

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**STREPTOZOTOCİN (STZ)'İN GENOTOKSİK,
SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK POTANSİYELİ**

Ebru ŞANCI

Tez Danışmanı : N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : 18.05.2018

Bornova-İZMİR

2018

Ebru ŞANCI tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “**Streptozotosin (STZ)’ in Genotoksik, Sitotoksik ve Apoptotik Potansiyeli**” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 18.05.2018 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.




Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU

Raportör Üye : Prof. Dr. Mehmet İbrahim TUĞLU

Üye : Doç. Dr. Savaş İZZETOĞLU

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI**

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Streptozotocin (STZ)’ in Genotoksik, Sitotoksik ve Apoptotik Potansiyeli” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

18 / 05 / 2018

Ebru ŞANCI

STREPTOZOTOCİN (STZ)'İN GENOTOKSİK, SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK POTANSİYELİ

ÖZET

Streptozotosin (STZ), toprakta yaşayan “*Streptomyces acromogenes*” adı verilen bir gram pozitif bakteri tarafından sentezlenen, geniş spektrumlu aktivite gösteren bir antibiyotiktir. STZ 1959 yılında keşfedilmiş olup, 1963’de diabetojenik etkisi ortaya çıkarılmış ve sonrasında yaygın olarak deney hayvanları ve prelinik çalışmalarda diyabet indükleyici ajan olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada STZ akut ve orta vadede beyin korteks, siyatik sinir ve karaciğer dokularında genotoksik ve sitotoksik etkisi aynı zamanda apoptotik potansiyeli incelenmiştir. Toksikite testleri kapsamında hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiş, A549, MCF-7, Hek-293, PC3, U87MG, MPanc-96, HeLa ve CaCo-2 hücre hatlarında IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. STZ’ nin 10, 5, 1 ve 0.5 µg dozları için AMES testi ile genotoksik etkileri belirlenmiştir.

In vivo denemeler kapsamında 40 adet Sprague-Dawley sıçan STZ (n=20) ve kontrol (n=20) olmak üzere 2 gruba ayrılmıştır. STZ grubuna, 50 mg/kg STZ (0.05 M sitrat tamponunda, pH: 4.5) intraperitoneal olarak verilmiştir. Kontrol gruba ise yalnızca salin uygulaması yapılmıştır. Uygulamadan 24 saat, 1, 2 ve 4 hafta sonrasında her gruptan 5 adet sıçan sakrifiye edilmiş ve anestezi altında dokuları çıkarılmıştır. Sıçanlardan alınan karaciğer, beyin ve siyatik sinir dokularında histolojik değerlendirme yapılarak en fazla etkilenen dokunun siyatik sinir olduğu belirlenmiştir. Ayrıca Roche Light Cycler® 480 II sistemi ile her hücre hattında apoptoz ile ilişkili 7 genin ekspresyon profilleri belirlenmiştir.

Bu çalışmada elde edilen veriler ile sıçanlarda STZ uygulamasının akut-orta dönemde sinir sistemi, karaciğer ve beyin korteks üzerindeki etkilerinin ortaya konması planlanmış olup bulgularımıza göre, STZ maruziyetinin diyabet ile oluşan doku hasarını arttırdığı gözlenmiştir. STZ tarafından indüklenen biyokimyasal değişikliklerin ortaya konulmasının hücresel ve fizyolojik anlamda önemli ve gerekli olduğu ortaya konmuştur.

Anahtar sözcükler: Streptozotosin, Apoptoz, Toksikite, Beyin, Karaciğer.

GENOTOXIC, CYTOTOXIC AND APOPTOTIC POTENTIAL OF STREPTOZOTOCIN

ABSTRACT

Streptozotocin (STZ) is an antibiotic with broad spectrum activity, expressed by a gram-positive bacterium called "Streptomyces acromogenes" that lives in the soil. STZ was discovered in 1959 and in 1963 diabetic effect was discovered and then it was used as a diabetes inducing agent in experimental animals and preclinical studies.

In this study, the genotoxic and cytotoxic effects of STZ in the acute and midvalent brain cortex, sciatic nerve and liver tissues were investigated at the same time with apoptotic potential.

Cell culture studies were carried out under toxicity tests and IC₅₀ values were calculated on A549, MCF-7, Hec-293, PC3, U87MG, MPanc-96, HeLa and CaCo-2 cell lines. Genotoxic effects of STZ were determined by AMES test for doses of 10, 5, 1 and 0.5 µg.

40 Sprague-Dawley rats were divided into 2 groups, STZ (n = 20) and control (n = 20). The STZ group was administered intraperitoneally at 50 mg / kg STZ (0.05 M citrate buffer, pH: 4.5). The control group was exposed only saline application. At 24 hours, 1, 2 and 4 weeks after the application, 5 rats from each group were sacrificed and the tissues were removed under anesthesia. Histological evaluation was performed on liver, brain and sciatic nerve tissues from rats and it was determined that the most affected tissue was sciatic nerve. In addition, the Roche Light Cycler® 480 II system identified seven gene expression profiles associated with apoptosis in each cell line.

With the data obtained in this study, it was aimed to reveal the effects of STZ administration in rats on the nervous system, liver and brain cortex in the acute-middle stage.

According to our findings, STZ exposure increases tissue damage caused by diabetes. The introduction of biochemical changes induced by STZ is important and necessary for this reason in the cellular and physiological sense.

Key words: Streptozotocin, Apoptosis, Toxicity, Brain, Liver.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici olan, desteğini esirgemeyen her zaman yanımda olan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVASOĞLU'na, teşekkür ve saygılarımı sunarım.

İş hayatı içerisinde aynı zamanda akademik çalışmalarımı da destekleyen, tez çalışmalarımı gerçekleştirirken ARGEFAR Laboratuvarları'nı ve imkanlarını kullanmama izin veren ve hiç bir zaman desteğini esirgemeyen Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme ve Farmakokinetik Araştırma Uygulama Merkezi müdürü sayın Prof. Dr. Ercüment KARASULU'ya teşekkür ve saygılarımı borç bilirim.

Maddi manevi desteğini esirgemeyen annem ve manevi olarak her zaman yanımda hissettiğim babama, Denemelerim ve tez yazım aşamasında her zaman yardımcı olan arkadaşım Dr. Biyo. Çinel KÖKSAL KARAYILDIRIM'a, yine her konuda yardımcı olan yol gösteren Yük. Biyo. Münevver YEGÜL'e teşekkürü bir borç bilirim.

Ebru ŞANCI

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
1.1. Diyabet Mellitus	1
1.1.1. Tip 1 Diyabet Mellitus.....	3
1.1.2. Tip 2 Diyabet Mellitus	3
1.2. Diyabet İndükleyici Ajanlar	4
1.2.1. Streptozotosin (STZ)	4
1.2.2. Streptozotosin'in Etki Mekanizması.....	6
1.2.3. Amaç.....	9
2. MATERYAL VE METOT	10
2.1. Materyal.....	10
2.1.1.Streptozotosin	10

İÇİNDEKİLER (devamı)

	<u>Sayfa</u>
2.1.2. Analizlerde kullanılan kimyasallar ve kitler	11
2.1.3. Deney hayvanları	12
2.2. Metot	13
2.2.1. <i>In vitro</i> Toksikite testleri	13
2.2.1.1. <i>In vitro</i> sitotoksik etkinin belirlenmesi	13
2.2.1.2. <i>In vitro</i> genotoksik etkinin belirlenmesi- <i>Salmonella</i> / mikrozom (AMES) mutajenite test	17
2.2.2. <i>In vivo</i> toksisite testleri	24
2.2.2.1. Streptozotosin Streptozotosin ile indüklenmiş <i>In vivo</i> diyabet modeli.....	24
2.2.2.2. Dokulardan RNA izolasyonu ve cDNA sentezi prosedürü.....	25
2.2.2.3. İmmünohistokimyasal boyama prosedürleri.....	29
3. BULGULAR.....	31
3.1. <i>In vitro</i> Toksikite Testleri Sonuçları.....	31
3.1.1. Hücre canlılığı ve sitotoksikite testi sonuçları.....	31
3.1.2. <i>Salmonella</i> /Mikrozom (AMES) Testi Sonuçları.....	34
3.2. <i>In vivo</i> Test Sonuçları.....	35
3.2.1. cDNA Analiz Sonuçları	35

İÇİNDEKİLER (devamı)

	<u>Sayfa</u>
3.2.2. Histolojik Değerlendirme Sonuçları	37
3.2.2.1. Siyatik sinir histokimyasal bulgular	37
3.2.2.2. Karaciğer histokimyasal bulgular	41
3.2.2.3. Beyin (Cerebrum) histokimyasal bulgular.....	45
4.TARTIŞMA ve SONUÇ	49
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	48
ÖZGEÇMİŞ	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Streptozotosin formlar	4
2.1. Streptozotosinin kimyasal yapısı	10
2.2. Deney Hayvanlarının Tutulduğu Kafesler	13
3.1 mPANC Hücre Hattı Morfolojik İnceleme.....	32
3.2 HEK-293 Hücre Hattı Morfolojik İnceleme.....	32
3.3 A549 Hücre Hattı Morfolojik İnceleme.....	33
3.4 MCF-7 Hücre Hattı Morfolojik İnceleme.....	33
3.5 Pc3 Hücre Hattı Morfolojik İnceleme	33
3.6 U87 Hücre Hattı Morfolojik İnceleme.....	34
3.7. Siyatik sinir histolojik kesitleri H & E boyama	38
3.8. Siyatik sinir histolojik kesidi TUNEL boyama	40
3.9. Karaciğer histolojik kesidi H & E boya.....	42
3.10. Karaciğer histolojik kesidi. TUNEL boyama	44
3.11. Cerebrum histolojik kesidi H & E boyama	46
3.12. Cerebrum histolojik kesidi. TUNEL boyama	48

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. qPCR genler ve primer dizileri).....	11
2.2. Streptozotosin Maruziyet Dozları.....	16
2.3. Maruziyet Dozuna Bağlı Hücre Canlılığının Hesaplanması.....	16
2.4. Salmonella typhimurium Suşlarının Genotipleri ve Özellikleri	17
2.5. Pozitif Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanması	22
2.6. Deney ve kontrol grupları	24
2.7. PCR Karışımının Hazırlanması	27
2.8. LightCycler® 480 Cihaz Çalışma Protokolü.....	28
2.9. $\Delta\Delta CT$ Değerinin Belirlenmesi	28
3.1. Hücre Çoğalmasının İnhibe Olduğu IC50 Değerleri	31
3.2. Salmonella typhimurium revertant koloni sayıları	34
3.3. S. typhimurium TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537 Mutajenite Denemesinin Sonuçları	35
3.4. Hayvanlardan alınan dokuların gen regülasyon değerleri	36

1. GİRİŞ

1.1. Diyabet Mellitus

Diyabet mellitus bilinen en eski hastalıklardan biri olarak ilk defa 3000 yıl önce Mısır el yazmalarında bildirilmiştir (Ahmed, 2002). Diyabet, dünya genelinde yapılan anket çalışmalarına göre dünya nüfusunun yaklaşık olarak %10'unu etkilemektedir. Gelişmiş ülkelerde kanser ve kalp hastalığından sonra ölüm nedeni olarak üçüncü sırada gelen diyabet, zayıf metabolik kontrol ile alakalı ciddi bir endokrin hastalıktır. Dünya çapında ateroskleroz, böbrek yetmezliği, körlük ve diyabete bağlı katarakt problemlerinden ve kardiyovasküler hastalık riskinin artmasından sorumludur. (Kumar et al., 2015). Diyabet, insülin salgılanma mekanizmasında hasar olduğunda veya vücutta mevcut olan insülinin etkin bir şekilde kullanılmadığında ortaya çıkan kronik metabolik bir hastalıktır. Kanda glukoz seviyesinin artmasıyla oluşur. Bu duruma hiperglisemi denir (Radenković et al., 2016). Diyabette görülen hiperglisemi uzun dönemde fonksiyon bozukluklarına ve özellikle göz, böbrek, sinir, kalp ve kan damarlarında olmak üzere çeşitli organ yetmezliklerine yol açmaktadır. Diyabette karbonhidrat, yağ, protein metabolizmasındaki anormalliklerin temeli hedef dokulardaki insülin etkisinin yetersizliğidir. İnsülin etkisinin yetersizliği, insülin salgısının eksikliğinden veya dokuların insülin hormonuna cevabının azalması ile sonuçlanır. Hiperglisema poliüri (çok idrara çıkma), polidipsi (çok su içme), kilo kaybı, bazen polifaji (çok yemek yeme) ve bulanık görme gibi semptomlara neden olmaktadır. Kronik hiperglisemiye, büyüme geriliği ve bazı enfeksiyonlara karşı hassasiyetin artması gibi durumlar da eşlik etmektedir. Diyabetin akut, hayati önem arz eden sonuçları, hiperglisemi ile beraber seyreden ketoasidoz veya non ketotik hiperozmolar komadır (American Diabetes Association, 2004).

Epidemiyolojik açıdan bakıldığında 2011 yılında yaklaşık 366 milyon insanda diyabet mellitus görüldüğü belirlenmiştir. 2030 yılında bu sayının 552 milyon olacağı ve bu sayının da 439 milyonunun tip 2 diabet olacağı olarak tahmin edilmektedir. Düşük ve orta gelirli ülkelerde, diyabet mellitus görülen hastalarda tip 2 diyabete sahip insanların sayısı %80 daha fazladır. 2011 yılında 4.6 milyon insanda diyabet ölümü yol açmıştır (Olokoba et al., 2012).

Batı ülkelerinde hastalık, nüfusun %7'sini etkilemekte global olarak ise dünya nüfusunun %5-7'lik kısmını etkilediği görülmektedir. Genel olarak tip 2 diyabet 40 yaş üstünde daha yaygın görülmele birlikte obezite, fiziksel aktivitelerin azalması ve kalıtımla ilişkilendirilmektedir. Son verilere göre tip 2 diyabet ergenlik çağındaki gençlerde ve çocuklarda da artış göstermeye başlamıştır. Bazı ülkelerde çocuklarda görülen tip 2 diyabet tip1 diyabetten daha yaygındır (Bastaki, 2005).

Diabet mellitus çeşitli türlerde sınıflandırılabilmele birlikte, 1936 yılında hastalık tip 1 ve tip 2 olarak tanımlanmıştır. Genel olarak tip 1 ve tip 2 diabet olarak 2 ana sınıfa ayrılmaktadır. Tip 1 ve 2 olarak adlandırılan diabet türleri etiyolojik olarak insülin bağımlı (IDDM) ve insülin bağımsız (NIDDM) diabet olarak da isimlendirilmektedir. İnsülin bağımlı diabet “juvenil başlangıçlı diyabet” olarak da adlandırılan kronik, ömür boyu süren bir hastalıktır. Tip 2 olarak belirtilen insülin bağımsız diabet ise daha sık karşılaşılan diabet türü olup “erişkin dönem diabeti” olarak adlandırılabilir (Atkinson et al., 1994; Zimmet et al., 2004).

Hamilelik diyabeti olarak bilinen gestasyonel diyabet ise, ilk defa 1979 yılında Ulusal Diyabet Veri Grubu (National Diabetes Data Group-NDDG) tarafından, ilk olarak gebelikte başlayan veya tanı alan glukoz tolerans bozukluğu olarak tanımlanmıştır. Hamilelik sonrasında da glukoz tolerans bozukluğunun devam etmesi durumunda diyabet mellitus (DM) tanısı konulması gerekmektedir (Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 1997).

Prediyabet, kan glukoz seviyesinin normalden yüksek değerde fakat diyabet teşhisi koyabilmek için yeteri kadar yüksek değerde olmadığı durumda teşhis konulan hastalıktır. Prediyabetik (gizli şeker hastası) kişilerde tip 2 diyabet (erişkin diyabeti), kalp hastalığı ve inme riski artar.

1.1.1. Tip 1 diyabet mellitus

Tip 1 diyabet immün sistem hücrelerinin pankreasta bulunan beta hücrelerine zarar vermesi üzerine vücutta insülin hormonunun salgılanmaması veya az salgılanması sonucu meydana gelen kronik metabolik bir hastalıktır. Sonuç olarak beta hücrelerinde % 80-90 oranında harabiyet görülmektedir. Tip 1 diyabetin tip 1a ve tip 1b olmak üzere 2 türü bulunmaktadır (Bastaki., 2005). Avrupa'da görülen diabet vakalarının %90'ını kapsayan Tip 1a diyabet, pankreatik beta hücrelerinin immunolojik yıkımından dolayı görülen insülin eksikliği olarak belirtilmektedir. Tip 1 diabetin %10'unu kapsayan Tip 1b diabet ise idiopattiktir ve otoimmün bir ispatı bulunmamaktadır (Bastaki, 2005). Beta hücre yıkımıyla otoimmün süreci tanımlayan adacık hücre antikoları, anti glutamik asit dekarboksilat (anti-GAD), insulinoa ile ilişkili antikoların (IA-2) varlığıyla tip 1a diyabet karakterize edilmektedir. Tip 1b diyabet herhangi bir etiyolojik temele dayandırılmamaktadır. Hastaların bazılarında kalıcı insülin eksikliği ve ketoasidoza yatkınlık vardır ancak otoimmüniteye dair kanıt bulunmamaktadır. Tip 1b diyabet Afrika ve Asya kökenli insanlarda daha yaygın olarak görülmektedir (Bastaki, 2005).

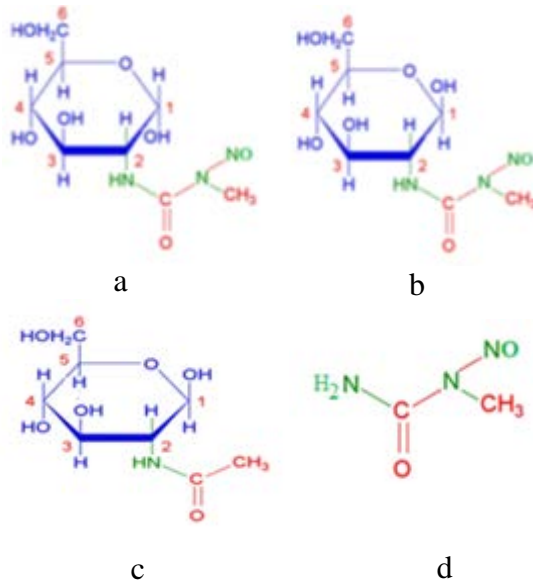
1.1.2. Tip 2 diyabet mellitus

Tip 2 diyabet, diabetin en yaygın görülen formudur. İnsülin hormonunun salgılanmasındaki bozukluklar ve insülin direnciyle karakterize edilmektedir (Bastaki, 2005). Tip 2 diyabetin görülme sıklığı yaşanan coğrafi bölgedeki yaşam şekli, fiziksel hareketsizlik ve çevresel risk faktörlerinin etkisiyle değişiklik gösterir (Olokoba et al., 2012).

1.2. Diyabet İndükleyici Ajanlar

1.2.1. Streptozotosin (STZ)

Streptozotosin (STZ) toprakta yaşayan *Streptomyces acromogenes* adı verilen bir gram pozitif bakteri tarafından sentezlenen, geniş spektrumlu aktivite gösteren bir antibiyotiktir. STZ 1959 yılında keşfedilmiş olup, 1963 yılında Rakieten ve arkadaşları diabetojenik etkisini ortaya çıkarmıştır (Eleazu et al., 2013; Goyal et al., 2016). Bu zamandan itibaren STZ yaygın olarak deney hayvanları ve prelinik çalışmalarda diabet indükleyici ajan olarak kullanılmıştır (Goud et al. 2015). Streptozotosin kimyasal olarak, bir glukoz analogu olan glucosamine-nitrosourea (2-deoxy-2-[3-methyl-3-nitrosoürido]-D-glucopyranose) bileşiğidir. IUPAC sisteminde N-methyl-N-nitrosourea yan zinciri bulunduran 2-deoxy-D-glucose olarak isimlendirilir (Şekil 1b). STZ kromotografik tekniklerle ayrılabilen alfa ve beta olarak 2 anomerik formdan meydana gelir (Şekil 1a). STZ 265.2 g/mol molekül ağırlığına ve $C_8H_{15}N_3O_7$ molekül formülüne sahip kristal toz halinde açık sarı veya kirli beyaz olarak bulunan hidrofilik bir bileşiktir (Eleazu et al., 2013). STZ kısa süreli muhafaza edilecekse 4 °C’da saklanabilir fakat uzun süreli muhafaza etmek için -20 °C’da saklanması gerekmektedir.



Şekil 1.1. Streptozotosin formları a. STZ α Anomeri b. STZ β Anomeri c. N-asetil glukozamin d. Metil Nitrozüre (Eleazu et al., 2013).

Diabet modeli oluşturmak amacıyla, hayvanlar üzerinde diyabet indükleyici ajan olarak kullanılan ve çeşitli kimyasallar arasında en çok tercih edilen madde olan streptozotosin ile uyarılan diabet modellerinde gözlenen yapısal, fonksiyonel ve biyokimyasal değişiklikler, genellikle insanlarda gözlenen diyabete benzerlik gösterir. Bu nedenle STZ ile indüklenmiş diyabet, deney hayvanlarında diyabet ve diyabete bağlı komplikasyonların patogenezini incelemek için klinik açıdan anlamlı bir modeli temsil etmektedir (Goyal et al., 2016).

STZ hayvan modellerinde kalıcı olarak diyabet indükleyici olarak kullanılan doğal diyabetojenik ajandır. STZ, deney hayvanlarına intravenöz veya intraperitoneal olarak çeşitli dozlarda verilerek hem insüline bağımlı (IDDM) hem de insüline bağımlı olmayan tipte (NIDDM) diyabet oluşturulabilir. Pankreatik beta hücrelerine hasar vererek insülin üretimini durdurur. DNA alkilasyonu, NO üretimi, serbest radikal salınımı (ROS ve RNS), O-GlcNAcse inhibisyonu β hücre toksisitesi sebeplerindedir. CH_3 ile DNA metillenmesi, nükleer enzim olan PARP aktivitesi sonucunda NAD ve ATP depolarının tükenmesi ile β hücrenin insülin üretim mekanizmasında bozukluk meydana gelir.

STZ sıçan, fare, maymun, hamster, tavşan ve guine piglerde diyabete sebep olan STZ hücre içerisine alınması ile toksik etkisini gösterir. Nitrozourea bileşikleri genellikle hücrenin içerisine hızlı bir şekilde girişi sağlayan lipofilik yapıda olmasına rağmen, STZ tam aksine hücre içine girişi sınırlayan hegzosun yerine geçmesinden dolayı hidrofilik bir bileşiktir. STZ indüksiyonunun sonuçları olan seçici pankreatik β hücre toksisitesi ve diyabetik durum, STZ'nin kimyasal yapısında bulunan glikoz molekülünün, plazma membranında bulunan düşük afiniteli glukoz taşıyıcı protein (GLUT2) aracılığıyla pankreasın β hücresine girip burada birikmesiyle oluşmaktadır.

Pankreasın β hücrelerinin glukozla olan ilişkisi, diğer hücrelerden daha aktif olmasından dolayı bu hücreler STZ'ye karşı daha duyarlıdır. Bu durumda glukoz taşıyıcıları ifade etmeyen insülin üreten hücrelerin STZ sitotoksitesine karşı dirençli olduğu ve sadece plazma membranında bulunan GLUT 2 proteinin ekspresyonundan sonra bileşiğin toksisitesine karşı savunmasız halde geldiği

gözlem yapılarak doğrulanmış ve ek olarak GLUT 2 taşıyıcılarını eksprese eden diğer hücrelerin de STZ'ye karşı duyarlı olduğu belirtilmiştir. Hepatosit ve renal tübüler hücreler buna örnek olarak verilebilmektedir.. Bu durum STZ uygulanmış deney hayvanlarında böbrek ve karaciğer hasarı olma eğilimini de açıklamaktadır (Eleazu et al., 2013).

1.2.2. Streptozotosin'in etki mekanizması

Streptozotosinin metilnitrosouraya parçasının, özellikle guanin O6 pozisyonunda, DNA metilasyon aktivitesi, STZ indüksiyonu sonucu hücrel enerji depolarının boşalmasına bağlı olarak pankreatik beta hücresinde nekroza yol açarak hücre ölümüne sebep olmaktadır. Streptozotosinin hücre içindeki temel etki yeri nükleer DNA'dır. Hücre içinde streptozotosin de kompozisyona uğramaktadır ve bu sırada oldukça reaktif karbonyum iyonlarının oluşumuna sebebiyet vererek DNA bazlarının alkilasyonuna neden olmaktadır. Bu olayı DNA tamir dönemi izlemektedir. Hasarlı DNA onarımı için gerçekleşen ve nükleer enzim olan polyADP-ribose polymerase (PARP) aktivasyonu sonucu hücrel NAD depoları boşalmakta ve buna bağlı olarak ATP depoları tükenmektedir. Sonuç olarak bu mekanizma hücre ölümüne sebep olmaktadır (Piepper et al., 1999; Bolzan and Bianchi, 2002).

STZ protein metilleyici olmasına rağmen, beta hücre ölümünden en çok sorumlu olan DNA metilasyonudur buna rağmen proteinlerdeki STZ metilasyonu da pankreatik beta hücre toksisitesine katkıda bulunmaktadır. Ek olarak nikotinamid gibi PARP engelleyicileri STZ tarafından gerçekleşen DNA metilasyonunu engellemektedir. Örneğin, deneyde kullanılan sıçanlarda STZ indüksiyonundan önce nikotinamid verilmesi pankreas hücrelerini STZ'nin toksik etkisinden korumakta aynı zamanda diabetik durumun gelişmesini engellemektedir (Stauffacher et al., 1970).

Diğer nitrosouralar gibi STZ'de *in vivo* koşullarda potansiyel Nitrik oksit (NO) donörüdür. Pankreas beta hücrelerini DNA hasarı ile imha etmekte ve STZ enjeksiyonundan 2 saat sonra sıçanların pankreatik β hücrelerinde NO'nin serbest bırakıldığı gözlenmektedir (Szkudelski, 2001). NO oluşumu nitrikoksit sentaz

(NOS) oluşumuna sebep olmamaktadır. NOS inhibitörü STZ varlığında üretilen NO oluşumunu deneysel olarak engellememiştir (Kronche et al., 1995). STZ enjeksiyonundan sonra guanil cyclase (cGMP) aktivitesinin ve cGMP oluşumunun artmasıyla NO salınımı olduğu kanıtlanmıştır.

Pankreatik β hücrelerinde serbest radikal süpürücü enzimlerin az miktarda değişimleri NO radikallerinin sitotoksik etkisine karşı hücreleri daha hassas yapmaktadır. NO indüklü hasarın hücre içi hedefleri henüz tam olarak belirlenememiştir. Fakat veriler STZ metabolizması sırasında üretilen NO'nun beta hücrelerinde fonksiyon bozukluğuna ve ölüme sebebiyet verdiğini göstermiştir. NO radikalleri mitokondriyal enzim olan akonitazı inaktive ederek ATP üretimini ve substrata bağlı oksidasyonu engellemektedir.

İyon kanalları ve mitokondriyal elektron taşıma zincirinin 1. ve 2. kompleksi insülin sekresyonunu bozan iki muhtemel hedefdir. NO ayrıca sıçan ve insan pankreatik beta hücrelerinde 'comet assay' ile değerlendirilebilen nükleer DNA hasarına sebep olmaktadır.

NO etkisi, DNA düzeyinde karmaşıktır ve N-nitrosoamin grubu içermektedir. NO, DNA'ya 2 yolla zarar vermektedir. Bunlar;

1. Nükleik asit nitrasyonu ve pürin, pirimidin bazlarının deaminasyonu

2. Superoksit serbest radikal ile reaksiyona girerek peroksinitrit oluşumuyla indüklenen hasar.

DNA hasarının yanısıra NO, DNA tamir ve replikasyon enzimlerini inaktive edebilmektedir. NO indüklü beta hücrelerinde DNA hasarı sonucu hücre ölümü, apoptozla veya nekrozla olmaktadır (Friederich et al., 2009).

Kimyasal bağlar, farklı atomlar içeren ve aynı yörüngeyi paylaşarak zıt yönde dönen çift elektronlardan oluşmuş yapılardır. Dış yörüngesinde eşleşmemiş elektronu bulunan molekül veya iyonlara "serbest radikal" adı verilmektedir. Fizyolojik veya patolojik reaksiyonlar sırasında oluşabilen serbest radikallerde

eşleşmemiş olan bu elektronlar genelde reaktiftir ve dış yörüngelerindeki elektronu eşleştirebilmek için diğer moleküllerle etkileşip reaksiyona girerek kararlı bir yapı oluşturmaya çalışmaktadır. Organizmada çeşitli reaksiyonlarla oksijen ve nitrojen kaynaklı oluşabilen bu radikallerden oksijen kaynaklı reaktif ürünlerin (ROS) metabolizmaya önemli ölçüde olumsuz etkisi olmaktadır (Cheeseman and Slate, 1993).

Serbest radikal oluşumunda devamlı artış ile oksidatif strese dokuya özgü artış meydana getirmektedir. STZ indüklü diabetik sıçanların erken dönemlerinde serbest radikal üretimi süperoksit radikalleri (O_2), hidroksil radikalleri (OH \cdot), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve peroksinitrat ($ONOO^-$) gibi oksidatif strese sebep olan reaktif oksijen (ROS) ve azot türlerini (RNS) içermektedir. Yapılan çalışmalar STZ indüklü diabette görülen hiperglisemmanın reaktif oksijen türlerinin oluşumunun ve dokudaki oksidatif hasarın artmasıyla ilişkili olduğunu göstermektedir. STZ indüklü diabetik hayvanlarda glukoz otooksidasyonu, protein glikasyonu, ileri glikasyon ürünleri üretimi ve serbest radikal üreten poliol yolu vasıtasıyla oksidatif stres görülmektedir.

Hipoksiantin metabolizması sırasında oluşan hidrojen peroksit dismutasyonundan kaynaklanan süperokist ve hidroksil radikalleri içeren bazı küçük ROS türevleri streptozotosinin etkisini gösterebilirler ve beta hücrelerinin yıkım sürecini hızlandırabilirler. STZ diğer alkilleyci ajanlar gibi, hücreyi DNA hasarına uğratarak hücrede toksik etki göstermektedir. Meydana gelen DNA hasarı ise PARP aktivasyonunu indüklemektedir (Szkudelski, 2001). Üzerinde glikoz molekülü bulundurmasından dolayı, glikoz molekülünün hücrelere taşınmasında etkili olan glikoz taşıyıcı protein (GLUT2) vasıtasıyla hücrelere taşınmakta ve GLUT2 taşıyıcı sistemi aracılığıyla STZ tercihen pankreatik β hücrelerinde toplanmakta, β hücre toksisitesi ile sonuçlanmaktadır (Goyal et al., 2016).

1.3. Amaç

Bu projede STZ akut ve orta vadede beyin korteks, siyatik sinir ve karaciğer dokularında genotoksik ve sitotoksik etki gösterip göstermediğinin aynı zamanda apoptotik potansiyel oluşturun oluşturmadağının incelenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışma sonucunda elde edilecek veriler STZ uygulamasının akut-orta dönemde sinir sistemi ve karaciğer üzerindeki etkilerinin ortaya konmasını sağlayacaktır. Ayrıca STZ ile diyabet oluşumayı hedefleyen biyokimyasal çalışmalar için yol gösterici veriler sağlanmış olacaktır.

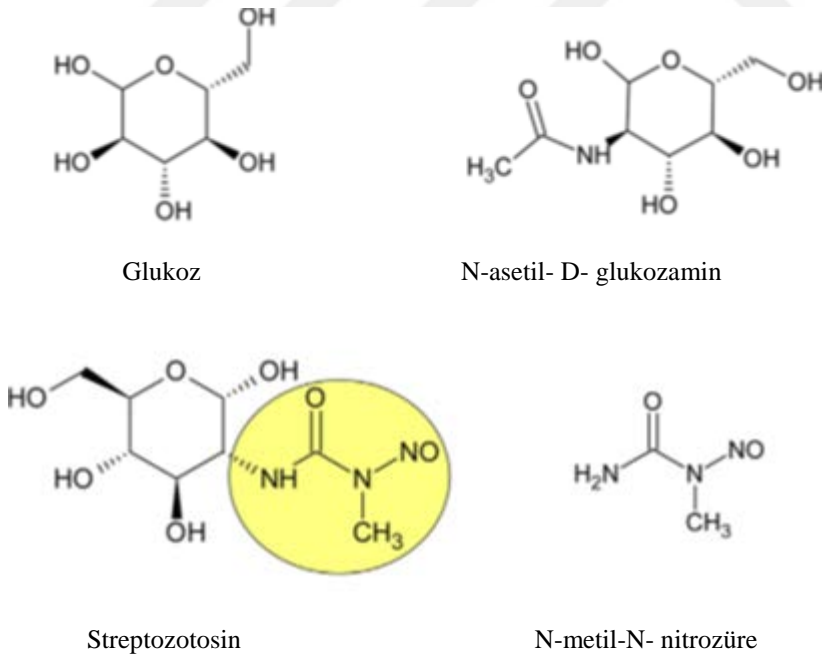


2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Streptozotosin

Streptozotosin (CAS 18883-66-4) Santa Cruz Biyoteknoloji firmasından temin edilmiştir. \geq % 98 saflık derecesinde bir glukoz analogu olan streptozotosin kimyasal olarak glukozamin-nitrozüre(2-deoxy-2-[3-methyl-3-nitrosoürido]-D-glucopyranose) bileşigidir. Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (International Union of Pure and Applied Chemistry veya IUPAC) sisteminde N-methyl-N-nitrosourea yan zinciri bulunduran 2-deoxy-D-glucose olarak isimlendirilmektedir (Şekil 2.1). STZ, 265.2 g/mol moleköl ağırlığına ve $C_8H_{15}N_3O_7$ moleköl formölüne sahip kristal toz halinde açık sarı veya kirli beyaz olarak bulunan hidrofilik bir bileşiktir (Goyal et al., 2016).



Şekil 2.1. Streptozotosinin kimyasal yapısı (Goyal et al., 2016)

2.1.2. Analizlerde kullanılan kimyasallar ve kitler

Streptozotosin olası mutajenik potansiyelini tespit etmek amacıyla RNA izolasyon ve Apoptoz kiti içeriğinde yer alan Tripure Isolation Reagent (1.667.165.001), Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Cat No: 04379012001), LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I kit (Cat No: 03003230001), Sentromer DNA Teknolojileri firmasından qPCR Primer Casp3, Casp8, Casp9, β -actin, Tnf-a, Bcl-2, Bax (Çizelge 2.1), İnsülin glarjin (Lantus, Sanofi Aventis Almanya) ve Giemsa Boya (Cas No: 51811826) Sigma firmasından satın alınmıştır. Histolojik incelemeler sırasında kullanılan tripsin (Chemical Co.St.Loıs, MO) Sigma firmasının'dan, Biotinylated secondary antibody ve streptavidin konjuge horse radish peroxidase (Cas No: 85-9043, San Francisco, CA) Zymed'dan satın alınmıştır.

Çizelge 2.1. qPCR genler ve primer dizileri

Genler	Forward-Reverse	Primer Dizilimi
Casp9	F	5' CTGAGCCAGATGCTGTCCCATA 3'
	R	5' GACACCATCCAAGGTCTCGATGTA 3'
Casp3	F	5' GAGACAGACAGTGGAAGTACGATG 3'
	R	5' GCGCA AAGTACTGGATGA 3'
Casp8	F	5'-AAGCACGGGAGGACATAACC-3'
	R	5'-CCTCTTCTAAAACGTGCTCC-3'
β -actin	F	5'-GTTTGAGACCTTCAACACC-3'
	R	5'-GTGGTGGTGAAGCTGTAG-3'
Bcl-2	F	5'-GGA TGA CTT CTC TCG TCG CTA C-3'
	R	5'-TGA CAT CTC CCT GTT GAC GCT-3'
Bax	F	5'-GGT TGC CCT CTT CTA CTT TGC-3'
	R	5'-TCT TCC AGA TGG TGA GCG AG-3'
TNF- α	F	5'-CAGACCCTCACACTCAGATCATCTT-3'
	R	5'-CAGAGCAATGACTCCAAAGTAGACCT-3'

2.1.3. Deney hayvanları

Bu çalışma, Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme ve Farmakokinetik Araştırma - Uygulama Merkezi (ARGEFAR) Faz Öncesi Araştırmalar Biriminde, Ege Üniversitesi, Hayvan Deneyle Yere Etik Kurulu' nun, 24.02.2012 tarih ve 2012 - 032 no'lu onayı ile gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışma, Ege Üniversitesi, Hayvan Deneyle Yere Etik Kurulu' nun, 24.02.2012 tarih ve 2012 - 032 no'lu onayı ile Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme ve Farmakokinetik Araştırma-Uygulama Merkezi (ARGEFAR) Faz Öncesi Araştırmalar Birimi' nde, gerçekleştirilmiştir

Kobay Deney Hayvanları Labratuvarı A.Ş. (Ankara)' den, seksüel olgunluğa erişmiş 8 - 10 haftalık, ağırlıkları 310 - 420 g arasında değişen $n=40$ adet erkek Sprague Dawley cinsi sıçanlar toksisite çalışmasında kullanılmıştır. Hayvanlar çalışmaya başlamadan 15 gün önce deney ortamına alınarak deneye hazırlanmıştır. Günlük tartımları düzenli olarak alınan sıçanlar kontrol ve deney grupları olarak 5'erli gruplara ayrılmış kafeslere yerleştirilmiştir. Çalışma süresince hayvanlar, Tecniplast firmasından satın alınan, her biri bireysel havalandırmaya sahip ve mikrobiyolojik kontaminasyonu önlemek adına 0,2 mikron por çapında filtreli kafeslerde tutulmuşlardır (Şekil 2.2). Laboratuvar sıcaklığı 20 - 24 °C ve nispi nem % 45 - 65 olarak düzenlenmiş ve günde 3 defa kontrol edilmiştir. 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık periyodu uygulanmıştır. Deney hayvanlarının beslenmeleri için yeteri kadar standart laboratuvar yemi (pellet) ve su kullanılmıştır. Yem ve su günlük olarak değiştirilmiştir.



Şekil 2.2 Deney Hayvanlarının Tutulduğu Kafesler

2.2. Metot

2.2.1. *In vitro* toksisite testleri

2.2.1.1. *In vitro* sitotoksik etkinin belirlenmesi

Hücre Hatları: MCF-7 (İnsan meme adenokarsinom hücre hattı), ATCC HTB-22), A549 (İnsan akciğer karsinom hücre hattı, ATCC-CCL-185), CaCo-2 (İnsan kolon kolektral adenokarsinom hücre hattı, ATCC-HTB-37), HeLa (İnsan servikal kanser hücre hattı, ATCC-CCL-2), PC3 (İnsan prostat karsinom hücre hattı, ATCC-CRL-1435), U87MG (İnsan glioblastoma hücresi, ATCC-HTB-14), MPanc-96 (İnsan pankreas karsinom hücre hattı, CRL-2380) ve HEK (İnsan embriyonik böbrek hücre hattı, ATCC-CRL-1573) sitotoksisite testlerinde kullanılmıştır. Hücre hatları, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü hücre kültür koleksiyonundan temin edilmiş olup

çalışmalar Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Eğitim laboratuvar'ında (AREL) gerçekleştirilmiştir.

Hücre Kültürü: Hücreler, % 10 Fetal sığır serum (FBS,Biological Industries, Cat: 04-121-1), % 1 L-glutamin (Biological Industries, Cat: 41-218-100), % 1 gentamisin (Biological Industries, Cat: 03-035-1C), % 2 NaHCO₃ (% 5,5) (Sigma, CAS Number 144-55-8), Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, Biological Industries, Cat: 30-2003), Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium (F-12K Medium, Biological Industries, Cat: 30-2004), 1 mM HEPES (Biological Industries, Cat: 03-025-1B), 100 U/ml penisilin ve 100 µg/mL streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) Ham's F12 besiyeri ortamı (Biological Industries, Cat: 01-170-1B) içerisinde 37 °C'ye ayarlanmış CO₂'li inkübatörde inkübe edilmiştir. Hücrelerin canlılığının devamı ve çoğaltılması kültür kabını % 80 kapladıktan sonra flasklarda pasajlama yapılarak sağlanmıştır.

Pasajlama ve Hücre Sayımı: Kullanılan uygun besi ortamları içerisinde aktif olarak çoğalan hücreler, Inverted Research Mikroskop (Olympus Ix71, Japan) altında incelenerek, sitotoksiste testi için istenilen hücre sayısına ulaşıp ulaşılmadığı belirlenmiştir. Logaritmik fazda aktif olarak çoğalan hücreler sitotoksiste testlerinde kullanılmıştır.

Hücrelerin hemositometrik sayımı için tüm hücre hatlarının besiyeri ortamı uzaklaştırılmış ve hücre hatlarının flaks içerisindeki çoğalma yüzeyine Tripsin (Biological Industries, Cas:03-051-5C) (75 cm²'lik flask yüzeyi için 1 mL, 25 cm²'lik flask yüzeyi için 0,5 mL) eklenerek, 37 °C'ye ayarlanmış CO₂'li inkübatörde inkübe edilmiştir. Her hücre hattının inkübasyon süresi, tripsin uygulanmış flasklardaki hücrelerin çoğalma yüzeyinden kalkması ve eklene tripsin içerisinde süspanse hale gelmesi ile orantılı olacak şekilde ayarlanmıştır. Hücreler süspanse hale geçtikten sonra her flaska uygun konsantrasyonlarda besi ortamı eklenerek, flask içeriği 15 mL'lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Santrifüj tüpleri, 1000 rpm'de +4 °C'de 5 dakika (Eppendorf, 5810 R, Hamburg, Germany) santrifüjlenmişlerdir. Tüplerdeki üst faz uzaklaştırıldıktan sonra hücre sayımı yapabilmek için % 10'luk bir dilüsyonda 100 µL hücre / 900 µL besi yeri olacak

şekilde 0,2 mL'lik falkon tüplerine aktarma işlemi yapılmıştır. Hemositometrik lama (Neubauer) % 10 dilüsyonda 50 µL'lik hücresel süspansiyon eklenerek mikroskop altında, kullanılan hemositometrik metota uygun olarak mL'de ki hücre sayısı hesaplanmıştır. Sayımı yapılan hücrelerden hazırlanan stok hücre solüsyonları sitotoksitenin belirlenmesi için kullanılmıştır.

Hücre Canlılığı ve Sitotoksite Testi: MTT testi, hücre canlılığını, büyümesini ve hücrelerin aktivasyonunu ölçen hassas, nicel ve güvenilir bir kolorimetrik testtir. Test, yaşayan hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz enzim kapasitesine bağlı suda çözünen sarı renkli MTT substratının, suda çözünmeyen koyu mavi renkli formazan substratına dönüştürülmesi esasına dayanır. Üretilen formazan miktarı direk olarak canlı hücre sayısı ile orantılıdır. MTT testi bölünmeyen ancak hala aktif olan hücrelerin belirlenmesinde oldukça kullanışlı bir yöntemdir (Fatokis, 2006).

1×10^5 hücre/mL konsantrasyondaki hücreler 96 gözlü hücre kültürü kaplarına 100'er µL'lik hacimlerde ekilmiştir (1×10^4 hücre/kuyucuk). Bu hücreler, 24 saat 37 °C'de, % 85 nem ve % 5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilerek 24 saat sonra üzerlerindeki ortamlar uzaklaştırılmış, yerlerine farklı konsantrasyonda hücre kültürü ortamında dilüe edilmiş farklı 50 – 5 – 0,5 µg/mL dozlarda STZ eklenmiştir (Çizelge 2.2). Hücre canlılığı, inkübasyonun 48. saatinde 5 mg/mL konsantrasyonda MTT (30 µL/kuyucuk) (Ambresco, CAS Number: 298-93-1) solüsyonu eklenerek 4 saat 37 °C'de inkübe edildikten sonra formozan kristalleri DMSO (200 mL) ile çözülüp 570 nm'de ölçülmüştür. Çalışmada Thermo Scientific, Multiskan Spectrum' dan (Waltham, USA) yararlanılarak her bir 96 kuyucuklu hücre kültür plakalarında hücre canlılığı belirlenmiştir. Her bir hücre hattı için uygulanan dozda, kontrol ile karşılaştırılarak, hücre canlılığı ve maddelerin IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Hesaplama GraphPad Prism 5 programı kullanılmıştır (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.2 Streptozotosin Maruziyet Dozları

Ana Stok Konsantrasyon	1 mg/mL
Uygulama Dozları	(µg/mL)
I. Doz	50
II. Doz	5
III. Doz	0,5

Çizelge 2.3 Maruziyet Dozuna Bağlı Hücre Canlılığının Hesaplanması

% Canlılık	$\frac{\text{Uygulanan dozdaki ortalama absorbans}}{\text{Kontrol hücre absorbansı}} \times 100$
-------------------	--

Morfolojik İnceleme: Farklı konsantrasyonlarda ekstraktlara maruz bırakılmış hücrelerin 48. saatteki morfolojik incelemeleri Olympus Ix71 Inverted Research mikroskop altında yapılarak, DP71 Camera Instruction aracılığı ile fotoğraflanmıştır.

Veri Analizi: Sitotoksisite, herhangi bir ajana maruz bırakılmamış kontrol \pm SD'e bağlı olarak yüzde artış şeklinde belirlenmiştir. Kontrol değeri % 0 sitotoksik olarak alınmıştır. Sitotoksisite verileri sigmoidal eğriye oturturulmuş ve herhangi bir madde uygulaması yapılmamış kontrol grubuna kıyasla % 50 inhibisyona neden olan madde konsantrasyon değeri olan IC₅₀ değerinin hesaplanmasında 4 parametrelili lojistik model kullanılmıştır. IC₅₀, deneysel koşullar altında hücre büyümesini % 50 azaltan konsantrasyon değeridir. Bu değer en az üç tane birbirinden bağımsız tekrarlanabilir ve istatistiksel olarak anlamlı hesaplamaların ortalamasıdır. IC₅₀ değeri % \pm 95 güven aralığında belirlenmiştir. Bu analiz GraphPad Prism (San Diego, CA) ile yapılmıştır.

2.2.1.2. In vitro genotoksik etkinin belirlenmesi - Salmonella / mikrozom (AMES) mutajenite testi

Bruce Ames tarafından geliştirilmiş olan Ames Testi “*Salmonella*-mikrozom test sistemi” olarak da bilinmektedir. Ames testi mutajen-karsinojen etkisi bilinen kimyasallar ile geçerliliği açıkça kabul edilmiş, Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Organizasyonu (Organisation for Economic Co-operation Development) tarafından standardize edilmiş bir testtir (OECD 471).

Bu test, yapay olarak mutasyona uğratarak histidin sentezleme yeteneğini kaybetmiş (*His*⁻, oksotrofik, His gerektiren) *Salmonelle typhimurium* suşlarının test edilen kimyasal madde ile maruziyetinden sonra ikinci bir mutasyon geçirip yabancıl tip (*His*⁺, prototrofik, His üreten) hale geri dönüşmeleri temeline dayanır.

Çalışmamızda *Salmonella typhimurium*'un TA 98, TA 100, TA 1535 ve TA 1537 suşları kullanılmıştır. Bu bakterilerin genotipleri ve özellikleri Çizelge 2.5'te görülmektedir.

Çizelge 2.4 *Salmonella typhimurium* Suşlarının Genotipleri ve Özellikleri

Suşlar	Histidin Mutasyonu	Mutasyon Tipi	Hedef	Hücre Duvarı	Onarım	pKm101	R-faktör
98	His D3052	Çerçeve kayması	GCGCGCGC GC yanından-1	Rfa	Δ uvr B	+	+
100	His G46	Baz çifti substitisyonu	GGG AT'den GC transisyonu	Rfa	Δ uvr B	+	+
1535	His G46	Baz çifti substitisyonu	GGG AT'den GC transisyonu	Rfa	Δ uvr B	-	+
1537	His C3076	Çerçeve kayması	C-C-C yanına +1	Rfa	Δ uvr B	-	+

His D 3052: His D⁺ geni histidinol dehidrojenaz enzimini kodlamaktadır. his D 3052 mutasyonu (-1) çerçeve kayması tipinde bir mutasyon olup nükleotid eksikliği his D⁻ geni içinde 8 kere tekrarlanan –GCGCGCGC- bölgesindedir. Bu nedenle suş daha çok çerçeve kayması tipi mutasyonlara sebep olan mutajenik/karsinojenik kimyasallarla his⁺ hale dönüştürülmektedir.

His G 46: Bu mutasyon histidin biyosentezinde rol alan ilk enzimi kodlayan gende l6sin kodunu (GAG) yerine prolin kodunu (GGG) gelmesine neden olmaktadır.

His C 3076: +1 7er7eve kayması (near C-C-C run) tipi mutasyonlara sebep olan mutajenik/karsinojenik kimyasallarla his⁺ hale d6n6şt6r6lmektedir.

Rfa: Bu mutasyon h6cre y6zeyini saran lipopolisakkarit 6rt6s6n6 zayıflatarak normal h6crelere giremeyen benzopiren gibi b6y6k molek6llerin test bakterilerine girebilmelerini sağlamaktadır.

Δ: Delesyon, Uvr B geni “excision repair” de g6revi olan bir enzimi kodlamaktadır. Dolayısıyla bu enzimin yokluğu mutant suşu değişik mutajenlere karşı daha hassas yapmaktadır.

+R: pKM101, Ampisilin diren7lilik geni taşıyan, h6crede 7ok sayıda bulunan bir plazmittir. Bu plazmidin h6crede bulunuşu, bu h6crelerde normalde bulunan ve hata frekansı y6ksek olan “error-prone” DNA onarım yolunun aktivasyonuna ve bu nedenle de kimyasalların etkisiyle veya spontan olan mutasyonların artmasına neden olmaktadır.

Test Organizma ve Genotip 6zelliklerinin Kontrol Edilmesi: *Salmonella typhimurium* test bakterilerinin stok k6lt6r i7eriği olarak Xenometrix (İsvi7re) firmasından temin edilmiştir. Testin g6venirliliği a7ısından test suşlarının genetik yapılarındaki mutasyon durumları Maron ve Ames (1983) tarafından geliştiren y6nteme uygun olarak Xenometrix tarafından yapılmış ve sertifikalandırılmıştır.

Bakterilerin spontan geriye d6n6ş sıklığı: 7alışılan bakteri suşlarının his⁻ fenotipinden his⁺ fenotipine spontan olarak (uyarılmadan) d6n6şmesi belirli limitler i7inde olmalıdır. Bu limitler; TA 98 i7in 30-50 revertant / plak, TA 100 i7in 120-200, TA 1535 i7in 10-50 revertant / plak ve TA 1537 i7in 10-50 revertant / plaktır.

Bu test için, büyüme besiyeri (Xenometrix (PMM-GMOO, LOT: K05672P) kullanılarak 37 °C’ de çalkalamalı inkübatörde 12-14 saat süreyle büyütülen bakterilerden 0,1 mL alınarak, 45 °C’ de tutulan histidin-biyotinli (0,05 mM) top agar içine eklenmiştir. Tüp çalkalanmış ve tüp içeriği 37 °C’ de yarım saat tutularak ısıtılmış Minimal Glukoz Agar (MGA) plaklarına ekim yapılmıştır. Plaklar 37 °C’ de inkübasyona tabi tutulmuş ve 48 saat ile 72 saat sonra plaklarda görülen koloniler sayılarak his⁺ revertantların sayısı belirlenmiştir.

Metabolik Aktivasyon Sağlayıcı Sistemin (S9 Karışımı) Hazırlanması:

Tüm bakteriyel testlerde olduğu gibi Ames testinde de eksik unsur memelilerdeki detoksifikasyon/biyoaktivasyon mekanizmasını gerçekleştiren enzim sisteminin bakterilerde olmayışdır. Bu amaçla en yaygın kullanılan enzim preparatı, sıçanların enzim aktivasyonunun kimyasal ile uyarılmış haldeki karaciğer dokularından homojenize edilen ve S9 fraksiyonu olarak isimlendirilen mikrozomal enzim fraksiyonudur. Hücre homojenize edilirken endoplazmik retikulum membranı “mikrozom” denilen kürecikler haline dönüşür. Bu kürecikler biyotransformasyonda görev alan enzimlerin oldukça önemli bir kısmını içerir.

Metabolik aktivasyon gerektiren promotajen/prekanserojen maddelerin bu testle saptanabilmeleri için karaciğer mikrozomları hazırlanarak kimyasalların metabolik aktivasyonları sağlanmaktadır. Mikrozomal enzimlerin miktarını arttırmak için 12 haftalık bir fareye öldürülmesinden önceki 5 gün boyunca, 80 mg/kg olacak şekilde 200 mg/mL konsantrasyonunda Sigma Aldrich (Germany) firmasından alınan Araclor 1254 (CAS 48586), mısır yağında çözülmüş ve oral yoldan verilmiştir.

a. Fareden karaciğerin çıkarılması: Hayvan servikal dislokasyonla öldürülmüştür. Steril bir makas ve bistüri ile karaciğeri aseptik olarak çıkarılmıştır.

b. Karaciğer S9 homojenatının hazırlanması: Çıkarılan karaciğer tartılmış ve 0-4 °C’ de soğutulmuş olan 0,15 M KCl solusyonuna 1 g karaciğer: 1 mL KCl olacak şekilde konmuştur. Sonra bir kaç kez soğuk KCl ile yıkanmış ve

karaciğere, 3 mL 0,15 M KCl / 1 g karaciğer oranı gözetilerek KCl eklenmiştir. Karaciğer daha sonra steril makasla parçalanmış ve doku parçaları homojenize edilmiştir. Homojenat 8700 rpm' de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant kısmı (S9) alınmış ve $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de saklanmıştır. Bu basamaktaki işlemlerin tamamı $0 - 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de yapılmıştır.

c. S9 karışımı: S9 fraksiyonunda bulunan mikrozomal enzimlerin metabolik aktivasyon reaksiyonlarını yürütebilmeleri için gereken kofaktörler S9'a eklenmelidir. Bu nedenle deneye başlamadan önce S9 karışımı hazırlanmıştır.

Tuz Çözeltisi (1,65 M KCl + 0,4 M MgCl₂)

Kullanımı: S9 karışımı

KCl	61,5 g
MgCl ₂ . 6 H ₂ O	40,7 g
Distile su	500 mL

121 °C' de 20 dakika otoklavda steril edilmiştir.

0,2 M Sodyum fosfat tamponu, pH 7,4

Kullanımı: S9 karışımı

0,2 M NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O (13,8 g/500 ml)	60 mL
0,2 M Na ₂ HPO ₄ (14,2 g/500 ml)	440 mL

121 °C' de 20 dakika otoklavda steril edilmiştir.

1 M NADP Çözeltisi

Kullanımı: S9 karışımı

NADP (FW 765,4)	383 mg
Steril distile su	5 mL

0,22 µm delik çaplı filtrelerden geçirilerek steril edilmiştir.

1 M Glukoz 6 fosfat

Kullanımı: S9 karışımı

Glukoz-6-fosfat	2,82 g
Steril distile su	10 mL

0,22 µm delik çaplı filtrelerden geçirilerek steril edilmiştir.

S9 karışımı

Kullanımı: Mutasyon deneyi

S9	2 mL
MgCl ₂ – KCl tuzları	1 mL
1 M Glukoz-6-fosfat	0,25 mL
0,1 M NADP	2 mL
0,2 M fosfat tamponu, pH 7,4	25 mL
Steril distile su	19,75 mL

Bu karışım taze olarak hazırlanmalı, içerikler soğukta tutulmalıdır.

Bakteri Kültürlerinin Hazırlanması: Bakteriler, ayrı ayrı 50 mL’lik steril falkon tüplere 10’ar mL büyüme besiyeri içerecek şekilde konulmuştur. “Negatif kontrol” olarak etiketlenen 50 mL’lik steril falkon tüpüne de 5 mL büyüme besiyeri eklenmiştir. -20 °C’den çıkarılan bakteri tüpleri oda sıcaklığına çözünmeye bırakılmış ve ampisilin çözeltisinden % 0,1 oranında (10 µL) eklenmiştir. -80 °C’de saklanan bakteri kültürleri oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiş ve üzerlerine 200 µL büyüme besiyeri ilave edilmiştir. Yarı katı pellet halindeki bakteriler steril pipet ucu ile mekanik olarak homojen hale getirilip bu karışımların 25 µL’si ampisilinli besiyeri içeren etiketlenmiş falkon tüplere ilave edilmiştir. Falkon tüpler inkübatörde 37 °C’de ve 250 rpm’de 14 - 16 saat çalkalanarak inkübe edildikten sonra bir gecelik kültürlerin OD₆₀₀ değerleri ölçülmüştür. Bakteri kültürlerinin optik yoğunluğunun en az 2,0 ve negatif kontrolün ise ≤ 0,05 olması gerekmektedir.

Pozitif Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanışı: Bakterilere karşı mutajenik etkileri bilinen standart maddeler pozitif olarak her deneyde yapılmalıdır. Test ortamına S9 karışı ilave edilmesi veya edilmemesi durumları için farklı pozitif

kontroller kullanılmıştır. Her suş için kullanılan pozitif kontroller ve miktarları Çizelge 2.5’te verilmiştir.

Çizelge 2.5 Pozitif Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanması

Suşlar	-S9’lu testler için kullanılan kimyasallar	Konsantrasyon	+S9’lu testler için kullanılan kimyasallar	Konsantrasyon
TA 98	2-nitrofluoren (2-NF)	2 µg/mL	2-aminoantrasen (2-AA)	25 µg/mL
TA 100	4-nitroquinolin N-oksit (4-NQO)	0,1 µg/mL	2-aminoantrasen (2-AA)	62,5 µg/mL
TA 1535	N ⁴ -aminositidin (N ⁴ -ACT)	100 µg/mL	2-aminoantrasen (2-AA)	125 µg/mL
TA 1537	9-aminoakridin (9-AA)	15 µg/mL	2-aminoantrasen (2-AA)	125 µg/mL

Mutajenik Aktivitenin Tespiti: Mutasyon deneyi için “Spot Test” kullanılmıştır. Bunun için, içinde 2 mL’lik histidin ve biyotin eklenmiş top agar bulunan ve 45 °C’ lik su banyosunda bulunan tüplere 0,1 mL 12-14 saatlik bakteri kültürü ve 0,5 mL S9 karışımı konmuş ve bu karışım MGA plaklarına dökülerek agarın donması beklenmiştir. Daha sonra plaklara 10, 5, 1, 0,5 µg/petri olarak STZ uygulanmıştır. 37°C’ de 48 saat inkübasyon sonrası his⁺ koloniler sayılmıştır.

Ames testinde kullanılan ortam içerikleri aşağıda verilmiştir.

Kullanılan ortamların içerikleri

Vogel-Bonner Medium E (50x)

Kullanımı: Minimal glukoz agar

Distile su (45 °C)	670 mL
MgSO ₄ .7 H ₂ O	10 g
Sitrik asit monohidrat	100 g
K ₂ HPO ₄	500 g
NaH ₂ NH ₄ (PO ₄ . 4 H ₂ O)	175 g

Maddeler sırasıyla sıcak su içerisine eklenmiştir. Daha sonra hacim 1L’ ye tamamlanmış 121°C’ de 20 dakika otoklavda steril edilmiştir.

0,5 mM Histidin/Biyotin Çözeltisi

Kullanımı: Mutasyon deneyi (100 mL top agara 10 mL)

D-Biyotin (FW 247,3)	30,9 mg
L-Histidin. HCl (FW 191,7)	24,0 mg
Distile su	250 mL

121 °C' de 20 dakika otoklavda steril edilmiştir.

Top agar

Kullanımı: Mutasyon deneyi

Agar	6 g
NaCl	5 g
Distile su	1000 mL

121 °C' de 20 dakika otoklavda steril edilmiştir.

Minimal glukoz agar plakları

Kullanımı: Mutasyon deneyi

Agar	15 g
Distile su	930 mL
50x VB tuzları	20 mL
% 40 Glukoz	50 mL

Agar distile suya eklenerek 121 °C' de 20 dakika otoklavda steril edilmiştir.

Çözelti soğuduktan sonra içine 50x VB tuzları ve % 40 Glukoz eklenmiştir.

Histidin/Biyotin plakları

Kullanımı: Histidin gereksinim deneyi

Agar	15 g
Distile su	914 mL
50xVB tuzları	20 mL
% 40 Glukoz	50 mL
Steril Histidin. HCl. H ₂ O	10 mL
(2 g/400 mL H ₂ O)	
Steril 0,5 mM Biyotin	6 mL

Agar, distile suya eklenerek 121 °C' de 20 dakika otoklavda steril edilmiştir. Çözelti soğuduktan sonra içine 50xVB tuzları, % 40 Glukoz ve histidin eklenmiştir. Çözelti tamamen soğuyunca biyotin eklenmiştir.

2.2.2. *In vivo* toksisite testleri

2.2.2.1. Streptozotosin ile indüklenmiş *in vivo* diyabet modeli

Deney hayvanları, karantina süresinin ardından veteriner hekim tarafından sağlık taramaları gerçekleştirilerek her kafeste 5'er adet sıçan olacak şekilde 8 gruba ayrılmıştır. Hayvanlar çizelge 2.6'da gösterildiği gibi gruplandırılmıştır.

Çizelge 2.6. Deney ve kontrol grupları

Grup	Hayvan sayısı (n)	
	Kontrol	Deney
24 saat	5	5
1 hafta	5	5
2 hafta	5	5
4 hafta	5	5

STZ, deney grubundaki hayvanlara 50 mg/kg doz uygulaması olacak şekilde 0,1 M sitrat tampon içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan STZ, deney grubundaki sıçanlara denemenin 1. gününde intraperitoneal (i.p.) olarak enjekte edilmiştir. Kontrol grubundaki hayvanlara ise 50 mg/kg dozda olacak şekilde i.p. olarak serum fizyolojik uygulaması yapılmıştır. STZ uygulamasından sonra hayvanlara diyabet oluşumunu engellemek amacıyla her gün 3 ünite (100 U/mL) subkutanöz insülin glarjin uygulaması yapılmıştır. Kontrol ve deney gruplarındaki hayvanlar (50 mg/kg ketamin, 10 mg/kg xylazin i.p.) 24 saat, 1 hafta , 2 hafta ve 4 haftalık uygulamalardan sonra sakrifiye edilmiştir. Sakrifiye edilen hayvanlardan hedef organ olarak beyin ve karaciğer, hedef doku olarak ise siyatik sinir alınmıştır. Beyin korteksi, siyatik sinir ve karaciğer lobunun bir kısmı RNA izolasyonu için TriPure Isolation Reagent içeren tüplere aktarılmıştır ve izole edilen RNA' lar, cDNA sentezinde kullanılmak üzere homojenizasyona kadar -80

°C' de muhafaza edilmiştir. Hedef organ ve dokuların diğer kısımları ise TUNEL immünohistokimyasal inceleme için %4' lük paraformaldehitte muamele edilmiştir.

2.2.2.2. Dokulardan RNA izolasyonu ve cDNA sentezi ve RT-PCR prosedürü

Deney ve kontrol grubu hayvanlarından tripüre içerisine alınan dokulardan total RNA izolasyonu yapılmış, ardından cDNA sentezi yapılmıştır. Yapılan RNA izolasyonlarından elde edilecek cDNA' lar GENMAR Teşhis Ürünleri, ARGE Laboratuvar Hizmetleri Sanayi ve Ticaret Limited Şirketi, ARGE laboratuvarında bulunan Roche Light Cycler® 480 II sistemi ile her hücre hattında apoptoz ile ilişkili 7 genin ekspresyon profilleri belirlenmiştir.

Dokudan Total RNA İzolasyonu prosedürü:

1. Steril polipropilen santrifüj tüpüne 1 mL TriPure Isolation Reagent konulmuştur (15-25 °C' de).
2. Tüp içine 50-100 mg doku eklenmiştir.
3. Cam-teflon homojenizatör ile dokular homojenize edilmiştir.
4. Nükleoprotein kompleksinin ayrılması için homojenatlar 15-25 °C' de 5 dk inkübe edilmiştir.
5. Her örneğe 1 mL TriPure reagent' ına 0.2 ml olacak şekilde kloroform eklenmiştir.
6. Tüplerin kapağı kapatılmış ve 15 sn güçlü bir şekilde çalkalanmıştır.
7. Örnekler 15-25 °C' de 15 dk inkübe edilmiştir.
8. Faz ayırımı yapmak için +4°C' de 12000 g' de (1770 rpm) 15 dk santrifüj yapılmıştır.
9. Santrifüj sonrasında 3 faz oluşmuş olup (renksiz üst sulu faz RNA izolasyonu için kullanıldı) ve renksiz üst faz polipropilen santrifüj tüpüne aktarılmıştır.
10. Bu fazdan RNA'nın çöktürülmesi için 1 mL TriPure reagent' ına 0.5 mL olacak şekilde izopropanol eklenmiştir.
11. Tüplerin kapağı kapatılıp birkaç kez ters-yüz edildikten sonra örnekler 5-10 dk 15-25 °C' de inkübasyona kaldırılmıştır.

12. +4°C'de 12000 g'de (1770 rpm) 10 dk santrifüj yapıp ve süpernatant atılmıştır.
13. Tüplere 1 mL TriPure reagent'ına 1 mL olacak şekilde %75 etanol eklenmiştir.
14. Örnekler vortekslenerek etanolde yıkanmıştır.
15. +4°C'de 7500 g'de (1730 rpm) 5 dk santrifüj yapıp ve oluşan süpernatant atılmıştır.
16. Vakum ya da hava akımı yolu ile RNA'dan etanol uzaklaştırılmıştır.
17. RNA pelleti Dietilpirokarbonat (DEPC)-uygulanmış RNaz-free su ile resüspande edilmiştir.
18. RNA bir pipet yardımı ile çözülerek, 55-60 °C'de 10-15 dk inkübe edilmiş olup kullanılmaya kadar -80 °C'de saklanmıştır.

cDNA analizine başlarken -80 °C'de saklanan RNA'ların konsantrasyonları ve saflıklarını belirlemek amacıyla spektrofotometrik yöntemler kullanılmıştır. Bu yöntemlerle RNAların 260 nm ve 280 nm dalga boylarında absorbans değerleri belirlenmiştir.

RNA' dan cDNA Sentezi:

1. cDNA sentezi için kullanılan Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit çalışma öncesinde çözülmüş ve birkaç sn santrifüjlenmiştir.
2. Steril PCR tüplerine Template primer karışımı hazırlanmıştır: 11 µL Total RNA ve 2 µL Random Hexamer primer (600 pmol/µL).
3. Template primer karışımını denatüre etmek için tüpler thermalcycler'a yerleştirilir ve 10 dk 65 °C' de bekletilerek daha sonra hemen buz üzerine alınmıştır.
4. Tüplere final hacim 20 µL olacak şekilde; 4 µL Reaksiyon tamponu, 0.5 µL RNaz inhibitörü, 2 µL Deoksinükleotid karışımı (dNTP) ve 0.5 µl Revers Transkriptaz enzimi eklenmiştir.
5. Karışım dikkatlice karıştırılarak (birkaç sn santrifüjlendi) termal cycler' a bırakılmıştır.
6. Revers transkriptaz reaksiyonu için 25 °C' de 10 dk' yı takiben 50° C' de 60 dk inkübasyon gerçekleştirilmiştir.

7. 85 °C' de 5 dk bekletilerek Revers transkriptaz enzimi inaktive edilmiş ve tüpler soğuk buz üzerine alınarak reaksiyon durdurulmuştur.

8. cDNA içeren tüpler kullanılıncaya kadar -20 °C' de saklanmıştır.

RT-PCR Analizi:

PCR analizine başlamadan önce her bir reaksiyon için PCR karışımı yine 96 reaksiyonluk PCR master mix şeklinde hazırlanmıştır. PCR karışımları ve hedef dokulardan elde edilen cDNA örnekleri plakaya yüklenmiştir (Çizelge 2.7). Böylece hedef gen ekspresyonunun görece miktarı kantitatif olarak belirlenmiştir.

Çizelge 2.7 PCR Karışımının Hazırlanması

Roche LightCycler® 480 SYBR Green I Master kullanımı		
Tek reaksiyon (hacim)	Tek reaksiyon (konsantrason)	Bileşenler
7,2µl	-	Su, PCR-grade (Roche FastStart ile birlikte sağlanmaktadır)
0,4µl	0,4 µM	Forward Primer(F)(ara stok 20 µM)
0,4µl	0,4 µM	Reverse Primer(R)(ara stok 20 µM)
10µl	x	Enzim Karışımı(2x) (Roche)
Toplam		18 µl

Çıkarılan dokulardan elde edilen cDNA' larda LightCycler 480II cihazı kullanılarak RealTime Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi (Çizelge 2.8) ile pro-apoptotik ve anti-apoptotik genlerin ekspresyon profilleri ortaya konacaktır.

Çizelge 2.8 LightCycler® 480 Cihaz Çalışma Protokolü

Program Adı		Döngüler	Analiz Modu
Denaturasyon		1	-
Ampfilikasyon		45	Miktar Ölçümü
Erime Eğrisi		1	-
Soğutma		1	-
Sıcaklık Hedefleri (°C)	Acquisition Modu	Süre (ss:dd:ss)	
Denaturasyon			
95	Yok	00:10:00	
Ampfilikasyon			
95	Yok	00:00:10	
60	Yok	00:00:10	
72	Tek	00:00:15	
Erime Eğrisi			
95	Yok	00:00:10	
60	Yok	00:00:30	
95	Devamlı	00:00:00	
Soğutma			
40	Yok	00:00:30	

Çalışmada elde edilen sonuçlardan relatif kantitasyon yapabilmek için Δ/Δ Ct metodu kullanılmıştır. Relatif kantitasyonda, çalışma grubunun hedef transkriptinin oluşturduğu PCR sinyalinin kontrol grubu ile göreceli olarak karşılaştırılması temelinde bir hesaplama yapılır. Karşılaştırmada kullanılan kantitatif değer, CT değeri, sabit bir eşik değere ulaşan amplifiye edilmiş hedef gen miktarındaki fraksiyonel döngü sayısını ifade eden bir değerdir. CT değerleri, 'Delta CT (Δ CT)' değeri olarak her bir hedef gen için LightCycler tarafından hesaplanmıştır. Elde edilen bu ham Δ CT değerlerinden ise analizdeki her bir hedef dokudaki hedef gen için Delta-Delta CT ($\Delta\Delta$ CT) değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 2.9).

Çizelge 2.9 $\Delta\Delta$ CT Değerinin Belirlenmesi

$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{hedef gen})} - \Delta C_{T(\text{Kont})}$	$\Delta\Delta C_T$: Hedef genin Delta C_T değeri
	$\Delta C_{T(\text{hedef gen})}$: Hedef gen C_T değeri
	$\Delta C_{T(\text{Kont})}$: Kontrol hücre hattındaki normalize edilmiş hedef gen C_T değeri

2.2.2.3. İmmünohistokimyasal boyama prosedürleri

TUNEL boyama yöntemi DNA kırıklarının *in situ* olarak tanınmasını sağlayan bir metottur (Gavrieli et al., 1992). Apoptotik parçalanma sonucu DNA uçları, DNA polimeraz veya Klenow fragmenti kullanılarak işaretlenebilmektedir. Konvansiyonel parafin kesitleri, TdT ve nonizotopik işaretli nükleotidler (sıklıkla biyotinli dUTP) kullanılarak yapılan *in situ* işaretleme ardından floresan veya enzimatik görüntüleme, apoptotik hücreleri diğerlerinden ayırmada yeterli olmaktadır. Bu yöntem yaygın olarak “TdT-dUTP nick-end-labelling” sözcüklerinin kısaltılması olan “TUNEL” yöntemi adıyla anılmaktadır (Elmore, 2007). Tümör dokularında ki apoptozu belirlemek amacıyla “Promega DeadEnd TM Colorimetric Apoptosis Detection System (TUNEL)” (Promega Corp. Madison; Cat No: G7130) sistem kullanılmıştır. TUNEL boyama metodu ile hücrelerde meydana gelen apoptozu belirlemek amacıyla aşağıdaki işlem basamakları gerçekleştirilmiştir.

1. Hayvanlardan alınan beyin, siyatik sinir ve karaciğer TUNEL immünohistokimyasal inceleme için %4' lük paraformaldehitten çıkarılır.
2. Dokular 1 gün önceden deparafinizasyon için Ksilole yerleştirilir.
3. Ardından, % 100 alkol, % 95 alkol, % 80 alkol serilerinden geçirilmiştir. % 1 Triton X-100'lü PBS ile yıkama (pH:7,4) işleminin ardından dokuların etrafı sınırlayıcı kalem ile çizilir.
4. Proteinaz K eklenmiş, (3,9 µL proteinaz K + 35 µL distile su) lamaların üzeri cover slip ile kapatılarak 15 dakika beklenir
5. PBS (Phosphote Buffered Saline) çözeltisi ile yıkama 2 kez 5'er dakika işleminin ardından 5 dakika H₂O₂ ile yıkama (63 mL PBS + 7mL H₂O₂) yapılır.
6. PBS ile yıkama 3 kez 1'er dakika, “equilibration tamponu” 5 dakika muamelenin ardından tampon lamlardan uzaklaştırılır.
7. TdT enzimi eklenir (77 µL Reaksiyon tamponu + 33 µL TdT enzimi).
8. Lamaların üzeri kapatılarak 1 saat 37 °C inkübatöre konulur.
9. 10 dakika Stop/Wash tampon ile yıkama (2 mL stop/wash tamponu + 68 mL distile su) yapılır.

10. 4 kez 2'şer dakika PBS ile yıkama işleminin ardından "Anti-Dioksijenin Peroksidaz" eklenir (Lamların üzeri kapatılmış, 30 dakika nemli oda sıcaklığında bekletilir).

11. 4 kez 2'şer dakika PBS ile yıkama ve hemen ardından DAB eklenir (735 µL DAB Dilution buffer + 15 µL DAB substrat).

12. 3 dakika boyunca distile su ile yıkama işleminin ardından 10 dakika % 0,5 "metil green" eklenmiş ve 3 dakika boyunca distile su ile yıkanır.

13. % 100 *n*-Butanol ile yıkama işleminin ardından % 80 alkol, % 95 alkol, % 100 alkol serilerinden geçirilmiş, Ksilen I, Ksilen II, Ksilen III serileri ile muamele yapılmış ve son olarak entalen ile preparatlar kapatılır (Millipore, Apoptag, Germany).

3. BULGULAR

3.1. *In vitro* Toksikite Testleri Sonuçları

3.1.1. Hücre canlılığı ve sitotoksikite testi sonuçları

Çalışmada streptozotosinin MCF-7 (İnsan meme adenokarsinom hücre hattı, ATCC-HTB-22), A549 (İnsan Akciğer karsinom hücre hattı, ATCC-CCL-185), CaCo-2 (İnsan kolon kolektral adenokarsinom hücre hattı, ATCC-HTB-37), Hek-293 (İnsan embriyonik böbrek hücre hattı, ATCC-CRL-1573), PC3 (İnsan prostat karsinom hücre hattı, ATCC-CRL-7934), U87MG (İnsan glioblastoma hücresi, ATCC-HTB-14), MPanc-96 (İnsan pankreas karsinom hücre hattı, CRL-2380) ve HeLa (İnsan servikal kanser hücre hattı, ATCC-CCL-2) hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi ve IC₅₀ değeri (hücrelerin % 50'sinin çoğalmasını inhibe eden konsantrasyon) belirlenmiştir.

MTT testi sonucunda 72. saatte elde edilen IC₅₀ değerleri Çizelge 3.1'de görülmektedir.

Çizelge 3.1 Hücre Çoğalmasının İnhibe Olduğu IC₅₀ Değerleri

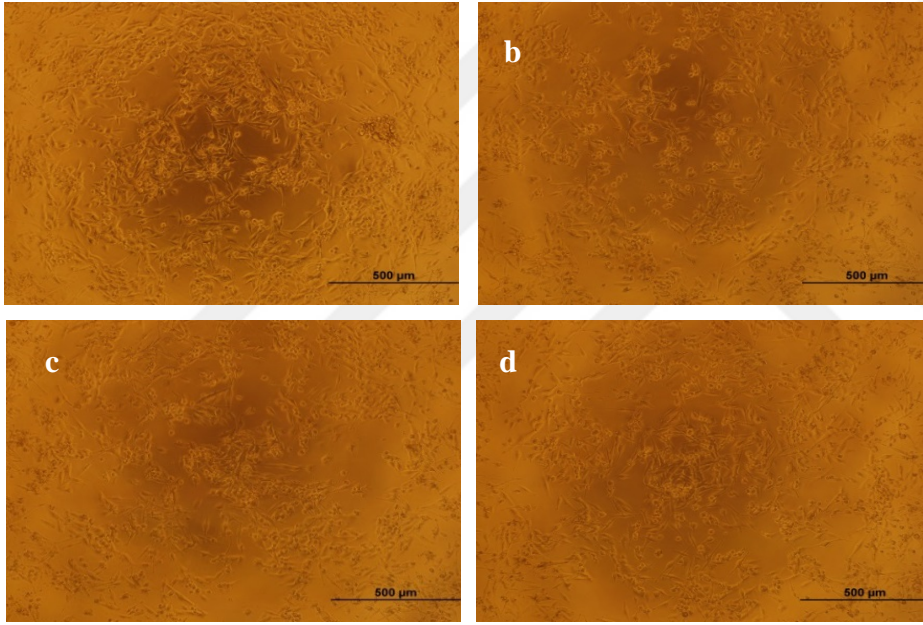
Madde	Hücre Hatları IC ₅₀ Değerleri (µg/mL)							
	MCF-7	A549	He-La	Caco-2	HEK-293	PC3	U87MG	MPanc-96
Streptozotosin	-	-	-	-	-	-	-	77.63

Çalışılan MCF7, Caco-2, A549, U-87- MG, HELA, PC3 ve HEK 293 hücre hatlarında çalışılan konsantrasyonlarda hesaplanabilir bir IC₅₀ değeri oluşturmamıştır. Bu durumda test maddesinin bu hücre hatları üzerinde sitotoksik etki göstermediği belirlenmiştir. Ancak MPAC96 hücre hattı üzerinde en yüksek dozda IC₅₀ değeri oluşturmuş ve bu değer 77,63 µg/mL şeklinde belirlenmiştir.

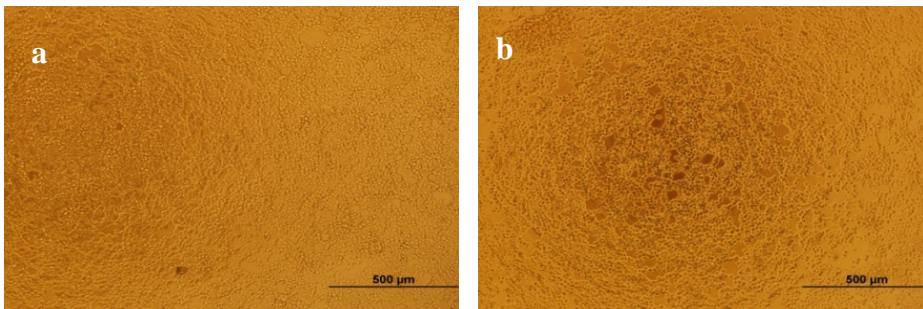
Morfolojik incelemeler, kullanılan hücre hatları hücre kontrol grubu ve test maddesi maruziyet grubu olacak şekilde iki gruba ayrılarak gerçekleştirilmiştir.

Hücresel morfolojinin gözlemlenmesi amacıyla ilk incelemeler, herhangi bir madde maruziyetinin yapılmadığı hücre hatları kontrol grubunda yapılmıştır.

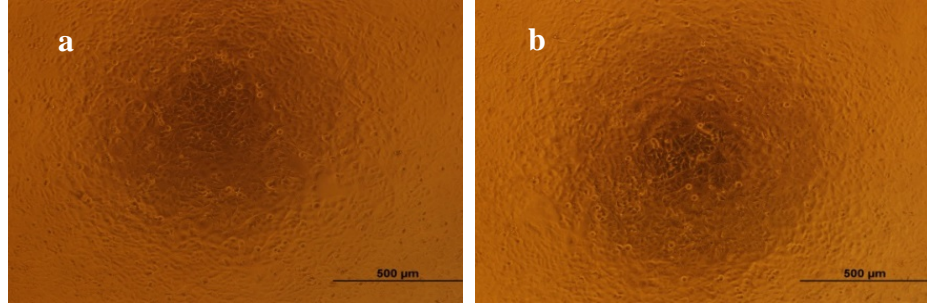
Test maddeleri için çözügen olarak kullanılan DMSO (% 0,05) ikinci grup olarak gözlemlenmiş ve DMSO kontrol (% 0,05) grubu olarak adlandırılmıştır. DMSO kullanılan bu konsantrasyonda hücre hatları üzerinde herhangi bir toksik etkiye sahip değildir. Sitotoksik etkiyi gözlemek amacıyla hücre hatları test maddesinin farklı dozlarına 48 saat maruz bırakılmış ve hücrelerde oluşturdukları morfolojik değişimler inverted mikroskop ile değerlendirilmiştir (Şekil 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6).



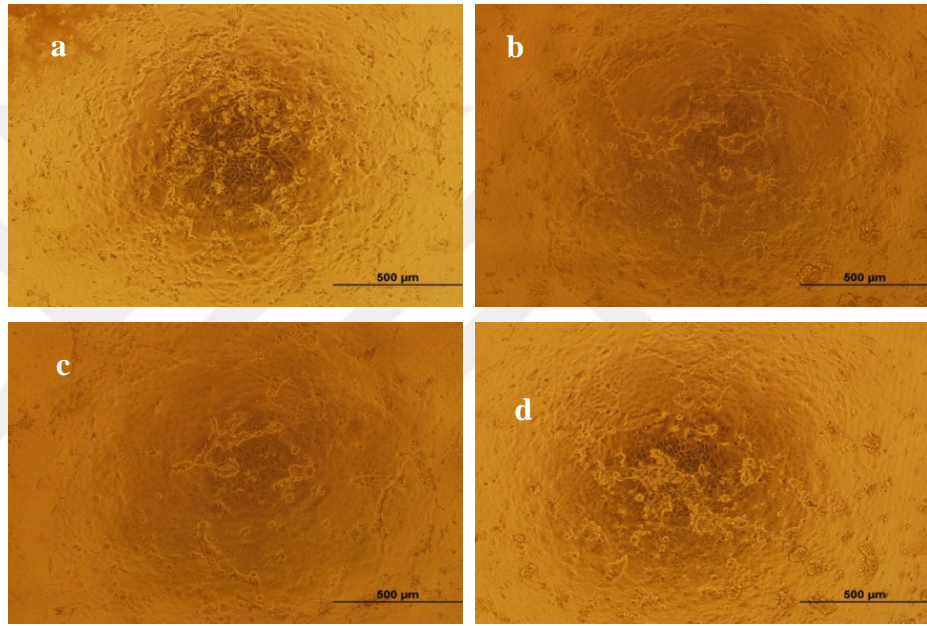
Şekil 3.1 mPANC Hücre Hattı Morfolojik İnceleme a. Hücre kontrol b.0,5 µL STZ c.5 µL STZ d.50 µL STZ.



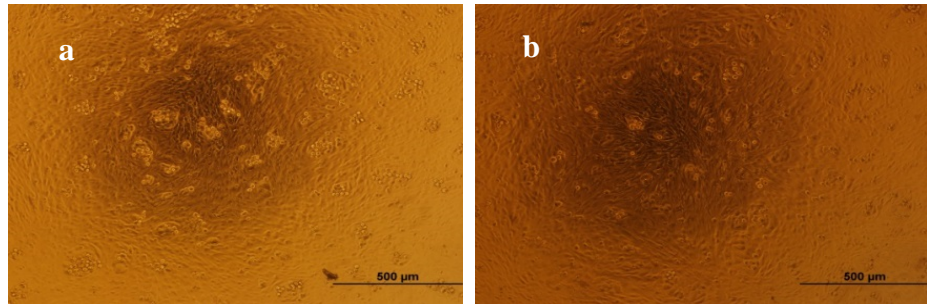
Şekil 3.2 HEK-293 Hücre Hattı Morfolojik İnceleme a. Hücre kontrol b. 50 µL STZ.



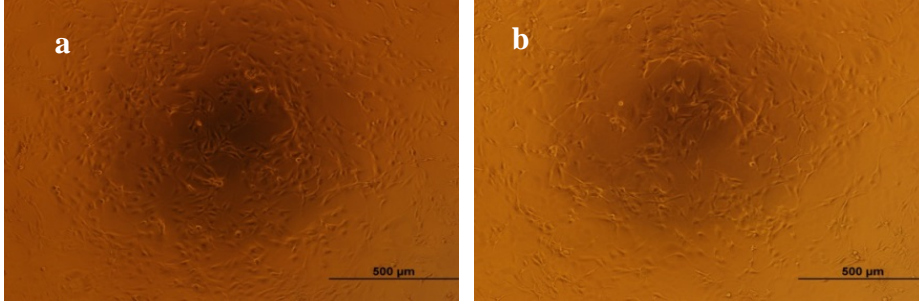
Şekil 3.3 A549 Hücre Hattı Morfolojik İnceleme a. Hücre Kontrol b. 50 µL STZ.



Şekil 3.4 MCF-7 Hücre Hattı Morfolojik İnceleme a. Hücre Kontrol b. 0,5 µL STZ c. 5 µL STZ d. 50 µL STZ.



Şekil 3.5 Pc3 Hücre Hattı Morfolojik İnceleme a. Hücre kontrol b. 50 µL STZ.



Şekil 3.6 U87 Hücre Hattı Morfolojik İnceleme a. Hücre kontrol b. 50 µL STZ.

3.1.2. *Salmonella*/Mikrozom (AMES) testi sonuçları

Salmonella typhimurium TA 98, TA 100, TA 1535 ve TA 1537 strainlerinin genotip kontrolleri Xenometrix (İsviçre) firması tarafından Maron ve Ames (1983) tarafından geliştirilen yönteme uygun olarak tarafından yapılmıştır ve sertifikalandırılmıştır. His⁺ revertantların sayısını belirlemek için Xenometrix firmasından satın alınan büyüme besiyerinde büyütülen bakteriler histidin-biyotinli (0,05 mM) top agar içine eklenmiştir. Daha sonra Minimal Glukoz Agar (MGA) plaklarına ekim yapılmış plaklarda görülen koloniler sayılarak revertant kolonilerin limit değerler içerisine girdiği saptanmıştır. (Çizelge 3.8)

Bu sonuçlara göre TA 98, TA 100, TA 1535 ve TA 1537 strainleri ile yapılan test sonucunda, STZ' nin 10, 5, 1 ve 0.5 µg dozları için elde edilen His⁺ mutantlarının sayısı Çizelge 3.9' de verilmiştir. Bu sonuçlara göre STZ, 1 µg ve üzeri konsantrasyonlarda baz değişim mutasyonlarına sebep olan bir sekonder mutajenik madde olarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.2 *Salmonella typhimurium* revertant koloni sayıları

<i>Salmonella typhimurium</i>	Revertant Koloni Sayıları	
TA 98	30 ± 2,1	18 ± 1,9
TA 100	96 ± 3,5	120 ± 4,2
TA 1535	19 ± 1,8	22 ± 2,1
TA 1537	10 ± 1,4	15 ± 2,0

Çizelge 3.3 *S. typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537 Mutajenite Denemesinin Sonuçları

	TA 98		TA 100		TA 1535		TA 1537	
	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9
0.5 µg/petri (STZ)	7±2,8	4±2,8	2±1,4	38,5±2,1	44,5±2,1	16,5±2,1	11±1,4	15,5±0,7
1 µg/petri (STZ)	11±1,4	28 ±11,3	139±100,4	85 ±7,1	1078 ±874	678±240,4	17,5±10,6	13,5±3,5
5 µg/petri (STZ)	9±2,8	4,5 ±0,7	97±62,2	197±66,5	467 ±60,8	308±11,3	21±1,4	12,5±3,5
10 µg/petri (STZ)	26,5 ±9,2	7±1,4	24,5±7,8	63,5±16,3	423±157,0	590±82	19±1,4	12,5±3,5

3.2. *In vivo* Test Sonuçları

3.2.1. cDNA analiz sonuçları

Deney ve kontrol grubu hayvanlarının tripüre içerisine alınan dokularından total RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA izolasyonu sonrasında cDNA sentezi yapılarak cDNA' lar GENMAR Teşhis Ürünleri, ARGE Laboratuvar Hizmetleri Sanayi ve Ticaret Limited Şirketi, ARGE laboratuvarında bulunan Roche Light Cycler® 480 II sistemi ile her hücre hattında apoptoz ile ilişkili 7 genin ekspresyon profilleri belirlenmiştir. Belirlenen genlerin regülasyonu çizelgede belirtildiği gibidir (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4 Hayvanlardan alınan dokuların gen regülasyon değerleri

24. Saat						
	TNF	Casp9	Casp3	Casp8	Bax	Bcl2
Karaciğer	-3.3	-1.5	+ 3.4	+5.17	-32	-50.5
Beyin	+ 4.2	+3.8	+6	+12.43	-6.25	+6.2
Sinir	-	+8.6	+1.3	+6.36	+32	+14.3

1. Hafta						
	TNF	Casp9	Casp3	Casp8	Bax	Bcl2
Karaciğer	+4.65	1.25	32	-1.14	-1.25	-33.1
Beyin	-	1.6	4	-1.3	-2.32	+17.3
Sinir	-11.1	-8	-10	-1.32	-9	-12.7

2. Hafta						
	TNF	Casp9	Casp3	Casp8	Bax	Bcl2
Karaciğer	+5.65	-9.3	-9.4	+20	-14.01	-2.56
Beyin	-1.4	-7.21	-2.7	-8.8	-11.2	-14.1
Sinir	-	+2.46	-8.4	-7.4	-16.3	-

4. Hafta						
	TNF	Casp9	Casp3	Casp8	Bax	Bcl2
Karaciğer	+2.63	+6.4	+3.1	+3.58	+2.5	+4.82
Beyin	-14	+4.8	-11.1	-9.21	-8.3	+5.0
Sinir	-16	-2.7	-20.17	-7.14	-2.27	-3.01

Uygulanan madde karaciğer dokusunun ekstrintik pathway genlerinde önemli bir down regülasyona neden olmazken, instrintik pathway genlerinde bax/ Bcl2 genlerindeki değişimlere bağlı olarak Casp3 ve Casp9 genlerindeki regülasyon artışları hücrenin apoptoza gitme eğilimini göstermektedir. Beyinde ise karaciğere göre daha fazla etkilenme görülmüştür. Özellikle ekstrintik genlerin ve Casp3 geninin down regülasyonu apoptozun baskılandığını belirtmektedir. Uygulanan maddenin en etkin olduğu organ sinir doku olarak görülmektedir. İlk haftadan itibaren sitotoksik etki göstererek hem ekstrintik hemde instrintik yollarda apoptozun baskılandığı ortaya çıkmıştır.

3.2.2. Histolojik Değerlendirme Sonuçları

3.2.2.1. Siyatik sinir histokimyasal bulgular

Hematoksilen-Eosin Boyama sonuçlarına göre;

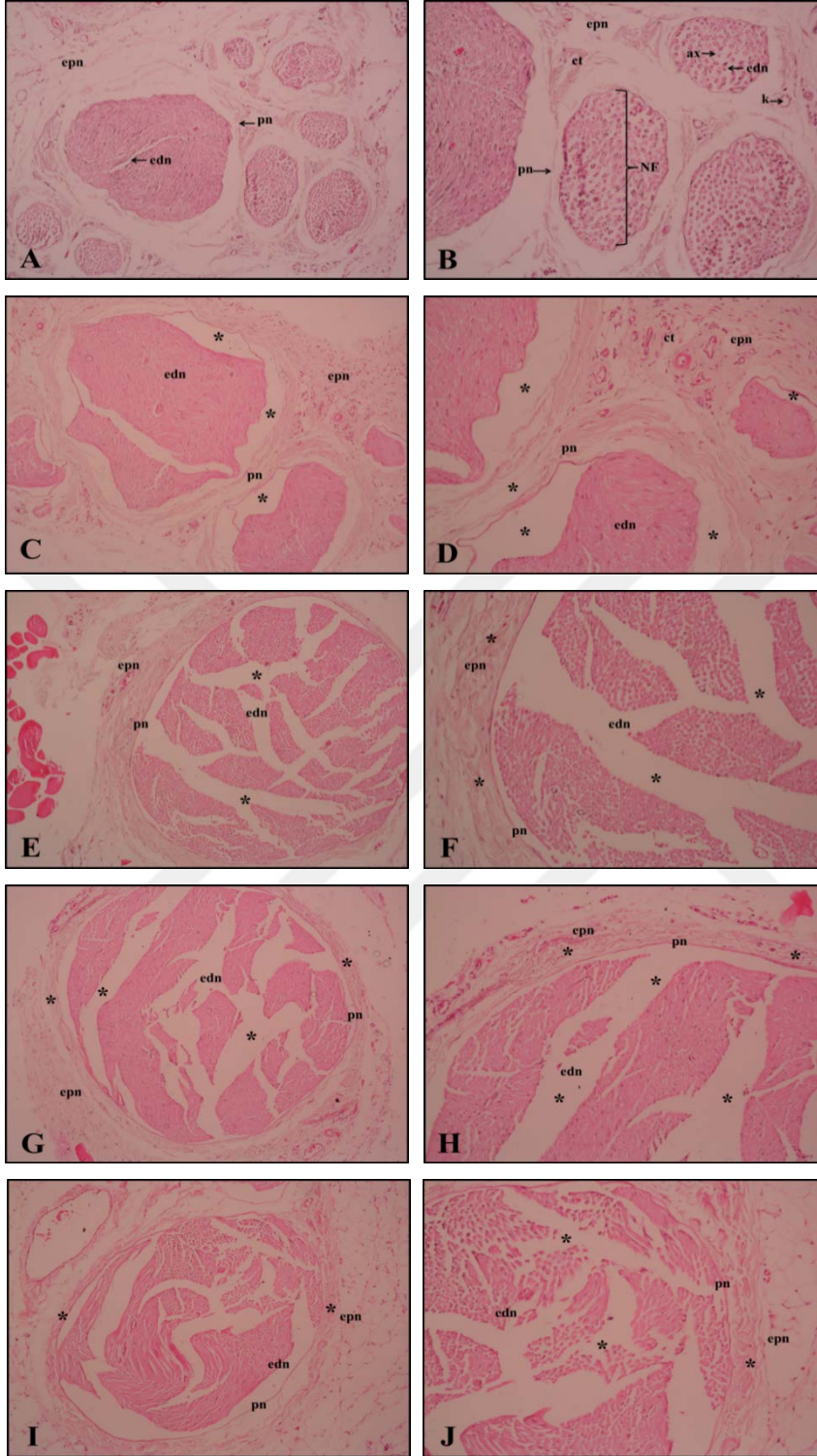
Kontrol grubu: siyatik sinir histolojik kesitleri genel histolojik parametreler açısından değerlendirilmiştir. Buna göre kontrol grubu siyatik sinir kesitleri normal histolojik görünümde izlenmiştir. Epinryum (epn), perinöryum (pn) ve endonöryum (edn) kılıfları normal olarak değerlendirilmiştir. Sinir demetleri (NF) ve sinir lifleri (akson- ax) normal görünümdedir (şekil 3.7).

24.saat grubu: kontrol grubu ile karşılaştırıldığında siyatik sinir kılıflarında histolojik değişiklikler gözlenmiştir. Epinryum'da hafif düzeyde fibrotik kalınlaşma ile perinöryum'da subperinöral alanlarda ayrışmalar izlenmiştir. Endonryum normal görünümdedir (şekil 3.7).

1.hafta grubu: kontrol ve 24 saat grupları ile karşılaştırıldığında histolojik değişikliklerde artış gözlenmiştir. Epinryumda artmış fibrotik kalınlaşma ile perinöral ayrışma ve endonöral ödem değerlendirilmiştir (şekil 3.7).

2.hafta grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hafif derecede epinöral fibrozis ve endonöral ödem izlenmiştir. 1 hafta grubuna göre histolojik değişikliklerde azalma grlmştir (şekil 3.7).

4.hafta grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hafif derecede epinöral fibrozis ve endonöral ödem izlenmiştir. Histolojik değişiklikler 24 saat grubuna yakın derecede değerlendirilmiştir (şekil 3.7).



Şekil 3.7. Siyatik sinir histolojik kesitleri. epn: epinöryum, pn: perinöryum, edn: endonöryum, ct: bağ doku, NF: sinir demeti, k: kapiler damar, ax: akson (sinir lifi). H & E boyama. Kontrol grubu Ax10, Bx20 büyütme. 24. saat grubu *: ayrışma. Cx10, Dx20 büyütme. 1. hafta grubu *: ödem ve fibrozis. Ex10, Fx20 büyütme. 2. hafta grubu Gx10, Hx20 büyütme. 4. hafta grubu *: ödem ve fibrozis. Ix10, Jx20 büyütme.

İmmunohistokimyasal Bulgulara göre;

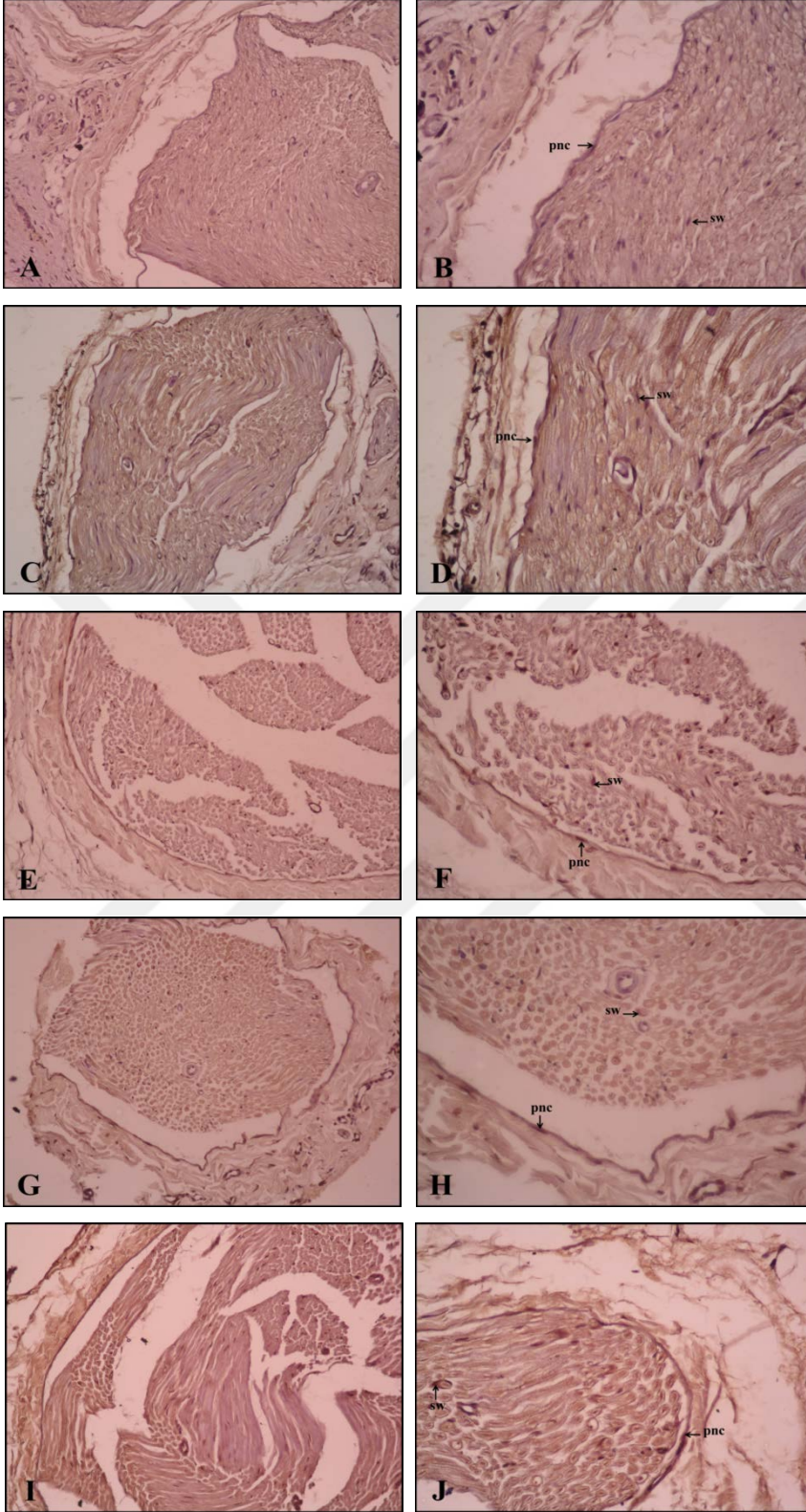
Kontrol grubu siyatik sinir histolojik kesitleri TUNEL immunohistokimyası açısından değerlendirilmiştir. Siyatik sinir histolojik kesitlerinde apoptotik hücrelere rastlanmamıştır (Şekil 3.8).

24.saat grubu kontrol grubu siyatik sinir histolojik kesitleri ile karşılaştırıldığında az sayıda Schwann ve perinöral hücrelerde Tunel ekspresyonu izlenmiştir (Şekil 3.8).

1.hafta grubu siyatik sinirlerin değerlendirmesinde Schwann ve perinöral hücrelerde TUNEL ekspresyonu gözlenmiştir. Kontrol ve 24 saat grupları ile karşılaştırıldığında ekspresyon gösteren hücre sayılarında artış görülmüştür (Şekil 3.8).

2. hafta grubu siyatik sinirlerinde TUNEL ekspresyonu gösteren hücre sayıları kontrol ve 24 saat gruplarına kıyasla daha fazla iken, 1 hafta grubu ile karşılaştırıldığında ekspresyon gösteren hücre sayılarında azalma olduğu görülmüştür (Şekil 3.8).

4. hafta grubu siyatik sinirlerinde TUNEL ekspresyonu gösteren hücre sayıları kontrol ve 24 saat gruplarına göre fazla, 1 hafta grubuna göre az olarak değerlendirilmiştir. Ek olarak 2 hafta grubu ile benzer TUNEL ekspresyonu izlenmiştir (Şekil 3.8).

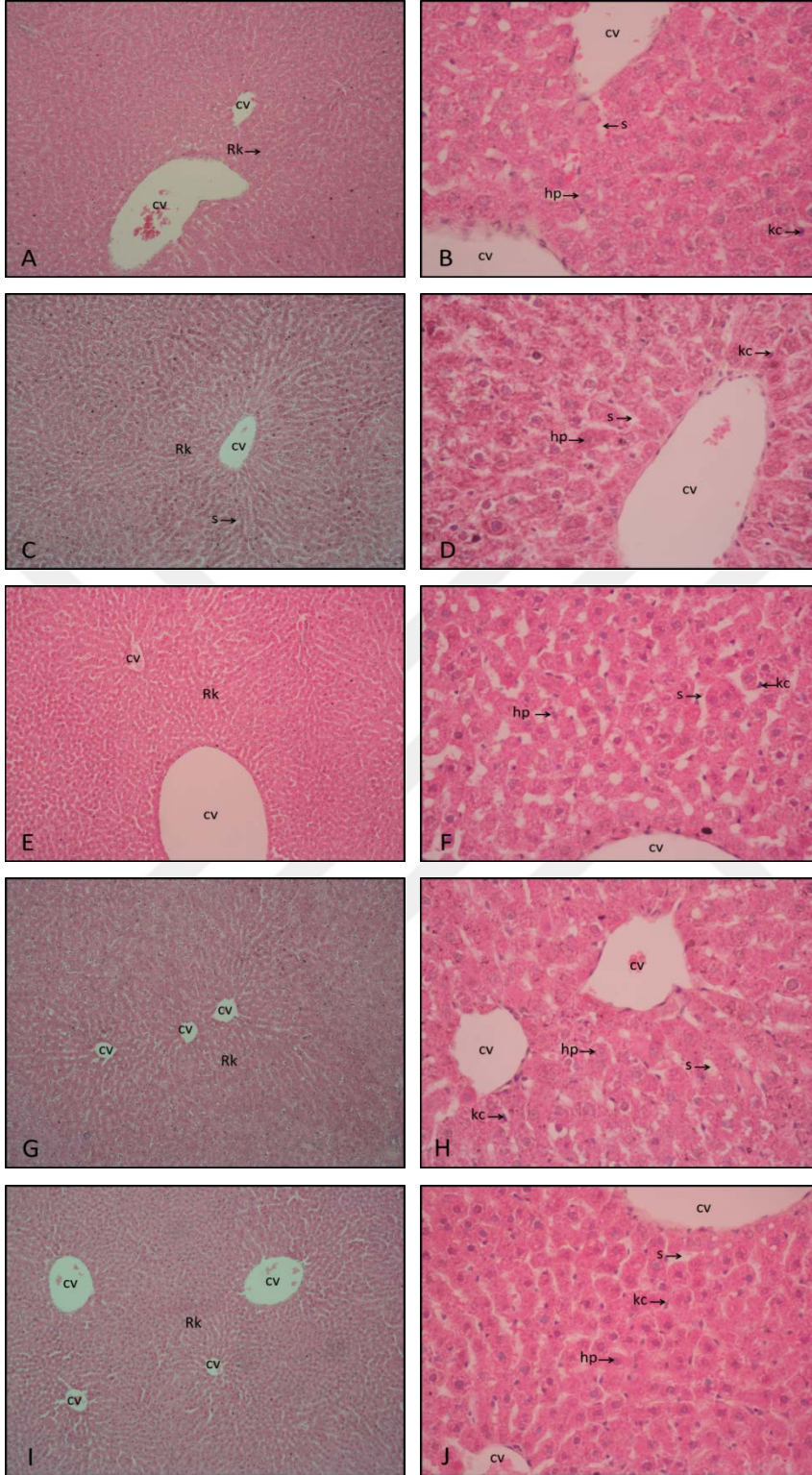


Şekil 3.8. Siyatik sinir histolojik kesidi. pnc: perinöral hücre, sw: Schwann hücresi. TUNEL boyama. Kontrol grubu Ax20, Bx40 büyütme, 24. saat grubu Cx20, Dx40 büyütme, 1. Hafta grubu Ex20, Fx40 büyütme, 2. hafta grubu G x 20, H x 40 büyütme, 4 hafta grubu Ix20, Jx40 büyütme.

3.2.2.2. Karaciğer histokimyasal bulgular

Kontrol grubu karaciğer dokusu histolojik kesitleri genel histolojik parametreler açısından değerlendirilmiştir (Şekil 3.9). Buna göre kontrol grubu karaciğer dokusu kesitleri normal histolojik görünümde izlenmiştir. Sentral ven (cv) ve sinuzoidler (s) normal görünümde. Organın stroması normal yoğunlukta görülmektedir. Organın parankimasını oluşturan Remark kordonları (Rk) ve bunlara bağlı hepatositler (hp) normal histolojik görünümde izlenmiştir.

Diğer deney grupları kontrol grupları ve birbirleri ile karşılaştırıldıklarında karaciğer stroma ve parankimalarında histolojik değişiklikler izlenmemiştir. Hiçbir deney grubunda stromal ödem ve fibrozis görülmemiştir. Aynı şekilde, hiçbir deney grubunda histokimyasal değerlendirmede hepatositlerde dejeneratif değişikliklere rastlanmamıştır (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Karaciğer histolojik kesidi. Rk: Remark kordonu, cv: sentral ven, hp: hepatosit, s: sinuzoid, kc: kupffer hücresi. H & E boyama. Kontrol grubu Ax10, Bx40 büyütme. 24. saat grubu Cx10, Dx40 büyütme, 1. hafta grubu. Ex10, Fx40 büyütme, 2. hafta grubu Gx10, Hx40 büyütme. 4. hafta grubu Ix10, Jx40 büyütme.

İmmunohistokimyasal Bulgulara göre;

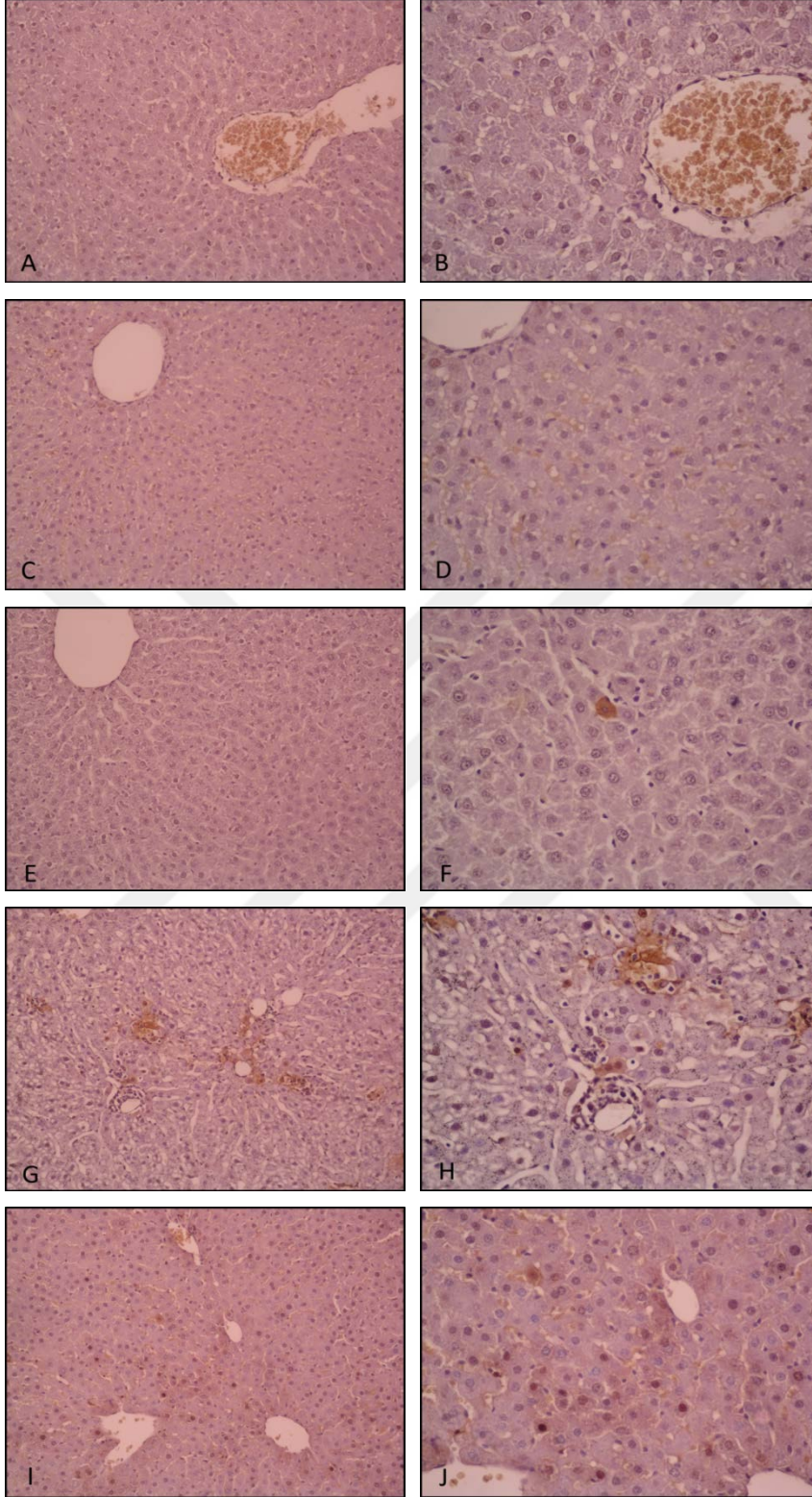
Kontrol grubu karaciğer histolojik kesitleri TUNEL immunohistokimyası açısından değerlendirilmiştir. Karaciğer histolojik kesitlerinde hepatositlerde apoptotik hücrelere rastlanmamıştır (Şekil 3.10).

24.saat grubu kontrol grubu karaciğer histolojik kesitleri ile karşılaştırıldığında hepatositlerde Tunel ekspresyonu izlenmemiştir (Şekil 3. 10).

1.hafta grubu karaciğer değerlendirmesinde çok az sayıda hücrede TUNEL ekspresyonu gözlenmiştir. Kontrol ve 24 saat grupları ile karşılaştırıldığında ekspresyon gösteren hücre sayılarında artış görülmüştür (Şekil 3.10).

2. hafta grubu karaciğer TUNEL ekspresyonu gösteren hücre sayıları kontrol, 24 saat ve 1 hafta grupları ile karşılaştırıldığında ekspresyon gösteren hücre sayılarında artış olduğu görülmüştür (Şekil 3.10).

4.hafta grubu karaciğer TUNEL ekspresyonu gösteren hücre sayıları kontrol, 24 saat, 1 hafta ve 2 hafta gruplarına göre oldukça artmış olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.10).

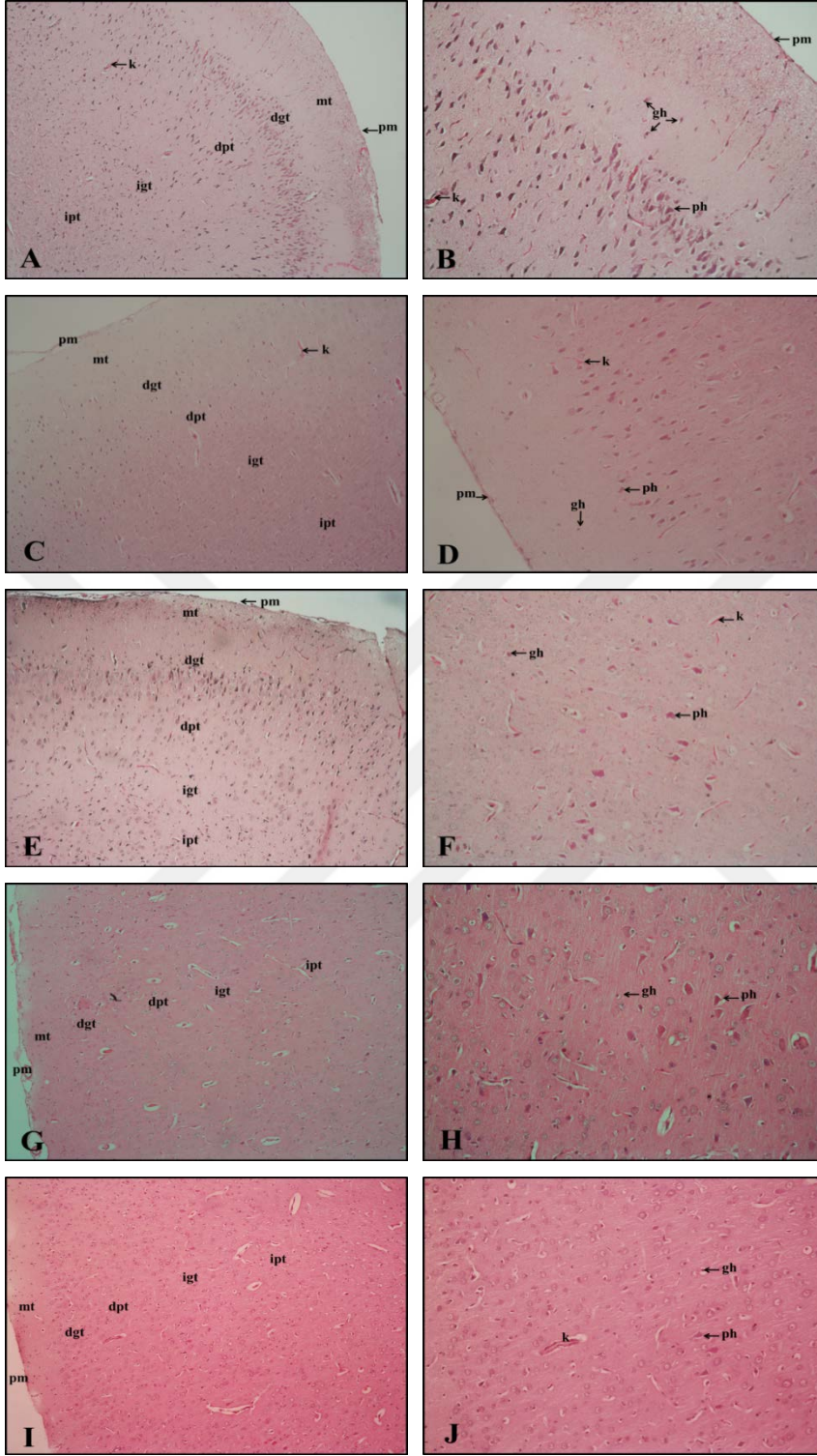


Şekil 3.10. Karaciğer histolojik kesidi. TUNEL boyama. Kontrol grubu Ax20, Bx40 büyütme. 24. saat grubu. Cx20, Dx40 büyütme. 1. hafta grubu Ex20, Fx40 büyütme. 2. hafta grubu Gx20, Hx40 büyütme. 4. hafta grubu Ix20, Jx40 büyütme.

3.2.2.3. Beyin (Cerebrum) histokimyasal bulgular

Kontrol grubu cerebrum dokusu histolojik kesitleri genel histolojik parametreler açısından değerlendirilmiştir. Buna göre kontrol grubu cerebrum dokusu kesitleri normal histolojik görünümde izlenmiştir (Şekil 3.11). Cerebrum dokusu iç zarı Pia mater ile örtülü Korteks tabakaları olan moleküler tabaka'dan itibaren dış granüler tabaka, dış piramidal tabaka, iç granüler tabaka, iç piramidal tabaka ve multiform tabaka ile Medulla'da bulunan nöron ve nöroglialar ile kapillar damarlar normal histolojik görünümde dir.

Diğer deney grupları cerebrum dokuları histokimyasal olarak değerlendirilmiş, cerebrum korteks ve medullasında histolojik değişiklikler gözlenmemiştir. Kontrol grubu ile diğer deney grupları karşılaştırıldığında da histolojik olarak herhangi bir değişiklik değerlendirilmemiştir (Şekil 3.11).

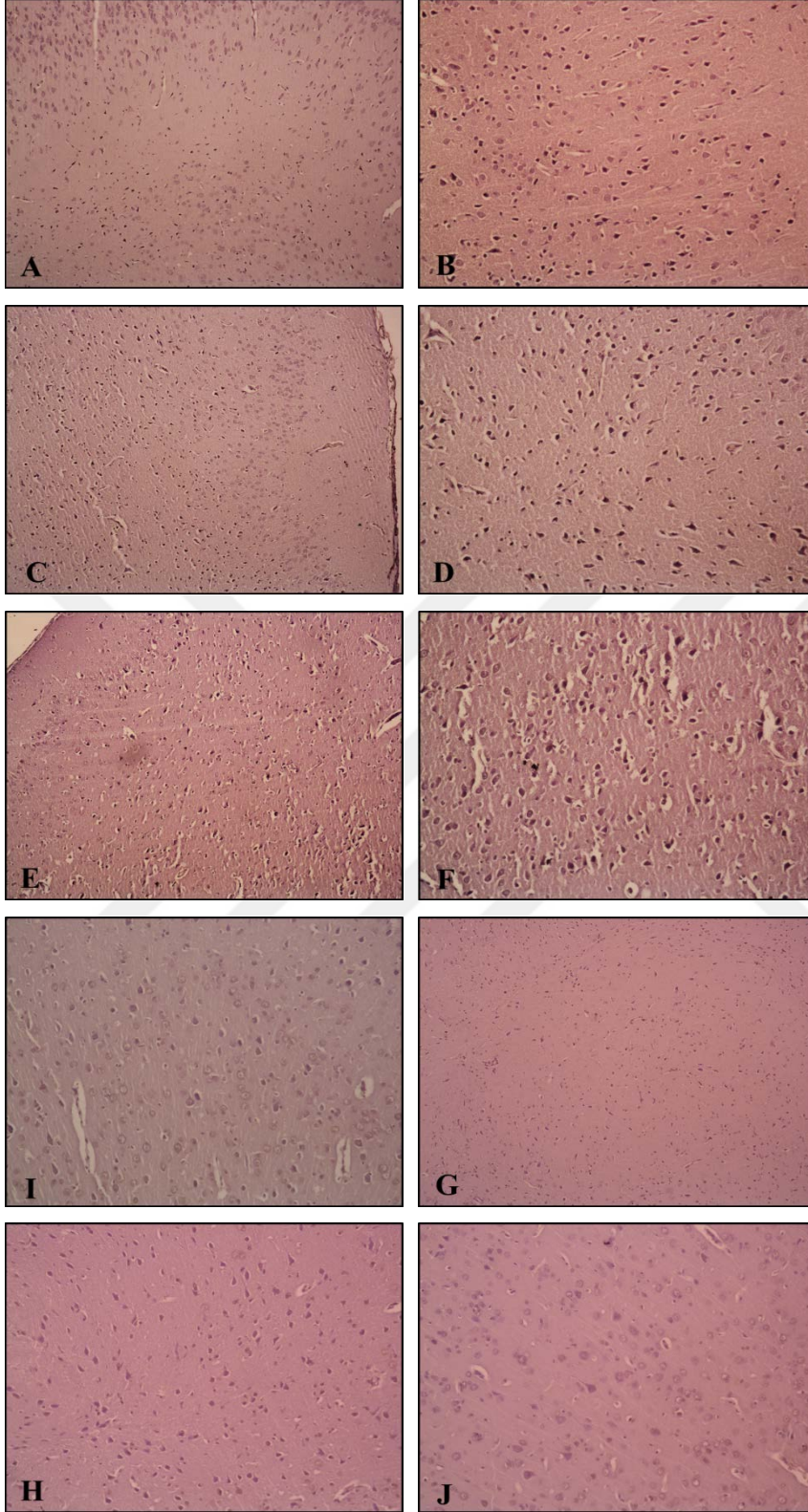


Şekil 3.11. Cerebrum histolojik kesidi. pm: Pia mater, mt: moleküler tabaka, dgt: dış granüler tabaka, dpt: dış piramidal tabaka, igt: iç granüler tabaka, ipt: iç piramidal tabaka, k: kapiller damar, gh: granüler hücre, ph: piramidal hücre. H & E boyama. Kontrol grubu Ax10, Bx20 büyütme. 24 saat grubu Cx10, Dx20 büyütme. 1 hafta grubu Ex10, Fx20 büyütme. 2 hafta grubu Gx10, Hx20 büyütme. 4 hafta grubu Ix10, Jx20 büyütme.

İmmunohistokimyasal Bulgulara göre;

Kontrol grubu cerebrum histolojik kesitleri TUNEL immunohistokimyası açısından değerlendirilmiştir. Cerebrum histolojik kesitlerinde apoptotik hücelere rastlanmamıştır. Deney gruplarının cerebrum kesitleri de TUNEL ekspresyonu açısından değerlendirilmiş ve kontrol grubunda olduğu gibi TUNEL ekspresyonu gösteren granüler veya piramidal hücelere rastlanmamıştır (Şekil 3.12).





Şekil 3.12. Cerebrum histolojik kesidi. TUNEL boyama. Kontrol grubu Ax10, Bx20 büyütme. 24 saat grubu Cx10, Dx20 büyütme. 1 hafta grubu Ex10, Fx20 büyütme. 2 hafta grubu Gx10, Hx20 büyütme. 4 hafta grubu Ix20, Jx20 büyütme.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Deney ve kontrol grubu olarak ayırdığımız çalışmamızda, diyabet modeli oluşturulmuş rodentlerde STZ uygulamasının beyin korteks, siyatik sinir ve karaciğer üzerine toksik etkileri ortaya konmuştur.

Tüm deney grupları cerebrum dokuları histokimyasal olarak değerlendirilmiş olup, kontrol grubu ile diğer deney grupları karşılaştırıldığında da histolojik olarak herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Kontrol grubu cerebrum histolojik kesitlerinde apoptotik hücelere rastlanmamıştır. Deney gruplarının cerebrum kesitleri TUNEL boyama yapılarak değerlendirilmiş ve kontrol grubunda olduğu gibi ekspresyonu gösteren granüler veya piramidal hücelere rastlanmamıştır.

Hasta sıçanlardaki siyatik sinir histolojik kesitleri ile kontrol grubundaki sıçanların genel histolojik parametreleri değerlendirildiğinde, kontrol grubu siyatik sinir kesitleri normal histolojik görünümde izlenmiştir. Ancak 24. saat deney grubu fareler, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında siyatik sinir kılıflarında histolojik değişiklikler gözlemlenmiş olup epinöryum'da hafif düzeyde fibrotik kalınlaşma ile perinöryum'da subperinöral alanlarda ayrışmalar izlenmiştir. 1.hafta deney grubu ve kontrol grubu ile 24. saat deney ve kontrol grupları karşılaştırıldığında ise histolojik değişikliklerde 1. hafta grubunda artış gözlenmiştir. 2. hafta deney grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hafif derecede epinöral fibrozis ve endonöral ödem izlenmiş ve 1. hafta grubuna göre histolojik değişikliklerde azalma görülmüştür. 4. hafta deney grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise hafif derecede epinöral fibrozis ve endonöral ödem izlenmiştir.

Kontrol grubu siyatik sinir histolojik kesitlerinde apoptotik hücelere rastlanmamış olup 24.saat deney grubu ile kontrol grubu siyatik sinir histolojik kesitleri karşılaştırıldığında az sayıda Schwann ve perinöral hücelerde Tunel ekspresyonu izlenmiştir. 1. hafta deney grubu ve kontrol grubu, 24 saat grupları ile karşılaştırıldığında 1. hafta deney grubunda ekspresyon gösteren hücre sayılarında artış görülmüştür. 2. hafta deney grubundan alınan siyatik sinirlerinde

TUNEL ekspresyonu gösteren hücre sayıları kontrol grubu ve 24 saat gruplarına kıyasla daha fazla iken, 1 hafta grubu ile karşılaştırıldığında ekspresyon gösteren hücre sayılarında azalma olduğu görülmüştür. 4. hafta grubu siyatik sinirlerinde TUNEL ekspresyonu gösteren hücre sayıları kontrol ve 24 saat gruplarına göre fazla, 1 hafta deney ve kontrol gruplarına göre az olarak değerlendirilmiş olup 2. haftadan sonra ekspresyonda değişiklik olmamıştır.

Sonuç olarak, yaptığımız çalışmamız sonucunda elde edilen veriler öncelikle akut STZ hasarını ortaya koymuş olup, en fazla etkinin gözlemlendiği doku siyatik sinir olarak belirlenmiştir.

Çalışmamız sonucunda STZ' nin sadece pankreatik β hücrelerine selektif bir toksisite göstermediği, diğer doku ve organlar için de çok toksik olduğu ortaya konmuştur. Kimyasal özellikleri sebebiyle birçok doku ve organa nüfuz edebilen STZ' nin diyabet modeli oluşturmada ne kadar avantajlı bir model olduğu bu nedenle tartışmalıdır. Özellikle çalışılacak dokudaki hasarın STZ kaynaklı mı yoksa kronik diyabet kaynaklı mı olduğu sorgulanmalıdır. STZ sonrası dokudaki biyokimyasal değişiklik diyabetle oluşan doku hasarının net bir şekilde ortaya konmasını etkileyebilir.

Sonuç olarak bu çalışma ile STZ' nin siyatik sinir, karaciğer ve beyin üzerindeki etkileri ortaya konmuş ve 24.saat ile 1.hafta ortaya çıkan STZ hasarın 2.haftadan sonra ortadan kalktığı belirlenmiştir. Bu nedenle STZ ile diyabet modeli oluşturacak araştırmacıların STZ uygulamasından özellikle 4. haftadan sonra denemelerine başlamasının uygun olacağı sonucuna varılmıştır.

Yüksek morbidite ve mortaliteye sahip olan diyabet hastalığını ve patogenezi araştırmak için yapılan çalışmalarda hayvan modelleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Hayvanlar üzerinde diyabet indükleyici ajanlar arasında en çok kullanılan kimyasallardan olan streptozotolin, hayvan modellerinde kalıcı olarak diyabeti indükler. Model hayvanlar üzerinde uyarılmış diyabetlerde gözlenen yapısal, fonksiyonel ve biyokimyasal değişiklikler, genellikle insanlarda gözlenen diyabete benzerlik gösterir. Bu nedenle deney hayvanlarında STZ ile indüklenmiş diyabet modeli, insanlardaki diyabet ve diyabete bağlı komplikasyonların

patogenezini incelemek için klinik açıdan anlamlı bir modeli temsil etmektedir (Goyal et al., 2016).

Pankreas-insülin ilişkisinin ortaya konması ile yapılan hiperglisemi çalışmalarında kullanılan cerrahi dışı yöntemler, pankreasın harap edilmesi ve beta hücre spesifik toksinlerin kullanılmasıyla yapılmaktadır. Kimyasal ajanların kullanımı ile oluşan deneysel diyabet modellerinde alloxan, STZ, çinko şelatörleri (8-hidroksikinolin, dithizone), rodentisid-Vacor, diyet nitrozaminleri gibi diyabetojenik etkisi bulunan toksinler denenmiştir (Rees and Alcolado, 2005).

Günümüzde diyabet oluşturmada en çok tercih edilen nitrozoüre sınıfındaki ajanlardan STZ, pankreastaki β hücreleri üzerinde tahribat yapma özelliğinden dolayı deney hayvanlarında diyabet modeli oluşturmada kullanılmasının yanı sıra, (Rees and Alcolado, 2005; Srinivasan and Ramarao, 2007; Islam and Wilson, 2012; Lai and Lo, 2013) malin tümörlerin tedavisinde de kullanılmaktadır. (Friedman et al., 1992). Ancak STZ , nitrozoüre sınıfındaki diğer alkile edici maddeler gibi, DNA hasarına sebep olur ve hücreler için toksiktir.

Nitrozoüre grubu, hem bir molekülün adı hem de bir nitroso (R-NO) grubu ve bir üre içeren bir bileşik sınıfıdır. Bu gruptaki kimyasalların çoğu teorik olarak kan beyin bariyerini geçebilme yeteneğindedir, bu da STZ' nin malin tümörlerde antikanser ajan olarak tercih edilme sebeplerinden biridir (Weller et al. 2013). Bunların yanında STZ' nin sadece pankreatik β hücrelerine selektif bir toksisite göstermediği, diğer doku ve organlar için de genotoksik etkileri olduğu ortaya konmuştur (Bolzan and Bianchi, 2002).

Nitrozoüre sınıfında yer alan ve diyabet oluşturmada sıklıkla kullanılan ve Streptozotosin ve alloxan gibi kimyasal ajanlarla oluşturulan diyabet modellerinin, diğer deneysel modellere göre daha ucuz olması, daha kolay geliştirilebilmesi, pankreastaki beta hücrelerini tahrip ederken alfa ve delta hücrelerinde zarar vermemesi, ketozis ve mortalitenin göreceli olarak daha az olması gibi çok sayıda avantajı bulunmaktadır.

Ürik asit türevi ve antineoplastik bir ajan olan Alloksanın toksik etkisi özellikle pankreas beta hücrelerine özgüdür. Glukozla uyarılan insülin salınımını inhibe etmekte, yüksek dozları ise beta hücrelerinde nekroza sebep olmaktadır. Tavşanlarda pankreasın β hücrelerini tahrip etmek suretiyle kalıcı diyabet oluşturduğu ilk kez Dunn ve ark. tarafından bulunmuştur (Dunn et al., 1944). STZ'nin pankreas beta hücrelerine özgü etkileri sıçan ve köpeklerde kalıcı diyabet oluşturmasıyla gösterilmiştir (Rakieten et al., 1963). STZ'nin alloksana göre beta hücreleri dışındaki yapılara daha az zarar verdiği; alloksan ile daha yüksek kan şekeri değerlerine ulaşıldığı ve ketozisin daha sık olduğu da bildirilmiştir (Lenzen, 2008).

STZ, glikoz taşıyıcı olan GLUT2 reseptörü vasıtasıyla beta hücrelerine girer ve DNA alkilenmesine sebep olur. Hücre içinde oluşan DNA hasarı PARP aktivasyonu ile hücrel NAD⁺ depolarını boşaltmakta ve hücrede ATP tükenmesine yol açmaktadır. Sonuç olarak enerjinin tükenmesine bağlı olarak hücre ölümüne sebebiyet vermektedir. Yapılan çalışmalar STZ'nin genotoksik etkilerinin olduğunu hücre yaşam döngüsünde duraksamayı ve apoptozu tetiklediği, DNA hasarı oluşturarak hücrelerde toksisite yarattığını göstermektedir (Bolzan and Bianchi, 2002). Streptozotosinin hücre içindeki temel etki yeri nükleer DNA'dır. Hücre içinde STZ reaktif karbonyum iyonlarının oluşumuna sebebiyet vererek DNA bazlarının alkilasyonuna neden olmaktadır. Bu olayı DNA tamir dönemi izlemektedir. Bu durumda hücre ya apoptozu seçmekte ya da DNA tamir mekanizmalarını kullanmaktadır.

STZ ile oluşturulan diyabet morfolojisi sıçan soyları arasında da standart değildir. Ayrıca çalışmalar sıçanların STZ toksisitesine farelere göre daha duyarlı olduğunu göstermiştir (Forman L. Brian, 2015)

Sıçan ve fare gibi deneysel hayvan modelleriyle yapılan çalışmalar, diyabet patolojisine en uygun türlerin seçilebilmesine; istatistiksel değerlendirmeye yetecek kadar örneğin kolay eldesine, değişkenlerin kontrol altında daha kolay tutulabilmelerine ve farmasotik çalışmaların daha kolay ve hızlı şekilde uygulanmalarına olanak vermekte olsa da, hayvanlarda oluşturulan diyabet modellerinin hiçbiri insan diyabetine tam olarak eş değer değildir (Kurçer ve

Karaoğlu, 2012). Ancak bizim de çalışmamızda yaptığımız gibi, model hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalardan elde edilen tüm veriler insan çalışmalarına kaynak sağlamaları açısından önemli ve gereklidir.

STZ, dünyada ve yurdumuzda rodentlerde yaygınlıkla diyabet modeli oluşturmada kullanılmakla birlikte, diyabet modeli oluşturmak için halen tam olarak kesinleşmiş bir STZ dozu ve uygulama yöntemi yoktur. Bu durum çalışmalar arasında çok farklı sonuçların çıkmasına sebep olabilmektedir. Ayrıca, toksik etkisi olduğu bilinen bir kimyasalın diyabet ile oluştuğu iddia edilen hasarlardan önce dokularda hasar yaratması sonuçların gölgelenip gölgelenmediği konusu da aydınlatılmış değil ve halen tartışmalıdır. Bunun gibi tartışmalı yaklaşımlar ve standartize edilmemiş protokoller ile yapılan çalışmalar sonucu STZ'nin akut toksik etki mekanizmalarının işleyişi tam olarak tam aydınlatılmış değildir. Bu nedenle kimyasal ajanlarla diyabet modeli oluşturmak isteyen araştırmacıların, araştırmayı dūřündükleri diyabet tipine göre, kullanacakları hayvan türünü ve sayısını, uygulayacakları kimyasal ajanın dozunu, uygulama sırasında ortaya çıkabilecek muhtemel sorunları ve çözümleri iyice araştırmaları (Kurçer ve Karaođlu, 2012), dahası; etki faktörü yüksek dergilerde yayımlanmış ve standartize edilmiş bir protokolü benimsemeleri, STZ ile yapılan çalışmaların geleceği açısından çok daha yararlı görülmektedir.

Yapılacak olan tüm çalışmalarda STZ'nin rodentlerdeki uygulamasının, beyin korteks, siyatik sinir ve karaciğer histolojisinin yanı sıra, toksik etkilerinin de tüm doku ve hücre düzeyinde ortaya çıkarılması oldukça önemli görünmektedir. Bununla birlikte, yapılması planlanan tüm çalışmalarda STZ'nin ya da diyabet modeli oluşturmakta kullanılan herhangi bir kimyasalın, uygulanan model canlıdaki kısa ve orta vadeli etkilerinin, insan çalışmalarına uyarlanması için gerekli olan; canlıların türünden, genetik uyumluluğuna kadar geniş bir yelpazeyi kapsayan tüm önemli hususlar unutulmamalıdır.

Yaşam kalitesine olan olumsuz etkileri yanında, yüksek morbidite ve mortaliteye sahip diyabet hastalığı ve komplikasyonlarının patogenezini araştırmak için yapılan çalışmalarda hayvan modelleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Deneysel hayvan modelleri, patolojiye genetik olarak uygun

türlerin seçilebilmesine; istatistiksel değerlendirmeye yetecek kadar çok sayıda örnekle çalışılabilmesine ve değişkenlerin kontrol altında tutulmasına; birden fazla risk ve patolojinin çalışılabilmesine; tanı, koruyucu veya terapötik yaklaşımların denenmesine olanak vermektedir. Bununla birlikte hayvanlarda oluşturulan diyabet modellerinin hiçbiri insan diyabetine tam olarak eş değer değildir (Kurçer ve Karaoğlu, 2012). Ancak bizim çalışmamızda yaptığımız gibi, model hayvanlar üzerinde yapılan tüm çalışmalardan elde edilen bilgiler tüm insan çalışmalarına kaynak sağlamaları açısından önemli ve gereklidir.

Tarihsel süreçte denenmiş toksinlerden günümüzde en çok tercih edilenleri STZ ve alloksandır. STZ, *Streptomyces chromogenes* mikroorganizmasından elde edilen 1950'lerde antibiyotik olarak tanımlanmış bir kimyasaldır. Nitrozüre grubu bir kimyasal olan STZ, pankreastaki β hücreleri üzerinde tahribat yapma özelliğinden dolayı deney hayvanlarında diyabet modeli oluşturmada yaygın olarak kullanılması (Rees and Alcolado, 2005; Srinivasan and Ramarao, 2007; Islam and Wilson, 2012; Lai and Lo, 2013) yanında malin tümörlerin tedavisinde çok sıklıkla olmasa da uygulaması olan bir kimyasaldır (Friedman et al., 1992).

STZ'nin de içinde yer aldığı nitrozüre grubu taşıyan kimyasallar genellikle kemoteraptiktir. Nitrozüre, hem bir molekülün adı hem de bir nitroso (R-NO) grubu ve bir üre içeren bir bileşik sınıfıdır.

STZ, aynı zamanda nitrozüre sınıfındaki diğer alkile edici maddelerde olduğu gibi, DNA hasarına sebep olması nedeniyle hücreler için toksiktir. Bu gruptaki kimyasalların çoğu teorik olarak kan beyin bariyerini geçebilme yeteneğindedir, bu da STZ'nin malin tümörlerde antikanser ajan olarak tercih edilme sebeplerinden biridir (Weller et al. 2013). Bunların yanında STZ'nin sadece pankreatik β hücrelerine selektif bir toksisite göstermediği, diğer doku ve organlar için de genotoksik etkileri olduğu ortaya konmuştur (Bolzan and Bianchi, 2002).

Ürik asit türevi, antineoplastik bir ajan olan alloksanın toksik etkisi özellikle pankreas beta hücrelerine özgüdür. Glukozla uyarılan insülin salınımını inhibe

etmekte, yüksek dozları ise beta hücrelerinde nekroza sebep olmaktadır. Tavşanlarda pankreasın β hücrelerini tahrip etmek suretiyle kalıcı diyabet oluşturduğu ilk kez Dunn ve ark. tarafından bulunmuştur (Dunn et al., 1944). STZ'nin benzer etkileri ise sıçan ve köpeklerde kalıcı diyabet oluşturmasıyla gösterilmiştir (Rakieten et al., 1963). STZ'nin alloksana göre beta hücreleri dışındaki yapılara daha az zarar verdiği; alloksan ile daha yüksek kan şekeri değerlerine ulaşıldığı ve ketozisin daha sık olduğu da bildirilmiştir (Lenzen, 2008).

Streptozotosin ve alloksan gibi kimyasal ajanlarla oluşturulan diyabet modellerinin, diğer deneysel modellere göre daha ucuz olması, daha kolay geliştirilebilmesi, pankreastaki beta hücrelerini tahrip ederken alfa ve delta hücrelerinde zarar vermemesi, ketozis ve mortalitenin göreceli olarak daha az olması gibi çok sayıda avantajı bulunmaktadır. Kimyasal ajanlarla diyabet model modeli oluşturmak isteyen araştırmacıların, araştırmayı düşündükleri diyabet tipine göre, kullanacakları hayvan türünü ve sayısını, uygulayacakları kimyasal ajanın dozunu, uygulama sırasında ortaya çıkabilecek muhtemel sorunları ve çözümleri iyice araştırmaları gerekmektedir (Kurçer ve Karaoğlu, 2012).

Pankreas-insülin ilişkisinin ortaya konması ile yapılan hiperglisemi çalışmalarında kullanılan cerrahi dışı yöntemler, pankreasın harap edilmesi ve beta hücre spesifik toksinlerin kullanılmasıyla yapılmaktadır. Kimyasal ajanların kullanımı ile oluşan deneysel diyabet modellerinde alloksan, STZ, çinko şelatörleri (8-hidroksikinolin, dithizone), rodentisid-Vacor, diyet nitrozaminleri gibi diyabetojenik etkisi bulunan toksinler denenmiştir (Rees and Alcolado, 2005).

Glikoz taşıyıcı olan GLUT2 reseptörü vasıtasıyla beta hücrelerine giren STZ burada DNA alkilenmesine sebep olmaktadır. Burada oluşan DNA hasarı PARP aktivasyonu ile hücrel NAD⁺ depolarını boşaltmakta ve hücrede ATP tükenmesine yol açmaktadır. Sonuç olarak enerjinin tükenmesine bağlı olarak hücre ölümüne sebebiyet vermektedir. Yapılan çalışmalar STZ'nin genotoksik etkilerinin olduğunu hücre yaşam döngüsünde duraksamayı ve apoptozu tetiklediği, DNA hasarı oluşturarak hücrelerde toksisite yarattığını göstermektedir

(Bolzan and Bianchi, 2002). Ayrıca çalışmalar sıçanların STZ toksisitesine farelere göre daha duyarlı olduğuna dikkat çekmektedir. STZ ile oluşturulan diyabet morfolojisi sıçan soyları arasında da standart değildir. STZ' nin akut uygulamasının beyin korteks, siyatik sinir ve karaciğer histolojisinde ne gibi değişiklikler yaptığının ortaya konması önemlidir. Ayrıca bu kimyasalın rodentlerde kısa-orta vadeli toksik kapasitesinin ortaya konması STZ ile diyabet modeli için alternatif yöntemlere yönelme açısından kritik öneme sahiptir. Bu proje ile STZ uygulamasının beyin korteks, siyatik sinir ve karaciğer üzerine toksik etkileri ortaya konmuştur.

Siyatik sinir histolojik kesitleri genel histolojik parametreler açısından değerlendirildiğinde kontrol grubu siyatik sinir kesitleri normal histolojik görünümde izlenmiştir. 24. saat grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında siyatik sinir kılıflarında histolojik değişiklikler gözlemlenmiş olup epinöryum'da hafif düzeyde fibrotik kalınlaşma ile perinöryum'da subperinöral alanlarda ayrışmalar izlenmiştir. 1.hafta grubu, kontrol ve 24 saat grupları ile karşılaştırıldığında ise histolojik değişikliklerde artış gözlenmiştir. 2.hafta grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hafif derecede epinöral fibrozis ve endonöral ödem izlenmiş ve 1 hafta grubuna göre histolojik değişikliklerde azalma görölmüştür. 4.hafta grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise hafif derecede epinöral fibrozis ve endonöral ödem izlenmiştir.

Kontrol grubu siyatik sinir histolojik kesitlerinde apoptotik hücelere rastlanmamış olup 24.saat grubu kontrol grubu siyatik sinir histolojik kesitleri ile karşılaştırıldığında az sayıda Schwann ve perinöral hücelerde Tunel ekspresyonu izlenmiştir. 1.hafta grubu, kontrol ve 24 saat grupları ile karşılaştırıldığında ekspresyon gösteren hücre sayılarında artış görölmüştür. 2. hafta grubu siyatik sinirlerinde TUNEL ekspresyonu gösteren hücre sayıları kontrol ve 24 saat gruplarına kıyasla daha fazla iken, 1 hafta grubu ile karşılaştırıldığında ekspresyon gösteren hücre sayılarında azalma olduğu görölmüştür. 4. hafta grubu siyatik sinirlerinde TUNEL ekspresyonu gösteren hücre sayıları kontrol ve 24 saat gruplarına göre fazla, 1 hafta grubuna göre az olarak değerlendirilmiş olup 2. hafta dan sonra ekspresyonda değişiklik olmamıştır.

Tüm deney grupları cerebrum dokuları histokimyasal olarak değerlendirilmiş olup kontrol grubu ile diğer deney grupları karşılaştırıldığında da histolojik olarak herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Kontrol grubu cerebrum histolojik kesitlerinde apoptotik hücelere rastlanmamıştır. Deney gruplarının cerebrum kesitleri TUNEL boyama yapılarak değerlendirilmiş ve kontrol grubunda olduğu gibi ekspresyonu gösteren granüler veya piramidal hücelere rastlanmamıştır.

Bu olumsuzluklarına rağmen STZ dünyada ve yurdumuzda rodentlerde yaygınlıkla diyabet modeli oluşturmada kullanılmakla birlikte, diyabet modeli oluşturmak için tam olarak kesinleşmiş bir STZ dozu ve uygulama yöntemi yoktur. Bu durum çalışmalar arasında çok farklı sonuçların çıkmasına sebep olmaktadır. Bunun dışında toksik etkisi olduğu bilinen bir kimyasalın diyabet ile oluştuğu iddia edilen hasarlardan önce dokularda hasar yaratması sonuçların gölgelenip gölgelenmediği konusunda soru işaretleri taşımaktadır. STZ' nin akut toksik etkileri bu güne kadar tam olarak ortaya konmamıştır.

Yaptığımız çalışmamız sonucunda elde edilen veriler öncelikle akut STZ hasarını ortaya koymuş olup en fazla etkinin gözlemediği doku siyatik sinir olarak belirlenmiştir. Proje kapsamında STZ' nin sadece pankreatik β hücrelerine selektif bir toksisite göstermediği, diğer doku ve organlar için de çok toksik olduğu ortaya konmuştur. Kimyasal özellikleri sebebiyle birçok doku ve organa nüfuz edebilen STZ' nin diyabet modeli oluşturmada ne kadar avantajlı bir model olduğu bu nedenle tartışmalıdır. Özellikle çalışılacak dokudaki hasarın STZ kaynaklı mı yoksa kronik diyabet kaynaklı mı olduğu sorgulanmalıdır. STZ sonrası dokudaki biyokimyasal değişiklik diyabetle oluşan doku hasarının net bir şekilde ortaya konmasını etkileyebilir.

Sonuç olarak bu proje ile STZ' nin siyatik sinir, karaciğer ve beyin üzerindeki etkileri ortaya konmuş ve 24.saat ile 1.hafta ortaya çıkan STZ hasarın 2.haftadan sonra ortadan kalktığı belirlenmiştir. Bu nedenle STZ ile diyabet modeli oluşturacak b araştırmacıların STZ uygulamasından özellikle 4. haftadan sonra denemelerine başlamasının uygun olacağı sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ahmed AM., 2002. History of diabetes mellitus, Saudi Med. J. 23(4), 373-378.
- American Diabetes Association, 2004. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.
- Atkinson MA., Maclaren NK., 1994. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med. 331: 1428-1436.
- Bastaki S., 2005. Diabetes mellitus and its treatment, Int J Diabetes & Metabolism. 13: 111-134.
- Bolzan AD., Bianchi MS., 2002. Genotoxicity of Streptozotocin. Mutation Research. 512, 2-3: 121-134.
- Bradford MM., 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-254.
- Cheeseman KH., Slate TF., 1993. An introduction to free radical biochemistry. Br. Med. Bull. 49, 481-493.
- Dunn JS, Duffy E, Gilmour MK, Kirkpatrick J, McLetchie NG., 1944. Further observations on the effects of alloxan on the pancreatic islets. J Physiol; 103:233-43.
- Eleazu CO, Iroaganachi M, Eleazu KC., 2013. Ameliorative Potentials of Cocoyam (*Colocasia esculenta* L.) and Unripe Plantain (*Musa paradisiaca* L.) on the Relative Tissue Weights of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. J Diabetes Res. 12(160964):8.
- Elmore S., 2007. Apoptosis: A review of programmed cell death. Toxicol. Pathol., 35(4): 495-516.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Friederich M, Hansell P, Palm F., 2009. Diabetes, oxidative stress, nitric oxide and mitochondria function. *Curr Diabetes Rev.* 5:120–144.
- Friedman H.S., Dolan M.E., Moschel R.C., Pegg A.E., Felker G.M., Rich J., Bigner D.D., and Schold Jr S.C., 1992. Enhancement of nitrosourea activity in medulloblastoma and glioblastoma multiforme. *Journal of the National Cancer Institute.* 84(24): 1926–1931
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA., 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119: 493–501.
- Goud BJ., Dwarakanath V., Chikka BK., 2015. Streptozotocin-A diabetogenic agent in animal models, *Int. J. Pharm. Pharm. Res.* 3 253e269.
- Goyal SN., Reddy NM., Patil KR. et al., 2016. Challenges and issues with streptozotocin-induced diabetes-a clinically relevant animal model to understand the diabetes pathogenesis and evaluate therapeutics, *Chemico-Biological Interactions*, 244: 49–63.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249(22): 7130-7139.
- Islam MS., Wilson RD., 2012. Experimentally induced rodent models of type 2 diabetes. *Methods Mol Biol.* 933: 161-74
- Karabay Yavasoglu NU., Koksall C., Dagdeviren M., Aktug H., Yavasoglu A., 2014. Induction of oxidative stress and histological changes in liver by subacute doses of butyl cyclohexyl phthalate. *Environ Toxicol.* 29(3) 345-53.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kronche KD., Fehsel K., Sommer A., Rodrigues ML., Kolb-Bachofen V., 1995. Nitric-oxide generation during cellular metabolization of the daibetogenic N-methyl-N-nitroso-urea streptozocin contributes to islet cell DNA damage. *Biol Chem* 376:179-185.
- Kumar R., Arora V., Ram V., Bhandari A., Vyas P., 2015. Hypoglycemic and hypolipidemic effect of Allopolyherbal formulations in streptozotocin induced diabetes mellitus in rats, *International Journal of Diabetes Mellitus*, 3: 45-50.
- Kurçer Z., Karaoğlu D., 2012. The use of Alloxan and Streptozotocin in Experimental Diabetes Models. *Turk Jem.* 16: 34-40
- Lai AKW., Lo ACY., 2013. Animal models of diabetic retinopathy: summary and coparison. *Journal of Diabetes Research*. Article ID 106594.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95(2): 351-358.
- Olokoba AB., Obateru AO., Olokoba LB., 2012. Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Current Trends, *Oman Med J.* 27(4): 269–273.
- Perera MDB, Hemingway J, Parakrama Karunaratne SHP, 2008. Multiple insecticide resistance mechanisms involving metabolic changes and insensitive target sites selected inanopheline vectors of malaria in Sri Lanka. *Malar J.* 7: 168.
- Piepper AA., Verma A, Zhang J, Snyder SH., 1999. Poly (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. *Trends Pharmacol Sci.* 20:171–181.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Radenković M., Stojanović M., Prostran M., 2016. Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 78: 13–31.
- Rees DA., Alcolado JC., 2005. Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med*. 22(4): 359-70
- Rakieten N, Rakieten ML, Nadkarni MV. 1963. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemother Rep*; 29:91-8.
- Lenzen S. 2008. The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*; 51:216-26.
- Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. 1997. *Diabetes Care*. 20:1183-97.
- Srinivasan K., Ramarao P., 2007. Animal models in type 2 diabetes research: An overview. *Indian J Med Res*. 125(3):451-72
- Stauffacher W, Burr I, Gutzeit I, Beaven D, Veleminsky J, Renold AE., 1970. Streptozotocin diabetes: time course of irreversible β -cell damage; further observations on prevention by nicotinamide. *Proc Soc Exp Biol Med*, 133:194–200.
- Szkudelski T., 2001. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiol. Res*. 50: 536-546.
- Weller M, Cloughesy T, Perry JR., Wick W., 2013. Standards of care for treatment of recurrent glioblastoma-are we yet there? *Neuro Oncol*. 2013 Jan; 15(1): 4–27.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Zimmet P., Cowie C., Ekoe JM., Shaw JE. 2004, Classification of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. In: International Textbook of Diabetes Mellitus, chapter 1, 3rd Ed., 3-14.



ÖZGEÇMİŞ

01.01.1989 yılında Eskişehir’de doğan Ebru ŞANCI 2007 yılında Prf. Dr. Orhan Oğuz Lisesinden mezun olmuştur. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde eğitimi sırasında Manisa Tıbbi Genetik Laboratuvarı ve ARGEFAR Çevre Gıda Laboratuvarında staj eğitimlerini gerçekleştirmiş 2014 yılında üniversiteden mezun olmuştur.

