici mesenterici superiore*"e, "*nodi lymphatici coeliaci*"ye dökülür.

Pankreasın sinirleri

"*Plexus lienalis*" içinde "*nervus Vagus*" ve "*nervi Splanchnici*"den gelir. Langerhans adacıkları ("*insulae pancreaticae*") özellikle kolinerjik innervasyondan zengindir (8).

2.1.2. Pankreasın Endokrin İşlevi ve Langerhans Adacıkları

1869 yılında Paul Langerhans, mikroskopla pankreasın yapısını incelerken, pankreasın dış salgı (ekzokrin) dokusunun içinde yayılmış hücre kümelerine rastlamıştır. Bir süre sonra Eduard Laguesse, daha sonraları "Langerhans adacıkları" diye adlandırılacak olan ve o dönemde işlevleri bilinmeyen bu hücreler için, sindirimde rolü olan bir salgı üretiyor olabilecekleri fikrini öne sürmüştür. 1889'da Oscar Minkowski, Joseph von Mering ile birlikte yürüttükleri bir çalışmada, pankreasın sindirim üzerindeki olası rolünü gösterebilmek için sağlıklı bir köpeğin pankreasını çıkarmıştır. Bundan birkaç gün sonra, köpeğin idrarının üzerinde sineklerin uçtuğu farkedilmiş ve köpeğin idrarı test edildiğinde de içinde şeker olduğu ortaya çıkmıştır. Bu, pankreas ve şeker hastalığı arasındaki ilişkiyi ortaya koyan ilk

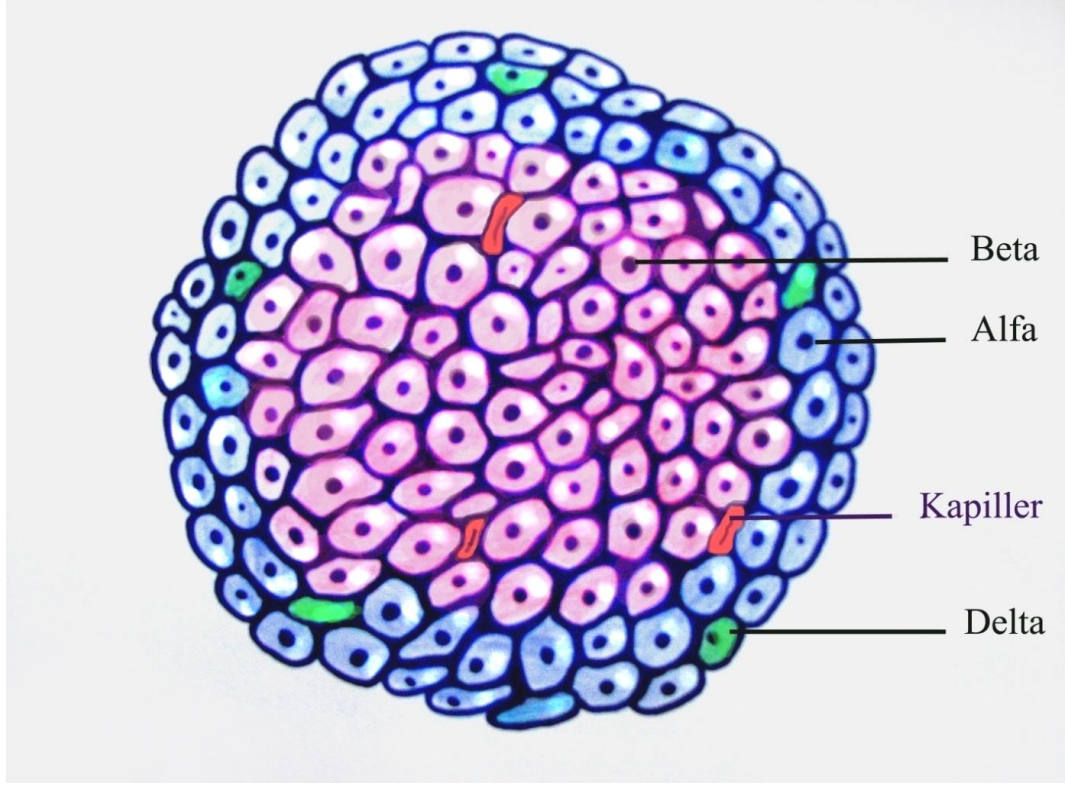
bulgu olmuştur. 1901 yılında ise, Eugene Opie'nin Langerhans adacıkları ile şeker hastalığı arasındaki ilişkiyi açıkça ortaya koymasıyla, bir başka önemli adım atılmıştır (11, 12).

1916 yılında Schafer, pankreatik adacıklardan antidiyabetik bir hormonun salgılandığını öne sürmüştü ve Latince'de "*ada*" anlamına gelen "*insula*" olarak isimlendirmiştir (13). 1920'lerin başlarında Frederick Banting ve John Macleod pankreastan diyabetik hayvanların kan şekerini düşürebilen bir madde elde etmeyi başarmışlardır. Diyabetik hastalarda insülinin kullanılabilmesi ise 1922 yılında gerçekleşmiştir (14, 15).

1923 yılı Nobel ödülleri komitesi insülinin başarılı bir biçimde elde edilebilmesi ve diyabetin insülin ile tedavi edilebilir hale gelmesi üzerine Banting ve Macleod'a Nobel fizyoloji ödülünü layık görmüşlerdir (11). 1926'da Abel kristalize insülini, ardından Jensen ve Evans B-zincirinin N-terminal fenilalanini hidrolize etmiş ve insülinin protein yapıda olduğunu göstermiştir (16, 17).

2.1.3. Tipik Langerhans Adacık Organizasyonu

Langerhans adacıkları, insulin, glukagon, pankreatik polipeptid ve somatostatin gibi hormonları sentezleyerek kapiller dolaşıma oradan portal vene boşaltır. Adacıklar pankreasta dağınık şekilde bulunur, değişik büyüklükte dirler ve ortalama bir adacık 1000 kadar hücre içerir. Bunların %80'i beta hücreleridir ve bu hücreler, adacığın merkezinde, non-beta hücreler tarafından çevrelenmiş olarak bulunur (Şekil 2.1). İnsan pankreasında bir milyon kadar adacık bulunur ve adacıklar, pankreasın toplam kütlesinin sadece %1'ini oluşturur (18).

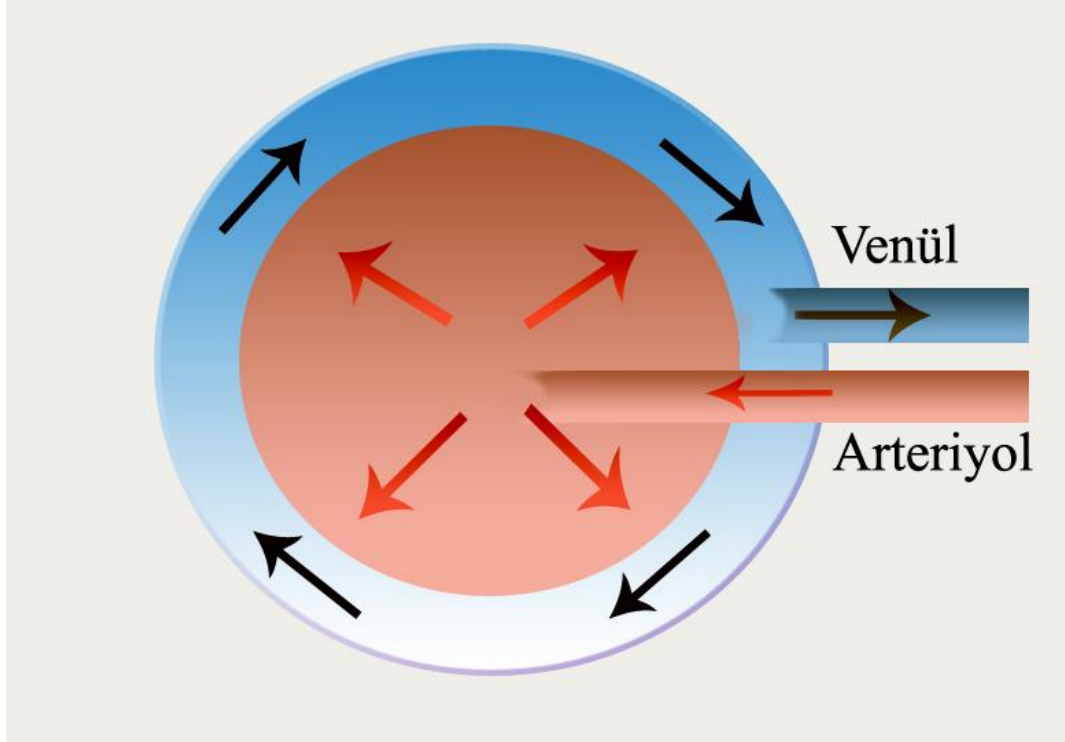


Şekil 2.1. Langerhans adacıklarında tipik hücresel dağılımın şematik gösterimi. Beta hücrelerinden oluşmuş bir çekirdek etrafında diğer hücreler yerleşmiştir.

Adacık hücreleri birbirine endokrin hücrelerin yüzeyinde bulunan hücre adezyon molekülleri (CAMs) ile bağlıdırlar (19, 20). Epitelyal hücre adezyon molekülü (Ep-CAM="human pancarcinoma antigen"), adacık gelişiminde, özellikle duktal epitelyumdan adacık benzeri hücre kümelerinin oluşmasında düzenleyici rol oynamaktadır (21). Ca^{+2} bağımsız nöral hücre adezyon molekülü (NCAM) de organogenez sırasında hücre tipi farklılaşmasında önemlidir. Bu adezyon molekülünün eksikliğinde adacık hücre dağılımı rastgele olmakta ve başlangıç yapısını kaybetmektedir (22). Beta hücrelerinin başlangıç demetlenmesi, ayrıca Ca^{+2} bağımlı hücre adezyon moleküllerinden (CAM) kaderinlere bağlıdır. Kaderinlerin yokluğunda, alfa hücrelerinin agregasyonu hariç olmak üzere adacık kümelenmesi yok olur (23).

Adacıkların kanlanması birçok endokrin organda olduğu gibi oldukça yoğundur. Adacıkların toplam kitlesi tüm pankreasın sadece %1'i olmasına rağmen, toplam pankreatik kan akımının %10'u adacıklara aittir.

İntraarteriyal olarak glikoz verilirse adacık kan akımı %80'in üstüne kadar çıkabilir. Ratlarda yaşla beraber toplam pankreas kan akımı ilerleyici olarak azalırken adacık kan akımı artmaktadır (24, 25).



Şekil 2.2. Adacıkların kanlanması. Adacıkların merkezine doğru giden arteriyoller, kapiller ağa dönüşür ve adacıkların çevresine kanı taşıyan venüllere dönüşüp birleşir (26).

Küçük afferent arterler, adacıkların merkezine gider ve burdan fenestreli endotele sahip kapiller ağına dönüşür. Bu kapillerler, adacıkların çevresine kanı taşıyan venüllere dönüşüp birleşir, böylece beta hücresindeki insülin önce alfa, delta, PP hücrelerinin etrafına gider (Şekil 2.2). Kanlanmanın bu şekilde olması, intersitisyel sıvının ven yönüne taşınmasına yarar ve beta hücre yan yüzlerinin glikoz ve diğer düzenleyici maddelerle temasını sağlar (parakrin etki). Adacık hormonları, kapiller dolaşımdan portal vene ve ardından sistemik dolaşıma ulaşırlar (27, 28, 29).

Langerhans adacıkları, parasempatik, sempatik ve peptiderjik innervasyona sahiptir. Ayrıca çevre delta hücreleri dentritiktir ve beta hücre

merkezine granüllü yumrular gönderip somatostatin salgılar. Bu da adacığın kendi içindeki parakrin ve nörokrin düzenlemesine yardımcı olur. Adacık hücreleri paralel destelenmiş ve salgı granüllerini düzgün bir sıra halinde ayıracak mikrotübül sistemi içermektedir (30).

2.1.4. Pankreasın morfogenezi

Gastrulasyon sırasında mezoendodermal hücreler göç ederek endodermal ve mezodermal germ tabakalarını oluştururlar. Endodermal hücreler embriyonun gastrointestinal traktusunu oluşturmak üzere yayılırlar. Sindirim sisteminin organları, bu hücre tabakalarının anteroposterior ve dorsal-ventral aksı boyunca uzanır (31, 32, 33). Gastrulasyon sırasında duodenal parçanın her iki tarafında dorsal ve ventral pankreatik tomurcuk belirir. Dominant ventral tomurcuk safra kanalını takiben döner, dorsal tomurcuğa yaklaşır, ardından ventral ve dorsal parçalar kaynaşır. Ventral parça, pankreasın başını; dorsal parça, pankreasın gövde ve kuyruğunu yapar (34, 35).

Pankreatik dönüşümün gerçekleşmesinde birçok faktör rol oynamaktadır. Notokord bir seri sinyal proteini sağlar ve dorsal pankreasın organogenesisini başlatır. Transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF- β) ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) sinyal yolları, notokord kaynaklıdır (36). TGF- β aile üyelerinden aktivinin, kemik morfogenetik proteinlerin ve retinoik asidin endodermde pankreatik genlerin ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir. Lateral plak mezodermi (LPM) ise ventral pankreasın doğru zamansal ve mekansal indüksiyonunu sağlar (37, 38). Kalp mezenşimi ve ön-bağırsak endoderminin arasındaki etkileşimlerin ön-bağırsağın ve karaciğer progenitör hücrelerinin farklılaşmasını regüle ettiğine dair çalışmalar mevcuttur. Kalp mezenşimi de TGF- β ve FGF sinyallerini üretir. Bu sinyaller hem karaciğer hem pankreasın farklılaşması için gereklidir (39). FGF sinyallerinin düşük düzeyleri pankreatik gen ekspresyonunu başlatır ve sonik "*hedgehog*" sinyallerini bloke eder. FGF sinyallerinin yüksek düzeyleri pankreas indüksiyonunu bloklarken "*hedgehog*" sinyallerini artırır. Yani

pankreasın oluşumu FGF sinyallerinin düşük dozuna ve "*hedgehog*" sinyalinin inhibisyonuna bağlıdır (36). Sonraki aşamalar sırasında endodermal tabaka genişleyip katlanarak tüp benzeri yapılar oluşturur. Erken aşamalardan farklı olarak mezeneşimal sinyaller artık kan damarlarını ve küçük vitellin venleri oluşturur. Bir vasküler büyüme faktörü reseptörü olan Flk-1 geninden yoksun transjenik farelerde, dorsal pankreatik epitel farklılaşması bozulur (40).

Endodermal paternin kontrolünde, endoderm kaynaklı organların oluşumunda ve pankreasın olgunlaşmasında rol oynayan transkripsiyon faktörlerinin bazıları şunlardır: Hepatik nükleer faktör 1-b ("*POU-homeodomain factor*") (41), hepatik nükleer faktör 3 a-b ("*Fox a1*" ve "*Fox a2*") (42), hepatik nükleer faktör 4a ("*orphan nucleer receptor*") (43) ve hepatik nükleer faktör 6 ("*cut-homeodomain factor*") (44), "*zinc-finger*" transkripsiyon faktörleri GATA 4, 5, 6 (45).

Erken aşamalardaki genler ise pre-pankreatik endodermden salınan iki transkripsiyon faktörüyle eksprese edilir: PDX-1 (parahoks homeodomain faktör) ve HB9 (46, 47). PDX-1'in ekspresyonunun ardından başka bir parahoks faktörü olan en çok anterior endodermden ekspresse edilen HB9 gelir. HB9 ve PDX1'in ekspresyonu başlangıç pankreas tomurcuklarının oluşumunu sağlar. Bu faktörlerin ekspresyonu matür B hücreleri tarafından reaktif edilir.

Çeşitli embriyonik sinyal yolları, pankreas organogenezi ve endokrin hücre farklılaşmasını düzenlemektedir. FGF 10, pankreatik tomurcuklar büyürken geçici olarak pankreatik mesankimden eksprese edilir. Bu da hem endokrin hem ekzokrin pankreas hücre proliferasyonunu regüle eder. Ayrıca FGF reseptörü-2, TGF- β /aktivin sinyali, ekzokrin ve endokrin hücre farklılaşmasını etkiler (48, 49). "*Soluble TGF1- β* " özellikle beta ve PP hücreleri olmak üzere endokrin hücrelerin farklılaşmasını stimüle eder. Aktivin endokrin hücre diferansiasyonunu etkiler, follistatin (aktivin reseptör antagonisti) endokrin hücre farklılaşmasını bozar ve ekzokrin hücre oluşumunu tetikler.

Hücrelerin yapışmaları, göçleri integrinlerle ve de heterodinamik transmembran proteinleri ile olur. Böylece endokrin öncül hücreler, endodermal epitelden ayrılıp çevreleyen mesenkimdeki komşu hücre dışı matrikse doğru göç eder (50). Son çalışmalarda, fetal ve olgun insan beta hücrelerinin farklı repertuvarda integrinleri eksprese edebildiği gösterilmiştir. İntegrin kompozisyonundaki değişiklikler, belki fetal hayattaki beta hücrelerinin erişkine göre neden daha hareketli olduğunu ve endokrin hücrelerin dağılım biçimini açıklayabilir (51).

2.1.5. Bir Pankreas Beta Hücresinin Yaşam Döngüsü

Fetal hayatta beta hücre kitlesi, hem beta hücre replikasyonu hem de duktus farklılaşması sebebi ile katlanarak artar; apoptoz oranı ise düşüktür (52,53). Doğumdan sonra süttten kesilene dek bu büyüme değeri erişkin değerlere düşmektedir. Ancak en belirgin beta hücre populasyon döngüsü doğumdan sonraki 3 hafta içinde görülür. Sıçanlarda doğumdan sonraki ilk 10-15 gün içerisinde endokrin pankreasta bir apoptoz patlaması görülür ancak total pankreatik beta hücre kitlesi pek değişmez, yani yeni gelen beta hücreleri bu apoptozu kompanze etmeye yeter (54). Benzer bir dalgalanma insan beta hücrelerinde de görülmektedir (55).

Beta hücrelerinden akut insulin patlamaları fetal hayatta gerekli değildir. Çünkü nispeten stabil bir nutrisyonel çevrededir. Doğumdan sonra beslenmeyle beraber hızlı salıverilmeler başlar. Doğumdan sonra IGF-1'in artmaya, IGF-2'nin ise düşmeye başladığı gösterilmiştir. IGF-2'nin doğum sonrası düşmesinin apoptoz dalgalanmasına katkısı olabileceği düşünülmektedir. Çünkü IGF-2 bu hücreler için yaşamsal bir önem taşımaktadır (56).

Fetal 19-20 günlük sıçanda (son fetal evrede) beta hücreleri çeşitli uyarılara cevap vermeye başlar. Fetal yaşam boyunca D-glikoz ve aminoasit karışımı, beta hücreleri için güçlü uyarılardır. Aminoasitler, özellikle dallı aminoasitler, beta hücre proliferasyonunu PHAS-I'in ("*phosphorylated heat-and acid-stable protein regulated by insulin*") fosforilasyonunu uyarak

gerçekleştirir (57). Beta hücre replikasyonu, büyüme hormonu ve prolaktin reseptörleriyle de stimule edilir (58). Ayrıca büyüme hormonu, hem fetal hem erişkin adacıklarından IGF-1 salımını uyarır. IGFBP (insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı proteinleri) de beta hücre mitojenik aktivitesinden sorumludur (59, 60). Bu faktörlere ek olarak, hepatosit büyüme faktörleri, epidermal büyüme faktörü, transforme edici büyüme faktörü-alfa (TGF- α) ve gastrointestinal kanaldan salınan peptidler gibi çeşitli polipeptid büyüme faktörleri de adacık hücre bölünmesini düzenlemektedir. Ayrıca glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1) de insulin sekresyonunu ve beta hücre mitogenezi uyarır (61, 62).

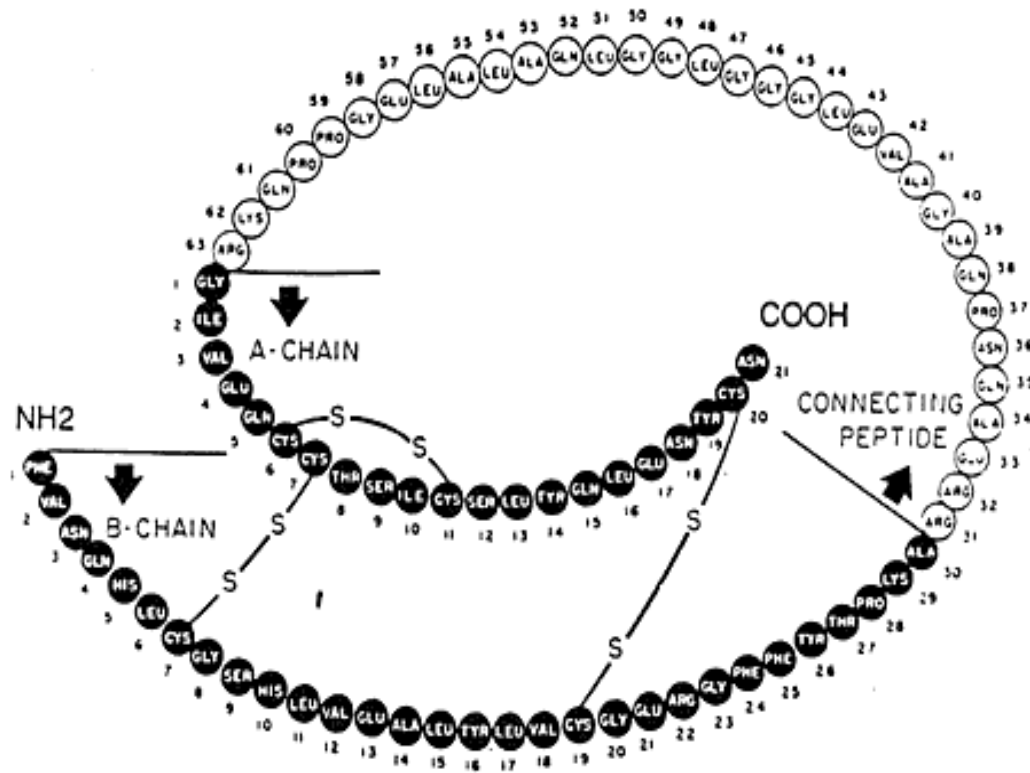
Erişkin beta hücre yenilenmesi yavaştır. Sadece %1'i herhangi bir zamanda sessiz G0 fazından sırasıyla G1, S, G2 ve M mitotik fazlarına geçip bölünebilir. Beta hücrenin ana hücreden iki yavru hücreye dönüşmesi sıçanda 14,9 saat sürmektedir. Bu süre epitelial hücre için 9-24 saat arasında değişmektedir. Beta hücre G1 fazı (DNA sentezinden önceki faz), *in vitro* 2,5 saat; S fazı (DNA sentezi), 6,4 saat; G2 fazı (premitotik), 5.5 saat; Mitoz fazı, 0,5 saat sürmektedir (63, 64).

Büyüme faktörlerinin eksikliği, iskemi, viral, bakteriyel etkenler, oksidatif stres ve çeşitli otoantikörler beta hücrelerinin yıkımını artırabilir. Apoptoz esnasında sitoplazmanın büzüştüğü ve çekirdeğin yoğunlaştığı görülür. Bu süreçte hücre içi Ca^{+2} seviyesi artar ve kaspaz aktivasyonu gerçekleşir. DNAaz'ın aktive olması ile beraber DNA fragmentasyonu meydana gelir. Tip I DM, beta hücre apoptozunun patolojik olarak arttığı bir hastalıktır. Glikolipotoksisitenin mitokondrilerde işlev bozukluğuna yol açarak reaktif oksijen türlerinin oluşumunu artırdığı ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir (65).

2.1.6. İnsülin

2.1.6.a. İnsülinin Yapısı ve Sentezi

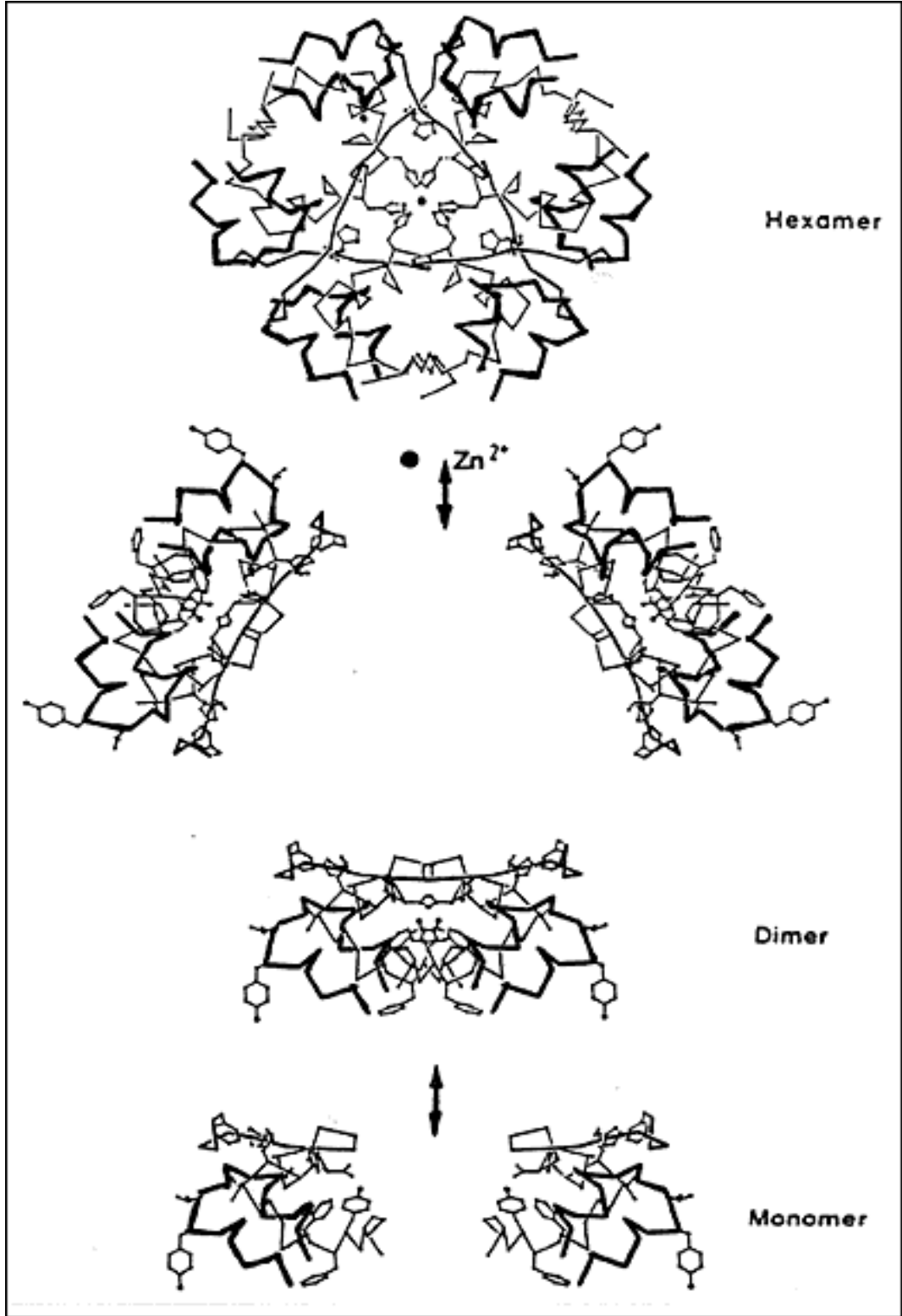
1950'lerin ortalarında Sanger'le birlikte insülinin primer yapısı keşfedilmiştir (Şekil 2.3) (66). İnsulin geni, 4 ekzon 2 introndan oluşmaktadır ve preproinsulin yapımını yönlendirir. Preproinsulin, N-ucu sinyal peptidi, insulin B zinciri, bir bağlayıcı peptid (C-peptid), insulin A zinciri olmak üzere 4 ardışık peptid içerir.



H-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-OH
16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29

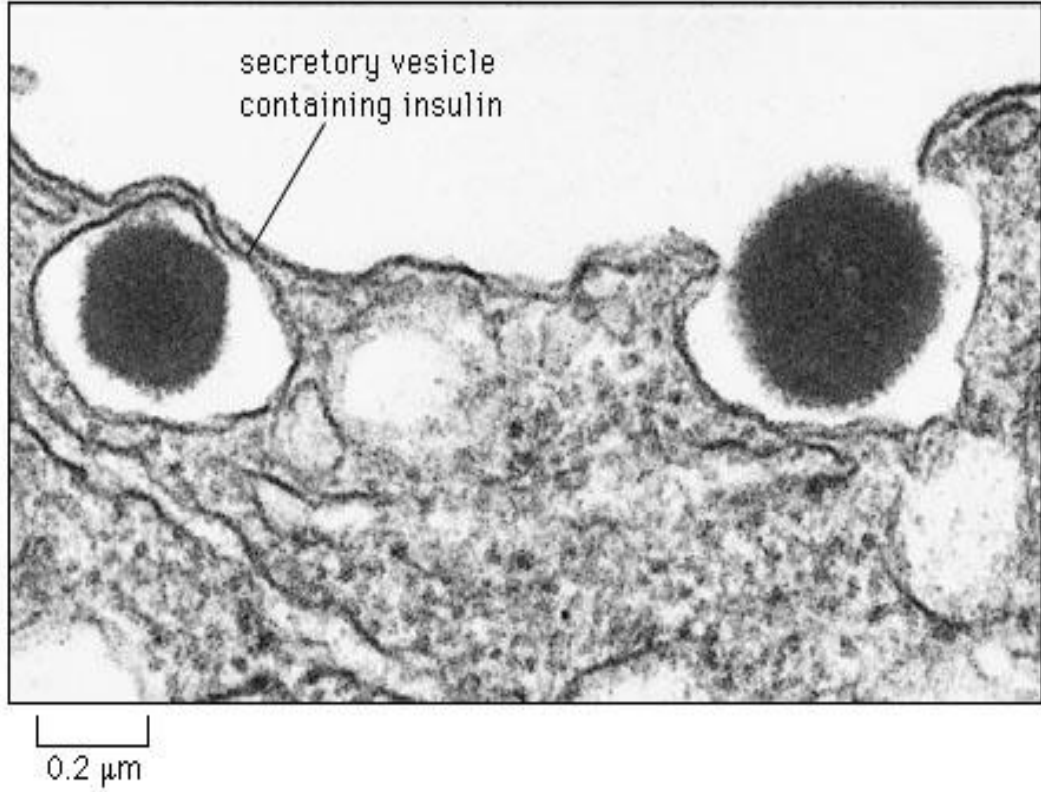
Şekil 2.3. Proinsülinin primer yapısı ve aminoasit dizilimi (67).

Proinsülinin proteolitik işlemi golgi aygıtında ve/veya erken sekretuvar veziküllerde gerçekleşir ve proinsülin granüllü endoplazmik retikulumdan golgi aygıtına transfer edilirken "*cis*" formundan "*trans*" formuna geçer. Bu geçiş sırasında ATP kullanılmaktadır (68, 69). Proinsülinin parçalanarak insülinin açığa çıkmasında iki çeşit proteaz rol oynamaktadır. Bunlardan biri tripsin benzeri endoproteaz aktivitesi gösterirken, diğeri karboksipeptidaz B benzeri ekzoproteaz aktivitesi göstermektedir (70). Bu enzimler sayesinde sırasıyla Arg-Arg ve Lys-Arg birimleri birbirinden ayrılır ve insülin ile C-peptid birbirinden ayrılarak veziküllerde depolanır (71). İnsülinin kristal yapısı, altı adet insülin molekülünün iki Zn^{+2} atomu etrafında simetrik bir eksenle birleşmesi ile oluşmaktadır. Oluşan bu yapı molekül ağırlığı yaklaşık 36000 D olan insülin hekzameridir ($insülin_6Zn^{+2}_2$) (72) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. İnsülinin hekzamerik yapısı. İnsülin monomerleri sentezlendikten sonra önce dimer sonra da hekzamer haline dönüşür; salgılandıktan sonra ise hızla dimerlerine ardından da insülin monomerlerine dönüşür (67).

İnsülin çinkoyla birleştğinde salgı granülleri olgun durumdadır. Çinkolu insülin kristalleri granülün merkezinde, C peptidi ise granül membranı ve merkez arasındaki boş alandadır (73) (Şekil 2.5).



©1998 GARLAND PUBLISHING

Şekil 2.5. Olgun insülin vezikülleri (74).

2.1.6.b. İnsülinin Salgılanması

İnsülinin salgılanmasını kontrol eden en önemli fizyolojik madde glikozdur (75, 76). Glikozun beta hücrelerine etkisi doz bağımlıdır ve oral veya intravenöz glikoz yüklenmesini takiben doza bağımlı olarak insülin ve C-peptid düzeyinde yükselme gözlenir (77, 78). İnsülin salgılanmasındaki artış, intravenöz glikoz uygulamasına göre oral uygulamada daha fazladır (79, 80). Oral glikoz alımına insülin cevabının daha fazla olmasının glikoz bağımlı insülinotropik peptid (GIP), kolesistokinin (CCK) ve glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1) gibi birçok gastrointestinal peptid hormonların aracılık etmesinden

kaynaklanabileceği düşünülmektedir ve bu etki “inkretin etkisi” olarak adlandırılır (81, 82).

Hücrelerin içine glikoz taşınmasını kolaylaştıran 12 glikoz taşıyıcısı (GLUT) tanımlanmıştır. GLUT1 glikoz taşıyıcısı, glikoz için 1,5-2 mmol/L Km değerine sahiptir, yani afinitesi yüksektir. GLUT4 insüline bağımlı glikoz taşıyıcısıdır (83).

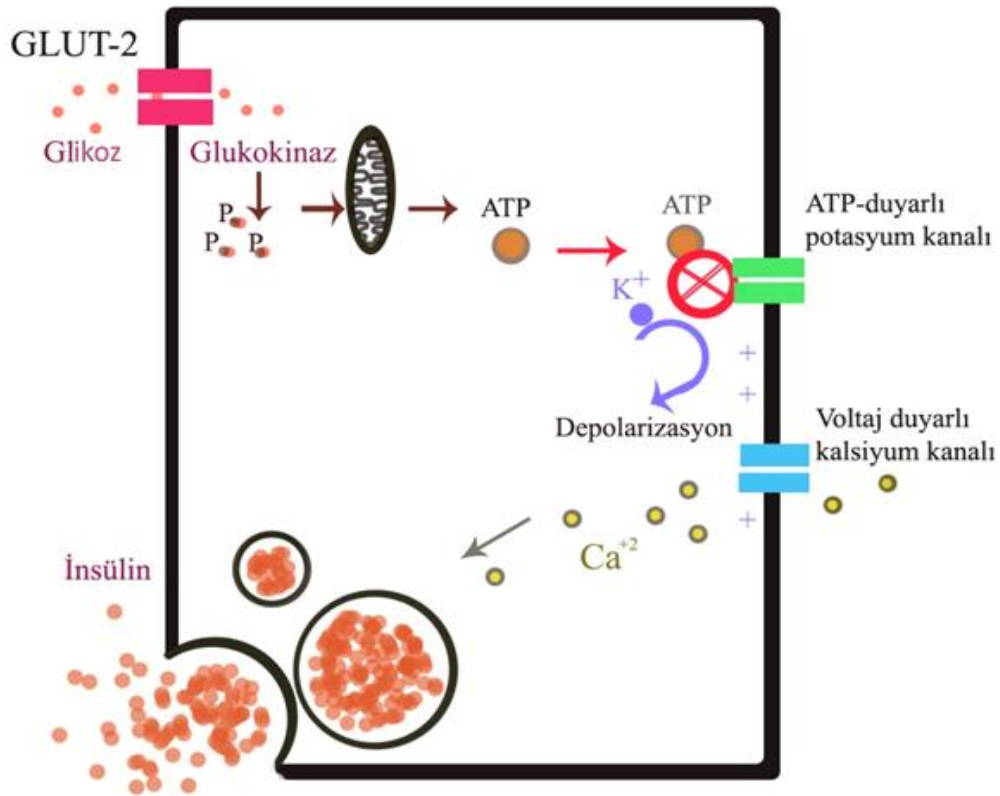
GLUT2 taşıyıcısının glikoz için Km değeri 15-20 mmol/L' dir, yani glikoza afinitesi diğer glikoz taşıyıcılarına göre daha düşüktür. Bu yüzden GLUT2, beta hücreleri için “glikoz sensörü” gibi çalışır (84, 85). GLUT2 beta hücrelerin arasındaki kanalcıkların yüzeyinde yoğunlaşmıştır. Bu da glikozun beta hücrelerindeki konsantrasyonunun interstisyel sıvıyla aynı düzeyde olmasına yardım eder (86). Glukokinaz enziminin glikoz için Km değeri fizyolojik glikoz konsantrasyon aralığının ortalarındadır ve 150 mg/dL (7 mmol/L) civarındadır (87). Glukokinaz tarafından glikoz fosforile edilir ve adacıklarda glikozun kullanılması için ilk basamak gerçekleştirilmiş olur. Glikozun fosforile olması, glikoz metabolizmasında hız kısıtlayıcı basamaktır (88, 89).

Glikozun glikolitik yolağa girmesi ile piruvat ve laktat oluşur. Glikoliz sonrası sentezlenen pirüvat ve laktat, insulin salgısı için uyarandır (90). Mitokondriyal pirüvat oksidasyonu sonucunda hücre içi ATP, ATP/ADP oranı NADH-NADPH ve H^+ konsantrasyonları artar. ATP/ADP oranının artmasıyla, ATP-duyarlı K^+ kanalı kapanır. Bu potasyum kanalları, “inward *rectifier*” K_{ir} tipi kanalların alt ailesindendir. K_{ir} kanalları 4 alt ünite içerir. Her alt ünite, M1 ve M2 olarak adlandırılan iki transmembran bölgesi içerir. Üzerinde sulfanilüre reseptörü (SUR1) bulunur (91). SUR1, “*ATP binding cassette*” (ABC) ailesi membran proteinlerinin bir üyesidir. ATP, bu kanalları kapatır, ADP ise açar (92, 93). K_{ir} ve SUR1'deki mutasyonlar, infantlarda hiperinsulinemi ve hipoglisemi ile sonuçlanır (94).

ATP-duyarlı K^+ kanallarının kapanması sonucu hücre içinden dışına K^+ sızıışının azalması, beta hücrelerinin depolarizasyonuna ve hücre içi Ca^{+2}

seviyesinin artmasına sebep olur (95, 96). Ca^{+2} seviyesinin hücre içinde artmasıyla beraber kullanıma hazır halde bulunan insülin içeren veziküllerin ekstraselüler boşluğa ekzositozu için gereken olaylar başlar. Veziküller hücre zarı proteinleriyle etkileşir ve membranla kaynaşır; böylece hegzamerler halindeki insülin ve C-peptid salgılanır (97, 98). Glikoz ile uyarılan bir beta hücresinden insülinin salgılanması, Şekil 2.6'da gösterilmiştir.

Sekretuar veziküllerle plazma membranının etkileşiminde beta hücresine ait bazı spesifik proteinler saptanmıştır. Veziküller ile membranın etkileşiminde v-SNARES (vezikül membranında), t-SNARES (hedef membranda), NSF ("*N-etil maleimid sensitive factor*") gibi sitozolik kofaktörler de ATP bağlanmasına ve hidrolizine yardım ederek ekzositoza yol açmaktadır. Bunların yanısıra Rab 3 gibi monomerik G proteinleri ve Ca^{+2} bağlayan protein benzeri sinaptotagmin de gösterilmiştir (99).



Şekil 2.6. Bir pankreas beta hücresinden insülin salgılanmasının şematik gösterimi. Artan glikoz seviyesi ile hücre içine giren glikoz oksidatif fosforilasyona uğrar. Hücre içi ATP/ ADP oranının artması ile kapanan potasyum kanalı hücre zarında depolarizasyona yol açar. Voltaj duyarlı Ca^{+2} kanallarının aktivasyonu ile beraber insülin içeren veziküllerin ekzositozu gerçekleşir (100).

İnsülin salgılanmasında glikoz dışında çeşitli hormonlar da etkili olmaktadır. Örneğin asetil kolin (Ach) beta hücre yüzeyinde bulunan muskarinik reseptörlere bağlanmasıyla inozitol 1,4,5-trifosfat (IP3) ve diasilgliserol (DAG) seviyeleri artar ve sonuçta artan hücre içi Ca^{+2} insülinin ekzositozuna neden olur. Glukagon, glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1) ve gastrik inhibitör peptid (GIP), stimülatör G proteini (Gs) ile kenetlidir ve adenilat siklaz aktivasyonu üzerinden, siklik adenosin 3'-5' monofosfat (cAMP) düzeylerini artırarak insülin salgısını artırır (101).

2.1.6.c. Glikozun İnsülin Sentezi ve Salgılanmasına Etkileri

İnsülin salgısının en önemli uyarıcısı glikozdur ve plazma insülini ile plazma glikozu arasındaki ilişki sigmoidaldır. Plazma glikozu yaklaşık 50 mg/dL'nin altına indiğinde plazma insülin düzeyi en düşüktür. Yaklaşık 150 mg/dL'lik plazma glikoz seviyesi yarı maksimal insülin salgı cevabını oluşturur; maksimal insülin salgı cevabı ise yaklaşık 300 mg/dL'lik glukoz seviyesinde gerçekleşir (30). Normal glukoz toleransından bozulmuş glukoz toleransına ve hafif NIDDM'e geçildiğinde hiperinsülinemi oluşur. Açlık glikoz düzeyi 80 mg/dL'den 140 mg/dL'e yükseldiğinde insülin düzeyi normal sağlıklı bireylere göre 2-2,5 kat artar. Açlık glikoz düzeyi 140 mg/dL'yi geçtiğinde ise beta hücrelerinin insülin salgılanması daha fazla artamaz ve açlık hiperglisemisi artıkça insülin salgılanması da kademeli olarak azalmaya başlar. İnsülin salgısının azalmaya başladığı bu sırada hepatik glikoz üretimi artmaya başlayarak açlık glisemisinin yükselmesine büyük katkıda bulunur. 250-300 mg/dL arasındaki açlık glisemi düzeyinde ise insülin salgılanması belirgin bir biçimde azalır (102).

Glikoz, glikolizisi başlatan genleri "*upregüle*" eder, beta hücresinde glukoneogenezi başlatan genleri ise "*downregüle*" eder ve protein sentezi için gerekli birçok beta hücresi geninin ekspresyonunu artırır. Örneğin endoplazmik retikuluma pre-proinsülinin girmesini sağlayan reseptör sinyal tanıma kısmının gen ekspresyonunu artırır. İnsülin mRNA'sının translasyonunu ve daha yavaş olmakla beraber insülin geninin transkripsiyonunu hızlandırır (insülin geninde bir cAMP düzenleyici element ve ayrı bir glikoz düzenleyici element tanımlanmıştır). Ancak yüksek glikoza sürekli maruz kalan beta hücresinde insülin gen transkripsiyonunun bozulduğu bunun da insülin sentezi ve sekresyonunu azalttığı gösterilmiştir.

Hipergliseminin kendisi hem beta hücresi üzerine etki ederek insülin salgılanmasını baskılar hem de periferik dokularda insülinin kullanılmasını azaltır. Hipergliseminin beta hücresi üzerine olan bu olumsuz etkisine "glikoz toksisitesi" adı verilmektedir. Serbest yağ asitlerindeki artış da glikoza benzer

şekilde insülin salgısında artışa neden olmaktadır. Ancak serbest yağ asitlerinin çok yüksek olması halinde de glikoza bağlı insülin salgısı engellenir. Bu durum ise "lipotoksisite" olarak adlandırılmaktadır (103, 104, 105).

2.1.6.d. İnsülinin Etki Mekanizmaları

İnsülin, kendi spesifik reseptörüne bağlanarak çeşitli biyolojik cevapların oluşmasını sağlar. İnsülin reseptör (IR) geninden yoksun farelerde doğumun ilk haftasıyla beraber şiddetli diyabetik ketoasidoz görülmüştür (106). İnsülin reseptör gen mutasyonları, reseptör sentezinde değişiklikler, işlevinde bozulmalara ve şiddetli insülin direnciyle ilişkili çeşitli sendromlara yol açmaktadır (107).

İnsülin reseptör sayısında orta dereceli bir düşme, Tip II DM'lu hastaların hücre ve dokularının hiperinsülinemiye verdikleri cevapta bir azalmaya yol açmaktadır (108). İnsülin reseptörü, 19. kromozomun kısa kolunda bulunan (19p13 bandı) tek bir genden sentezlenir ve plazma membranına yerleştirilir. İki ekstrasellüler alfa alt ünitesi ve iki transmembran beta alt ünitesinden oluşan heterotetramerik bir proteindir. 1971 yılında Freychet ve ark.'nın insülin reseptörünü bulmasının ardından reseptörün tirozin kinaz aktivitesi gösterdiği keşfedilmiştir. İnsülin ile muamele edilen hücrelerde fosforillenen ve insülin reseptör substrat (IRS) adı verilen bir takım proteinler tanımlanmıştır. IRS proteinleri çoklu protein yığınlarının bir araya gelmesini ve hücre içi sinyallerin oluşmasını sağlar. IRS proteinlerinin kendisi katalitik etki göstermemekle beraber çok çeşitli etkileşim bölgesi bulundurması sebebi ile insülin sinyallerinin hücrelerde çok çeşitli sonuçlar doğurmasına neden olur. IRS proteinleri farklı yapılarda olup çeşitli dokularda dağılımları değişkenlik gösterir. IRS1 ve IRS2 vücutta yaygın olarak eksprese edilirken IRS4, timus, beyin, karaciğer ve böbrekte eksprese edilir. IRS3 kemirgenlerde yağ dokusunda bulunmaktadır ancak henüz insanlarda varlığı gösterilememiştir (109, 110). İnsanlarda IRS5 ve IRS6 da tanımlanmış ancak henüz işlevleri tam olarak aydınlatılamamıştır (111). İnsülinin, insülin reseptörünün alfa alt ünitesine bağlanması ile reseptörde konformasyon

değişikliği olur. Bu değişikliklerle beraber reseptör otofosforile olarak adenosin trifosfat (ATP) bağlar ve beta alt ünitesinde intrinsek bir tirozin kinaz aktivitesi başlar (112). Reseptörün fosforilasyonu, insüline kompleks hücrel cevapların gelişmesi için gereklidir (113). Hücre yüzeyinde bulunan insülin reseptörüne insülinin bağlanmasıyla başlayan tirozin bölgelerinin fosforilasyonu, hücre içindeki katalizleyici bölgenin aktifleşmesini ve böylece hücre içindeki bir grup IRS proteininin tirozin bölgelerinin fosforillenmesine yol açar (114). Fosforillenmiş IRS proteinleri, fosfatidilinozitol-3 kinaz (PI3-K) enzimindeki düzenleyici alt birimde bulunan iki adet SH2 bölgesine bağlanır, böylece enzimin katalitik alt birimi aktifleşir. Katalitik alt birim, fosfatidilinozitolün (PI) fosforillenmesini sağlar, böylece PI'dan PI 3-fosfat; PI 4-fosfattan PI 3,4-bifosfat ve PI 4,5-bifosfattan da PI 3,4,5-trifosfat oluşur (115). PI3-K ürünleri sitoplazmada bir takım serin kinazlarla etkileşime girerek membrana bağlı bir sinyal sistemi oluştururlar, bu şekilde glikojen sentezi ve glikoz taşınması gibi pek çok işlevin düzenlenmesine aracılık ederler (116).

Glikozun hücre içine taşınmasını kolaylaştıran glikoz taşıyıcı proteinlerden GLUT4, insülin ile kontrol edilen glikoz taşıyıcısıdır ve insüline duyarlı dokular olarak bilinen kas, yağ dokusu ve kalpte hücre içi veziküllerde bulunur. Bu dokulara insülin uyarısının gelmesiyle beraber GLUT4 içeren veziküller hücre yüzeyine doğru hareketlenir (117). İnsülin etkisi ile GLUT4'ün hücre yüzeyine taşınmasına "translokasyon" adı verilir. GLUT4'ün translokasyonu için PI 3 kinaz yolağının aktivasyonu ve TC 10 adı verilen küçük bir G proteinindeki GDP'nin guanozin trifosfat (GTP) ile değiştirilmesi gereklidir (118, 119). Sonuçta insüline duyarlı dokularda hücre içine glikoz girişi artmış olur.

İnsülin etkilerini, PI3-K yolu dışında ras mitojenle aktifleşen protein kinaz (MAPK) yoluyla da gösterir. MAP kinaz ise transkripsiyon faktörlerinden c-fos ve elk-1'i de aktifleştirerek transkripsiyon aktivitesini artırır, böylece ras

sinyal yolağının aktive olması DNA sentezi ve mitogenezi uyararak hücre büyümesi ve farklılaşmasına yol açar (120).

2.1.7. Beta Hücresi İşlev Bozukluğu ve Diabetes Mellitus

2.1.7.a. Diabetes Mellitus'un Tanımı

DM, periferik insülin direnciyle beraber pankreas beta hücrelerindeki insülin salgısının kan şekerini kontrol edememesi halinde ortaya çıkan bir hastalıktır. DM'un altında oldukça geniş patofizyolojik mekanizmalar yatar, ancak en önemli ortak özellik pankreastaki beta hücrelerinin yetersizliğidir (121).

İnsülin, IGF-1 sistemi ile birlikte embriyonel gelişim sırasında bedensel büyümeyi destekler (122, 123); doğum sonrasında da pankreas beta hücrelerinin, kemik, nöron, retina gibi pek çok dokunun büyümesini ve hayatta kalmasını sağlar (124, 125). Beta hücresi işlev yetersizliğinde, insülinin eksikliğine bağlı birçok doku ve organda işlev bozukluğu görülmektedir.

Tip I DM, insülin üreten pankreas beta hücrelerinin otoimmün mekanizmalarla yıkılması sonucu gelişen kronik bir hastalıktır. Tip I DM'un nedeni veya nedenleri halen pek bilinmemektedir. En sık Kuzey Avrupalı beyaz ırktan insanlarda görülmektedir ve hastalık insidansı oranlarında coğrafi bölgeler arasında 40 kattan daha fazla farklılık olabilmektedir. Diyet, stres ve virüsler gibi çevresel faktörlerin tip I DM gelişimini etkileyebileceği, hatta bu faktörlerin temel rolleri olduğu ileri sürülmüştür. Tip I DM'a genetik yatkınlık da söz konusudur ve HLA DR3, DR4, DQA1*0301, DQA1*0501, DQB1*0201, DQB1*0302 ile birliktelik gösterir. Tip I DM'un gelişmesinde otoimmün mekanizmalar suçlanmaktadır. Pankreas adacık hücrelerinde lenfositik infiltrasyon olması (insülit) ve adacık hücreleri ile reaksiyon veren oto-antikorların varlığı otoimmüniteyi desteklemektedir. Bir zamanlar akut olarak gelişen bir hastalık olarak görülmesine karşın, bugün tip 1 DM'un doğal seyrinin bir kronik otoimmün süreç olduğu bilinmektedir. Çok sayıda

adacık hücre antijeni, tip I DM ile ilişkilendirilmiştir. Adacık hücresi sitoplazmik oto-antikorları, yüzey oto-antikorları, 64, 51, 52, 128, 152 kD oto-antikorları, insülin oto-antikorları, insülin reseptörleri oto-antikorları, karbonik anhidraz I-II oto-antikorları DNA topoizomera II oto-antikorları gibi birçok oto-antikor adacık immünitesinde belirteç olarak görülmüştür (126, 127).

Tip II DM, toplumda en sık görülen Diabetes Mellitus tipidir. İnsuline bağımlı olmayan Diabetes Mellitus (NIDDM) olarak da adlandırılan tip II DM, polidipsi, poliüri, polifaji, kaşıntı, ağırlık kaybı gibi klasik belirtiler ile ortaya çıkar, ancak çoğu kez uzun bir asemptomatik dönemi mevcuttur. Genellikle 45 yaş üzerinde ilk yakınmalar başlar. Çoğunlukla ilk tanı konulduğunda retinopati, nefropati, nöropati ve aterosklerotik kalp hastalığı gibi kronik komplikasyonlar vardır (128).

2.1.7.b. Diabetes Mellitus'un Tanı Kriterleri

Diabetes Mellitus tanısı için gereken kriterler şunlardır:

1. DM semptomlarının görülmesi (poliüri, polidipsi, açıklanamayan ağırlık kaybı) ve randomize plazma glikoz düzeyinin (günün herhangi bir saatinde öğüne bakılmaksızın ölçülen plazma glisemi değeri) 200 mg/dL veya üzerinde olması,
2. Açlık plazma glikoz düzeyinin (en az 8 saatlik tam açlık sonrası) 126 mg/dL veya üzerinde olması ve
3. Oral glikoz tolerans testi sırasında 2. saat plazma glikoz düzeyinin 200 mg/dL veya üzerinde olması gereklidir.

Açlık plazma glikoz düzeyi 110 mg/dL altında olan ve DM açısından yüksek risk taşıyan bireylerde belirli aralıklarla OGTT yapılarak bozulmuş glikoz toleransı veya diyabet aranmalıdır. Açlık kan şekeri tek başına tanı kriterini sağlıyorsa OGTT'ne gerek yoktur. Eğer hastada semptomlar yok veya hafif ise ve glisemi tanı sınırlarını zorluyor ise OGTT gerekebilir. Bozulmuş glikoz tolerans tanısı için de OGTT'ne gerek vardır. Amerikan Diyabet Birliği

(ADA) tarafından verilen tanı kriterleri ile de açlık plazma glikozuna göre tanı konulabilmektedir (129).

Glikoz Toleransının Sınıflaması (ADA)

1-Açlık plazma glikozu

Normal: 110 mg/dL'nin altında olması

Bozulmuş açlık glikozu: 110-125 mg/dL

DM: 126 mg/dL veya üzerinde olması

2-OGTT sırasında 2. saat plazma glikozu:

Normal: 140 mg/dL'nin altında olması

Bozulmuş glikoz toleransı: 140-199 mg/dL

DM: 200 mg/dL'nin üzerinde olması

2.1.7.c. Diabetes Mellitus'un Tedavisi

1922 yılında insülinin Banting, Best, Collip ve Maclead tarafından tedavide kullanılması ile DM artık hemen öldüren bir hastalık olmaktan çıkıp kronik bir hastalığa dönüşmüştür. İlk insülin (çözünebilir-regüler insülin) preparatlarının etki süreleri çok kısaydı ve büyük hacimlere gerek duyulmaktaydı. 1930'lerden sonra protein kimyagerleri, etki süresini uzatmak ve tedaviyi kolaylaştırmak için regüler insülinde değişiklikler yapmışlardır. Sonuçta protamin çinko insülin (PZI), nötral protamin Hagedorn (NPH) ve izofan insülin, globin insülin, Lente serisi (SemiLente, Lente, Ultralente) geliştirilmiştir (130). Geliştirilen bu insülinlerin etki süreleri göz önünde bulundurularak günlük tedavi protokolleri belirlenmiştir. İnsülin replasman tedavisi, glisemik kontrolü sağlamak ve komplikasyonların gelişmesini geciktirmek amacıyla halen yaygın bir biçimde kullanılmaktadır.

1980 yılından beri glisemik kontrolü iyileştirmek amacıyla, subkutan insülin pompası aracılığı ile insülin replasmanı, tedavide yer almaya

başlamıştır. Pompalarda kullanılan insülin analogları, regüler insüline göre daha iyi glisemik kontrol sağlamaktadır (131).

DM'un başlangıç aşamasında insülin replasman rejimlerine başlanmadan önce diyet ve sülfonilüre türevleri, miglitinidler, biguanid türevleri, α -glukozidaz inhibitörleri, insüline duyarlaştırıcılar, aldoz redüktaz inhibitörleri gibi oral antidiyabetikler ile tedavi önerilmektedir. İlaç ve insülin tedavilerine alternatif olarak pankreas ve Langerhans adacıklarının nakli de uygulanmaktadır.

2.1.7.d. Pankreas Transplantasyonu

Pankreas transplantasyonu ilk kez 20 Aralık 1893 yılında Dr. Watson-Williams ve cerrah arkadaşı Mr. Hansant tarafından Bristol Royal kliniğinde İngiltere'de yapılmıştır. Üç parça taze koyun pankreası, 15 yaşında bir diyabetik erkek hastanın subkutanöz dokusuna transplante edilmiş; geçici bir düzelme olmasına rağmen çocuk 3 gün sonra ölmüştür (132).

İlk klinik vaskülarize pankreas nakli, William Kelly ve Richard Lillehei tarafından 1966'da Minnesota Üniversitesi'nde böbrek nakliyle eş zamanlı olarak "*duct-ligated segmental graft*" şeklinde yapılmıştır (133). 1980'lerin ortalarına doğru cerrahi tekniklerin gelişmesiyle ve yeni immunosupresyon yaklaşımlarının elde edilmesiyle bu işlem yaygınlaşmıştır. 2002 yılında 1875 transplantasyonun 1417'si ABD'de 458'i diğer yerlerde iken bu rakam 2003 Haziran'da tüm dünyada 19.600'e ulaşmıştır. ABD'de pankreas transplantasyonunun maliyeti, hastane masrafları dahil olmak üzere 80.000 USD ile 120.000 USD arasında değişmektedir (134). Pankreas nakli en sık eşzamanlı pankreas-böbrek transplantasyonu, 2. sıklıkta böbrek sonrası pankreas ve son olarak tek başına pankreas transplantasyonu şeklinde yapılmaktadır (135).

Nakil sonrası organ reddini önlemek amacı ile immünsupresan tedaviler uygulanmaktadır, ancak bu ilaçların yan etkileri oldukça fazladır (136). Antirejection terapi olarak ilk dönemlerde azatiyoprin ve prednizon

kullanılıyorken, 1980'lerin ortalarında kombinasyona siklosporin eklenmiştir. 1990'dan sonra takrolimus ile mikofenolat mofetil ve prednizon kombinasyonu başlamış, sonraları T hücre sayısını azaltan antikorlarla indüksiyon terapisi standart hale gelmiştir. Steroidlerin yan etkilerinden dolayı steroidsiz protokoller geliştirilmeye çalışılmaktadır. Takrolimus/mikofenolat mofetil ve takrolimus/sirolimus kombinasyonları gibi ilaçlar bunlar arasındadır (137).

2.1.7.e. Adacık Transplantasyonunun Diabetes Mellitus Tedavisindeki Yeri

DM'un tedavisinde doğal insülin kaynaklarını kullanmak için, kök hücre çalışmaları yapılmakta ve klinikte de tüm pankreas ve adacık nakli uygulanmaktadır; ancak tüm pankreas nakli hem daha büyük bir cerrahi işlem gerektirmekte hem de hastalara ekzokrin doku aktarımı yapılmaktadır. Adacık naklinin daha basit ve daha az komplikasyonlu olması sebebi ile adacık nakline olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır.

Rodentlerde ilk başarılı adacık transplantasyonu adacık izolasyonunda kollagenaz enziminin kullanıma geçmesi sayesinde mümkün olabilmıştır. 1970-1980'ler arasında hayvan modelleri insanlara uyarlanmaya çalışılmıştır. 1977 yılında Najarian ve ark. tarafından azatiyoprin ve kortikosteroidler kullanılarak yapılan nakil, sıçan denemelerinden sonraki ilk başarılı klinik adacık nakli olmuştur (138).

1998 yılına dek alıcıların %61'inin nakil işleminden 1 yıl sonraya kadar insulinden bağımsız hale gelebildiği rapor edilmiştir. Hastaların yarısından az bir bölümü de 2 yıl süreyle insulinden bağımsız duruma gelebilmekteydi (139). Ancak 2000 yılında Edmonton protokolü olarak adlandırılan ve kortikosteroid kullanılmadan düşük doz takrolimus/ sirolimus uygulanarak yapılan immünsüpresif tedavi rejiminin geliştirilmesi ile 1 yıllık insülinsiz yaşam %100'e çıkmıştır. 3 yıllık insülinsiz yaşam %50 civarında iken 5 yılda bu oran %10'a düşmektedir (140, 141).

Adacık işlevinin iyi olması sadece insülin cevabını değil aynı zamanda hipoglisemideki glukagon sekresyonlarını da düzeltmektedir. Böylece, diyabetik hastalarda çok sık karşılaşılan tekrarlayıcı şiddetli hipoglisemik atakların önlenmesi de adacık nakli sayesinde mümkün olabilmektedir (142, 143).

2.2. Primer Sıçan Adacıklarında ve Beta Hücre Serilerinde Hücresel Canlılık Değerlendirme Yöntemleri

2.2.1. Primer Adacık Hücrelerinde Canlılık Değerlendirme Yöntemleri

2.2.1.a. Floresan Boyamalar

Adacık hücre canlılığını değerlendirme yöntemleri çok değişken olmakla beraber genellikle floresan mikroskopi teknikleri kullanılarak hücrelerin apoptoz, nekroz ve canlılık düzeylerinin belirlenmesi tercih edilmektedir. Konfokal mikroskop kullanımının intakt adacıklarda çalışma imkanı vermesine rağmen halen birçok araştırmacı hücreleri ayrıştırarak çalışmayı tercih etmektedir. Ancak ayrıştırma işlemi sırasında uygulanan mekanik ve enzimatik işlemlerin hücrelerin canlılığını ve işlevlerini değiştirme riski vardır. Hücrelerin ayrıştırılması için tripsin-EDTA'lı solüsyon içinde inkübe edilen adacıklara hafifçe pipetaj yapılır. Apoptoz ölçümü için floresan CaspACE substratları eklenip karanlıkta inkübe edildikten sonra floresan mikroskop altında yaklaşık 1000 adet hücre sayılarak apoptotik hücrelerin yüzdesi belirlenir.

CaspACE ile apoptoz oranının belirlenmesine alternatif bir diğer yöntem de Annexin V-Cy3 ve 6-carboxyfluorescein diacetate (6-CFDA) ile apoptotik, nekrotik ve canlı hücrelerin tayin edilmesidir. Adacık hücrelerinin ayrıştırılması ve boyanması için CaspACE yöntemindekine benzer işlemler uygulandıktan sonra canlı hücreler yeşil, apoptotik olanlar ortası yeşil plazma membranı kırmızı bir çember şeklinde, nekrotik hücreler ise tamamen kırmızı olarak izlenir.

Canlılık tayini için kullanılan başka floresan boya karışımı da propidyum iyodür (PI) ve floresein diasetattır (FDA). Ölü hücreler PI ile yeşil ışık eksitasyonu altında turuncu-kırmızı renkli floresans verirken canlı hücreler floresein diasetat boyasını alarak mavi ışık eksitasyonunda yeşil renkte izlenirler. Akridin oranj da ölü hücreler için floresein diasetat'a alternatif olarak kullanılmaktadır (144, 145, 146).

2.2.1.b. İşlev Değerlendirmeleri

Adacıklar izole edilirken ve kültürde beklerken işlevlerinin bir kısmını kaybetmektedirler. Glikoz veya arginin ile stimüle insülin, proinsülin ve C-peptid düzeyi ölçümleri ile adacık işlevleri hakkında fikir sahibi olmak mümkündür. Bu yöntemde yüksek ve düşük glikoz konsantrasyonlarına sahip RPMI medyumunu ile adacıkların inkübe edilmesi sonucu ELISA testi yapılarak insülin değerleri ölçülür. Yüksek glikoz örneklerinden elde edilen değer, düşük glikoz konsantrasyonundaki insülin değerine bölünerek stimülasyon indeksi (SI) hesaplanır. Sağlıklı ve iyi nitelikteki adacıkların SI değeri 5 veya daha fazladır (147).

2.2.2. Klonal İnsülinoma Hücre Serilerinde Canlılık Ölçümleri

2.2.2.a. Vital Boyama

Vital boyama, hücre canlılığının belirlenmesinde kullanılan oldukça kolay ve hızlı yöntemlerden birisidir. Tripan mavisini standart laboratuvar mikroskoplarında kolaylıkla incelenebilen bir boya olduğu için rutin değerlendirmelerde tercih edilmektedir. Ölü hücreler %0,04'lük tripan mavisini ile mavi olarak izlenirken canlı hücreler boyanmamış olarak görülür ve ölü hücrelerin toplam hücre popülasyonuna oranı tayin edilir. İyi kalitedeki taze adacık preparatlarında %90'ın üzerinde canlılık beklenmektedir (148).

2.2.2.b. Methanethiosulphonate (MTS)-Bazlı Proliferasyon Yöntemi

MTS (veya bir varyantı olan MTT) yöntemi hücre canlılığının veya hücre proliferasyonunun göstergesi olarak kullanılmaktadır. Ancak MTS'nin aynı zamanda mitokondrial dehidrojenaz aktivitesini de ölçmesi sebebiyle hücre canlılığının sadece indirekt göstergesi olarak kabul edilmektedir. "96-well plate" içinde inkübe edildikten sonra ELISA plak okuyucu ile 490 nm absorbansta okunarak canlı hücrelerin oranı ölçülür (149).

2.2.2.c. "Flow" Sitometrik Yöntemler

Hücre ölümü sırasında DNA'da sıklıkla yarıklanmalar meydana gelir ve DNA yüksek molekül ağırlıklı formdan düşük molekül ağırlıklı forma geçer. Bu değişim, "flow" sitometri ile monitorize edilebilir. DNA fragmentasyonu genellikle apoptozun kanıtı olarak ele alınsa da bu durum için spesifik değildir, nekrozda da ortaya çıkabilir.

DNA fragmentasyonu tayini için PBS içindeki %70'lik etanol ile sabitlenen hücreler propidyum iyot ile boyanır ve 37°C'de 30 dakika inkübe edilir. İnkübasyonu takiben örnekler "flow" sitometrik yöntem ile incelenir ve hücrelerin siklus durumuna göre bir PI yoğunluk histogramı elde edilir. Hücreler bir alt G0/G1 topluluğu içinde DNA fragmanları şeklinde belirir. Sonuçlar G0/G1 dışında S ve G2/M fazlarına göre de elde edilebilir.

DNA fragmentasyonu, farklı floresan boyalar kullanılarak da ölçülebilmektedir. PI kullanımına ek olarak Annexin V veya floroforlarla konjuge olan FITC gibi boyalar da tercih edilmektedir. Bu yöntem, erken ve geç apoptotik hücrelerin ayırtedilmesine imkan vermektedir. Hücreler Annexin V-FITC ve propidium iodide ile oda sıcaklığında, karanlıkta 15 dakika inkübe edildikten sonra "flow" sitometrik yöntemle incelenir. Sağlam hücre toplulukları hem PI hem de Annexin V ile (-); geç apoptotik veya nekrotik hücre toplulukları hem PI hem Annexin V ile (+); erken apoptotik süreçteki hücre toplulukları ise Annexin V (+), PI (-) olarak izlenmektedir (150).

2.3. Karvakrol

2.3.1. Uçucu Yağlar Hakkında Genel Bilgi

Uçucu yağlar, bitkilerden veya bitkisel ham maddelerden, su veya su buharı distilasyonu (damıtma) yolu ile elde edilen, oda sıcaklığında sıvı halde olan ancak açıkta bırakıldığında gaz haline geçen, kuvvetli kokulu ve yağimsi karışımlardır. Oda sıcaklığında buharlaşabildiklerinden "uçucu yağ", genellikle güzel kokulu olmaları ve parfümeride kullanılmaları nedeniyle "esans" gibi isimlerle anılırlar (151). Uçucu yağlar, suda çözünmezler ancak organik çözücülerde kolaylıkla çözünebilirler. Su ile karışmadıkları için yağ olarak tanımlansalar da sabit yağlardan farklıdır (152). Özellikle bitkilerin çiçek ve meyvelerinde daha yoğundurlar ancak diğer bölümlerinde de bulunabilirler (153). Kimyasal yapılarında en büyük grubu terpenler oluşturmaktadır. Bununla birlikte az miktarda alkoller, aldehytler, esterler, fenoller, azot ve kükürt içeren bileşikler de bulunmaktadır. Terpenlerin oksitlenmesi ile meydana gelen oksijenli türevler koku, tat verici ve tedavi edici özellikteki maddelerdir.

Terpenler, $(C_5H_8)_n$ formülüne uyan hidrokarbürlerdir. Terpenler, mono veya diterpen içinde yapılanmış olabilir. Grup yapılarına, çift bağ içerip içermemesine, oksijen ilavesinin olup olmamasına göre çeşitlendirilir. Yeryüzünde yaklaşık 1000 çeşit monoterpen olduğu tahmin edilmektedir. Timol ve karvakrol, monoterpenoidler ya da izoprenoidler gibi sınıflardan sentezlenmektedir (154).

2.3.2. Uçucu Yağların Elde Edilme Yöntemleri

Uçucu yağ eldesi için 1300'lü yılların başında İspanya ve Fransa'da distilasyon metodu geliştirilmiş, 1550'li yıllara gelindiğinde yeni teknikler uygulanmaya başlanmıştır (155).

Distilasyon Yöntemi

Distilasyon, sıvıların kaynama noktalarındaki farklardan yararlanılarak gerçekleştirilen bir ayırma işlemidir. Kaynama noktası düşük bileşikler, az

miktarda da kaynama noktası yüksek ve suda çözünen bileşikler bu yöntemle elde edilmektedir.

Distilasyon yöntemleri, su distilasyonu, buhar distilasyonu ve vakum distilasyonu olmak üzere üçe ayrılmaktadır. Su distilasyonu yöntemi, soğutucu ile irtibatlandırılan bir cam balon içerisinde su ve bitki materyalinin 2-8 saat süre ile kaynatılarak, su buharı ile birlikte hareket eden yağ moleküllerinin soğutucuda yoğunlaştırılıp sudan ayrıştırılması esasına dayanmaktadır. Buhar distilasyonu, taze bitkiler için uygulanmaktadır. Bu yöntemde cam kap içerisine yerleştirilen taze bitki materyaline basınç yardımıyla uygulanan buhar, yağ damlacıklarını da beraberinde sürükleyerek toplama kabına getirmekte ve yağ burada yoğunlaştırılarak sudan ayrıştırılmaktadır. Vakum distilasyonu, kaynama noktaları yüksek olan bileşikler elde etmek amacıyla sıcaklığı artırmak yerine basıncı düşürmek temeline dayanan bir yöntemdir (156).

Ayrıştırma Yöntemi

Bitkisel materyalin organik çözücüler içinde çözülmesi ile elde edilmektedir.

Eş zamanlı Distilasyon-Ayrıştırma Yöntemi

Buharla distile edilen materyalin cam balonun içerisinde ayrı bir bölüme hareket edip çözücü ile karıştırılması esasına dayanan bir yöntemdir (157, 158).

Mekanik Yöntem (Presleme)

Limon ve portakal gibi bazı turuncgillerin kabuklarındaki uçucu bileşiklerle, distilasyon yöntemi uygulandığında bozulmaktadır. Bu gibi meyvelerin kabukları bez bir torbaya koyularak soğuk hidrolik preslerde sıkılarak uçucu yağlar elde edilebilmektedir (159).

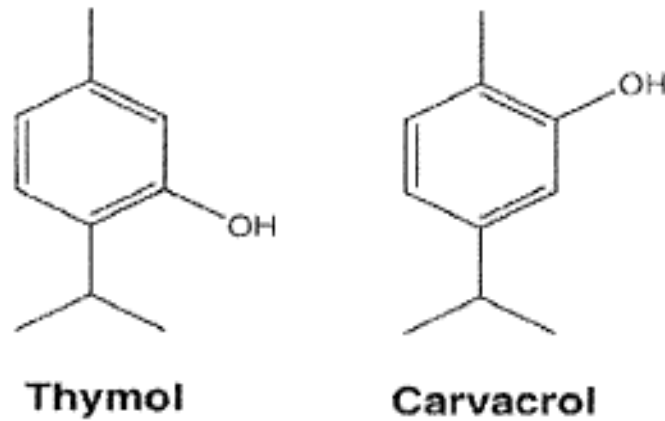
2.3.3. Kekik ve Temel Uçucu Yağ Bileşenleri

Türkiye’de farklı bitki türleri “kekik” adıyla adlandırılıp kullanılmaktadır. Bu bitkilerin bir kısmının Thymus cinsine ait olmasına karşılık, bazıları Lamiaceae familyasının Origanum, Satureja, Majorana ve Thymbra cinslerine dahildir (160). Türkiye’de ticarete kullanılan ve “ kekik yağı” adı altında satılan yağlar Origanum cinsinin türlerinden ve özellikle de *O. onites* ve *O. vulgare*’den elde edilmektedir.

Kekik uçucu yağı (oleum thymi), kekik yapraklarından buhar distilasyonu yöntemi ile elde edilir. Fenolik yapıdadır ve yüksek miktarda karvakrol (%60-92), daha az miktarda timol (%1-14) ve diğer uçucu yağ bileşenlerinden (p-simen, linalool, borneol, beta-phellandren, trans-sabinenhyd, cis-sabinenhidrat, alfa-gama terpinen) oluşmaktadır. Karvakrol, kekik olarak adlandırılan bitki türlerinde çiçeklenme döneminin sonunda en yüksek miktarda bulunur (161).

Karvakrol (2-hydroxy-p-cymeneisopropyl-o-Cresol), Türkiye ekonomisi için büyük değer taşıyan kekik uçucu yağı temel bileşenidir ve kekik yağı kalitesini belirleyen en önemli monoterpenik maddedir. Gıda endüstrisinde çok yaygın bir biçimde tat ve koku verici, antibakteriyel ve gıda koruyucu etkilerinden dolayı kullanılmaktadırlar. Çeşitli gıdalarda 0,1 ppm’den 30 ppm konsantrasyonlara dek bulunabilmektedir (162).

Karvakrol ($C_{10}H_{14}O$), 150,21 g/mol molekül ağırlığında, şeffaftan soluk sarıya kadar değişebilen renkte, antimikrobiyal, antifungal, antihelmintik, insektisidal, analjezik, antioksidan ve antispazmodik etkilere sahip bir uçucu yağdır. Kimyasal yapıları ve vücuttaki etkileri timol ile büyük benzerlik göstermektedir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Karvakrol ve timolün kimyasal yapıları (163).

Karvakrol alkol, eter ve çok az olarak da suda çözünebilir. Kaynama noktası 237-238°C, pH'ı 3,9'dur. Oral alımı takiben kan, gayta ve idrarda 2 saatten yaklaşık 48 saate dek ölçülebilen 7 metaboliti mevcuttur ve bu metabolitler oral alımdan 72 saat sonra tamamen vücuttan temizlenmektedir (164).

2.3.4. Karvakrolün Etkileri

Antimikrobiyal, Antihelmintik, Antifungal Etkileri

Eschericia coli, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Penicillium sublateralis*, *Penicillium canescens*, *Penicillium steckii* gibi birçok mikroorganizma ile yapılan çalışmalarda karvakrolün öldürücü etkisi gösterilmiştir. Karvakrolün 1mM'den 3 mM'e kadar değişen konsantrasyonlardaki varlığı *Bacillus cereus*ü kültürde 30 dakika içinde yok etmektedir. Karvakrol, *Basillus cereus* membranının H⁺ ve K⁺ gibi katyonlara geçirgenliğini artırarak öldürücü etkide bulunmaktadır (165).

Timol ve karvakrol tek başlarına veya kombinasyon halinde oral infektif hastalıkların tedavisinde oral bakteriler üzerine inhibitör etkileri sebebiyle kullanılmaktadır (166). Türkiye'de yetişen origano (*Origanum onites*) uçucu

yağlarının Lepidoptera üzerinde larvisidal etkilerini araştırmak üzere Çetin ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada en toksik komponentin karvakrol olduğu gösterilmiştir (167).

Antitümoral Etkileri

Zeytinoğlu ve ark.'nın küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre serilerinde karvakrolün etkilerini araştırmak amacıyla yaptıkları bir çalışmada karvakrolün kanser hücreleri üzerine oldukça güçlü bir inhibitör etki gösterdiği bulunmuştur (168). Karvakrol *in vitro* fare B16 melanoma hücrelerinin büyümesini baskılamaktadır (169). N-ras onkogen mutasyonunun aktivasyonu ile indüklenerek *in vitro* koşullarda kanserleştirilen myoblast hücreleri üzerine karvakrolün inhibitör etkileri bildirilmiştir (170).

Antiinflamatuvar etkileri

Karvakrolün antienflamatuvar etkiler gösterdiği 1989 yılında Lorente ve ark. tarafından bildirilmiştir (171). *Origanum vulgare* uçucu yağları ile yapılan bir çalışmada timol, karvakrol ve trans-sabinen hidratin THP1 makrofajlarında TNF- α , IL-1 β ve IL-6 sitokin sentezini azaltarak antiinflamatuvar etkiler gösterdiği bulunmuştur (172).

Antioksidan ve Antilipidemik Etkileri

Kekik uçucu yağlarının antioksidan etkilerini araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada V79 Çin hamsterleri akciğer fibroblast hücreleri 1-100 μ M timol ve karvakrol ile inkübe edilmiş ve doz bağımlı olarak artan antioksidan aktivite gözlenmiştir (173). Karvakrol ve timolün 0.1 mM ve daha düşük konsantrasyonları oksidatif DNA hasarına karşı insan lenfositlerini korumaktadır. Fenolik bileşiklerin yüksek konsantrasyonları (0.2 mM) ise hücre yüzeyine hidrofobik olarak bağlanıp oksidatif hasarı tetiklemekte ve plasma membranını daha fragil bir hale getirmektedir (174).

Thymbra spicata ekstraktlarının, yüksek yağ içeren diyetle indüklenen hiperkolestrerolemili farelerde kontrole göre plazma, total kolesterol (TC),

trigliserit (TG), düşük dansiteli lipoprotein (LDL) ve malondialdehit (MDA) konsantrasyonunu düşürdüğü gösterilmiştir. Aynı çalışmada *T. spicata* ekstraktının hepatosteatozdan koruyucu etkisi ve antioksidan etkileri de gösterilmiş; bu durum özellikle karvakrolle ilişkilendirilmiştir (175). İçme suyu ile 7 gün boyunca sıçanlara 30 ve 60 mg/kg/gün ve 14 gün boyunca 15 ve 30 mg/kg/gün dozunda verilen karvakrolün H₂O₂ (0-250 µM) ile oksidatif olarak hasarlandırılan testis ve karaciğer hücreleri üzerinde DNA hasarından koruyucu etkisi gösterilmiştir (6).

DM ve Karvakrol

Altmış gün boyunca günde bir adet *Satureja khuzestanica* ekstraktı içeren tablet verilen tip 2 DM'lu hastaların TC ve LDL düzeyleri bazale göre düşük, yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) düzeyleri ise yüksek bulunmuş; kan glikozu, TG ve kreatinin seviyelerinde ise fark bulunamamıştır (176). NIDDM'lu hastalarda Labitae ailesinden yüksek miktarda öjenol ve karvakrol içeren bir tür olan *O. sanctum* pudrasının 1 ay boyunca alınmasıyla yapılan bir çalışmada kan glikozunda anlamlı bir düşme (%20,8), TC, LDL, VLDL düzeylerinde de belirgin azalma kaydedilmiştir (177).

Karvakrolün Diğer Etkileri

İnsan ve köpek ventriküler kardiyomiyositlerinde karvakrolün konsantrasyon bağımlı olarak (10-1000 µM) L-tipi Ca⁺² kanallarını inaktive ettiği bildirilmiştir (178). Normotansif sıçanlara intraperitoneal olarak 100 µg/kg verilen karvakrolün kalp hızını, sistolik ve diyastolik kan basınçları ile ortalama arteriyel kan basıncını düşürdüğü gösterilmiştir. Karvakrol ile izole sıçan aortasında yapılan çalışmada CaCl₂ ve fenilefrin ile indüklenen kasılmaları inhibe ettiği bulunmuştur (179).

Karvakrol ve öjenolün doz bağımlı olarak Th1 hücrelerinde intraselüler Ca⁺² mobilizasyonunu ve mitojenle aktive edilen protein kinazların (MAPK) alt grubundan olan p-38'in fosforilasyonunu stimule ettiği bulunmuştur (180).

İzole kobay ileum düz kası üzerinde antispazmodik etkileri gösterilmiştir (181). Kobay trakeasında güçlü gevşeme yanıtı ortaya çıkardığı ve bu gevşetici etkinin beta 2-adrenerjik, histaminerjik, muskarinik reseptörler üzerinden olmadığı bildirilmiştir (182). Aydın ve ark.'nın izole sıçan mide fundusu, duodenum ve ileumu üzerinde saf karvakrolün asetilkolin ile indüklenen kasılma cevaplarına herhangi bir etkisinin bulunmadığı gösterilmiştir (183).

Öjenol, timol, karvakrol gibi fenolik bileşiklerin güçlü bir şekilde prostaglandin sentez inhibisyonu yaptığı gösterilmiştir (184). Karvakrol lipofilik bir bileşik olması sebebi ile deride stratum korneum üzerine etki ederek derinin geçirgenlik katsayısını yükseltmiştir (185). Karvakrol insan dermal fibroblast hücrelerinde AP-1 aktivasyon yolağını kullanarak tip-I kollajen gen ekspresyonunu indüklemektedir. Bu etkiyi hücre içi Ca^{+2} seviyesini artırarak yapmaktadır (186).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney Düzenegi

Deneylerde 40 adet, 22 haftalık Wistar Albino (280 ± 30 g) erkek sıçan kullanıldı. Deneyler, Ankara Numune Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (Protokol No:2009/5) izin alınmasından sonra, Pankreas Hücre Araştırmaları Laboratuvarı'nda yapıldı. Sıçanlar standart 12 saat karanlık 12 saat aydınlık, havalandırılmalı, sabit oda sıcaklığında olacak şekilde kafeslere yerleştirildi. Hayvanlar standart pellet yemi ve musluk suyu kullanılarak beslendi. Deneyler süresince yerel etik kurulca istenilen tüm taahhütlere uyuldu.

Her grupta 8'er hayvan olacak şekilde sıçanlar randomize olarak seçildi ve gruplar oluşturuldu. Canlılık analizleri için kontrol ve dimetil sülfoksit (DMSO, AppliChem) uygulanan grupların yanında 3 farklı dozda karvakrol (Sigma-aldrich, W22,450-K) grubu oluşturuldu: 20, 40 ve 80 mg/kg/gün. Tüm maddeler mideye kadar ulaşılan özel orogastik iğne ile 9 gün boyunca her sabah, günde bir kez 0,3 cc olacak şekilde oral olarak uygulandı. Karvakrol, %5'lik DMSO içinde çözüldü ve üç ayrı dozda (20, 40 ve 80 mg/kg/gün) uygulandı. DMSO grubuna %5'lik DMSO, kontrol grubuna ise 0,3'er cc fizyolojik tuzlu su oral olarak verildi.

Gruplardaki sıçanların pankreasları 9. günde çıkarıldı ve her iki sıçanın pankreası tek bir tüpte birleştirildi. Pankreasların izolasyon ve saflaştırma işlemlerine tabi tutulmalarından sonra saf adacık hücreleri elde edildi. Her gruptan elde edilen hücreler sayıldıktan sonra 0, 150 ve 300 μ M H₂O₂ içeren ortamlara bırakılarak hücrelerde oksidatif hasar oluşturuldu. Deney sonunda bu hücreler floresan mikroskop altında incelenerek canlılıkları değerlendirildi. H₂O₂ ile oluşturulan oksidatif hasara karşı canlılık değerlendirilmesinde üç farklı karvakrol grubuna göre analizler yapılarak, karvakrol dozu konusunda karar verildi ve diğer analizlerimiz en yüksek canlılık oranının görüldüğü 20 mg/kg/gün dozundaki karvakrol grubu ile yapıldı. Oksidatif hasarın göstergeleri olan protein karbonil (PC) ve malondialdehit (MDA) düzeyleri,

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji A.D. Laboratuvarı'nda değerlendirildi. DNA hasarını değerlendiren DNA fragmentasyon analizleri, Zekai Tahir Burak Hastanesi Genetik Laboratuvarı'nda yapıldı.

3.2. Pankreas Adacık İzolasyon Prosedürü

3.2.1. Kimyasalların Temini ve Solüsyonların Hazırlanması

Pankreasın çıkarılması ve saflaştırılması sırasında uygulanan protokol, rodentlerden pankreas adacık izolasyon metodlarından uyarlanarak yapılmıştır (150, 187).

3.2.1.a. İzolasyon solüsyonlarının Hazırlanması

Solüsyon A

500 mL "*Hank's Buffered Salt Solution Medium*" (HBSS, Lonza, BE10-527F) içine 50 mL fetal siğir serumu (FBS, Lonza, DE14-801EH), 5 mL penisilin/ streptomisin (Lonza, DE17-602E), 5 mL L-glutamin eklenir ve +4°C'de saklanır.

Solüsyon B

500 mL "*Roswell Park Memorial Institute Medium*" (RPMI-1640, Lonza, BE12-702F) içine 50 mL FBS, 5 mL Penisilin/streptomisin, 5 mL L-glutamin eklenir ve +4°C'de saklanır.

3.2.1.b. Kollagenaz'ın Hazırlanması

Kollagenazın tek kullanımlığı için, 1000 mg'lık kollagenaz V (Sigma-aldrich, C9263-1G) eşit miktarda 5 tüpe ayrılır, üzerine 50 mL HBSS ilave edilir.

3.2.1.c. Ditizon (DTZ) Boyasının Hazırlanması

10 mg DTZ (Sigma-aldrich, D5130-10G) ile 5 mL DMSO karıştırılıp üzerine 25 mL HBSS eklenir, 0,4 µm'lik filtreden geçirildikten sonra ependorf tüplerine alınır ve – 20 °C'de saklanır.

3.2.1.d. Dansite Solüsyonlarının Hazırlanması

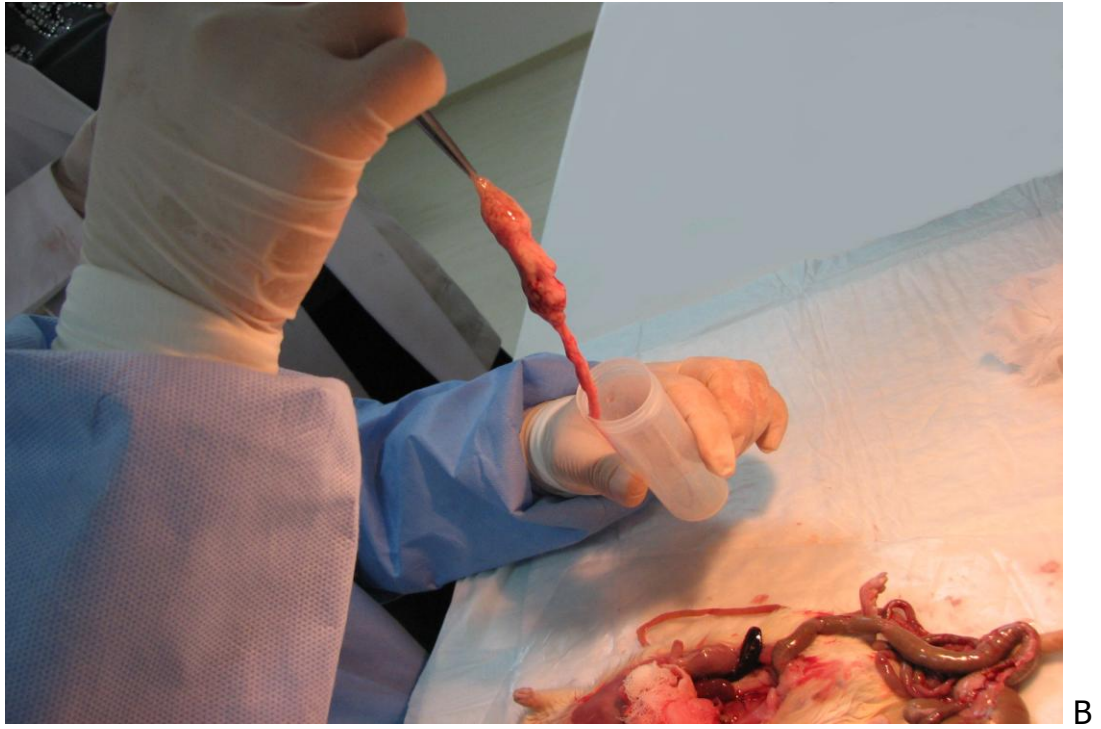
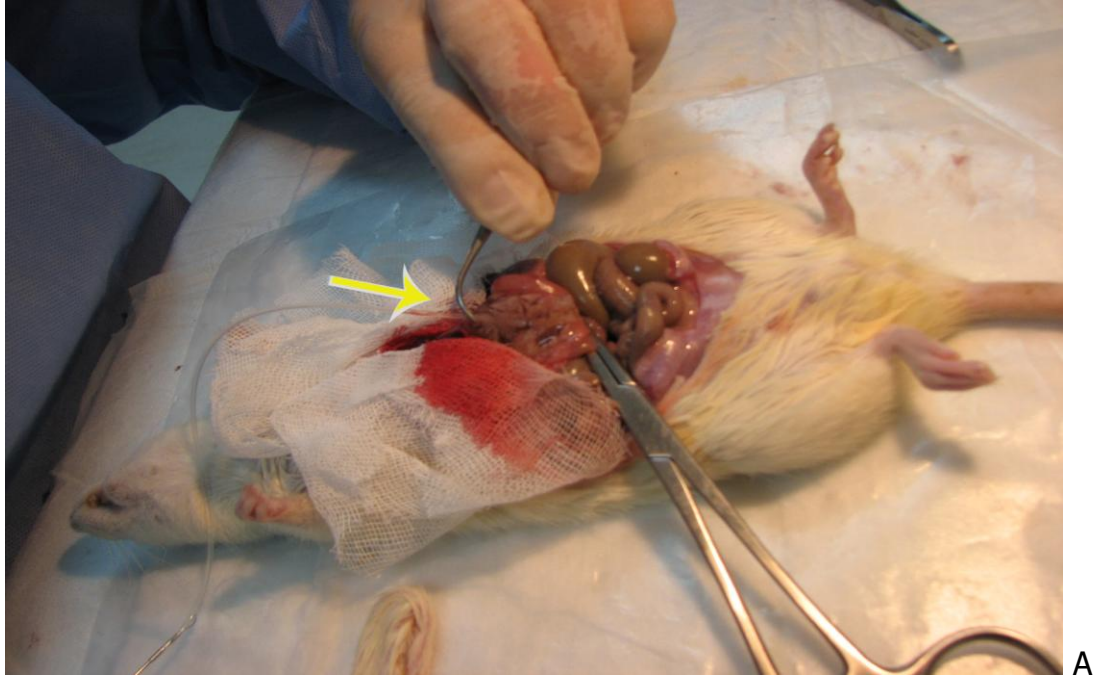
"Ficol/1077" (Biochrom, L6113) işlem sırasında her tüpte 5'er cc olacak şekilde kullanılır.

3.2.1.e. Hidrojen peroksit içeren RPMI'ın hazırlanması

3,1 μ L H_2O_2 , 100 mL solüsyon B'ye eklenerek 300 μ M H_2O_2 konsantrasyonu elde edilir. 300 μ M H_2O_2 'lik solüsyondan 20 mL alınarak eşit hacimde solüsyon B'ye eklenir ve 150 μ M H_2O_2 konsantrasyonu elde edilmiş olur.

3.2.2. Pankreasın Çıkarılması

Ketamin (60-80 mg/kg) ve xylazine (10 mg/kg) karışımı her sıçana 0,3-0,4 mL olacak şekilde verildi. Abdominal bölge etanol (%70) ile spreylendikten sonra yukarı doğru kesildi. Karaciğer gazlı bez arasında göğüs kafesine doğru alındı. Ductus belirlendi ve duodenuma açılan kısmı (ampulla vater) klemplendi. Karaciğere yakın bir noktadan duktusa çentik atıldı. 10 mL'lik vidalı enjektöre 8 mL kollegenaz V çözeltisi alındı. Enjektöre 10 cm'lik PE50 kateteri takıldı ve kateter duktusa yerleştirildi. Kollagenaz enzim solüsyonu yavaşça verilerek pankreas şişirildi. İşlem bitince göğüs kafesi altından girilerek kalp kesildi. Pankreas hızla diğer dokulardan ayrılarak 50 mL'lik falkon tüpe alındı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Pankreas dokusunun cerrahi olarak çıkarılma aşamaları. A) Sıçan pankreasının kollagenaz V enzimi ile şişirilmesi. Resimde sarı ok ile kanülün giriş yeri olan pankreatik kanal gösterilmektedir. B) Tüm dokulardan ayrılan pankreas dokusu 50 mL'lik falkon tüpe alınırken görülmektedir.

3.2.3. Adacıkların Saflaştırılması

Pankreas 37°C'de su banyosunda 19 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda falkon tüp 35 mL ye kadar solüsyon A (HBSS) ile tamamlandı. 15 saniye hızlı bir şekilde tüp alt üst edildi ve 1300 rpm, yavaş frende 3 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatanı atıldıktan sonra peletler pipetajla kırıldı. Santrifüj ve pipetaj işlemi bir kez daha tekrarlandıktan sonra pelet süspansiyonu 450 µm'lik çelik elekten süzülerek huni yardımıyla yeni bir 50 mL'lik falkon tüpe alındı. Eski falkon tüp, çelik elek ve huni solüsyon A (HBSS) ile yıkanarak tekrar 50 mL'ye tamamlandı. Adacık hücrelerinin yıkanması için 1300 rpm, yavaş frende 3 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatanı atıldıktan sonra pelet 50 mL'ye kadar RPMI/FBS ile tamamlandı. Yıkama işlemi bir kez daha aynı şekilde tekrarlandı ve tüm peletler bir falkon tüpte birleştirildi. Pelet süspansiyonu 3 adet 15'lik falkon tüpe 5'er mL olacak şekilde bölündü. Yavaş frende, 1400 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatanı atıldıktan sonra tüpler ters çevrilerek peletler iyice kurutuldu.

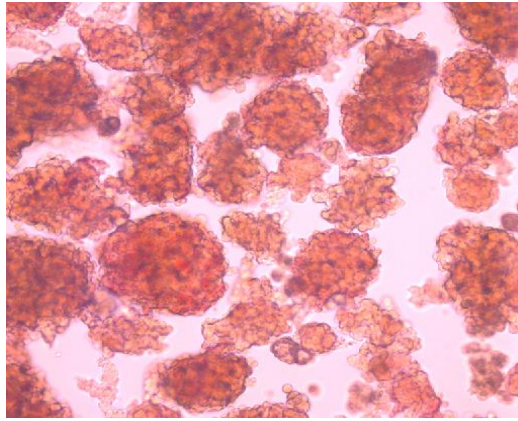
Dansite aşaması için üzerine 5 mL'ye kadar "*ficoll*-1077" eklenerek vortekslendi. Üzerine 14 G'lik iğne ucu ile 5'er mL serumsuz RPMI eklendi. 2400 rpm'de, +10°C'de 20 dakika frensiz santrifüje edildi. Dansite farkı nedeniyle orta kısımda toplanan adacıklar pastör pipeti ile alınıp başka bir 50 mL'lik tüpte birleştirildi. 1400 rpm, yavaş frende 4 dakika santrifüj yapıldı. Solüsyon B'den 25 mL eklenip 1400 rpm'de, yavaş frende 4 dakika santrifüj yapıldı ve bu işlem bir kez daha tekrarlandı. Böylece saf adacıklar elde edildi.

3.3. Pankreas Adacıklarının Sayımı

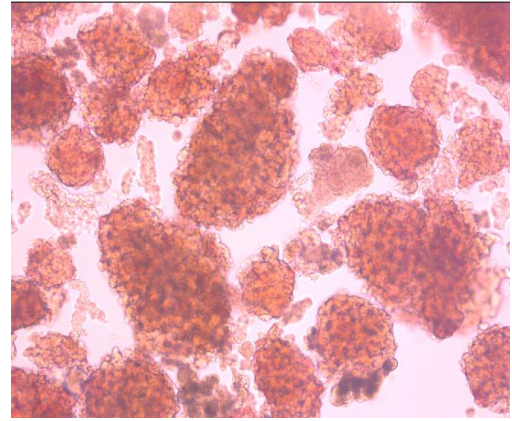
Adacık hücrelerindeki insulin granüllerine spesifik bir boya olan ditizon (DTZ), hücrelerin özgün kırmızı bir renk ile boyanmasına yol açarak, açık kahverengi renk alan ekzokrin hücrelerinden kolaylıkla ayırt edilmesini sağlar. DTZ boyası, insulin moleküllerinin merkezindeki çinkoya bağlanan bir çinko şelasyon ajanıdır. Adacıklar, boyutları farklı olan küçük çapta hücrelerin oluşturduğu 50 µm'den küçük gruplar ile 350 µm'den büyük kümelerdir.

Adacıklar yassı değil, 3 boyutlu yapılardır ve boyutları ile şekilleri değişkenlik gösterir. Adacık hacmi, çapın küpü ile yaklaşık olarak orantılıdır.

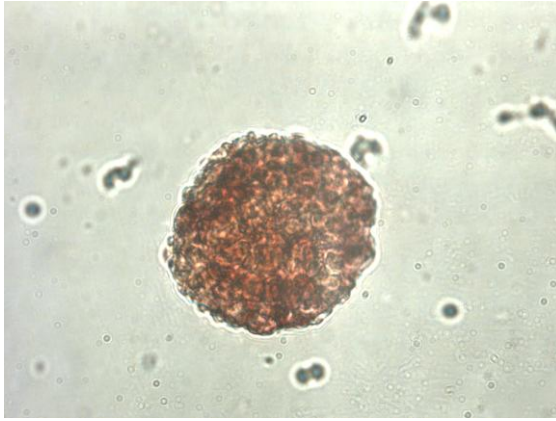
Adacık sayımı için saflaştırılmış adacıkların üzerine 50 mL RPMI eklenerek yeniden süspansiyon haline getirildi. Kullanım öncesi sterilize edilmiş, 1 mL'lik displasman pipeti ile numune alınıp 35 mm boyutunda ölçekli petri kabına konuldu ve örnek üzerine 100 μ L DTZ eklendi. Boyama için 3-4 dakika beklendi. Işık mikroskobu ile x10'luk büyütmede her bir adacık boyutuna göre gruplandı ve grupların çetelesi tutuldu. Bir aksı diğerinden belirgin olarak daha büyük olan adacıklar için iki aksın ortalaması hesaplandı. Şaryo vidaları tek bir yönde hareket ettirilerek yeni bir alana ilerletildi ve adacıklar bu alanda sayılmaya başlandı (Şekil 3.2). Tüm petri kabı sayıldı, aynı kümeleri saymamaya, kap üzerinde alan atlamamaya ve sayım sırasında adacıkların yerini değiştirmemeye dikkat edildi. Grupta bulunan her boyuttaki adacık sayısı uygun IEQ faktörüyle çarpıldı ve tüm boyut grupları toplandı. Örnek dilüsyonuna göre dilüsyon faktörü de hesaba katıldı (188).



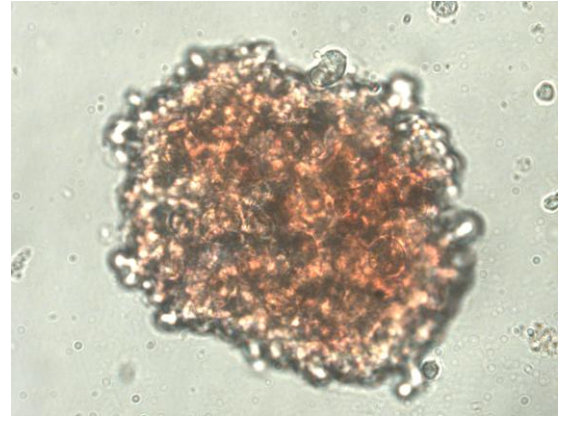
A



B



C



D

Şekil 3.2. Işık mikroskopunda DTZ boyası ile boyanmış adacıklar. A) x10'luk büyütme ile B) x10'luk büyütme ile C) x20'lik büyütme ile D) x40'lık büyütme ile.

3.4. Adacıkların H_2O_2 ile Muamele Edilmesi

Adacık süspansiyonu 3 adet 15 mL'lik tüpe eşit hacimde bölünüp 1400 rpm'de, yavaş frende, 4 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant tamamen uzaklaştırıldıktan sonra altta kalan adacıklar 3'er cc 150 ve 300 μM H_2O_2 ile 35 mm'lik petri kabına alınarak $+4^\circ C$ 'de 15 dakika bekletildi. Bekleme süresinin sonunda adacıklar yıkanmak üzere 15 mL'lik tüplere alındı ve 2 kez 15 cc solüsyon B ile tamamlanarak 1300 rpm, 3 dakika yavaş frende santrifüje edildi. Adacık süspansiyonundan örnek alınarak floresan boyama ile canlılık

analizi yapıldı. Kalan hücreler iki ayrı ependorfa ayrılarak -80°C'de oksidatif hasar ve apoptoz (DNA fragmentasyonu) tayini için saklandı.

3.5. Pankreatik Adacık Canlılığının Propidiyum İyot (PI) ve Floresein Dasetat (FDA) Kullanılarak Floresan Mikroskop ile Değerlendirilmesi

Hücre canlılığının değerlendirildiği bu yöntemde aynı anda canlı ve ölü hücrelerin görülmesini sağlayan iki reaktif kullanıldı: propidiyum iyot (PI, Sigma-aldrich, P4170) ve floresein dasetat (FDA, Sigma-aldrich, F7378-10G). PI, nükleik asitlerle etkileşime giren floresan bir boyadır. PI, canlı olmayan hücrelerin geçirgen hücre membranlarından DNA arasına girerek turuncu-kırmızı renkli floresan (uyarılma dalga boyu= 536 nm, emisyon dalga boyu= 617 nm) veren bir boyadır. FDA, canlı hücrelerin sitoplazmalarını boyayarak mavi ışık eksitasyonu altında (490 nm) yeşil floresans vermektedir.

Bir tablet PBS, 100 mL steril deiyonize su içinde çözülerek PBS stok solüsyonu hazırlandı ve etiketlenerek + 4°C'de saklandı. PI stok solüsyonu hazırlamak için 6.346 mg PI 100 mL PBS'de çözünerek hazırlandı ve +4 °C'de saklandı. FDA stok solüsyonu için 1mg FDA 100 mL aseton içinde çözüldü ve etiketlenerek – 20°C de saklandı. 1 mL'lik PI/FDA çalışma solüsyonunun hazırlanmak için 1 mL'lik ependorf içinde 42 µL PI stok solüsyonu, 28 µL FDA stok solüsyonu ile 930 µL PBS stok solüsyonu karıştırıldı ve etiketlenerek kullanılabilecek kadar +4°C'de karanlık bir ortamda saklandı. Adacıkların floresan boyalarla boyanması için 1 mL hücre süspansiyonu alınıp 60 mm'lik petriye konuldu. Karanlık ve nemli bir ortamda 50 µl PI/FDA çalışma solüsyonu petriye eklendi ve 90 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Adacıklar, floresan altında incelendiğinde canlı hücreler, FDA boyası ile mavi eksitasyon ışığı altında yeşil renkte; ölü hücreler, PI boyası ile yeşil eksitasyon ışığı altında turuncu-kırmızı renkte izlendi (189). Adacıkların resimleri çekilerek Matlab programında yazılımı yapılmış renk analiz kodu yardımı ile canlı olan hücrelerin oranı belirlendi.

3.6. Lipit Peroksidasyonu ve Protein Oksidasyonu Analizi

Hücrelerin içinde bulunduğu süspansiyona 0,2 mM pH: 7,4 olan Tris-HCl tamponundan eklendi. Ardından homogenizatör (Homoeginezer-721296, USA) ile 4000 rpm, 3 dakika süre ile homojenize edildi. Homojenattan lipit peroksidasyon indeksi olan malondialdehit (MDA) ve protein oksidasyon göstergesi olan protein karbonil analizleri yapıldı. Homojenatta her grup için ayrı protein analizi yapıldı (190).

Esterbauer ve Cheeseman'ın metoduna göre çalışılan MDA, asidik ortamdaki tiyobarbitürik asit ile 95°C'de reaksiyona girmesi prensibine dayanmaktadır (191). Reaksiyon sonunda spektrofotometrik (Shimadzu, UV-1800, Kyoto, Japan) olarak 532 nm dalga boyunda köre göre alınan sonuçların bu dalga boyunda tiyobarbitürik asit reaktif ürünlerinin verdiği ekstinksiyon katsayısına göre hesaplandı.

Protein oksidasyonu göstergesi olan protein karbonil miktarı 2,4 dinitrofenilhisrazinin karbonil grupları ile reaksiyona girip 2,4-dinitrofenilhidrazona dönüşme reaksiyonu esasına dayanmaktadır (192). Reaksiyon ürünü 360 nm dalga boyunda ölçülerek ekstinksiyon katsayısına göre hesaplamalar yapılmıştır. Triklor asetik asit ekelenen homojenatlar 11000 rpm de 4 dakika santrifüje edildi. Süpernatant kısmının dökülmesinden sonra tortu kısmı üzerine HCl içinde hazırlanan 2,4-dinitrofenilhidrazin eklendi ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon triklor asetik asit ile durduruldu ve etanol-etil asetat çözeltisiyle yıkandıktan sonra NaOH çözeltisinde 37°C'de çözülerek 360 nm'de köre karşı spektrofotometrede okundu. Sonuçlar 360 nm dalga boyundaki ekstinksiyon katsayısına göre ($\epsilon=22000$) hesaplandı.

3.7. DNA Fragmentasyonu Tayini

Pankreas dokusundan DNA izolasyonu için Roche High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, 11 796 828 001) kullanıldı ve üretici firmanın talimatlarına uyularak elde edilen DNA'lar toplama tüpüne aktarıldı. Apoptoz DNA ekstraksiyonu için ise Apoptotic DNA Ladder Extraction Kit

(Biovision, K170-50) ile uygulama yapıldı. Elde edilen DNA'lar %1'lik agaroz jelde 80 V akımda katottan anoda doğru 90 dakika yürütüldü. Süre sonunda elektroforez tankından çıkarılan jel transillüminatör üzerine yerleştirilerek elde edilen görüntü cihazın kamerası vasıtası ile bilgisayara aktarıldı ve kaydedildi (150).

3.8. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizlerde Windows uyumlu SPSS 15.0 programı kullanıldı. Tüm gruplar kendi içlerinde Shapiro-Wilk testi ile dağılım açısından incelendi. Tüm gruplarda normal dağılım görülmesi üzerine karşılaştırma analizlerinde parametrik testler kullanıldı. Gruplar arası karşılaştırmalarda ANOVA ve iki grubu birbirleriyle karşılaştırmada Post Hoc testlerden LSD (en küçük anlamlı fark analizi) ile anlamlılık test edildi. $P < 0,05$ olan sonuçlar anlamlı kabul edildi. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi.

4. BULGULAR

4.1. Floresan (PI/FDA) Boyama ile Canlılık Düzeyleri

Kontrol, DMSO ve 3 farklı karvakrol dozu uygulanan gruplarda 0, 150 ve 300 μM H_2O_2 'e maruz bırakılmaları sonrasında PI/FDA floresan boyama ile adacıkların canlılık düzeyleri % olarak Tablo 4.1'de gösterilmektedir.

Tablo 4.1. Deney gruplarının canlılık yüzdeleri.

	0 μM H_2O_2	150 μM H_2O_2	300 μM H_2O_2
Kontrol	78,64 $\pm$ 7,50	69,13 $\pm$ 12,42 ^a	70,25 $\pm$ 8,35 ^a
DMSO	73,77 $\pm$ 8,74	61,07 $\pm$ 12,31 ^a	56,08 $\pm$ 11,88 ^a
Karvakrol 20mg/kg	87,22 $\pm$ 6,42	78,68 $\pm$ 8,59 ^a	80,72 $\pm$ 8,69 ^a
Karvakrol 40mg/kg	84,45 $\pm$ 8,48	79,48 $\pm$ 9,27	73,45 $\pm$ 11,69 ^{a,b}
Karvakrol 80mg/kg	73,19 $\pm$ 10,81	67,41 $\pm$ 11,72	58,60 $\pm$ 11,69 ^{a,b}

a; 0 μM H_2O_2 'e göre anlamlı farklı,

b; 150 μM H_2O_2 'e göre anlamlı farklı,

P karşılaştırma tablosu

<i>Kontrol ile DMSO</i>	A.D.	< 0,005	< 0,001
<i>Kontrol ile Karvakrol20</i>	< 0,005	< 0,005	< 0,005
<i>Kontrol ile Karvakrol40</i>	< 0,005	< 0,005	A.D.
<i>Kontrol ile Karvakrol80</i>	< 0,005	A.D.	< 0,005
<i>DMSO ile Karvakrol20</i>	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>DMSO ile Karvakrol40</i>	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>DMSO ile Karvakrol80</i>	A.D.	A.D.	A.D.
<i>Karvakrol20 ile Karvakrol40</i>	A.D.	A.D.	< 0,005
<i>Karvakrol20 ile Karvakrol80</i>	< 0,001	< 0,005	< 0,001
<i>Karvakrol40 ile Karvakrol80</i>	< 0,001	< 0,001	< 0,001

A.D.; Anlamlı değil.

0 μM H_2O_2 konsantrasyon düzeyinde kontrol, DMSO, karvakrol 20, karvakrol 40, karvakrol 80 grupları birbirleriyle kıyaslandığında, DMSO

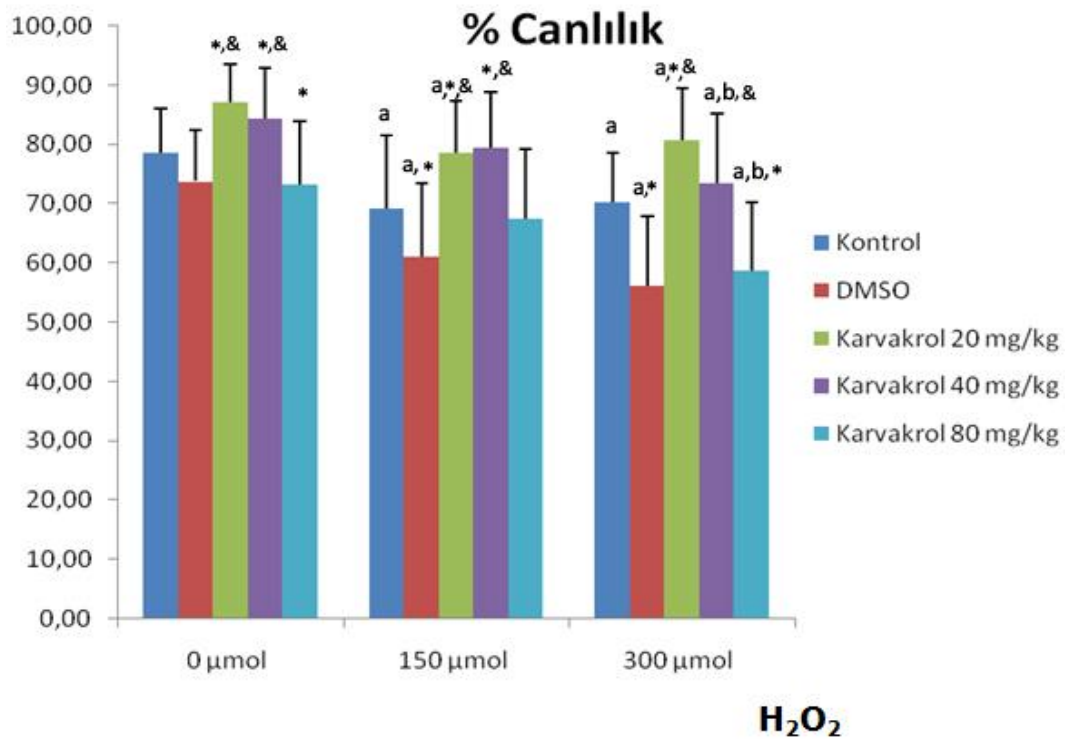
grubunun canlılık düzeyi ($73,77 \pm 8,74$), kontrol ($78,64 \pm 7,50$) ve karvakrol 80 ($73,19 \pm 10,81$) grubuna göre farklı bulunmamasına karşılık ($P>0,05$), karvakrol 20 ($87,22 \pm 6,42$) ve karvakrol 40 ($84,45 \pm 8,48$) gruplarına göre düşük bulundu ($P<0,05$). Karvakrol 20 ve karvakrol 40 gruplarının canlılık düzeyleri arasında fark bulunamadı ancak diğer gruplara göre canlılık düzeyleri anlamlı olarak yüksekti ($P<0,05$). Karvakrol 80 grubunun canlılığı, DMSO grubu dışındaki tüm grupların canlılığına göre düşük bulundu ($P<0,05$).

150 μM H_2O_2 konsantrasyon düzeyinde DMSO grubu ($61,07 \pm 12,31$) ile karvakrol 80 grubu ($67,41 \pm 11,72$) arasında fark görülemedi. ancak DMSO grubunun canlılık düzeyi kontrole ($69,13 \pm 12,42$), karvakrol 20 ($78,68 \pm 8,59$) ve karvakrol 40 ($79,48 \pm 9,27$) gruplarına göre düşüktü ($P<0,05$). Karvakrol 20 ve karvakrol 40 gruplarının canlılık düzeyleri arasında 150 μM H_2O_2 konsantrasyon seviyesinde de fark bulunamadı ancak diğer gruplara göre canlılık düzeyleri anlamlı olarak yüksekti ($P<0,05$). Karvakrol 80 grubu ile kontrol ve DMSO grupları farklı bulunmazken, karvakrol 20 ve karvakrol 40 gruplarının canlılığına göre düşüktü ($P<0,05$).

300 μM H_2O_2 konsantrasyon seviyesinde de DMSO grubunun canlılık düzeyi kontrole ($70,25 \pm 8,35$), karvakrol 20 ($80,72 \pm 8,69$) ve karvakrol 40 ($73,45 \pm 11,69$) gruplarına göre düşük bulundu ($P<0,05$); DMSO grubu ($56,08 \pm 11,88$) ile karvakrol 80 grubu ($58,60 \pm 11,69$) arasında fark bulunamadı. Karvakrol 20 grubunun canlılığı tüm gruplara göre yüksekti ($P<0,05$). Karvakrol 40 ile kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunamadı, karvakrol 20 grubuna göre canlılık düzeyi düşük, DMSO ve karvakrol 80 gruplarına göre de anlamlı yüksek olduğu görüldü ($P<0,05$). Karvakrol 80 grubunun canlılık düzeyi DMSO dışındaki tüm gruplara göre düşük bulundu ($P<0,05$).

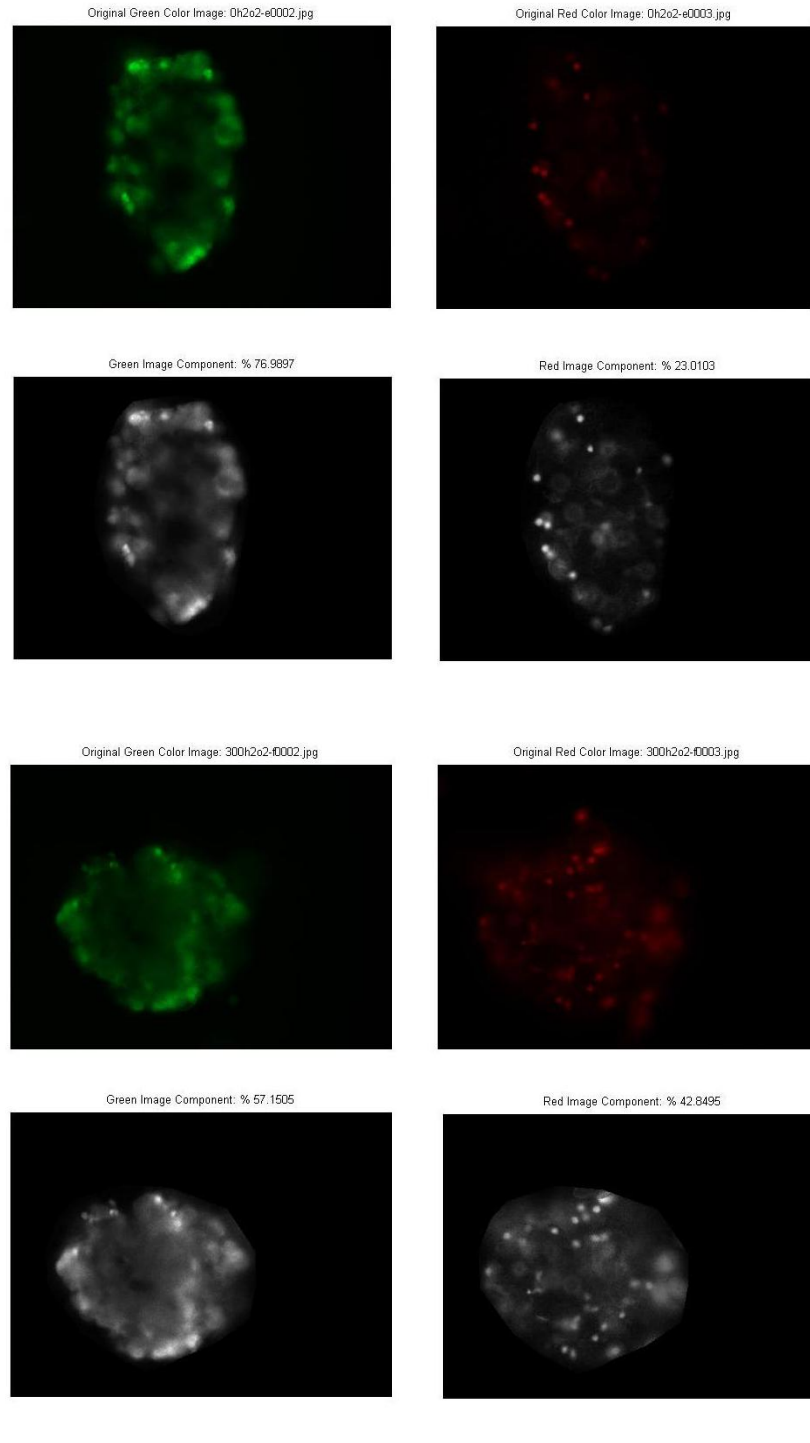
Gruplar H_2O_2 düzeylerine göre değerlendirildiğinde kontrol, DMSO, karvakrol 20 gruplarının 150 μM H_2O_2 konsantrasyonlarındaki canlılık düzeyi H_2O_2 içermeyen ortamdakine göre anlamlı düşük bulundu. Buna karşılık 150

ile 300 μM H_2O_2 konsantrasyonlarının canlılık düzeyleri arasında anlamlı fark bulunamadı. Karvakrol 40 ve karvakrol 80 gruplarının 0-150 μM H_2O_2 konsantrasyonlarında anlamlı fark bulunamadı ancak 0-300 μM H_2O_2 ve 150-300 μM H_2O_2 konsantrasyonlarındaki canlılık düzeyleri arasındaki fark anlamlıydı ($P<0,05$). Canlılık düzeylerinin gösterildiği grafik Şekil 4.1'deki gibidir. Kontrol ve 20 mg/kg/gün dozundaki karvakrol grubunun floresan mikroskop ile çekilmiş resimleri ve canlılık analizi örnekleri Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te verilmiştir.

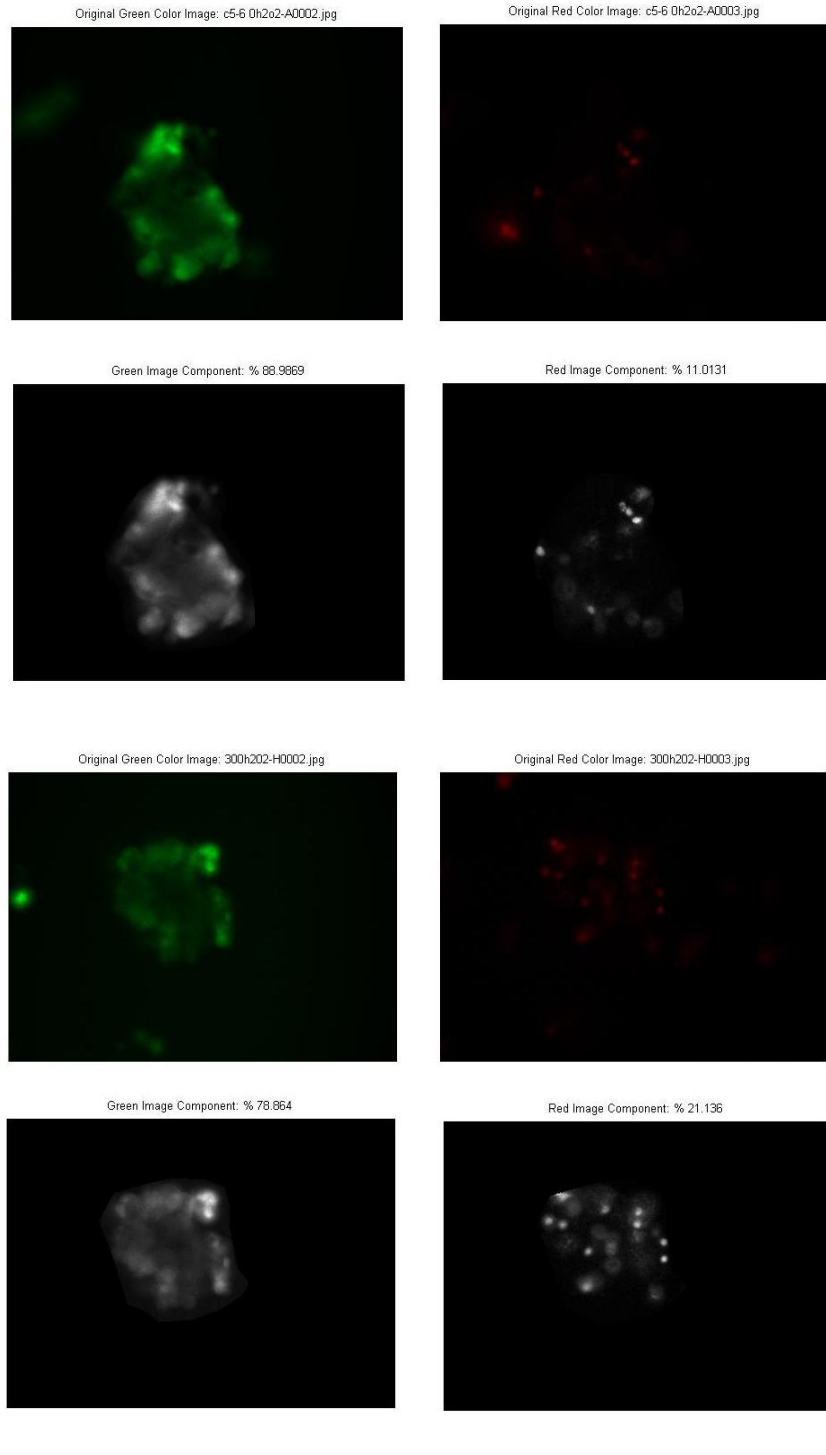


a; 0 μM H_2O_2 'e göre anlamlı farklı,
b; 150 μM H_2O_2 'e göre anlamlı farklı,
*; Kontrole göre anlamlı farklı,
&; DMSO'ya göre anlamlı farklı

Şekil 4.1. Floresan boyama ile canlılık düzeylerinin grafiği.



Şekil 4.2. PI/FDA ile boyanmış kontrol grubu adacık resimleri. Sol üstteki resimler FDA ile yeşil boyanmış canlı hücreleri, sağ üstteki resimler PI ile kırmızı boyanmış ölü hücreleri göstermektedir. Altta resimler Matlab programında kesilerek renk analizine göre canlılık yüzdeleri vermektedir. A) Kontrol grubu 0 μM H_2O_2 ile muamele edilmiş adacıklar, B) Kontrol grubu 300 μM H_2O_2 ile muamele edilmiş adacıklar.



Şekil 4.3. PI/FDA ile boyanmış karvakrol 20 mg/kg/gün grubunun adacık resimleri. Sol üstteki resimler FDA ile boyanmış canlı hücreleri, sağ üstteki resimler PI ile boyanmış ölü hücreleri göstermektedir. Altta resimler Matlab programına göre canlılık yüzdelerini vermektedir. A) H_2O_2 'siz ortamdaki adacıklar, B) 300 μM H_2O_2 ile muamele edilmiş adacıklar.

4.2. Protein Oksidasyonu ve Lipit Peroksidasyonu

Floresan boyama ile canlılık oranının en yüksek olduğu karvakrol 20 mg/kg/gün dozu ile kontrol ve DMSO gruplarının oksidatif hasar göstergeleri değerlendirildi. Grupların 0, 150 ve 300 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ maruz bırakılmaları sonrası protein karbonil (PC) düzeyleri (nmol/mg prot) Tablo 4.2’de gösterilmektedir.

Tablo 4.2. Protein Karbonil Düzeyleri (nmol/mg prot)

	0 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$	150 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$	300 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$
Kontrol	2,33 $\pm$ 0,15	3, 55 $\pm$ 0,37 ^a	5,70 $\pm$ 1,13 ^{ab}
DMSO	2,46 $\pm$ 0,13	3,69 $\pm$ 0,35 ^a	5,87 $\pm$ 0,56 ^{ab}
Karvakrol 20mg/kg	1,74 $\pm$ 0,17 ^{*&}	2,75 $\pm$ 0,12 ^{a*&}	3,87 $\pm$ 0,29 ^{ab*&}

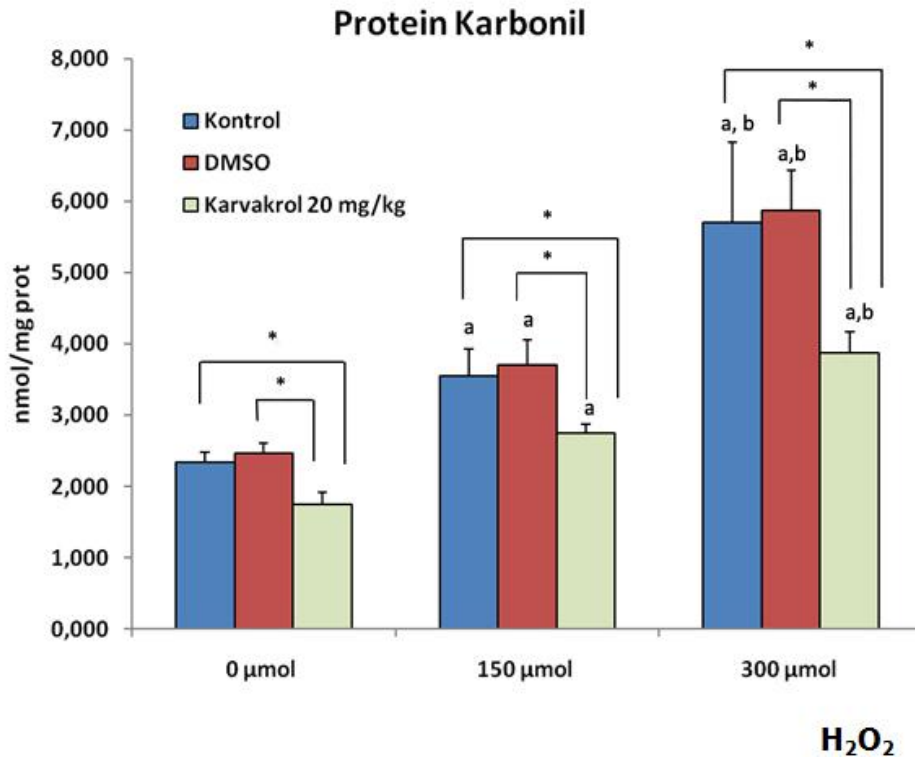
a; 0 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ ’e göre anlamlı farklı,
b; 150 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ ’e göre anlamlı farklı,
*; Kontrole göre anlamlı farklı,
&; DMSO’ya göre anlamlı farklı

0 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ konsantrasyon düzeyinde kontrol, DMSO, karvakrol 20 grupları birbirleriyle kıyaslandığında, karvakrol 20 grubunun PC düzeyi (nmol/mg prot) (1,74 $\pm$ 0,17), hem kontrol (2,33 $\pm$ 0,15) hem DMSO (2,46 $\pm$ 0,13) grubuna göre anlamlı düşük bulundu ($P<0,05$). Kontrol ve DMSO grupları arasında fark bulunamadı.

150 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ konsantrasyon düzeyinde de karvakrol 20 (2,75 $\pm$ 0,12) grubu PC ortalamasında farkın kontrol (3, 55 $\pm$ 0,37) ve DMSO (3,69 $\pm$ 0,35) grubuna göre anlamlı düşük bulunmasına karşılık ($P<0,05$) kontrol ve DMSO grupları arasında fark yoktu.

300 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ konsantrasyon düzeyinde, karvakrol 20 PC (3,87 $\pm$ 0,29) düzeyi, kontrol (5,70 $\pm$ 1,13) ve DMSO (5,87 $\pm$ 0,56) gruplarının PC düzeylerine göre anlamlı düşük bulundu ($P<0,05$) ancak kontrol ve DMSO gruplarının PC düzeyleri istatistiksel olarak farklı değildi.

PC seviyeleri, H_2O_2 seviyelerine göre kıyaslandığında tüm gruplarda (kontrol, DMSO, karvakrol 20) 150 μM H_2O_2 PC düzeyi, 0 H_2O_2 PC düzeylerine göre anlamlı yüksekti ($P<0,05$). 300 μM H_2O_2 PC düzeyleri de tüm grupların (kontrol, DMSO, karvakrol 20) hem 0 H_2O_2 hem 150 μM H_2O_2 PC düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($P<0,05$) (Şekil 4.4).



a; 0 μM H_2O_2 'e göre anlamlı farklı,
 b; 150 μM H_2O_2 'e göre anlamlı farklı,
 *; $P<0,05$

Şekil 4.4. Protein karbonil düzeylerinin grafiği

Kontrol, DMSO ve karvakrol 20mg/kg/gün dozu uygulanan gruplarda 0, 150 ve 300 μM H_2O_2 maruz bırakılmaları sonrası malondialdehit (MDA) düzeyleri (nmol/mg prot) Tablo 4.3'de gösterilmektedir.

Tablo 4.3. Malondialdehit Düzeyleri (nmol/mg prot)

	0 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$	150 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$	300 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$
Kontrol	0,199 $\pm$ 0,029	0,311 $\pm$ 0,024 ^a	0,429 $\pm$ 0,092 ^{ab}
DMSO	0,219 $\pm$ 0,048	0,321 $\pm$ 0,020 ^a	0,451 $\pm$ 0,034 ^{ab}
Karvakrol 20mg/kg	0,166 $\pm$ 0,025	0,253 $\pm$ 0,017 ^{a*&}	0,315 $\pm$ 0,015 ^{ab*&}

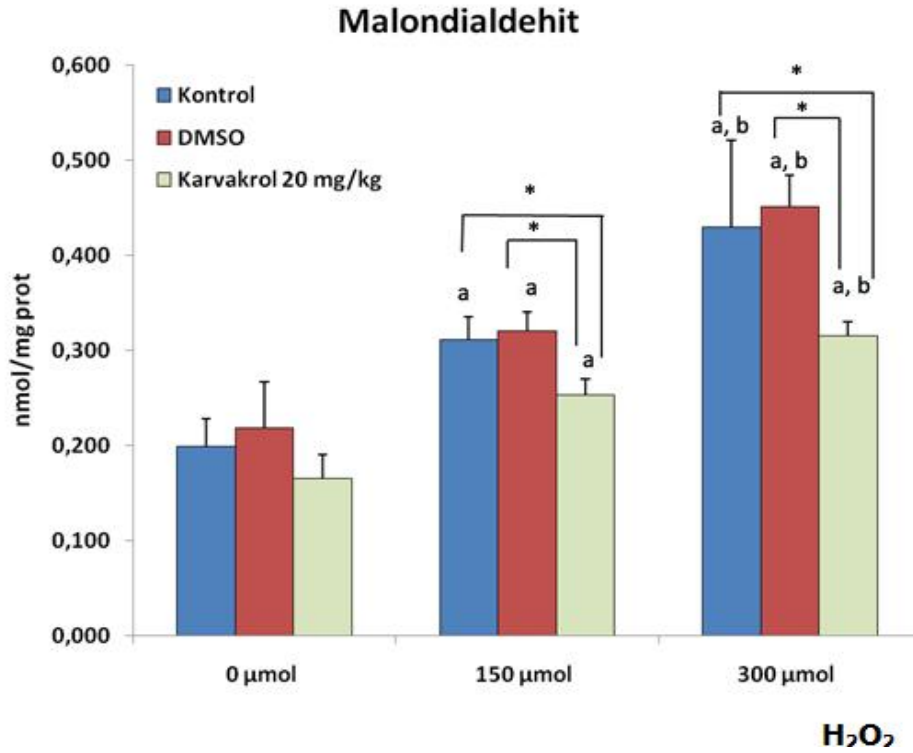
a; 0 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ 'e göre anlamlı farklı,
b; 150 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ 'e göre anlamlı farklı,
*; Kontrole göre anlamlı farklı,
&; DMSO'ya göre anlamlı farklı

0 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ konsantrasyon düzeyinde kontrol, DMSO ve karvakrol 20 gruplarının MDA seviyeleri birbirleriyle kıyaslandığında, karvakrol 20 grubunun MDA düzeyi (0,166 $\pm$ 0,025), hem kontrol (0,199 $\pm$ 0,029) hem DMSO (0,219 $\pm$ 0,048) grubuna göre düşük bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi ($P>0,05$). Kontrol ve DMSO grupları arasında da fark yoktu.

150 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ konsantrasyon düzeyinde karvakrol 20 (0,253 $\pm$ 0,017) grubu MDA ortalamasının kontrol (0,311 $\pm$ 0,024) ve DMSO (0,321 $\pm$ 0,020) grubuna göre anlamlı düşük bulunmasına karşılık ($P<0,05$) kontrol ve DMSO grupları arasında fark yoktu.

300 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ konsantrasyon düzeyinde, yine kontrol (0,429 $\pm$ 0,092) ve DMSO (0,451 $\pm$ 0,034) gruplarının MDA düzeyleri arasında farklılık bulunamadı ($P>0,05$). Karvakrol 20 MDA düzeyi (0,315 $\pm$ 0,015) ise hem kontrol hem de DMSO grubuna göre anlamlı düşük bulundu ($P<0,05$).

MDA düzeyleri, H_2O_2 seviyelerine göre kıyaslandığında tüm gruplarda (kontrol, DMSO, karvakrol 20) 150 H_2O_2 MDA düzeyleri, 0 H_2O_2 MDA düzeylerine göre anlamlı yüksekti. 300 H_2O_2 MDA düzeyleri de tüm grupların (kontrol, DMSO, karvakrol 20) hem 0 H_2O_2 hem 150 H_2O_2 MDA düzeylerine göre anlamlı yüksek bulundu ($P<0,05$) (Şekil 4.5).



a; 0 µM H₂O₂'e göre anlamlı farklı,
 b; 150 µM H₂O₂'e göre anlamlı farklı,
 *; $P < 0,05$

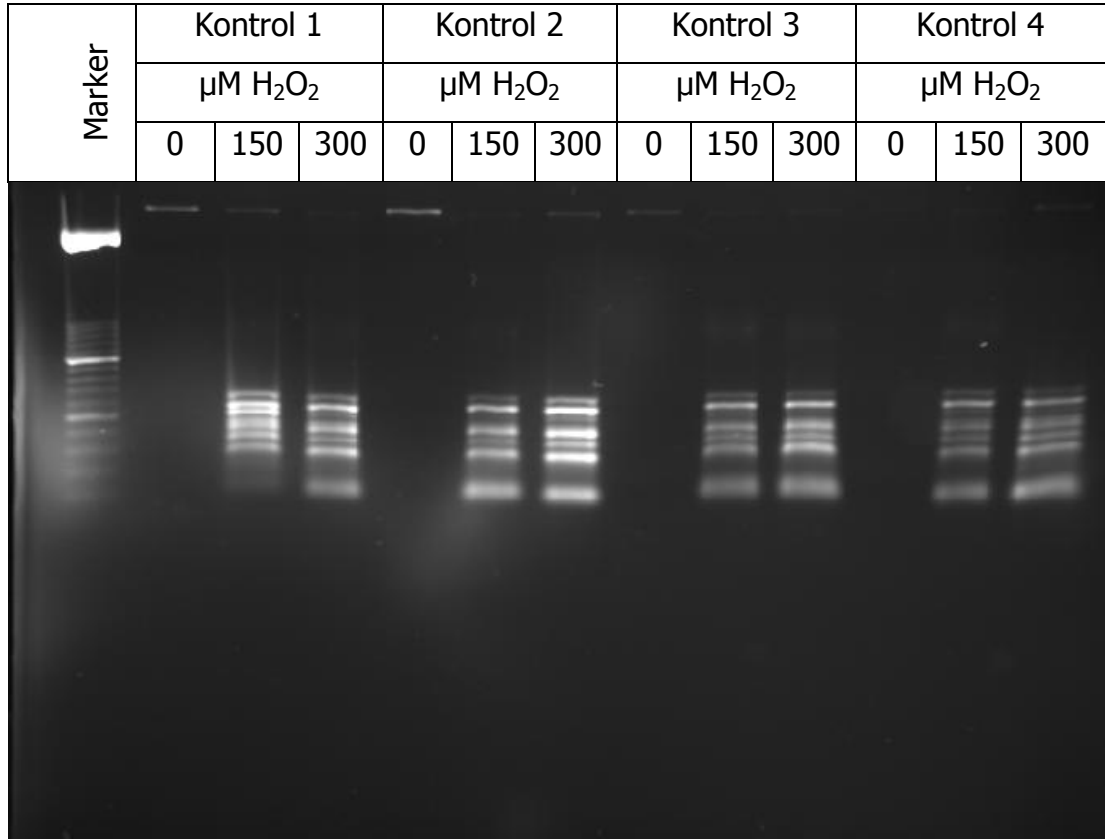
Şekil 4.5. Malondialdehit düzeylerinin grafiği.

4.3. DNA Fragmentasyon Düzeyleri

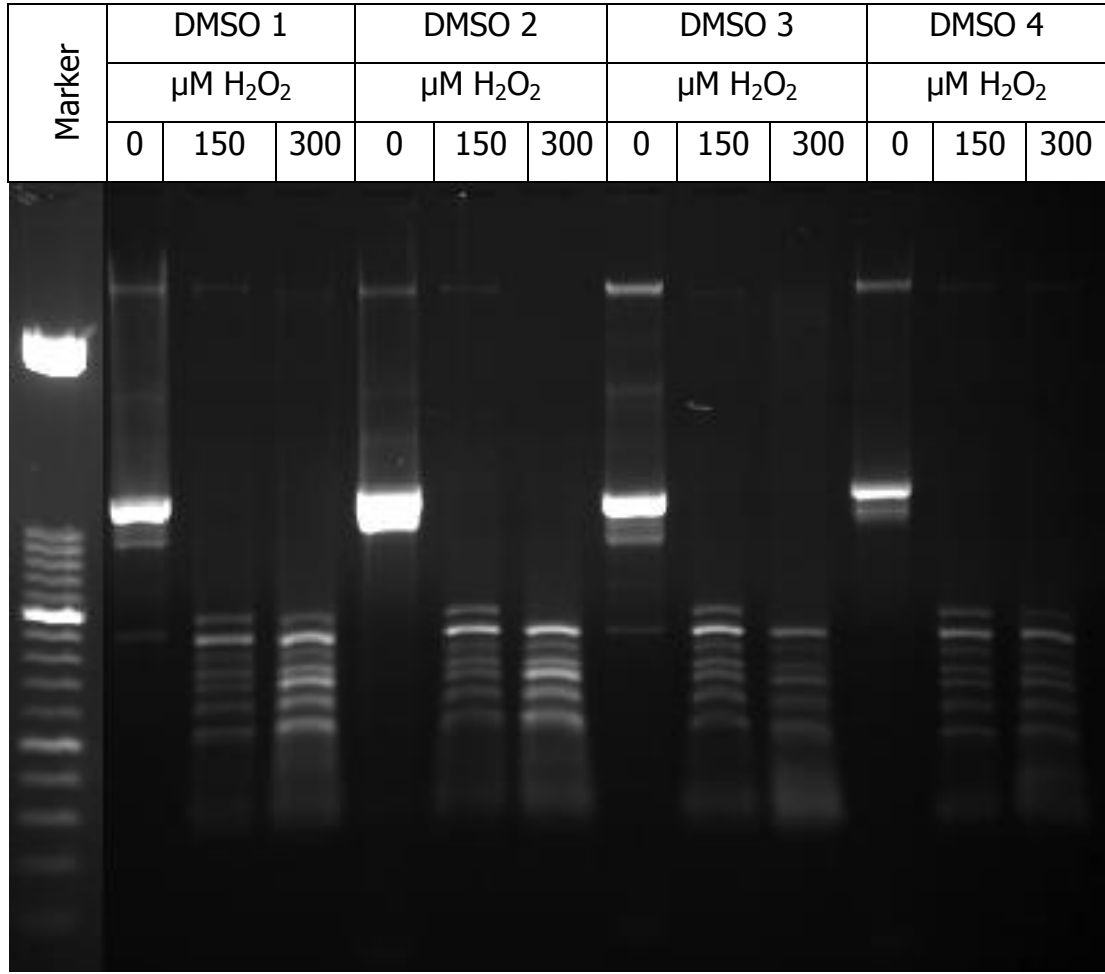
DNA fragmentasyonu için yapılan %1'lik agaroz jeldeki analizlerde DNA fragmentasyonu tespit edilemeyecek kadar az olanlarda total DNA yürütülürken, fragmentasyon olan grupta ise total DNA yürütülmemiştir. Apoptoz göstergesi olan DNA fragmentasyonunu incelendiğinde kontrol (Şekil 4.6) ve DMSO (Şekil 4.7) gruplarında H₂O₂ konsantrasyonunun artması ile fragmentasyonun arttığı görüldü. Bu iki grupta 150 ve 300 µM H₂O₂ adacık hücrelerinin DNAlarında belirgin fragmentasyona yol açmıştır.

Karvakrolün 20 mg/kg dozunda uygulandığı grupta yapılan DNA fragmentasyonu analizinde sadece 300 µM H₂O₂'e maruz kalan adacık hücrelerinin DNA'larında kontrol ve DMSO grupları ile kıyaslandığında çok az miktarda fragmente DNA gözlenmiştir. Karvakrol uygulaması H₂O₂'den

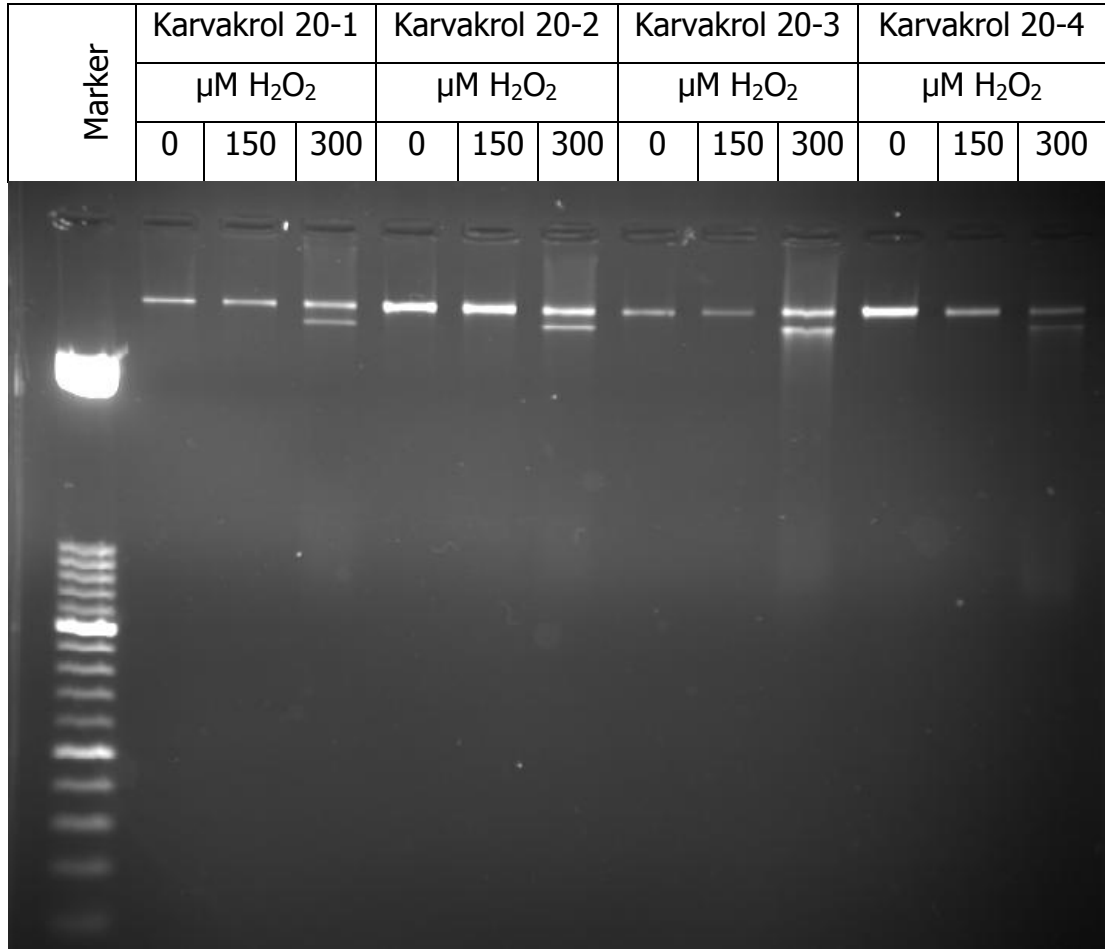
kaynaklanan DNA fragmantasyonunu belirgin bir şekilde engellemiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.6. Kontrol gruplarının DNA fragmantasyonu. Hücrelerde apoptoz göstergesi olan DNA fragmantasyonu incelendiğinde, kontrol grubunda sadece H_2O_2 'siz ortamdaki adacık hücrelerinde DNA fragmantasyonu oluşmamış, 150 ve 300 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ 'e maruz kalan hücrelerde yoğun DNA fragmantasyonu gözlenmiştir.



Şekil 4.7. DMSO gruplarının DNA fragmentasyonu. Hücrelerde apoptoz göstergesi olan DNA fragmentasyonu incelendiğinde, DMSO grubunda sadece H_2O_2 'siz ortamdaki adacık hücrelerinde DNA fragmentasyonu oluşmamış, 150 ve 300 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ 'e maruz kalan hücrelerde yoğun DNA fragmentasyonu gözlenmiştir.



Şekil 4.8. Karvakrol 20 mg/kg/gün gruplarının DNA fragmentasyonu. Hücrelerde apoptoz göstergesi olan DNA fragmentasyonu incelendiğinde, karvakrol grubunda 0 ve 150 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ 'e maruz kalanlar adacık hücreleri fragmentasyondan korunmuş, sadece 300 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ maruz kalan hücrelerde DNA fragmentasyonu bir miktar gözlenmiştir.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada antiinflamatuvar, antigenotoksik ve antioksidan özellikleri ile bilinen karvakrolün izole edilmiş Langerhans adacıklarının canlılığına, oksidatif hasara ve DNA fragmantasyonuna etkileri incelenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre 9 gün boyunca 20 mg/kg/gün dozunda oral uygulanan karvakrol, adacık izolasyonu sırasında meydana gelen oksidatif hasarı ve DNA hasarını azaltmakta, böylece adacık canlılığını korumaktadır.

Langerhans adacık naklinde, yeterli sayıda adacık transplantasyonu yapılması ve nakledilen adacıkların uzun süre canlılıklarının korunması çok önemlidir. Enzimatik sindirimde yapılan modifikasyonlar (193), saflaştırma sırasında "*ficoll*" yerine daha az toksik maddelerin kullanılması (194), kültür ortamına antioksidan, antiinflamatuvar maddelerin eklenmesi ve genetik manupilasyonlar (195) gibi adacık canlılığını artırmaya yönelik çalışmalar yapılmaktadır. İzolasyon koşullarını optimize etme çabalarına rağmen adacıkların çıkarılması, saflaştırılması ve kültürü sırasında meydana gelen stres sonucu oluşan hasarlar, nakil öncesi adacıkların kaybına ve fonksiyon bozukluğuna neden olmaktadır (3, 4, 196). Organın çıkarılması sırasındaki mekanik etkenler, soğukta muhafaza süresi, izolasyon ve saflaştırma esnasında kullanılan bazı kimyasallar gibi birçok potansiyel tehdit söz konusudur. İzole edilmiş adacıklar artık avaskülerdir ve yeniden vaskülarize olana dek iskemik hasara maruz kalırlar. Beta hücrelerinin fonksiyon bozukluğuna ve ölümüne sebep olan olaylar kaskadı henüz tam olarak aydınlatılamamış olsa da hem insan (197) hem rodent (198) çalışmalarında oksidatif stresin major rol oynadığı belirtilmektedir. Kronik hipergliseminin adacık beta hücrelerinden insülin biyosentezine olan yan etkileri ile oksidatif stresin yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir (199-201).

Katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi antioksidan enzim seviyelerinin düşük olması sebebiyle adacık hücreleri oksidatif strese karşı oldukça hassastırlar (202). Aşırı oksidatif stresin olduğu durumlarda adacık antioksidan savunma mekanizmaları

yetersiz kalır ve redoks dengesizliğine yol açarak reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşmasına neden olur. Serbest radikaller, hücrelerin proteinlerine, zar lipidlerine ve nükleik asitlerine zarar verirler. Yapılan son çalışmalarda fare adacık hücrelerine manganez SOD enziminin genetik aktarımı ile nakil sonrası adacık hücre sağ kalımının iyileştiği gösterilmiştir (203). Glutasyon peroksidaz, metallothionein, CAT ve SOD'ın farklı formları gibi antioksidan genlerin adacıklara aktarımı, adacık canlılığını belirgin olarak artırmakta ve ROS oluşumunu *in vitro* ortamda azaltmaktadır (204, 205). Vitamin C ve E, 1-25 dihidroksivitamin D3 (1, 25 D3), riboflavin, gibi vitaminler (206); *curcumin* (zerdeçal bileşeni), *Epigallocatechin-3-gallate* (EGCG) (yeşil çay bileşeni), *puerarin* (Çin tıbbında kullanılan puererya bitkisinin antioksidan bileşeni) gibi bitkisel antioksidanlar (207, 208); çinko , selenyum (209, 210) gibi elementler ve yavaş salınan enkapsüle SOD ve CAT mimetik ajanlar (211) gibi birçok madde adacık hücrelerinin canlılığını değerlendirmek için çalışılmıştır.

Karvakrol (2-hydroxy-p-cymeneisopropyl-o-Cresol) de antioksidan özelliklere sahip bir kekik uçucu yağı temel bileşenidir ve en yüksek oranda kekik bitkisinde (Origano ve Timus cinsleri) bulunmakla beraber yabani bergamot, tere gibi çeşitli bitkilerde de bulunabilmektedir. Karvakrolün antioksidan etkilerinin olduğu, Folin-Ciocalteu metodu, DPPH dekoloryasyon ve Fe(3+) redüksiyonu (FRAP) yöntemleri ile belirlenmiştir. *In vitro* 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil ve beta-karoten/linoleik asit analizleriyle de antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (212,213). Gıda endüstrisinde tatlandırıcı olarak kullanılmasının yanı sıra hem antibakteriyel hem de antioksidan etkinliği sebebi ile koruyucu olarak kullanılmaktadır. Luna ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada kümes hayvanları etinin içerdiği çoklu doymamış yağ asitleri sebebiyle oksidatif bozulmaya meyilli olduğu; timol ve karvakrolün oluşan lipid oksidasyonunu önleyerek koruma sağladığı gösterilmiştir (214).

Akkol ve arkadaşlarının yüksek miktarda karvakrol içeren *Thymbra spicata* ekstreleri ile yaptıkları bir çalışmada diyetle indüklenen

hiperkolestrerolemili farelerde karvakrolün antioksidan etkisi sayesinde karaciğer yağlanması karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir. Hiperkolesterolemi oluşturulmuş grupta ekstrelerin verilmesi ile serum, total kolesterol (TC), trigliserit (TG), düşük dansiteli lipoprotein (LDL) düzeyleri ile malondialdehit (MDA) konsantrasyonunun düştüğü bulunmuştur (175). Yapılan bir çalışmada akciğer fibroblast hücreleri 1-100 μ M timol ve karvakrol ile muamele edilmiş ve doz bağımlı olarak artan antioksidan aktivite gözlenmiştir. Karvakrol, öjenol, izoöjenol gibi uçucu yağların ultraviyole ışınlarına maruz kalınarak gerçekleşen cilt hasarında, $\cdot$ OH (hidroksil radikali) süpürücü etkinliği sebebi ile antioksidan özellik gösterdikleri bulunmuştur (215, 216). Timol, karvakrol ve 6-gingerolün peroksil radikallerini süpürücü etkisi oldukça kuvvetlidir ve fosfolipit lipozomlarının peroksidasyonunu azaltmaktadır (217).

Karvakrolün antioksidan etkisinin çeşitli dokularda gösterilmiş olmasına rağmen henüz izole Langerhans adacıkları ile yapılmış bir çalışma yoktur. Bu çalışmada karvakrolün antioksidan özelliklerinin adacık canlılığı üzerine etkilerini incelemek için H_2O_2 ile oksidatif olarak hasarlandırılmış adacık hücrelerinde floresan boyama ile canlılık tayini yapıldı. Üç farklı *in vitro* ortam sağlanarak H_2O_2 'siz, 150 ve 300 μ M H_2O_2 'li medyumlar ile hücreler muamele edildi. Lipit peroksidasyonu için MDA ve protein oksidasyonu için PC düzeyleri ile karvakrolün antioksidan etkinliği değerlendirildi. Aydın ve ark.'nın insan lenfositleri ile yaptığı bir çalışmada karvakrol ve timolün 0.1 mM ve daha düşük konsantrasyonlarda oksidatif DNA hasarına karşı koruyucu olduğu buna karşılık fenolik bileşiklerin yüksek konsantrasyonlarında (0.2 mM ve üzeri) hücre yüzeyine hidrofobik olarak bağlanıp oksidatif hasarı tetiklediği ve plasma zarını daha fragil bir hale getirdiği belirtilmiştir (174).

Bu tez çalışmasında 9 gün boyunca 20 mg/kg/gün karvakrol verilen sıçanların adacıklarının tüm hidrojen peroksit seviyelerinde canlılık düzeyinin kontrol ve DMSO gruplarına göre yüksek olduğu belirlendi. 40 mg/kg/gün karvakrol dozunda da benzer şekilde 0 ve 150 μ M H_2O_2 konsantrasyonunda

canlılığın yüksek olduğu ancak 300 μM H_2O_2 seviyesinde adacık canlılığının kontrole göre farkının anlamlı olmadığı tespit edildi. 80mg/kg/gün dozunda ise tüm H_2O_2 konsantrasyonlarındaki canlılık düzeylerinde belirgin bir azalma olduğu saptandı. Aydın ve ark.'nın (174) lenfositler üzerinde yaptıkları çalışmada yüksek molaritedeki karvakrolün oksidatif hasara yol açtığını ve hücre zarı fragilitasını artırdığını göstermelerine benzer şekilde bizim çalışmamızda da yüksek dozda verilen karvakrolün adacıkların canlılık düzeyine olumsuz etkisi tespit edildi. Bundan dolayı çalışmanın ikinci aşamasında oksidatif hasar parametreleri ile DNA fragmentasyonu analizlerinde canlılık düzeyinin en yüksek olduğu 20 mg/kg/gün karvakrol dozu ile devam edilmesine karar verildi.

Çalışmamızda oksidatif hasar için çeşitli konsantrasyonlarda H_2O_2 (0-150-300 μM) uygulanan kontrol, DMSO ve 20 mg/kg/gün karvakrol gruplarında H_2O_2 konsantrasyonuna bağlı olarak artan MDA ve PC düzeyleri tespit edildi. Karvakrolün tüm H_2O_2 konsantrasyonlarında lipid peroksidasyonu ve protein hasarını azaltarak antioksidan etki gösterdiği bulundu.

Karvakrolün çeşitli organ ve dokuların DNA'ları üzerindeki etkileri araştırılmış, doz ve süreye bağımlı olarak farklı sonuçlar kaydedilmiştir. Timol ve karvakrol OH^- gruplarının fizyolojik pH'da DNA üzerindeki guanin N7 ve sitozin N3 atomlarına hidrojen bağları ile bağlandığı spektroskopik olarak gösterilebilmiştir (218). Stammati ve arkadaşlarının karvakrol, sinnamaldehit, karvon ve timolün genotoksisitesini ölçmek amacıyla yaptıkları bir çalışmada karvon ve sinnamaldehitin doz bağımlı olarak toksik etkilerinin görüldüğü ancak karvakrol ve timolde artan dozla beraber toksisitenin çok düşük olduğu belirtilmiştir (219). İnsanda periferik kan lenfositleriyle yapılan sitogenetik analizlerde karvakrolün mitomisin C ile indüklenen *in vitro* sister kromatid değiş-tokuşunu önlediği ve böylece antigenotoksik bir ajan gibi davrandığı gösterilmiştir (220). Slamenova ve ark.'nın yapmış olduğu bir çalışmada sıçanlara içme suyu ile 7 gün boyunca 30 ve 60 mg/kg/gün ve 14 gün boyunca da 15 ve 30 mg/kg/gün konsantrasyonlarında karvakrol verilmiş;

izole edilen hepatosit ve testiküler hücreleri 5 dakika boyunca farklı konsantrasyonlarda H_2O_2 (0-100-150-200-250 μM) ile muamele edilmiştir. DNA lezyonları tek hücre jel elektroforezi ile analiz edilmiş ve sonuçta tüm konsantrasyonlarda karvakrol ile muamele edilen hücrelerin kontrole göre DNA hasarına karşı dirençli olduğu gösterilmiştir (6). Lipia organoidlerinin uçucu yağları ile yapılan bir çalışmada bleomisin ile indüklenen DNA hasarına karşı timol ve karvakrolün koruyucu olduğu, dolayısı ile antigenotoksik etki gösterdiği bulunmuştur (221). İnsan hepatoma HepG2 ve kolonik Caco-2 hücre serilerinde H_2O_2 ile indüklenen DNA hasarına karşı 24 saat kültür eklenen karvakrol ve timolün DNA lezyonlarını azalttığı gösterilmiştir (222). Öte yandan, Azirak ve Rencuzoğullarının bir çalışmasında intraperitoneal uygulanan karvakrol (10, 30, 50, 70 mg/kg) ve timolün (40, 60, 80 ve 100 mg/kg) kemik iliği hücrelerinde yüksek konsantrasyon seviyelerinde (70 mg/kg 12 ve 24 saatte ve 100 mg/kg tüm uygulama zamanlarında) toplam kromozom düzensizliğini artırdığı bulunmuştur (223).

Bu çalışmada da apoptozun göstergelerinden biri olan DNA fragmentasyonu değerlendirildi; 20 mg/kg/gün dozunda uygulanan karvakrolün kontrol ve DMSO gruplarına göre DNA fragmentasyonunu azalttığı ve böylece H_2O_2 ile oluşturulan DNA hasarını önlediği gösterildi. 80 mg/kg/gün karvakrol dozunda canlılık düzeyinin belirgin bir biçimde düşük olması belki Azirak ve ark.'nın belirttiği gibi yüksek doz karvakrol ile kromozomal düzensizliğin artmasına bağlı olabilir.

İzolasyon stresinden sorumlu tutulan bir başka mekanizma da kemokin ve sitokinlerin aracılık ettiği inflamatuvar cevaptır. Adacıkların izolasyonu sırasında meydana gelen strese verilen inflamatuvar cevapta özellikle ekzokrin dokunun sitokin üretimi ve salınımının etkili olduğu gösterilmiştir (224). Sitokinlerden IL-6'nın beta hücreleri üzerine doğrudan toksik etkilerinin yanı sıra proinflamatuvar sitokinlerle etkileşerek de hasara katkıda bulunduğu gösterilmiştir. MCP-1 ve IL-8 gibi kemokinlerin de izolasyon işlemleri sırasında açığa çıktığı ve transplantasyon sonrası adacık fonksiyonunun tehlikeye

düşmesinde etken olduğu tespit edilmiştir (225-227). Adacıkların etrafına yerleşmiş makrofajlardan IL-1 β and TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımı hücreler üzerinde toksik etki gösterir ve adacık hücrelerinde ROS üretimini artırır (228, 229). İzolasyon sırasında veya kültür aşamasında ortama antioksidanların eklenmesinin adacık nakli sonuçlarını iyileştirdiğine dair çalışmalar mevcuttur (147).

Potansiyel bir ROS bağımlı hedef molekül olan nükleer faktör kappa-B (NF- κ B) proinflamatuvar sitokinlerin, kemokinlerin, adezyon moleküllerinin ve inflamatuvar enzimlerin düzenlenmesindeki anahtar transkripsiyon faktörüdür. İzolasyon işlemi sırasında pankreatik hücrelerde NF- κ B translokasyonunun meydana geldiği gösterilmiştir. NF- κ B'nin blokajı, beta hücrelerini interleukin (IL)-1 β ile indüklenen nitrik oksit (NO) üretiminin etkilerinden korumaktadır (230, 231).

Karvakrolün antibakteriyel ve antioksidan etkilerinin yanı sıra güçlü antiinflamatuvar özelliklere sahip bir madde olduğu birçok çalışma ile gösterilmiştir. Ocana ve ark. nın yaptıkları bir çalışmada Timol, karvakrol ve trans-sabinen hidratin makrofajlardan TNF- α , IL-1 β ve IL-6 sitokinlerinin sentezini azalttığı bulunmuştur (172). Karvakrolün inflamasyonda prostaglandin biyosentezinin hız kısıtlayıcı enzimi olan siklooksijenaz-2 (COX-2) ekspresyonunu peroksizom proliferatör-aktif reseptörleri (PPARs) üzerinden baskılayarak antiinflamatuvar etki gösterdiği tespit edilmiştir (232).

Karvakrol *in vitro* saflaştırılmış domuz lenfositlerinin proliferasyonunu 182 $\pm$ 67 μ M konsantrasyonunda inhibe etmektedir; ancak karvakrol uygulanan lenfosit preparatlarına monositlerin eklenmesi, lenfositler üzerinde koruyucu etki göstermektedir (7).

Adacık izolasyonunda cerrahi işlemler sırasında ve saflaştırma öncesi endokrin ve ekzokrin dokunun birlikteliği çeşitli inflamatuvar yanıtların oluşmasına yol açarak da adacık canlılığını azaltmaktadır. Karvakrolün antiinflamatuvar özellikleri çalışmamızda değerlendirilmemekle beraber

antioksidan ve antigenotoksik etkilerine katkıda bulunarak adacık canlılığının korunmasında etken olmuş olabilir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında 9 gün boyunca oral uygulanan karvakrolün adacık canlılığı, oksidatif DNA hasarına, lipid peroksidasyonuna ve protein oksidasyonuna etkileri incelenmiş ve 20 mg/kg/gün dozunun oksidatif hasarı azaltarak adacık canlılığını koruduğu gösterilmiştir.

DM, insülin üreten pankreas beta hücrelerinin genellikle oto-immün mekanizmalarla yıkılması sonucu kan şekeri kontrolünün bozulduğu kronik bir hastalıktır. DM'un oral antidiyabetikler ve insülin replasman terapisi ile tedavisi yeterli glisemik kontrolü sağlayacak biyolojik geribildirim mekanizmalarını sağlayamamakta ve uzun vadede gelişecek komplikasyonları tam olarak önleyememektedir. Geribildirim mekanizmalarını koruyabilen ve hipoglisemik atakları önleyebilen endojen bir kaynak kullanabilmek amacıyla tüm pankreas ve Langerhans adacık nakli, insülin tedavisine alternatif olarak uygulanmaktadır. DM'un düzeltilmesi için tüm pankreas dokusunun nakledilmesine gerek yoktur; sadece Langerhans adacıklarının transferi DM'taki fonksiyon kaybını düzeltebilmektedir. Solid organ naklinde daha derin ve uzun süreli anestezinin gerekliliği ve major cerrahiye ait komplikasyonların fazla oluşu adacık naklini gün geçtikçe daha cazip hale getirmektedir.

Pankreas Langerhans adacıkları nakli ile normal glisemik kontrolü oluşturmak için daha doğal ve endojen bir insulin kaynağı elde etmek, hastaların hipoglisemik ataklarını önlemek ve yaşam kalitesini artırmak amaçlanmaktadır. Böylece her gün insülin enjeksiyonu yapılmadan da DM'un kronik komplikasyonlarından korunmak veya bu komplikasyonları geciktirmek mümkün olabilecektir. Pankreas transplantasyonu sonrası normal glisemik kontrol sağlandığında ekzojen insulin enjeksiyonunun kesilebilmesi tedavideki başarının göstergesidir; ancak henüz 5 yıldan fazla insülin-siz yaşam sağlanabilmiş değildir. Langerhans adacık naklinde, replase edilen adacıkların izolasyon öncesi ve sonrasında canlılıklarının korunması çok önemlidir.

Langerhans adacıklarının izolasyonu sırasında karşılaşılan problemler, nakil sonrası tedavi başarısını olumsuz etkilemektedir. Oksidatif hasarın en aza indirilmesi için alınan önlemlerden biri antioksidan ajanların çeşitli aşamalarda kullanılmasıdır. Bu çalışma ile izolasyondan önce verilen karvakrolün pankreas adacıklarında antioksidan ve antigenotoksik etkileri olduğu gösterilmiştir; ancak hücre içi sinyal yollarındaki etki mekanizmalarının tam olarak aydınlatılabilmesi, kültür ortamındaki etkilerinin görülmesi için *in vitro* çalışmalara ve nakil sonrası etkilerinin değerlendirilmesi için ileri çalışmalara gerek duyulmaktadır.

Ayrıca diyabetik hastalardan alınan doku örneklerinde oksidatif stresin birçok biyokimyasal göstergesinin yükseldiği bilinmektedir (233). Karvakrol gibi antioksidan ajanların adacıklar üzerine olan olumlu etkileri sadece nakil çalışmalarında değil aynı zamanda DM'un komplikasyonlarından korunmada etkin olabilir ve gelecekteki tedavi şekillerine yön verebilir.

KAYNAKLAR

1. Jonnakuty, C., Gagnoli, C. (2007). Karyotype of the human insulinoma CM cell line--beta cell model in vitro?. *Journal of Cellular Physiology*, 213(3), 661-662.
2. Kin, T., Senior, P., O'Gorman, D. (2008). Risk factors for islet loss during culture prior to transplantation. *Transplant International*, 21(11), 1029-1035.
3. Lakey, J.R., Burridge, P.W., Shapiro, A.M. (2003). Technical aspects of islet preparation and transplantation. *Transplant International*, 16(9), 613-632.
4. Paraskevas, S., Maysinger, D., Wang, R., Duguid, T.P., Rosenberg, L. (2000). *Cell loss in isolated human islets occurs by apoptosis. Pancreas*, 20(3), 270-276.
5. Wolff, S.P. (1993). Diabetes mellitus and free radicals. Free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications. *British Medical Bulletin*, 49(3), 642-652.
6. Slamenova, D., Horvathova, E., Marsalkova, L., Wsolova, L. (2008). Carvacrol given to rats in drinking water reduces the level of DNA lesions induced in freshly isolated hepatocytes and testicular cells by H(2)O(2). *Neoplasma*, 55(5), 394-399.
7. Bimczok, D., Rau, H., Sewekow, E. (2008). Influence of carvacrol on proliferation and survival of porcine lymphocytes and intestinal epithelial cells in vitro. *Toxicology In Vitro*, 22(3), 652-658.
8. Çimen, A. (1994). *Anatomi*. 4. Bs., s:413-416. Bursa, Uludağ üniversitesi Güçlendirme vakfı, yayın no: 87.
9. Snell, R.S. (1997). Karın boşluğu. *Klinik Anatomi*, bölüm 5, 5. Bs., s:222-223, İstanbul, Nobel Tıp kitabevi.

10. Orci, L. (1982). Macro and micro domains in the endocrine pancreas. *Diabetes*, 31(6), 538-565.
11. Murray, I. (1971). Paulesco and the Isolation of Insulin. *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences*, 26 (2), 150-157.
12. Von Mering, J., Minkowski, O. (1890). Diabetes mellitus each pankreas extirpation. *Archive Experimental Pathology and Pharmacology*, 26, 371-382.
13. Schafer, E.A. (1916). An introduction to the study of internal secretion. In: *The Endocrine Organs*. S:142-156. Londra, Longmans.
14. Banting, F.G., Best, C.H. (2007). The internal secretion of the pancreas.1922. *Indian Journal of Medical Research*. 125(3), 251-266.
15. Bliss, M. (1982). *The Discovery of Insulin*. 25. Bs. S:256-267. Chicago, University of Chicago Press.
16. Murnaghan, J.H., Talalay, P. (1967). John Jacob Abel and the crystallization of insulin. *Perspectives in Biology and Medicine*, 10(3), 334-380.
17. Jensen, H., Evans, E.A. (1935). Studies on crystalline insulin. XVIII. The *Nature* of free amino groups in insulin and the isolation of phenylalanine and proline from crystalline insulin. *Journal of Biological Chemistry*, 108, 10-19.
18. Jay S. Skyler (2007). *Diyabet Atlası*, 3. Bs.,s:1-23. İstanbul, Tenedoks yayıncılık.
19. Rouiller, D.G., Cirulli, V., Halban, P. (1990). Difference in aggregation properties and levels of neural cell adhesion molecule (NCAM) between islet cell types. *Experimantal Cell Research*, 391, 305-312.
20. Rouiller, D.G., Cirulli, V., Halban, P.A. (1991). Uvomorulin mediates calcium dependent cell adhesion molecules distinguish between islet cell types. *Developmental Biology*, 148(1), 233-242.

21. Cirulli, V., Crisa Li Beattie, G.M. (1998). KSA antigen Ep-CAM mediates cell-cell adhesion of pancreatic epithelial cells: Morphoregulatory roles in pancreatic islet development. *Journal of Cell Biology*, 140(6), 1519-1534.
22. Esni, F., Taljedal, I.B., Perk, A.K. (1999). Neural cell adhesion molecule(N-CAM) is required for cell type segregation and normal ultrastructure in pancreatic islets. *Journal of Cell Biology*, 144(2), 325-337.
23. Dahl, U., Sjodin, A., Semb, H. (1996). Cadherins regulate aggregation of pancreatic beta cells in vivo. *Development*, 122(9), 2895-2902.
24. Jansson, L., Hellerström, C. (1983). Stimulation by glucose of the blood flow to the pancreatic islets of the rat. *Diabetologia*, 25(1), 45-50.
25. Jansson, L. (1984). The blood flow to the pancreatic and the islets of the Langerhans during an intraperitoneal glucose load in rat. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 1(2), 111-114.
26. Bern, R.M, Levy, M.N., Koeppe, B.M., Stanton, B.A. (2008). *Physiology*. 6. Bs. S:676, Şekil 38-11D'den uyarlanarak alınmıştır.
27. Grube, D., Bohn, R. (1983). The microanatomy of human islets of Langerhans with special reference to somatostatin (D) cells. *Archivum Histologicum Japonicum*, 46(3), 327-353.
28. Grube, D., Eckert, I., Speck, P.T. (1983). Immunohistochemistry and microanatomy of the islets of Langerhans. *Biomedical Research*, 4, 25-36.
29. Bonner-Weier, S., Orci, L. (1982). New perspectives on the microvasculature of the islets of Langerhans. *Diabetes*, 31(10), 729-732.

30. Bern, R.M, Levy, M.N., Koeppen, B.M., Stanton, B.A. (2008). Pankreas adacık hormonları. *Fizyoloji*. 5. Bs. S:766-791. Ankara, Güneş Tıp kitabevi.
31. Patrick, P.L., Kanai-Azuma, M., Kanai, Y. (2003). Early endoderm development in vertebrates: lineage differentiation and morphogenetic function. *Current Opinion in Genetics & Development*, 13(4), 393-400.
32. Ober, E.A., Field, H.A., Stainier, Y.R. (2003). From endoderm formation to liver and pancreas development in zebrafish. *Mechanisms of Development*, 120(1), 5-18.
33. Wells, J.M., Melton, D.A. (1999). Vertebrate endoderm development. *Annual Review of Cell & Developmental Biology*, 15, 393-410.
34. Pictate, R., Rutter, W.J. (1972). Development of embryonic endocrine pancreas. In Steiner DF, Frenkel N: *Handbook of Physiology Society*, Washington, Williams & Wilkins.
35. Slack, J.M.W. (1995). Developmental biology of the pancreas. *Development*, 121(6), 1569-1580.
36. Hebrok, M., Kim, S.G., Melton, D.A. (1998). Notochord repression of endodermal Sonic hedgehog permits pancreas development. *Genes & Development*, 12(11), 1705-1713.
37. Kumar, M., Jordan, N. (2003). Signals from lateral plate mesoderm instruct endoderm toward a pancreatic fate. *Developmental Biology*, 259(1), 109-122.
38. Wells, J.M., Melton, D.A. (2000). Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers. *Development*, 127(8), 1563-1572.
39. Deutsch, G., Jung, J., Zheng, M. (2001). A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm. *Development*, 128(6), 871-881.

40. Lammert, E., Cleaver, O., Melton, D. (2001). Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels. *Science*, 294(5542), 564-567.
41. Ott, M.O., Rey-Campos, J., Cereghini, S. (1991). vHNF1 is expressed in epithelial cells of distinct embryonic origin during development and precedes HNF1 expression. *Mechanisms of Development*, 36(1-2), 47-58.
42. Monaghan, A.P., Kaestner, K.H. (1993). Postimplantation expression patterns indicate a role for the Mouse forkhead/HNF-3, and genes in determination of the definitive endoderm, chordamesoderm and neuroectoderm. *Development*, 119(3), 567-578.
43. Duncan, S.A., Manova, K., Chen, W. (1994). Expression of transcription factor HNF-4 in the extraembryonic endoderm, gut, and nephrogenic tissue of the developing mouse embryo: HNF-4 is a marker for primary endoderm in the implanting blastocyst. *Proceedings of the National Academy Sciences of the USA*, 91(16), 7598-7602.
44. Rausa, F., Samadani, U., Fletcher, C.F. (1997). The cut-homeodomain transcriptional activator HNF-6 is coexpressed with its target gene HNF-3 in the developing murine liver and pancreas. *Developmental Biology*, 192(2), 228-246.
45. Lavemiere, A.C., MacNeill, C. (1994). GATA-4/5/6, a Subfamily of Three Transcription Factors Transcribed in Developing Heart and Gut. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(37), 23177-23184.
46. Guz, Y., Montminy, M.R., Leonard, J. (1995). Expression of murine STF-1, a putative insulin gene transcription factor, in b cells of pancreas, duodenal epithelium and pancreatic exocrine and endocrine progenitors during ontogeny. *Development*, 121, 11-18.

47. Offield, M.F., Jeton, T.L., Labosky, P.A. (1996). PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development*, 122(3), 983-995.
48. Miralles, F., Czernichow, P. (1999). Signaling through fibroblast growth factor receptor 2b plays a key role in the development of the exocrine pancreas. *Proceedings of the National Academy Sciences of the USA*, 96(11), 6267-6272.
49. Bras, S.L., Miralles, F., Czernichow, P. (1998). Fibroblast growth factor 2 promotes pancreatic epithelial cell proliferation via functional fibroblast growth factor receptors during embryonic life. *Diabetes*, 47(8), 1236-1242.
50. Hynes, R. (2002). Integrins. Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110(6), 673-687.
51. Kaido, T., Perez, B., Yebra, M. (2004). Alphav-integrin utilization in human beta-cell adhesion, spreading, and motility. *Journal of Biological Chemistry*, 279(17), 17731-17737.
52. Hill, D.J., Hogg, J. (1991). Growth factor control of pancreatic beta cell hyperplasia. In Herington A: *Clinical Endocrinology and Metabolism*, s:689-698, Londra, Bailliere Tindall.
53. Kaung, H.L. (1994). Growth dynamics of pancreatic islet cell populations during fetal and neonatal development of the rat. *Developmental Dynamics*, 200(2), 163-175.
54. Caglia, L., Cahil, C.J., Finegoog, D.T. (1997). Apoptosis participates in the remodeling of the endocrine pancreas in the neonatal rat. *Endocrinology*, 138(4), 1736-1741.
55. Tornehave, D., Larsson, L.I. (1997). Presence of Bcl-X1 during development of the human fetal and rat neonatal endocrine pancreas. Correlation to programmed cell death. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, 105(6), 300-308.

56. Petrik, J., Arany, E., Mc Donald, T. (1998). Apoptosis in the pancreatic islet cells of the neonatal rat is associated with a reduced expression of insulin like growth factor II that may act as a survival factor. *Endocrinology*, 139(6), 2994-3004.
57. Xu, G., Kwon, G., Marshall, C.A. (1998). Branched chain amino acids are essential in the regulation of PHAS-I and p70 S6 kinase by pancreatic beta cells. *Journal of Biological Chemistry*, 273(43), 18178-28184.
58. Nielsen, J.H., Svensson, C., Galsgaard, E.D. (1999). Beta cell proliferation and growth factors. *Journal of Molecular Medicine*, 77(1), 62-66.
59. Baxter, R.C. (1991). Insulin like growth factor (IGF) binding proteins: The role of serum IGFBPs in regulating IGF availability. *Acta Paediatrica Supplements.*, 372, 107-114.
60. Hogg, J., Han, V.K.M., Clemmons, D.R. (1993). Interactions of nutrients, insulin like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins in the regulation of DNA synthesis by isolated fetal rat islets of Langerhans. *Journal of Endocrinology*, 138(3), 401-412.
61. Nielsen, J.H., Svensson, C., Galsgaard, E.D. (1999). Beta cell proliferation and growth factors. *Journal of Molecular Medicine*, 77, 62-66.
62. Swenne, I. (1992). Pancreatic beta cell growth and Diabetes Mellitus. *Diabetologia*, 35, 193-201.
63. Logothetopoulos, J. (1972). Islet cell regeneration and neogenesis. In Steiner ED, Freinkel N (eds): Handbook of Physiology. Section 7: Endocrinology, vol 1. *Endocrine Pancreas*. Washington, DC, American Physiological Society, 67-76.

64. Kaung, H.L.C. (1983). Effect of glucose on beta cell proliferation and population size in organ culture of fetal and neonatal rat pancreases. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 74,303-312.
65. El-Assaad, W., Joly, E., Barbeau, A. (2010). Glucolipotoxicity alters lipid partitioning and causes mitochondrial dysfunction, cholesterol, and ceramide deposition and reactive oxygen species production in INS832/13 ss-cells. *Endocrinology*. Doi:10.1210/2009-1238.
66. Sanger, F. (1959). The Chemistry of Insulin. *Science*, 129 (7), 1340-1344.
67. Pittman, I., Philippon L.H., Steiner, D.F. (2004). Insulin Biosynthesis, Secretion, Structure, and Structure-Activity Relationships. *Diabetes, Insulin Receptor*. Ch 3. Şekil 1b ve Şekil 6'dan alınmıştır.
68. Steiner, D.F., Clark, J.L., Nolan, C. (1970). The biosynthesis of insulin and some speculation regarding the pathogenesis of human diabetes. In: *The Pathogenesis of Diabetes Mellitus*. (Cerasi E, Luft R, Eds) S:57-80, Stockholm, Almqvist and Wiksell.
69. Orci, L., Ravazzola, M., Amherdt, M., Madsen, O. (1985). Direct identification of prohormone conversion site in insulin secreting cells. *Cell*, 42(2), 671-681.
70. Kemler, W., Peterson, J.D., Steiner, D.F. (1971). Studies on the conversion of proinsulin to insulin. I. Conversion in vitro with trypsin and carboxypeptidase. *Journal of Biological Chemistry*, 246(13), 6786-6791.
71. Valverde, I., Garcia-Morales, P., Ghiglione, M., Malaisse, W.J. (1983). The stimulus-secretion coupling of glucose induced insulin release LIII. Calcium dependency of the cyclic AMP response to nutrient secretagogues. *Hormone and Metabolic Research*, 15(2), 62-68.

72. Baker, E.N., Blundell, T.L., Cutfield, J.F. (1988). The structure of 2 Zn pig insulin crystals at 1.5 Å resolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, 319, 369-456.
73. Permutt, M.A., Chirgwin, J., Rotwein, P. (1984). Insulin gene structure and function: a review of studies using recombinant DNA methodology. *Diabetes Care*, 7(4), 386-394.
74. http://www.zoology.ubc.ca/~berger/B200sample/unit_9_secretion/images9/14_26.jpg adresinden alınmıştır.
75. Porte, D. Jr., Puppo, A.A. (1969). Insulin responses to glucose: Evidence for a two pool system in man. *Journal of Clinical Investigation*, 48(12), 2309-2319.
76. Ward, W.K., Beard, J.C., Halter, J.B. (1984). Pathophysiology of insulin secretion in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 7(5), 491-502.
77. Waldhäusl, W., Bratusch-Marrain, P., Gasic, S. (October 1979). Insulin production rate following glucose ingestion estimated by splanchnic C-peptide output in normal man. *Diabetologia*, 17(4), 221-227.
78. Eaton, R.P., Allen, R.C., Schade, D.S. (1983). Hepatic removal of insulin in normal man: dose response to endogenous insulin secretion. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 56(6), 1294-1300.
79. Shapiro, E.T., Tillil, H., Miller, M.A. (1987). Insulin secretion and clearance. Comparison after oral and intravenous glucose. *Diabetes*, 36(12), 1365-1371.
80. Tillil, H., Shapiro, E.T., Miller, M.A. (1988). Dose-dependent effects of oral and intravenous glucose on insulin secretion and clearance in normal humans. *American Journal of Physiology*, 254, 349-357.
81. Nauck, M.A., Homberger, E., Siegel, E.G. (1986). Incretin effects of increasing glucose loads in man calculated from venous insulin and C-

- peptide responses. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 63(2), 492-498.
82. Creutzfeldt, W., Ebert, R. (1985). New developments in the incretin concept. *Diabetologia*, 28(8), 565-573.
 83. Mueckler, M., Caruso, C., Baldwin, S.A., Panico, M., Blench, I., Morris, H.R. (1985). Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science*, 229(4717), 941-945.
 84. Orci, L., Thorens, B., Ravazzola, M., Lodish, H.F. (1989). Localization of the pancreatic beta cell glucose transporter to specific plasma membrane domains. *Science*, 245(4915), 295-297.
 85. Unger, R.H. (1991). Diabetic hyperglycemia: link to impaired glucose transport in pancreatic beta cells. *Science*, 251(4998), 1200-1205.
 86. Shepherd, P.R., Kahn, B.B. (1999). Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine*, 341(4), 248-257.
 87. Roche, E., Assimacopoulos-Jeannet, F., Witters, L.A. (1997). Induction by glucose of genes coding for glycolytic enzymes in a pancreatic beta-cell line (INS-1). *Journal of Biological Chemistry*, 272(5), 3091-3098.
 88. Matschinsky, F.M. (1996). Banting lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes*, 45(2), 223-241.
 89. Morita, H., Yano, Y., Niswender, K.D. (1994). Coexpression of glucose transporters and glucokinase in *Xenopus* oocytes indicates that both glucose transport and phosphorylation determine glucose utilization. *Journal of Clinical Investigation*, 94(4), 1373-1382.
 90. Krus, U., Kotova, O., Spéjel, P., Hallgard, E. (2010). Pyruvate dehydrogenase kinase 1 controls mitochondrial metabolism and insulin

secretion in INS-1 832/13 clonal beta-cells. *Biochemical Journal*, 429, 205-213.

91. Nishida, M., MacKinnon, R. (2002). Structural basis of inward rectification: cytoplasmic pore of the G-protein gated inward rectifier GIRK1 at 1.8 Å resolution. *Cell*, 111(7), 957-965.
92. Aguilar-Bryan, L., Bryan, J. (1999). Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Endocrine Reviews*, 20(2), 101-135.
93. Ashcroft, F.M., Rorsman, P. (1990). ATP-sensitive K⁺ channels: a link between β -cell metabolism and insulin secretion. *Biochemical Society Transactions*, 18(1), 109-111.
94. Nichols, C.G., Koster J.C. (2002). Diabetes and insulin secretion: Whither KATP?. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*, 283(3), 403-412.
95. MacDonald, P.E., Wheeler, M.B. (2003). Voltage-dependent K(+) channels in pancreatic beta cells: Role, regulation and potential as therapeutic targets. *Diabetologia*, 46(8), 1046-1062.
96. Henquin, J.C., Ravier, M.A., Nenquin, M. (2003). Hierarchy of the beta-cell signals controlling insulin secretion. *European Journal of Clinical Investigation*, 33(9), 742-750.
97. Tsuboi, T., Rutter, G.A. (2003). Insulin secretion by "kiss-and run" exocytosis in clonal pancreatic islet beta-cells. *Biochem Society Transactions*, 31(4), 833-836.
98. Tsuboi, T., McMahon, H.T., Rutter, G.A. (2004). Mechanisms of dense core vesicle recapture following "kiss-and-run" ("cavcapture") exocytosis in insulin secreting cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(45), 47115-47124.

99. Sutton, R.B., Fasshauer, D., Jahn, R., Brunger, A.T. (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 angstrom resolution. *Nature*, 395, 347-353.
100. <http://www.nauba-aloke-bangla.com/EBook/Projukti-o-Biggan/top100/insulin-secretion.jpg> adresinden uyarlanarak alınmıştır.
101. Holst, J.J., Gromada, J. (2004). Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 287(2), 199-206.
102. Yenigün, M., Altuntaş, Y. (2001). Tip 2 diabetes mellitus'un patogenezi. İn: *Her Yönüyle Diabetes Mellitus*, (1), s: 85-237. Nobel Tıp kitabevi, İstanbul.
103. McGarry, J.D., Dobbins, R.L. (1999). Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion. *Diabetologia*, 42(2),128-138.
104. Prentki, M., Corney, B.E. (1996). Are the beta-cell signaling molecules malonyl-coA and cytosolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM?. *Diabetes*, 45, 273-283.
105. Weir, G.C., Bonner-Weir, S. (2004). *Insulin secretion in type 2 diabetes. Diabetes mellitus: A Fundamental and Clinical Text*, edn 3. Edited by LeRoith D, Taylor SI, Olefsky J.M. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 887-898.
106. Di Cola, G., Cool, M.H., Acilci, D. (15 May 1997). Hypoglycemic effect of insulin-like growth factor-1 in mice lacking insulin receptors. *Journal of Clinical Investigation*, 99(10), 2538-44.
107. Barbetti, F., Gejman, P.V., Taylor, S.I. (1992). Detection of mutations in insulin receptor gene by denaturing gradient gel electrophoresis. *Diabetes*, 41(4),408-15.

108. Olefsky, JM. (1976). Decreased insulin binding to adipocytes and circulating monocytes from obese subjects. *Journal of Clinical Investigation*, 57(5), 1165-1172.
109. Smith-Hall, J., Pons, S., Patti, ME. (1997). The 60-kDa insulin receptor substrate functions like an IRS-protein (pp60IRS3) in adipose cells. *Biochemistry*, 36(27), 8304-8310.
110. Bjornholm, M., Attersand, A. (2002). Absence of functional insulin receptor substrate-3 (IRS-3) gene in humans. *Diabetologia*, 45(12), 1697-1702.
111. Jellema, A., Mensink, R.P., Kromhout, D. (2003). Metabolic risk markers in ana overweight and normal weight population with oversampling of carriers of the IRS-! 972Arg-variant. *Atherosclerosis*, 171, 75-81.
112. Yenush, L., White, M.F. (1998). The IRS-signaling system during insulin and cytokine action. *Essays in Biochemistry*, 53, 119-138.
113. Kasuga, M., Karlsson, F.A., Kahn, C.R. (1982). Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. *Science*, 215(4529), 185-187.
114. White, M.F., Kahn, C.R. (1994). The insulin signaling system. *Journal of Biological Chemistry*, 269(1), 1-4.
115. Toker, A., Cantley, L.C. (1997). Signalling through the lipid products of phosphoinositide 3-OH kinase. *Nature*, 387(6634), 673-676.
116. Cross, DAE., Alessi, D.R., Cohen, P. (1996). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated protein kinase B. *Nature*, 378(6559), 785-787.
117. Pessin, J.E., Thurmond D.C., Elmendorf J.S. ve ark. (1999). Molecular basis of insulin-stimulated GLUT 4 vesicle trafficking. Location! Location! Location!. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 2593-2596.

118. Khan, H., Pessin, J.E. (2002). Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways. *Diabetologia*, 45(11),1475-1483.
119. Chiang, S.H., Bauman, C.A., Kanzaki, M. (2001). Insulin stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. *Nature*, 19(410), 944-948.
120. Pawson, T., Scott, J.D. (1997). Signalling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science*, 278, 2075-2080.
121. Groop, L.C., Saloranta, C., Schenk, M. (1991). The role of free fatty acid metabolism in the pathogenesis of insulin resistance in obesity and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 72, 96-102.
122. Baker, J., Liu, J.P., Robertson, E.J. (1993). Efstratiadis A: Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell*, 75(1), 73-82.
123. Liu, J.P., Baker, J., Perkins, J.A. (1993). Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (IGF-1) and type 1 IGF receptor (IGF1r). *Cell*, 75(1), 59-72.
124. DeFronzo, R.A., Simonson, D., Ferrannini, E. (1983). Hepatic and peripheral insulin resistance: a common feature of insulin-independent and insulin-dependent diabetes. *Diabetologia*, 32, 35-45.
125. Paternostro, G., Camici, P.G., Lammerstma, A.A. (1996). Cardiac and skeletal muscle insulin resistance in patients with coronary artery disease: a study with positron-emitting tomography. *Journal of Clinical Investigation*, 98, 2094-2099.
126. Atkinson, M., Eisenbarth, G. (2001). Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet*, 358(9277), 221-229.

127. Imagawa, A., Hanafusa, T., Tamura, S. (2001). Pancreatic biopsy as a procedure for detecting in situ autoimmune phenomena in type 1 diabetes: close correlation between serological markers and histological evidence of cellular autoimmunity. *Diabetes*, 50(6), 1269-1273.
128. Altuntaş, Y. (2001). Diabetes mellitus'un tanımı, tanısı ve sınıflandırması in: Yenigün M, Altuntaş Y(eds): *Her Yönüyle Diabetes Mellitus*. Nobel Tıp kitabevi, İstanbul, (1), 51-63.
129. American Diabetes Association (2010): Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*; 33 Suppl 1:S62.
130. Skyler, J.S. (1988). Insulin Pharmacology. *Medical Clinics of North America*, 72(6), 1337-1354.
131. Colquitt, J., Royle, P., Waugh, N. (2003). Are analogue insulins beter than soluble in continious subcutaneous insulin infusion? Results of a meta-analysis. *Diabet Med.*,20, 863-866.
132. Williams, P. (1894). Notes on diabetes treated with extract and by grafts of sheep' s pancreas. *British Medical Journal*, 2,1303.
133. Kelly, W.D., Lillehei, R.C., Merkel, F.K., Idezuki, Y. (1967). Allotransplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy. *Surgery*, 61(6), 827.
134. Sollinger, H.W., Knechtle, S.J., Reed, A. (1992). Experience with 100 consecutive simultaneus kidney-pancreas transplants with bladder drainage. American Diabetes Association. Position statement: pancreas transplantation for patienets with diabetes mellitus. *Diabet Care*, 15, 1668.
135. Sutherland, D.E. (2001). Pancreas transplantation. *J Diabetes Complications*, 15(1), 10.

136. Cattaneo, D., Merlini, S., Pellegrino, M. (2004). Therapeutic drug monitoring of sirolimus: effect of concomitant immunosuppressive therapy and optimization of drug dosing. *American Journal of Transplantation*, 4, 1345-1351.
137. Shapiro, A.M., Lakey, J.R., Ryan, E.A. (2000). Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *New England Journal of Medicine*, 343, 230-238.
138. Najarian, J.S., Sutherland, D.E., Matas, A.J., Steffes, M.W. (1977). Human islet transplantation: a preliminary report. *Transplant Proceedings*, 9(1), 233-236.
139. Brendel, M.D., Hering, B.J., Schultz, A.O. (1998). *Islet Transplant Registry Newsletter*. No:8,.
140. Shapiro, A.M., Lakey, J.R., Ryan, E.A. (2000). Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *New England Journal of Medicine*, 343(4), 230-238.
141. Ryan, E.A., Paty, B.W., Senior, P.A. (2005). Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes*, 54(7), 2060-2069.
142. American Diabetes Association. (2000). Pancreas transplantation for patients with Type 1 diabetes. *Diabetes Care*, 23, 117.
143. Esmatjes, E., Flores, L., Vidal, M. (2003). Hypoglycemia after pancreas transplantation: usefulness of a continuous glucose monitoring system. *Clinical Transplantation*, 17, 534-538.
144. Eliot, J., Scarpello, J.H.B., Morgan, N.G. (2002). Differential effects of genistein on apoptosis induced by fluoride and pertussis toxin in human and rat pancreatic islets and RIN m5F cells. *Journal of Endocrinology*, 172, 137-143.

145. London, J.M., Contractor, H., Lake, S.P. (1990). A fluorometric viability assay for single human and rat islets. *Hormone and Metabolic Research Supplementation*, 25, 82-87.
146. Mascotti, K., Mc Cullough, J., Burger, S.R. (2000). HPC viability measurment: Trypan blue versus acridine orange and propidium iodide. *Transfusion*, 40, 693-696.
147. Bottino, R., Balamurugan, A.N., Bertera, S. (2002). Preservation of human islet cell functional mass by anti-oxidative action of a novel SOP mimic compound. *Diabetes*, 51(2), 561-517.
148. Tennant, J.R. (1964). Evaluation of trypan blue technique for determination of cell viability. *Transplantation*, 2, 685-694,.
149. Janjic, D., Wollheim, C.B. (1992). Islet cell metabolism is reflected by the MTT (tetrazolium) colorimetric assay. *Diabetologia*, 35, 482-485.
150. Morgan, N.G., Diakogiannaki, E., Russell, M.A. (2009). The incubation and monitoring of cell viability in primary rat islets of Langerhans and pancreatic beta-cell lines. *Methods of Molecular Biology*, 560, 53-64.
151. Çalıkoglu, E., Kıralan, M., Bayrak, A. (2006). *Uçucu yağ nedir, nasıl üretilir ve Türkiye'deki durumuna genel bir bakış*, Türkiye 9. Gıda Kongresi; 24-26 Mayıs.
152. Ceylan, A. (1983). *Tıbbi Bitkiler-II*. İzmir, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayını No:481.
153. Baytop, T., Başer, K.H.C.(1995). On essential oils and aromatic waters used as madicine in Istanbul between 17th and 19th centuries-K. H. C. Başer (ed.): *Flavours, Fragrances and Essential Oils*. Proceedings of the 13th INternational Congress of Flavours, Fragrances and Essential Oil, Istanbul, Turkey, 2, 99.
154. Linskens, H.F., Jackson JF. (1997). Modern Methods of Plant Analysis, Vol. 19: *Plant Volatile Analysis*, Springer, Germany.

155. Rangahau, M.K. (2001). Essential oils and their production. Crop and Food Research. *Natural Products of Woody Plants* Vol.2, Germany, Springer.
156. Linskens, H.F., Jackson, J.F. (1997). Modern Methods of Plant Analysis, Vol. 12: *Essential Oils and waxes*, Germany, Springer.
157. Yamani, Y., Khajeh, M., Ghasemi, E., Mirza, M., Javidnia, K. (2007). Comparison Of Essential Oil Compositions Of *Salvia mirzayanii* Obtained By Supercritical Carbondioxide Extraction And Hydrodistillation Methods. *Food Chemistry*, 108, 341-346.
158. Moyler, D.A. (1993). Extraction Of Essential Oils With Carbon Dioxide. *Flavour and Fragrance J.*, 8, 235-247.
159. Ceylan, A. (1983). *Tıbbi Bitkiler-II*. İzmir, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayını No:481.
160. Kocabas, Y.Z., Karaman, S. (2001). Essential oils of Lamiaceae family from South East Mediterranean Region (Turkey), Pakistan. *Journal of Biological Sciences*, 4, 1221-1222.
161. Baydar, H. (2005). Yayla kekiği (*Origanum minutiflorum*)' nde farklı toplama zamanlarının uçucu yağ içeriği ve uçucu yağ bileşenleri üzerine etkisi. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 18(2), 175-178.
162. Andersen, A. (2001). Final report on the safety assessment of sodium p-chloro-m-cresol, p-chloro-m-cresol, chlorothymol, mixed cresols, m-cresol, o-cresol, p-cresol, isopropyl cresols, thymol, o-cymen-5-ol, and carvacrol. *International Journal of Toxicology*. 1, 29-127.
163. <http://memorias.ioc.fiocruz.br/984/474701.html> adresinden alınmıştır.
164. Austgulen, L.T.E., Scheline, R.R. (1987). Metabolism in rats of p-Cymene derivatives: Carvacrol and thymol. *Pharmacology and Toxicology*, 61, 98-102.

165. Ultee, A., Kets, E.P., Smid, E.J. (1999). Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10), 4606-4610.
166. Bhattaram, V.A., Graefe, U., Kohlert, C. (2002). Pharmacokinetics and bioavailability of herbal medicinal products. *Phytomedicine*, 9 (3), 1-33.
167. Cetin, H., Erler, F., Yanikoglu, A. (2007). A comparative evaluation of *Origanum onites* essential oil and its four major components as larvicides against the pine processionary moth, *Thaumetopoea wilkinsoni*. *Pest Management Science*, 63(8), 830-833.
168. Koparal, A.T., Zeytinoglu, M. (2003). Effects of Carvacrol on a Human Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Cell Line, A549. *Cytotechnology*, 43(1-3):149-154.
169. He, L., Mo, H., Hadisusilo, S., Qureshi, A.A., Elson, C.E. (1997). Isoprenoids suppress the growth of murine B16 melanomas in vitro and in vivo. *Journal of Nutrition*, 127, 668-674.
170. Zeytinoglu, H., Incesu, Z., Baser, K.H. (2003). Inhibition of DNA synthesis by carvacrol in mouse myoblast cells bearing a human N-RAS oncogene. *Phytomedicine*, 10(4), 292-299.
171. Lorente, I., Ocete, M.A., Zarzuelo, A. (1989). Bioactivity of the essential oil of *Bupleurum fruticosum*. *Journal of Natural Products*, 52(2), 267-272.
172. Ocaña-Fuentes, A., Arranz-Gutiérrez E. (2010). Supercritical fluid extraction of oregano (*Origanum vulgare*) essentials oils: Anti-inflammatory properties based on cytokine response on THP-1 macrophages. *Food Chemical Toxicology*, 48(6), 1568-1575.
173. Undeğer U, Başaran A, Degen G.H. (2009). Antioxidant activities of major thyme ingredients and lack of (oxidative) DNA damage in V79 Chinese hamster lung fibroblast cells at low levels of carvacrol and thymol. *Food Chemical Toxicology*, 47(8), 2037-2043.

174. Aydin S, Başaran A.A, Başaran N. (2005). The effects of thyme volatiles on the induction of DNA damage by the heterocyclic amine IQ and mitomycin C. *Mutation Research*, 581(1-2), 43-53.
175. Akkol, E.K., Avci, G., Küçükkurt, I., Keleş, H. (2009). Cholesterol-reducer, antioxidant and liver protective effects of *Thymbra spicata* L. var. *spicata*. *Journal of Ethnopharmacology*, 126(2), 314-319.
176. Vosough-Ghanbari, S., Rahimi, R., Kharabaf, S.: Effects of *Satureja khuzestanica* on Serum Glucose, Lipids and Markers of Oxidative Stress in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: A Double-Blind Randomized Controlled Trial. *Oxford Journals Medicine Evidence-based Compl and Alt. Medicine, eCAM Advance Access*, 10.1093/ecam/nen018.
177. Rai, V., Mani, U.V. (1997). Effect of *Ocimum sanctum* Leaf Powder on Blood Lipoproteins, Glycated Proteins and Total Amino Acids in Patients with Non-insulin-dependent Diabetes Mellitus. *Journal of Nutritional & Environmental Medicine*, 7, 113-118.
178. Magyar, J., Szentandrassy, N., Bányász, T. (2004). Effects of terpenoid phenol derivatives on calcium current in canine and human ventricular cardiomyocytes. *European Journal of Pharmacology*, 487(3), 29-36.
179. Aydin, Y., Kutlay, O., Ari, S., Duman, S. (2007). Hypotensive effects of carvacrol on the blood pressure of normotensive rats. *Planta Med.*, 73(13), 1365-1371.
180. Chan, A.S., Pang, H., Yip, E.C. (2005). Carvacrol and eugenol differentially stimulate intracellular Ca^{2+} mobilization and mitogen-activated protein kinases in Jurkat T-cells and monocytic THP-1 cells. *Planta Medica*, 71(7), 634-639.
181. Van Den Broucke, C.O., Lemli, J.A. (1982). Antispasmodic Activity of *Origanum compactum*. *Planta Medica*, 45(7), 188-190.

182. Boskabady, M.H., Jandaghi, P. (2003). Relaxant effects of carvacrol on guinea pig tracheal chains and its possible mechanisms. *Pharmazie*. 58(9), 661-663.
183. Aydin, S., Seker, E. (2005). Effect of an aqueous distillate of *Origanum onites* L. on isolated rat fundus, duodenum and ileum: evidence for the role of oxygenated monoterpenes. *Pharmazie*, 60(2), 147-150.
184. Wagner, H., Wierer, M., Bauer, R. (1986). In vitro Inhibition of Prostaglandin Biosynthesis by Essential Oils and Phenolic Compounds1. *Planta Medica* , 52(3),184-187.
185. Vaddi, H.K., Ho, P.C., Chan, Y.W., Chan, S.Y. (2002). Terpenes in ethanol: haloperidol permeation and partition through human skin and stratum corneum changes. *Journal of Controlled Release*, 81(2), 121-133.
186. Lee, J., Jung, E., Yu, H., Kim, Y., Ha, J. (2008). Mechanisms of carvacrol-induced expression of type I collagen gene. *Journal of Dermatological Sciences*, 52(3), 160-169.
187. Carter, J.D., Dula, S.B., Corbin, K.L., Wu, R. (2009). A Practical Guide to Rodent Islet Isolation and Assessment. *Biological Procedures Online*, 11, 3-31.
188. Ricordi, C. (1991). Quantative and qualitative standarts for islet isolation assesment in humans and large animals. *Pancreas*, 6, 242-244.
189. London, J.M., Contractor, H., Lake, S.P. (1990). A fluorometric viability assay for single human and rat islets. *Horm Metab Res Suppl.*, 25, 82-87.
190. Lowry, O., Rosenbraugh, N., Farr, L., Rondall, R. (1951). Protein measurement with the folin-phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.

191. Esterbauer, H., Cheeseman, K.H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology*, 186, 407-421.
192. Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 186, 464-478.
193. Hyder, A. (2005). Effect of the pancreatic digestion with liberase versus collagenase on the yield, function and viability of neonatal rat pancreatic islets. *Cell Biology International*, 29(9), 831-834.
194. Dellê, H., Saito, M.H., Yoshimoto, P.M., Noronha, I.L. (2007). The use of iodixanol for the purification of rat pancreatic islets. *Transplantation Proceedings*, 39(2), 467-469.
195. Chen, X.B., Li, Y.X., Jiao, Y., Dong, W.P., Li, G., Chen, J., Tan, J.M. (2007). Influence of heme oxygenase-1 gene transfer on the viability and function of rat islets in in vitro culture. *World Journal of Gastroenterology*, 13(7), 1053-1059.
196. Kin, T., Senior, P., O’Gorman, D. (2008). Risk factors for islet loss during culture prior to transplantation. *Transplant International*, 21(11), 1029-1035.
197. Pileggi, A., Molano, R.D., Berney, T., Cattani, P., Vizzardelli, C., Oliver, R. (2001). Heme oxygenase-1 induction in islet cells results in protection from apoptosis and improved in vivo function after transplantation. *Diabetes*, 50(9), 1983-1991.
198. Blinman, T.A., Gukovsky, I., Mouria, M., Zaninovic, V., Livingston, E., Pandol, S.J. (2000). Activation of pancreatic acinar cells on isolation from tissue: cytokine upregulation via p38 MAP kinase. *American Journal of Physiology*, 279(6), 1993-2003.

199. Robertson, R.P., Harmon, J., Tran, P.O., Tanaka, Y., Takahashi, H. (2003). Glucose toxicity in β -cells: type 2 Diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes*, 52(3), 581-587.
200. Hoeldtke, R.D., Bryner, K.D., McNeill, D.R., Warehime, S.S., Van Dyke, K. (2003). Oxidative stress and insulin requirements in patients with recent-onset type 1 diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88(4), 1624-1628.
201. Evans, J.L., Goldfine I.D., Maddux, B.A., Grodsky, G.M. (2003). Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and β -cell dysfunction? *Diabetes*, 52(1), 1-8.
202. Lenzen, S., Drinkgern, J., Tiedge, M. (1996). Low antioxidant enzyme geneexpression in pancreatic islets compared with various mouse tissues. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(3), 463-466.
203. Bertera, S., Crawford, M.L., Alexander, A.M., Papworth, G.D., Watkins, SC. (2003). Gene transfer of manganese superoxide dismutase extends islet graft function in a mouse model of autoimmune diabetes. *Diabetes*, 52(2), 387-393.
204. Chen, H., Li, X., Epstein, P.N. (2005). MnSOD and catalase transgenes demonstrate that protection of islets from oxidative stress does not alter cytokine toxicity. *Diabetes*, 54(5), 1437-1446.
205. Li, X., Chen, H., Epstein, P.N. (2004). Metallothionein protects islets from hypoxia and extends islet graft survival by scavenging most kinds of reactive oxygen species. *Journal of Biological Chemistry*, 279(1), 765-771.
206. Wagner, B.A., Buettner, G.R., Burns, C.P. (1996). Vitamin E slows the rate of free radical-mediated lipid peroxidation in cells. *Arch Biochem Biophys*, 334(2), 261-267.

207. Amoli, M.M., Mousavizadeh, R., Sorouri, R., Rahmani, M., Larijani, B. (2006). Curcumin inhibits in vitro MCP-1 release from mouse pancreatic islets. *Transplantation Proceedings*, 38(9), 3035-3038.
208. Zhu, Q.L., He, A.X., Lu, X.R. (2001). Effects of puerarin on the scavenge of oxygen free radicals and the antagonism against oxidative injury. *Pharmacological Journal of Chin PLA*, 17, 1-4.
209. Beckett, G.J., Arthur, J.R. (2005). Selenium and endocrine systems. *Journal of Endocrinology*, 184(3), 455-465.
210. Jindal, R.M., Taylor, R.P., Morris, P.J., Gray, D.W. (1996). The role of zinc in solutions used for cold preservation of pancreatic islets. *Pancreas*, 12(4), 340-344.
211. Okado-Matsumoto, A., Batinić-Haberle, I., Fridovich, I. (2004). Complementation of SOD-deficient Escherichia coli by manganese porphyrin mimics of superoxide dismutase activity. *Free Radical Biology of Medicine*, 37(3), 401-410.
212. Chizzola, R., Michitsch, H., Franz, C.(2008). Antioxidative properties of Thymus vulgaris leaves: comparison of different extracts and essential oil chemotypes. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 56(16), 6897-904.
213. Goze, I., Alim, A., Cetinus, S.A., Cetin, A. (2010). In Vitro Antimicrobial, Antioxidant, and Antispasmodic Activities and the Composition of the Essential Oil of Origanum acutidens (Hand.-Mazz.) Ietswaart. *Journal of Medicine Food*, 13(3), 705-709.
214. Luna, A., Lábaque, M.C., Zygadlo, J.A. (2010). Effects of thymol and carvacrol feed supplementation on lipid oxidation in broiler meat. *Poultry Science*, 89(2), 366-370.
215. Taira, J., Ikemoto, T., Yoneya, T. (1992). Essential oil phenyl propanoids. Useful as.OH scavengers? *Free Radical Research Community*, 16 (3), 197-204.

216. Clarys, P., Barel, A. (1998). Efficacy of tropical treatment of pigmentation skin disorders with plant hydroquinone glucosides as assessed by quantitative color analysis. *Journal of dermatology*, 25 (6), 412-414.
217. Aeschbach, R., Loliger, J., Scott, B.. Antioxidants actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food Chemistry and Toxicology*, 32 (1), 31-36.
218. Nafisi, S.H., Hajiakhoondi, A., Yektadoost, A. (2004). Thymol and carvacrol binding to DNA: model for drug-DNA interaction. *Biopolymers*, 74(5), 345-351.
219. Stamatii, A., Bonsi, P., Zucco F. (1999). Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-termassays. *Food Chemical Toxicology*, 37(8), 813-823.
220. Ipek, E., Tüylü, B.A., Zeytinoğlu, H. (2003). Effects of carvacrol on sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures. *Cytotechnology*, 43(1-3), 145-148.
221. Vicuña, G.C., Stashenko, E.E., Fuentes, J.L. (2009). Chemical composition of the *Lippia origanoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. *Fitoterapia*, 81(5), 343-349.
222. Horváthová, E., Sramková, M., Lábaj, J. (2006). Study of cytotoxic, genotoxic and DNA-protective effects of selected plant essential oils on human cells cultured in vitro. *Neuro Endocrinology Lett.*, 27 (2), 44-47.
223. Azirak, S., Rencuzoğulları, E. (2008). The in vivo genotoxic effects of carvacrol and thymol in rat bone marrow cells. *Environmental Toxicology*, 23(6), 728-735.

224. Blinman, T.A., Gukovsky, I., Mouria, M., Zaninovic, V., Livingston, E. (2000). Activation of pancreatic acinar cells on isolation from tissue: cytokine upregulation via p38 MAP kinase. *American Journal of Physiology*, 279(6), 1993-2003.
225. Thorn, C.F., Whitehead, A.S. (2002). Differential transcription of the mouse acute phase serum amyloid A genes in response to pro-inflammatory cytokines. *Amyloid*, 9(4), 229-236.
226. Piemonti, L., Leone, B.E., Nano, R., Saccani, A., Monti, P., Maffi, P. (2002). Human pancreatic islets produce and secrete MCP-1/CCL2: relevance in human islet transplantation. *Diabetes*, 51(1), 55-65.
227. Eckhoff, D.E., Smyth, C.A., Eckstein, C., Bilbao, G., Young, C.J., Thompson, J.A. (2003). Suppression of the c-Jun N-terminal kinase pathway by 17beta-estradiol can preserve human islet functional mass from proinflammatory cytokine-induced destruction. *Surgery*, 134(2), 169-179.
228. Bottino, R., Balamurugan, A.N., Tse, H. (2004). Response of human islets to isolation stress and the effect of antioxidant treatment. *Diabetes*, 53(10), 2559-2568.
229. Matsuda, T., Omori, K., Vuong, T., Pascual, M., Valiente, L. (2005). Inhibition of p38 pathway suppresses human islet production of pro-inflammatory cytokines and improves islet graft function. *American Journal of Transplantation*, 5(3), 484-493.
230. Quan, N., Ho, E., La, W., Tsai, Y.H., Bray, T. (2001). Administration of NF-kappaB decoy inhibits pancreatic activation of NF-kappaB and prevents diabetogenesis by alloxan in mice. *FASEB Journal*, 15(9), 1616-1618.

231. Giannoukakis, N., Rudert, W.A., Trucco, M., Robbins, P.D. (2000) Protection of human islets from the effects of interleukin-1beta by adenoviral gene transfer of an Ik B repressor. *Journal of Biological Chemistry*, 275(47), 36509-36513.
232. Hotta, M., Nakata, R., Katsukawa, M. (2010). Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPAR alpha and gamma and suppresses COX-2 expression. *Journal of Lipid Research*, 51(1), 132-139.
233. Robertson, R.P. (2006). Oxidative stress and impaired insulin secretion in type 2 diabetes. *Current Opinion in Pharmacology*, 6(6), 615-619.