T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ
FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
Danışman: Prof. Dr. Sema BOLKENT

DELTA-9-TETRAHİDROKANNABİNOL UYGULANAN DİYABETİK SIÇANLARIN İDRAR METABOLİTLERİNİN, PANKREAS KANNABİNOİD RESEPTÖR EKSPRESYONLARININ VE ANTİOKSİDAN SİSTEMLERİNİN İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ

Bio. Zeynep Mine COŞKUN, M.Sc.

İstanbul - 2012

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ
FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
Danışman: Prof. Dr. Sema BOLKENT

DELTA-9-TETRAHİDROKANNABİNOL UYGULANAN DİYABETİK SIÇANLARIN İDRAR METABOLİTLERİNİN, PANKREAS KANNABİNOİD RESEPTÖR EKSPRESYONLARININ VE ANTİOKSİDAN SİSTEMLERİNİN İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ

Bio. Zeynep Mine COŞKUN, M.Sc.

İstanbul - 2012

Bu tez projesi İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 7823

İstanbul, 17 Aralık 2012

İ.Ü.ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Lisansüstü Öğretim Yönetmeliğinin 50.maddesi uyarınca Enstitünüz Fen Bilimleri Anabilim Dalı'nın doktora öğrencisi Zeynep Mine COŞKUN'un,

"Delta-9 Tetrahidrokannabinol Uygulanan Diyabetik Sıçanların İdrar Metabolitlerin Pankreas Kannabinoid Reseptör Ekspresyonlarının ve Antioksidan Sistemlerinin İncelenmesi"

Adlı tezi jürimizce tetkik edilmiş ve kendisine tez savunması yaptırılmıştır.

Yukarıda adı geçen tezin ve tez savunmasının kabul edilmesine oy birliğiyle karar verilmiştir.

Prof.Dr.Salih CENGİZ
Jüri Başkanı

Prof.Dr.Sema BOLKENT
Danışman

Prof.Dr.Gürsel ÇETİN
Üye

Doç.Dr.Canan HÜRDAĞ
Üye

Doç.Dr.Sibel ÖZYAZGAN
Üye

Biyolog Prof. Dr. Tuncay ALTUĞ Anısına,

ÖNSÖZ

Eğitimim süresince sabır ve hoşgörüsüyle değerli bilgilerini aktaran, eleştirileriyle hep yol gösteren değerli tez danışman hocam

Prof. Dr. Sema BOLKENT'e ,

Akademik yolda her türlü imkanı sunarak, kendimi geliştirmemi sağlayan,

hiçbir yardımını esirgemeyen kıymetli hocam

Prof. Dr. Salih CENGİZ'e,

Beni her zaman motive eden, iş ahlakı ve başarıları ile daima bana örnek olan değerli hocam

Prof. Dr. Hayrunnisa DENKTAŞ'a,

Tez çalışmalarım süresince desteklerini ve teşviklerini eksik etmeyen kıymetli hocam

Yrd. Doç. Dr. Cem DİKMEN'e,

Araştırmalarım sırasında çalışma imkanı sunan değerli hocam

Prof. Dr. Turgut ULUTİN'e

Deneysel çalışmalarım süresince her zaman destek olan

Tıbbi Bio. Çetin KARACA'ya

Yardımlarını esirgemeyen ve dostluğunu hep yanımda hissettiğim sevgili arkadaşlarım

Gülsen POLAT ve Melike ERSÖZ'e

Bugünlere gelmemi sağlayan ve tüm eğitimim boyunca hiçbir zaman maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen

Aileme,

Bana şans getiren, ailemizin yeni üyesi

Ömer Yavuz COŞKUN'a

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Zeynep Mine COŞKUN

İÇİNDEKİLER

SAYFA NO

İTHAF I

ÖNSÖZ II

İÇİNDEKİLER III

KISALTMALAR LİSTESİ VII

ŞEKİLLER LİSTESİ XI

TABLOLAR LİSTESİ XIII

1. GİRİŞ VE AMAÇ 1

2. GENEL BİLGİLER 4

2. 1. Kannabis Bitkisi 4

2. 1.1. *Cannabis sativa L.* 5

2. 2. Esrar 8

2. 2. 1. Yapısal Özellikleri 8

2. 2. 2. Kannabinoid 10

2. 2. 3. Δ^9-Tetrahidrokannabinol 13

2. 2. 4. Bağımlılık 14

2. 2. 5. Kannabinoid Reseptörleri 15

2. 3. Diabetes Mellitus 17

2. 3. 1. Epidemiyoloji 18

2. 3. 2. Tip-2 Diyabet 19

2. 3. 3. Deneysel Tip-2 Diyabet Modelleri 20

2. 3. 4. Pankreas 22

2. 4. Serbets Radikaller ve Oksidatif Stres 24

2. 4. 1. Lipid Oksidasyonu 25

2. 4. 2. Protein Oksidasyonu 26

2. 4. 3. DNA Oksidasyonu 26

2. 5. Antioksidan Sistem 26

2. 5. 1. Süperoksit Dismutaz 27

2. 5. 2. Katalaz 27

2. 5. 3. Glutatyon 28

2. 6. Diyabet ve Oksidatif Stres 28

2. 7. İmmunohistokimya Yöntemi 29

2. 8. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) 32

2. 8. 1. PZR Çeşitleri 33

2. 8. 2. Real-Time PZR (Eş zamanlı PZR) 34

3. GEREÇ VE YÖNTEM 36

3. 1. Kimyasal Maddeler 36

3. 2. Gereçler ve Sarf Malzemeler 38

3. 3. Deneyde Kullanılan Hayvanlar 40

3. 3. 1. Hayvanların Gruplandırılması 40

3. 4. Biyokimyasal İncelemeler 41

3. 4. 1. Örnek Hazırlanması 41

3. 4. 1. 1. Plazma ve Eritrositlerin Hazırlanması 41

3. 4. 1. 2. Pankreas Dokusu Homojenatlarının Hazırlanması 42

3. 4. 2. Lipid Peroksidayonu Tayini 42

3. 4. 2. 1. Plazma Lipid Peroksidasyon Tayin Metodu 42

3. 4. 2. 2. Pankreas Dokusu Lipid Peroksidasyon Tayin Metodu 43

3. 4. 3. Eritrosit Hemoglobin Miktar Tayini 44

3. 4. 4. Glutatyon Tayini 44

3. 4. 4. 1. Eritrosit Glutatyon Tayin Metodu 44

3. 4. 4. 2. Pankreas Dokusu Glutatyon Tayin Metodu 45

3. 4. 5. Katalaz Aktivitesinin Tayini 46

3. 4. 5. 1. Plazma Katalaz Aktivite Tayin Metodu 46

3. 4. 5. 2. Pankreas Dokusu Katalaz Aktivite Tayin Metodu 46

3. 4. 6. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Tayini 47

3. 4. 6. 1. Plazma Süperoksit Dismutaz Aktivite Tayin Metodu 47

3. 4. 6. 2. Pankreas Dokusu Süperoksit Dismutaz Aktivite Tayin Metodu . 47

3. 4. 7. Protein Miktar Tayini 48

3. 4. 7. 1. Pankreas Dokusu Protein Miktar Tayin Metodu 48

3. 5. İmmunohistokimyasal İncelemeler 49

3. 5. 1. Kannabinoid 1 (CB1) Reseptörünün İmmunohistokimya Yöntemi ile Gösterilemsi 49

3. 5. 2. Kannabinoid 2 (CB2) Reseptörünün İmmunohistokimya Yöntemi ile Gösterilmesi 50

3. 6. Kannabinoid 1 (CB1) ve Kannabinoid 1 (CB2) Reseptör mRNA Seviyelerinin İncelenmesi 52

3. 6. 1. Pankreas Dokusundan RNA İzolasyonu 52

3. 6. 2. RNA Kalite Tayini 53

3. 6. 3. cDNA Sentezi 53

3. 6. 4. Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizi 54

3. 7. İdrarda Δ^9-THC Metabolitlerinin Tespiti 57

3. 8. İstatistik 58

4. BULGULAR 59

4. 1. Kan Glukoz Değerleri 59

4. 2. Vücut Ağırlık Değerleri 60

4. 3. Biyokimyasal Bulgular 62

4. 3. 1. Plazma ve Pankreas Dokusu MDA Seviyeleri 62

4. 3. 2. Eritrosit ve Pankreas Dokusu GSH Seviyeleri 63

4. 3. 3. Plazma ve Pankreas Dokusu CAT Aktivitesi 64

4. 3. 4. Plazma ve Pankreas Dokusu SOD Aktivitesi 65

4. 4. İmmunohistokimyasal Bulgular 66

4. 4. 1. Kannabinoid 1 (CB1) Reseptör 66

4. 4. 2. Kannabinoid 2 (CB2) Reseptör 71

4. 5. Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyon Bulguları 75

4. 5. 1. Kannabinoid 1 (CB1) Reseptör mRNA Seviyesindeki Değişiklikler .. 75

4. 5. 2. Kannabinoid 2 (CB2) Reseptör mRNA Seviyesindeki Değişiklikler .. 76

4. 6. İdrar Analiz Bulguları 80

5. TARTIŞMA VE SONUÇ 82

6. ÖZET 91

7. ABSTRACT 93

8. KAYNAKLAR 95

9. ÖZGEÇMİŞ 120

10. EKLER 127

EK-1. Etik Kurul Onayı 127

KISALTMALAR

ACTB	Beta-Aktin
AEA	Anadamid
AEC	3-amino-9-ethyl carbazole
AMV	Avian myeloblastosis virus
BSA	Bovin serum albumin
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
CAT	Katalaz
CB1	Kannabinoid 1 reseptörü
CB2	Kannabinoid 2 reseptörü
CBC	Kannabikromen
CBD	Kannabidiol
CBG	Kannabigerol
CBL	Kannabicilol
CBN	Kannabinol
CBT	Kannabitriol
cDNA	Tamamlayıcı DNA
CN	4-chloro-1-naphthol
CREB	cAMP response element binding protein
$CuCl_2$	Bakır (II) klorür
$CuSO_4$. $5H_2O$	Bakır (II) sülfat pentahidrat

CT	Treshhold Cycle (Eşik Değeri)
Δ^8-THC	Δ-8-tetrahidrokannabinol
Δ^9-THC	Δ-9-tetrahidrokannabinol
DAB	3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride
dH_2O	Saf su
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonukleotid trifosfat
DTNB	5-5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit
FeSOD	Demir süperoksit dismutaz
Folin	Fosfo molibdat-fosfotungustat
GC-MS	Gaz kromaografisi-Kütle spektrometresi
GDM	Gestasyonel diabetes mellitus
GPR55	G proteine bağlı reseptör 55
GSH	Glutatyon
GSSG	Glutatyon disülfid
GPx	Glutatyon peroksidaz
G6P	Glukoz-6-fosfat
G6PDH	Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
H_2O_2	Hidrojen peroksit
HCl	Hidroklorik asit
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
IL-1	İnterlökin 1
LC-MS	Sıvı kromaografisi-Kütle spektrometresi
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
MDA	Malondialdehit

$MgCl_2$	Magnezyum klorid
MMLV	Moloney murine leukemia virus
Na_2CO_3	Sodyum Karbonat
Na_2HPO_4	Sodyum fosfat
NAD	Nikotinamid
NaH_2PO_4	Sodyum dihidrojen fosfat
NaOH	Sodyum hidroksit
NBT	Nitroblue tetrazolium
NIDDM	İnsulinden bağımsız diyabet
NiSOD	Nikel süperoksit dismutaz
NO	Nitrik oksit
PBS	Fosfat tamponu
PC-12	Feokromositoma
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
ROT	Reaktif oksijen türevleri
RT-PZR	Ters (Reverse) transkripsiyon PZR
SH	Sülfidril
SOD	Süperoksit dismutaz
STZ	Streptozotosin
TBA	Tiyobarbiturik asit
TBS	Tris tampon
TCA	Trikloroasetikasit
TG	Triglisetid
THC	Δ-9-tetrahidrokannabinol

THCCOOH	11-nor-9-karboksi-delta9-THC
THCV	Kannabavarin
Tip-1 DM	Tip-1 Diabetes Mellitus
Tip-2 DM	Tip-2 Diabetes Mellitus
XO	Ksantin oksidaz
2-AG	2-araşidonil gliserol
11-OH-THC	11-hidroksi-delta9-THC

ŞEKİL LİSTESİ

SAYFA NO

Şekil 1. *Cannabis sativa* L. bitkisinin görünüşü 5

Şekil 2. *Cannabis sativa* L. bitkisinin morfolojisi 7

Şekil 3. Kannabis ekstraktlarında doğal olarak bulunan en önemli bileşenler 12

Şekil 4. Δ^9-THC'nin metabolik yolu 14

Şekil 5. 2010-2030 yılları arasında diyabetin Dünya'daki tahmini dağılımı 19

Şekil 6. Streptozotosin (STZ)'in yapısı 21

Şekil 7. Nikotinamid (NAD)'in yapısı 21

Şekil 8. Pankreas 22

Şekil 9. Langerhans adacık hücre tipleri ve ekzokrin asiner hücrelerin şematik görüntüsü 23

Şekil 10. Langerhans adacığının mikroskobik görüntüsü (H&E) 24

Şekil 11. Doymamış lipid peroksidasyonu sonucu oluşan ürünler 25

Şekil 12. Reaktif oksijen türevleri (ROT)'ne karşı savunma mekanizması 28

Şekil 13. PZR sıcaklık döngüleri 32

Şekil 14. Eş zamanlı PZR sonuç eğrisi 35

Şekil 15. Deneklerin haftalara göre kan glukoz seviyelerinin dağılımı 59

Şekil 16. Dört gruba ait 0., 7., 14. ve 21. günlerde vücut ağırlık ortalamaları 61

Şekil 17. Langerhans adacıklarındaki kannabinoid 1 (CB1) reseptör içeren immunpozitif hücrelerin alan yüzdesi 67

Şekil 18. Langerhans adacıklarında (sol üst köşe) CB1 reseptör immunpozitif hücreler sitoplazmik ve nuklear (*), sitoplazmik (#) yerleşimleri görülmekte. 68

Şekil 19. Pankreatik kanallarda CB1 reseptör hücreleri negatif 68

Şekil 20. CB1 reseptör için işaretli antikor ile gösterilen immunpozitif hücreler 69

Şekil 21. CB1 reseptör immunpozitif hücreler 70

Şekil 22. Langerhans adacığında nadiren görülen CB2 reseptör immunpozitif hücreler 72

Şekil 23. Pankreatik kanallardaki kannabinoid 2 (CB2) reseptör hücre alan yüzdesi 72

Şekil 24. CB2 reseptör için pankreatik kanalda immunpozitif hücreler 73

Şekil 25. Pankreatik kanallardaki immunpozitif CB2 reseptör hücreleri 74

Şekil 26. Kontrol grubunda eş zamanlı PZR çoğaltım eğrilerinin Light Cycler 480 görüntüsü 76

Şekil 27. Kontrol grubunda Actb, CB1 ve CB2 reseptör genlerinin eş zmanlı PZR çoğaltım eğrilerini gösteren Light Cycler 480 cihaz yazılımı görüntüsü .. 77

Şekil 28. Δ^9-THC grubuna ait bir sıçanın Actb, CB1 ve CB2 reseptör genlerine ait eş zamanlı PZR çoğaltım görüntüsü 77

Şekil 29. Actb, CB1 ve CB2 reseptör genlerine ait eş zamanlı PZR çoğaltım görüntüsü 78

Şekil 30. Δ^9-THC, diyabet ve diyabet+Δ^9-THC gruplarına ait eş zamanlı PZR çoğaltım görüntüsü 79

Şekil 31. CB2 reseptör genine ait eş zamanlı PZR çoğaltım görüntüsü 80

Şekil 32. 0. gün, idrar Δ^9-THC metabolit miktarları 81

TABLO LİSTESİ

SAYFA NO

Tablo 1. Kronoloji 17

Tablo 2. cDNA sentezinde kullanılan reaksiyon karışımı 54

Tablo 3. Primer özellikleri. Kannabinoid 1 (CB1) reseptör, kannabinoid 2 (CB2) reseptör ve beta-aktin (Actb). İleri primer (F), geri primer (R) 55

Tablo 4. Eş zamanlı PZR yönteminde kullanılan reaksiyon çözeltisi 56

Tablo 5. Eş zamanlı PZR döngü protokolü 56

Tablo 6. İdrarda analizi yapılan Δ^9-THC metabolitleri 57

Tablo 7. Tüm grupların kan glukoz ortalama değerleri 60

Tablo 8. Deney süresince tüm gruplara ait vücut ağırlık değerleri 61

Tablo 9. Deney gruplarının plazma ve doku malondialdehit (MDA) seviyeleri 62

Tablo 10. Dört gruba ait eritrosit ve doku glutatyon (GSH) seviyeleri 63

Tablo 11. Deney grupları arasında plazma ve doku katalaz (CAT) aktiviteleri 65

Tablo 12. Deney grupları arasında plazma ve doku süperoksid dismutaz (SOD) aktiviteleri 66

Tablo 13. Eş zamanlı PZR yöntemiyle CB1 reseptörüne ait mRNA seviyeleri 75

Tablo 14. 0.,7. ve 14. günlerde idrar Δ^9-THC metabolit miktarları 81

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Eski çağlardan beri bağımlılık yaptığı bilinen, esrar (*Cannabis sativa* L., marijuana), günümüzde dünyada en yaygın kötüye kullanılan yasadışı madde olmasına rağmen eksitotoksisitede, kalsiyum düzenlenmesinde ve oksidatif hasarların azaltılmasında etkili olduğu ileri sürülmektedir (1, 2). Esrar bitkisinin içinde bulunan en etkin psikoaktif madde olan Δ-9-tetrahidrokannabinol (Δ^9-THC/THC) ve türevleri, potansiyel terapötik kullanımı açısından son zamanlarda araştırmacılar için büyük önem taşımaktadır (3-5). Yapılan çalışmalarda, kannabisin kan glukoz seviyesini düşürdüğü rapor edilmektedir (6, 7). Eksojen Δ^9-THC'nin iştah ve yeme metabolizmasını uyardığı gösterilmiştir (8, 9).

Δ^9-THC içeren kannabis ürünlerinin (marijuana ve haşiş) tüketimi idrar örneklerinde tespit edilebilmektedir. Hızlı metabolize olan Δ^9-THC'nin yarılanma ömrü 20-40 saattir. Δ^9-THC kullanımının bırakılmasını takiben birkaç hafta içerisinde varlığı tespit edilebilmektedir (10). Kannabinoid (CB1 ve CB2) reseptörlerinden CB1 reseptörü çoğunlukla beyin bölgelerinde dağılmış olmakla birlikte (11), bazı periferal organlarda da bulunduğu bildirilmiştir (12). CB1 reseptörünün enerji homeostazında rol oynadığı bilinmektedir (13-15). Li ve ark. (16) CB1 ve CB2 reseptörlerinin insan beta hücre fonksiyonlarını etkilediğini ve insulin sekresyonunu uyardığını ileri sürmüşlerdir. CB2 reseptörünün kronik dejeneratif hastalıklarda koruyucu etkisinin olduğu ve CB2 reseptör aktivasyonunun diyabetle ilişkili komplikasyonlarda pozitif etkili olabileceği bildirilmektedir (17).

Diyabet 2010 yılında dünyada erişkin popülasyonun % 6.4, yani yaklaşık olarak 285 milyon insanı etkileyen bir hastalıktır. Bu sayının 2030 yılına kadar yaklaşık olarak 438 milyonu bulacağı tahmin edilmektedir (18). İnsulinden bağımsız diyabet (non-insulin dependent diabetes mellitus = NIDDM) olarak da bilinen tip-2 diabetes mellitus (tip-2 DM) tüm diyabet vakalarının % 80-90'ını oluşturmaktadır (19). Tip-2 DM; insulin salgılanmasındaki bozukluk ve glukoz artışı sonucu insulin direnci ile karakterize olan heterojen, multifaktöriyel, poligenik bir hastalıktır. Metabolik hastalıkların patogenezinde oksidatif stresin esas rolü üstlendiği gösterilmiştir (20). Tip-2 DM uzun süreli belirti vermemesi nedeniyle çoğu zaman geç teşhis edilmektedir. Semptom vermeyen periyodu takiben poliüri, polidipsi, kilo kaybı gibi klasik diabetes mellitus belirtileriyle ortaya çıkar (21).

Diyabetik hastalardaki hiperglisemi oksidatif hasara yol açan reaktif oksijen türevlerinin (ROT) meydana gelmesine sebep olmaktadır. Oksidatif stres, diyabet ve diyabetin daha sonraki komplikasyonlarının patogenezinde önemli rol oynar. Son yıllarda yayınlanan *in vitro* ve deney hayvanı çalışmalarının çoğu hiperglisemik şartların pro- ve pre-antioksidanları azalttığını ve böylece oksidatif hasara yol açtığını bildirmektedir (22, 23).

Kim ve ark. (24) beta hücreleri ile yaptıkları bir çalışmada; beta hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde rol oynayan CB1 reseptörünün ve insulin reseptör sinyallerinin birbirleriyle fonksiyonel ilişkisinin olduğunu tespit etmişlerdir. Sıçan feokromositoma (PC 12) hücreleri ile yapılan bir çalışmada ise CB1 reseptör agonisti olan HU-210'nun hiperglisemi ile ilişkili olarak artan oksidatif stresi önlediği ve kannabinoidlerin diyabetteki nörolojik komplikasyonlarda terapötik etkileri olduğu bildirilmiştir (22).

Fareler üzerine düşük dozda birkaç kez uygulanan streptozotosinin neden olduğu otoimmün diyabette, başlangıçta beta hücrelerinin harap olduğu ve beta hücrelerinin tahribatının immun sistem tarafından çoğaltıldığı buna karşılık Δ^9-THC'nin de otoimmun diyabet modelinde otoimmun yanıt şiddetini azalttığı bildirilmiştir (25). Dagon ve ark. (22)'na göre kannabinoidler antioksidan ajan gibi hareket ederler ve bu özellikleri sayesinde nöron koruma özelliği gösterirler.

Çalışmamızda; Δ^9-THC uygulanmış diyabetik ve sağlıklı sıçan idrarlarında Δ^9-THC metabolitlerinin miktarlarındaki değişimlerin saptanması ve adli tıpa uyarlanması hedeflenmektedir. Antioksidan ajan gibi davrandığı bildirilen kannabinoidlerin tip-2 diyabetik pankreas dokusunda oluşan oksidatif hasar üzerindeki etkilerinin araştırılması ve ayrıca pankreas CB1 ve CB2 reseptörlerinin gen ekspresyonlarının (= anlatımlarının) immunohistokimyasal ve real-time (eş zamanlı) polimeraz zincir reaksiyonu yöntemleriyle tip-2 diyabetik sıçanlarda gösterilmesi amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kannabis Bitkisi

Kannabis, tarihte bilinen en eski psikoaktif bitkilerden biridir. Bu bitki, Cannabacea familyasına bağlı *Cannabis* genusunda sınıflandırılmıştır. Bu bitkinin üç türü olduğu bildirilmektedir. Bu türlerden en yaygın olanı *Cannabis sativa* L.'dir. Diğerleri *Cannabis indica* ve *Cannabis ruderalis*'tir (26, 27).

Cannabis sativa* L.*: Uzun, ince ve gevşek dallanma gösteren ve uzunluğu 1-3 m olan bir gövdeye sahip otsu bir bitkidir. Bitkinin koyu yeşil ve kenarları testere dişli yaprakları vardır, sapları yivlidir (Şekil 1).

Cannabis indica: Piramit şekilli, yoğun dallanma gösterir ve boyu 90 cm ile 2.5 m arasında değişen bir gövdeye sahiptir. *C. Indica*'nın kuru, acı-ekşi bir tadı vardır. Rahatlatıcı, uyutucu, stres ve acı hafifletici olduğu bildirilmiştir.

Cannabis ruderalis: Gövde az sayıda dallanma göstermektedir. Gövde uzunluğu 60 cm civarındadır (27-29).

Dünyada çeşitli iklim ve toprak tiplerinde yetiştirilebilen *Cannabis* çeşitlilik gösteren ve çok yaygın bulunan bir bitkidir. Bitkiden üretilen lifler yüzyıllardır tekstil ve kağıt sektöründe kullanılmıştır. Halen lif elde etmek amacıyla kültür yapılmasına izin verilmektedir. Tohumları

ise kuşyemi olarak tüketilmektedir. Tohumlarında bulunan yağdan aydınlanma ve sabun yapımında yararlanılmıştır, günümüzde de boya sektöründe kullanımı bulunmaktadır (26, 27, 30).



Şekil 1: *Cannabis sativa* L. bitkisinin görünüşü (35)

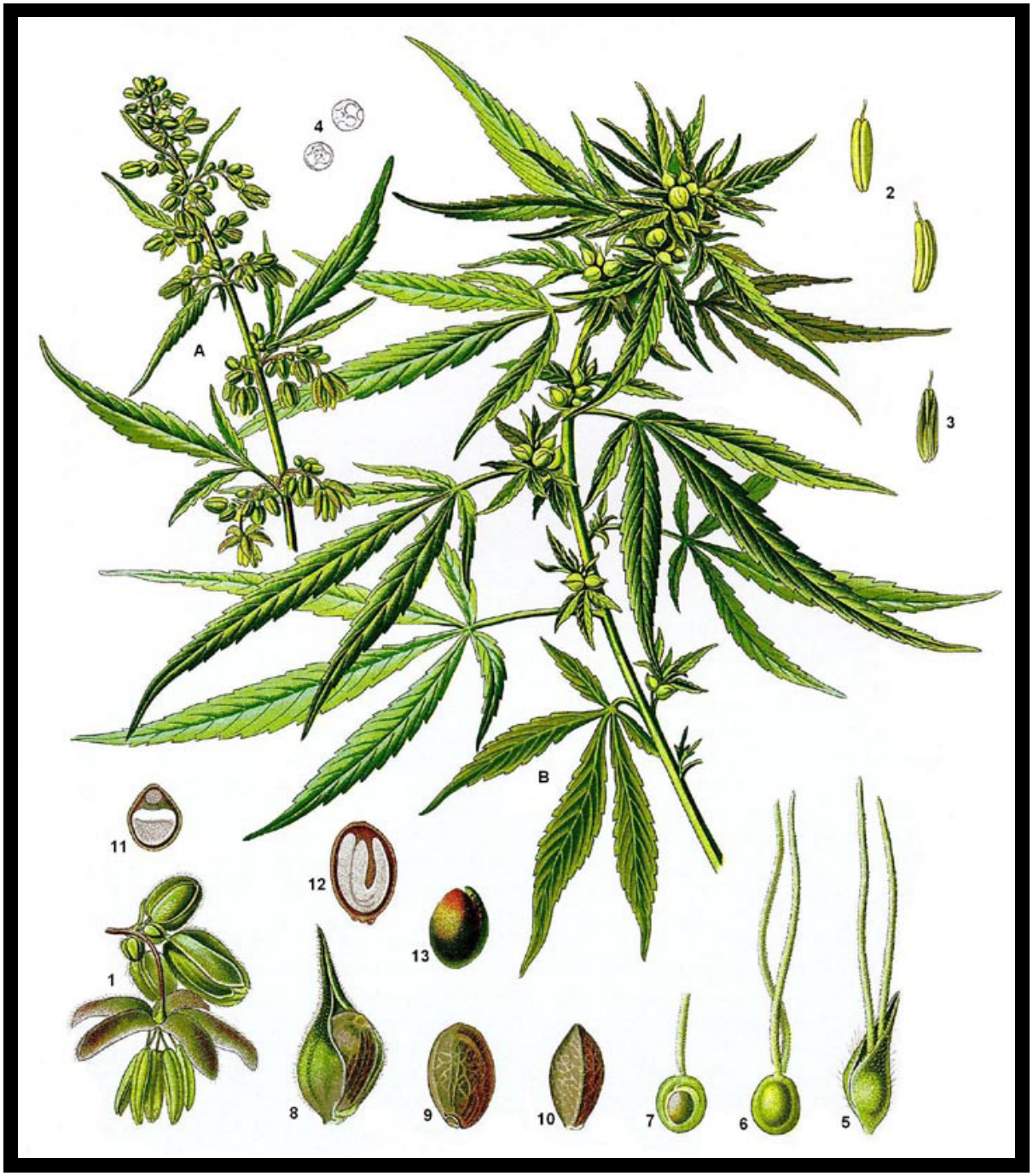
2.1.1. *Cannabis sativa* L.

Dünyanın birçok bölgesinde yaklaşık olarak 4500 yıldan beri yetiştirilen *Cannabis sativa* L. yetiştiği yörelere göre farklı isimlendirilir. Bu adlardan bazıları; hint keneviri, esrar, haşiş ve marijuana'dır (30-33).

Dişi ve erkek bitkiler olgunluğa erişinceye kadar birbirlerine benzer görünümdedirler. Olgunlaşma evresine gelindiğinde çiçeklerinde farklılık gözlenir. Erkek bitki; uç kısmında çiçek tozlarını yayabilen çiçeklere sahiptir. Dişi bitkinin çiçekleri ise bitkinin üst kısmında bulunmaktadır. Çok sayıda yaprak ve dallar arasına gömülmüş şekildedir. Erkek bitki, ip yapımında kullanılan liflerin elde edilmesi amacıyla yetiştirilir. Psikoaktif maddeler, dişi *C. sativa* bitkisinin çiçekli tepeleri ve dişi bitkinin tohumu etrafında bulunan yapraklarda

taşınmaktadır. Dişi bitkinin çiçekli tepelerinden salgılanan reçine "haşiş" adını alır (32, 34) (Şekil 2).

C. sativa'nın meyvemsi, floral ve tatlı aromaları vardır. Odaklayıcı ve enerji verici olduğu söylenmektedir. *C. sativa* (marijuana), kannabinoidlerin dışında yüzün üzerinde terpenoid ve aromatik kimyasalları içermektedir. Terpenoidler, aroma ve lezzeti sağlarlar. Ayrıca, *C. sativa* 20'nin üzerinde flavonoid bulundurur. Flavonoidlerin anti-inflammator, anti-oksidan özellikleri olduğu ve kanser ve diğer hastalıklara karşı korumaya yardımcı olduğu düşünülmektedir (29).



Şekil 2: *Cannabis sativa* L. bitkisinin morfolojisi (36). A: Erkek çiçek durumu (staminate), B: Dişi çiçek durumu (pistillate) 1: Staminate çiçek, 2: Stamen (anther ve filament), 3: Stamen, 4: Polen tanesi, 5: Pistillate çiçek (brakte ile birlikte), 6: Pistillate çiçek (braktesiz), 7: Boyuna kesitte pistillate çiçeğin ovaryumu, 8: Tohum (aken tip) (brakte ile birlikte), 9: Tohum (braktesiz), 10: Tohum (yandan görünüş), 11: Tohum (enine kesit), 12: Tohum (boyuna kesit), 13: Perikarpı soyulmuş tohum

2.2. Esrar

M.Ö. 3 bin yıllarında Çin ve Hindistan'da dini törenlerde kullanılan esrar, daha sonraları Orta Doğu Avrupa ve Amerika'ya yayılmıştır. Hint keneviri bitkisinin çiçek ve yapraklarının kurutulup doğranması ile elde edilmektedir. Rengi yeşil-gri'dir. Yasadışı maddeler arasında en sık kullanıma sahip olan esrar öforizan, sedatif ve halusinojen bir maddedir. Argo "ot" adı verilen esrarın preslenmiş haline ise "Bhang" adı verilmektedir (31).

Esrara coğrafi bölgelere göre değişik isimler verilmektedir. Batı ülkelerinde esrara karşılık genellikle "marijuana" terimi kullanılmaktadır. Diğer yandan, genellikle hint kenevirinin yaprak ve saplarından elde edildiğinde "marijuana", çiçeklerinden elde edildiğinde "haşhiş" terimi kullanılmaktadır (28, 37).

2.2.1. Yapısal Özellikleri

Hint keneviri (*C. sativa*) bitkisinden elde edilen, etkin maddesi tetrahidrokannabinol (THC) olan keyif verici başlıca yasadışı maddelerden biridir. Bitkinin üst filiz yapraklarından kannabis reçinesi (haşiş) elde edilmektedir (31).

Esrar veya kannabis reçinesi denilen reçine, içerisinde en az 61 kannabinoid ve 300'ün üzerinde doğal madde bulundurur. Bunlar arasında en etken psikoaktif madde Δ^9-THC'dir (30, 34).

Esrar içinde yaklaşık % 1-2 oranında Δ^9-THC maddesi bulundurur. Reçineden zengin olan esrarda bu oran daha fazladır (% 5-10). Dişi bitkide Δ^9-THC'nin yoğun olarak bulunma sırası reçine, çiçek ve son olarak da yapraklardır. Δ^9-THC yağda kolay çözünen bir madde olduğu

için, başta beyin olmak üzere diğer dokulara kolayca dağılabilir. Δ^9-THC, ana aktif metaboliti olan 11-hidroksi-THC'ye dönüşür ve bu etken madde 50 saate varan bir yarılanma ömrüne sahiptir. Yağ dokulara hızlıca dağılması nedeniyle esrarın etkileri yarılanma ömrüne oranla daha kısadır. Ancak, idrarda akut fizyolojik etkilerinin geçmesinden sonra da uzun süre saptanabilir. Esrar içimini takiben 30 dk süresince idrarda esrar negatifken, 30 dk sonrasında pozitif olur. Küçük bir odada pasif içicilerin idrarında dahi bulunabilir ve uzun süre kullanan insanların idrar tahlillerinde iki haftadan fazla bir süre pozitif kalabilir (30-32, 34, 37, 38).

Esrarın farklı tüketim şekilleri mevcuttur. Çoğunlukla sigara şeklinde içilmesinin yanında yenerek ya da enjeksiyon şeklinde de vücuda alınabilir. 10-20 dk içerisinde etkisini göstermeye başlar ve 2-6 saat kadar sürer. Solunum yolu ile alındığında etkisi 2-4 saat, sindirim yolu ile alındığında ise 5-12 saat kadar sürebilir. Esrarın insanlardaki letal dozu bilinmemektedir (30, 31, 34, 37, 39).

Esrar; alkol, amfetamin ve santral depresan ilaçların etkilerine benzer belirtilere neden olabilir. Yapılan çalışmalar kannabinoidlerin kanser tedavisinde kullanılabilirliği gösterilmiştir. Son yıllarda bazı ülkelerde esrarın, kanser tedavisinde kullanılan ilaçların oluşturduğu refrakter kusmaları ve şiddetli ağrıları önlemek amacıyla kullanımına izin verilmiştir (31, 40).

Esrarın yapılışında hint keneviri bitkisinin yüksek miktarda Δ^9-THC bulunduran kısımları kullanılmaktadır. Dişi çiçekler tamamen açıldıktan sonra bitkiler dip kısımlarından kesilerek gölgede kurutulur, bitki sonrasında ufalanır ve elenir. Eleme sonunda ince toz halinde elde edilen madde "toz esrar" olarak isimlendirilmektedir. Toz esrarın ısıtılarak kalıplaştırılması ile elde edilen plaka şeklindeki haline ise "plaka esrar" denilmektedir (28, 32).

Esrarın en önemli bileşenleri (41, 42) (Şekil 3);

- Δ^9-THC
- Kannabinol (CBN)
- Kannabidiol (CBD)
- Kannabikromen (CBC)'dir.

Δ^9-THC'nin miktarı; toz esrarda % 0.5-5, esrar reçinesinde % 2-10 ve sıvı esrar içerisinde % 10-30 civarındadır.

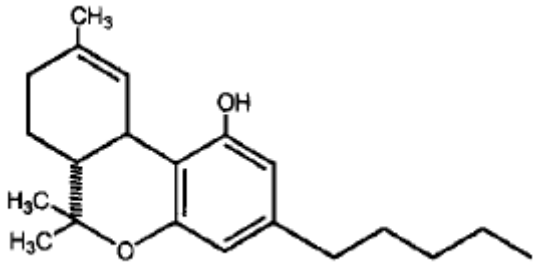
Türkiye'de esrar imali, satışı ve kullanılışı yasaktır. Esrar imal eden veya satışını yapanlara, Türk Ceza yasasının 403. Maddesi uyarınca, 10 yıldan az olmamak üzere hapis cezası verilir.

2.2.2. Kannabinoid

Marijuananın tedavi edici ve psikoaktif etkilerinin asıl sebebi doğal bileşenleri olan kannabinoidlerdir. Kannabinoid sistemin oksidatif streste etkili olduğu ileri sürülmektedir. Doğada yaklaşık olarak 86 kannabinoid tanımlanmıştır. Diğerleri ise kimyasal olarak sentezlenmektedir (3, 43).

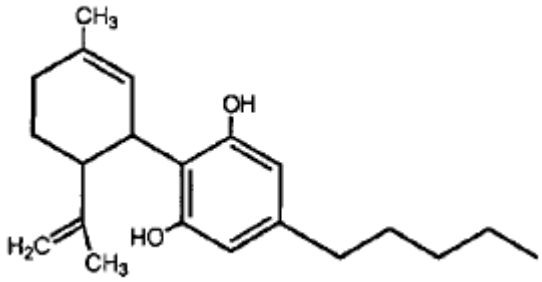
Kannabinoidlerin üç tipi vardır; bitkilerden sentez edilen bitkisel kannabinoidler, insan vücudundaki endojen kannabinoidler (N-araşidonil etanolamid ve anadamid) ve laboratuvarda sentezlenen sentetik kannabinoidlerdir (44). Endokannabinoidler, kannabinoid reseptörlerine bağlanabilen endojen yağlardır. Endokannabinoid sistem, enerji dengesinin ve besin alımının sağlanmasına, glukoz ve lipid metabolizmalarının düzenlenmesine katkıda bulunur (33).

- Doğal kannabinoidler
    - Δ^9-Tetrahidrokannabinol (Δ^9-THC)
    - Kannabidiol (CBD)
    - Kannabinol (CBN)
    - Kannabavarin (THCV)
    - Kannabigerol (CBG)
    - Kannabikrom (CBC)
    - Δ^8- Tetrahidrokannabinol (Δ^8-THC)
    - Kannabicilol (CBL)
    - Kannabitriol (CBT)
- Endojen kannabinoidler
    - 2-araşidonil gliserol (2-AG)
    - Anadamid (AEA)
- Sentetik kannabinoidlerdir
    - Rimonabant



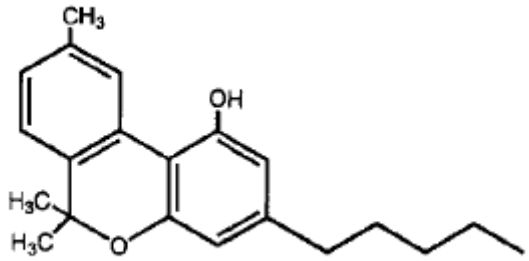
Δ^9-THC

CAS:	1972-08-3
Formule:	$C_{21}H_{30}O_2$
Moleküler ağırlığı:	314.46 gr/mol
Çözünürlüğü:	
Su	çözünmez
Etanol	çözünür
Kloroform	çözünür
Hekzan	çözünür



CBD

CAS:	13956-29-1
Formule:	$C_{21}H_{30}O_2$
Moleküler ağırlığı:	314.46 gr/mol
Çözünürlüğü:	
Su	çözünmez
Etanol	çözünür
Kloroform	çözünür
Hekzan	çözünür



CBN

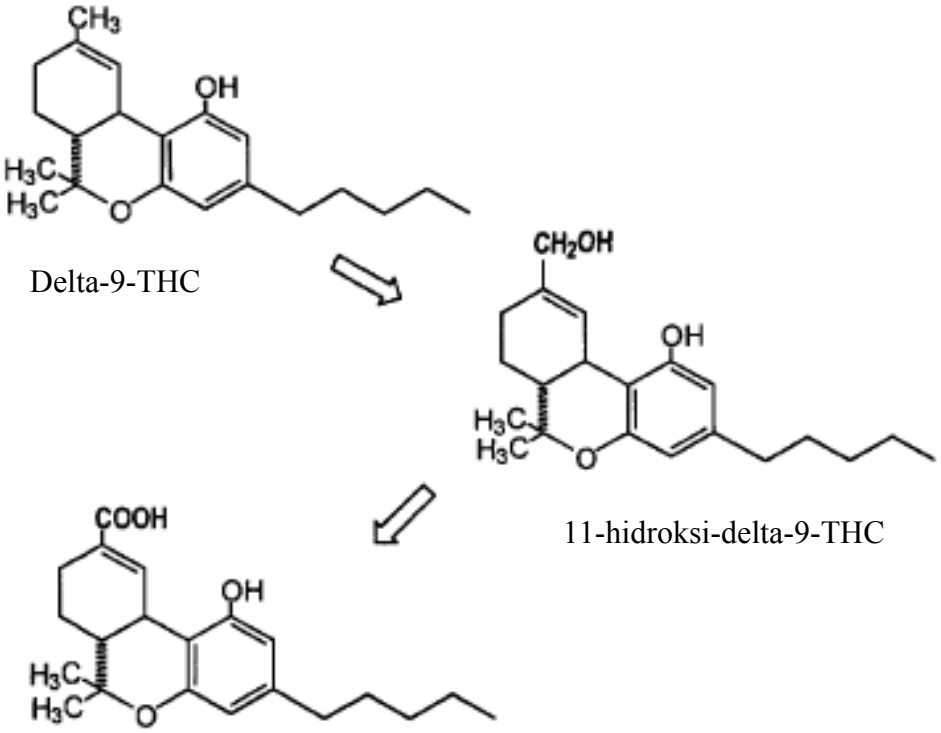
CAS:	521-35-7
Formule:	$C_{21}H_{26}O_2$
Moleküler ağırlığı:	310.43 gr/mol
Çözünürlüğü:	
Su	çözünmez
Etanol	çözünür
Kloroform	çözünür
Hekzan	çözünür

Şekil 3: Kannabis ekstraktlarında doğal olarak bulunan en önemli bileşenler (36)

2.2.3. Δ^9-Tetrahidrokannabinol (Δ^9-THC)

Δ^9-THC beyindeki spesifik kannabinoid reseptörlerini etkinleştirmektedir. Bu reseptörler, hafıza, düşünce, nörogenez, konsantrasyon, koordine hareketler, zaman ve derinlik algısı ile ilgilidir. Δ^9-THC serebellumun normal fonksiyonlarında da etkinlik sağlar. Δ^9-THC'nin bellek üzerine olan etkisi özellikle hipokampus bölgesindedir. Bunun nedeni kannabinoid reseptör içeriğinin burada fazla olmasıdır (38, 45).

Δ^9-THC'nin terapötik oral dozunun 2.5-20 mg arasında olduğu bildirilmiştir. Kannabis bitkisinde Δ^9-THC aktif formda bulunmaz. Tetrahidrokannabinolik asit (THCA) olarak bilinen bir formda oluşur. Marijuana sigara olarak yakıldığında, THCA hızlıca Δ^9-THC'ye dönüşür. Marijunanın çiğ olarak tüketilmesi ciddi bir psikoaktif etkiye neden olmamaktadır. Bunun sebebi; THCA'nın Δ^9-THC'a dönüşmemesidir. Marijuana reçinesi ise yüksek miktarda aktif Δ^9-THC içermektedir. Δ^9-THC, aktif metaboliti olan 11-hidroksi-delta9-THC (11-OH-THC)'ye sonra ise inaktif 11-nor-9-karboksi-delta9-THC (THCCOOH)'a dönüşür. Pasif kannabis içicilerinin kan ve idrar örneklerinde kannabinoid konsantrasyonu az da olsa tespit edilebilmektedir (3, 29, 38, 46) (Şekil 4).



Şekil 4: Δ^9-THC'nin metabolik yolu (47)

Δ^9-THC'nin ROT'lara karşı koruyucu etki yapmasının antioksidan özelliği göstermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca Δ^9-THC'nin total lipid metabolizmasında düzenleyici olarak rol oynadığı bilinmektedir (48, 49).

2.2.4. Bağımlılık

İlaç bağımlılığı başlıca üç özellik ile karakterize edilebilir (34).

- Tolerans
- Fiziksel bağımlılık
- Psişik bağımlılık

Tolerans "bir kimyasal maddenin veya ilacın beklenen etkisine göre cevabın azalması" şeklinde tanımlanmaktadır.

Fiziksel bağımlılık "ilaca maruz kalma sonucu, özellikle sinir sisteminin normal fonksiyonları için, ilaca gereksinim duyulması" olarak tanımlanabilir.

Psişik bağımlılık ise " ilaca karşı ruhsal zorunluluk duyma" ile ilgilidir.

İlaçlara karşı psişik bağımlılık tek başına görülebildiği halde, fiziksel bağımlılık psişik bağımlılıkla birlikte gelişmektedir. Kannabis ile psişik bağımlılık görülürken, tolerans ve fiziksel bağımlılık gelişmez; sigara ve kahve içme alışkanlığında ise psişik bağımlılık kuvvetlidir. Baş ağrısı, huzursuzluk, sinirlilik gibi nörolojik bozukluklar ortaya çıkabilir. Yapılan çalışma sonuçlarına göre, esrarın ne bedensel, ne de ruhsal zararları konusunda tam olarak bir görüş birliği oluşturulamamıştır (28, 30, 34).

2.2.5. Kannabinoid Reseptörleri

G proteinlerine bağlı reseptörler sinyal iletimini bağlı oldukları G proteinleri ile sağlarlar. G proteinleri heterodimerik yapıdadır ve hücre membranının sitoplazmik yüzüne yerleşik olarak bulunurlar. α, β ve γ olmak üzere üç alt birimlerinden meydana gelen G proteinleri 1000'in üzerinde hücre yüzey reseptörüne bağlanarak, enzim ve iyon kanalı gibi farklı efektörler üzerinden sinyal iletimine aracılık ederler. G proteinleri α alt birimlerine göre 4 sınıfa ayrılırlar. G proteinleri aktif değilken α, β ve γ alt birimleri bir arada ve α alt birimine guanozin difosfat bağlı şekilde bulunur. G proteinine bağlı reseptöre agonistin bağlanmasının ardından, uyarılan reseptör G proteini ile etkileşime girer. Guanozin difosfat G proteininin α alt biriminden ayrılır ve guanozin trifosfat bağlanır. Sonrasında G protein alt birimleri α ve βγ

olarak ayrılır. α alt birimi efektör proteinini etkinleştirir. α alt biriminin bağlı olduğu guanozin trifosfat guanozin difosfat'a hidrolizlenmesi ile α monomeri ile βγ dimeri yeniden biraraya gelir. βγ alt birimleri de α gibi G proteinlerine bağlanarak efektörleri uyarabilirler (50-52).

Her iki kannabinoid 1 (CB1) ve kannabinoid 2 (CB2) reseptörleri G proteine bağlı reseptörlerdir. Kannabinoid reseptörlerin fonksiyonları arasında adenil siklazın inhibisyonu ve iyon kanallarının düzenlenmesi sayılabilir. Bu iki reseptörün arasındaki farklar; amino asid düzeni, sinyal mekanizmaları, doku dağılımları, agonist ve antagonistlere olan duyarlılıklarıdır (53-55).

Bu reseptörlerden; CB1 reseptörleri çoğunlukla beyin bölgelerinde dağılmış olmakla birlikte (56, 57), pankreas ve bazı periferal organlarda da bulunduğu bildirilmiştir (12, 58). CB1 reseptörleri santral sinir sisteminde baskın olan kannabinoid reseptörleri iken, CB2 reseptörleri periferal organlarda bulunmaktadır ve kannabinoidlerin bağışıklık sistemi üzerindeki etkileriyle ilişkilendirilmektedir (59). Son zamanlarda, üçüncü kannabinoid reseptörü olarak önerilen G proteine bağlı reseptör 55 (GPR55)'in pankreas adacıklarında insulin sekresyonunu uyardığı ileri sürülmüştür (60) (Tablo 1).

Kannabinoid reseptörlerine bağlanan ligandlar agonist ya da antagonist olabilirler. SR141716A, AM251, AM281, SR144528 ve LY320135 sentetik CB1 reseptör antagonistlerinden bazılarıdır. HU-210, HU-211, CP-55940 ve WIN-5521-2 ise sentetik CB1 reseptör agonistleridir. Sentetik AM630 ve SR144528 CB2 reseptörü için antagonist etki gösterirken, JWH 015 ve HU-308 agonist olarak görev yapar. Bitkisel kannabinoid olan Δ^9-THC ise hem CB1 hem de CB2 reseptörlerinin agonistidir (55, 61).

Tablo 1: Kronoloji (55, 62-64)

Kronoloji	Yıl
***C. sativa*'nın aktif yapısı olan Δ^9-THC'nin izole edilmesi**	1964
Sıçan beyninde kannabinoid bağlanma yerlerinin keşfi	1988
Sıçan CB1 reseptörünün klonlanması	1990
İnsan CB1 reseptörünün klonlanması	1991
Anandamid'in keşfedilmesi	1992
CB2 reseptörünün klonlanması	1993
2-AG'nin izole edilmesi	1995
GPR55'in bulunması	1999
Endokannabinoid sistemin metabolik fonksiyonları ve çeşitli hastalıklar ile ilgili çalışmalar	2000-2012

2.3. Diabetes Mellitus

Ciddi kronik metabolik bir hastalık olan diabetes mellitus; lipid, karbonhidrat ve protein metabolizmalarının bozukluğu ile oluşan hiperglisemi ile karakterizedir. Diabetes mellitus'a insulin üretiminin eksikliği ya da insulin direncinin artması sebep olur. Hiperglisemi semptomları arasında poliüri, polidipsi, polifaji, kilo kaybı, görmede bozukluk ve enfeksiyonlara yatkınlık görülmektedir (65-68). Dört grup altında sınıflandırılır (19, 69).

Sınıflama:

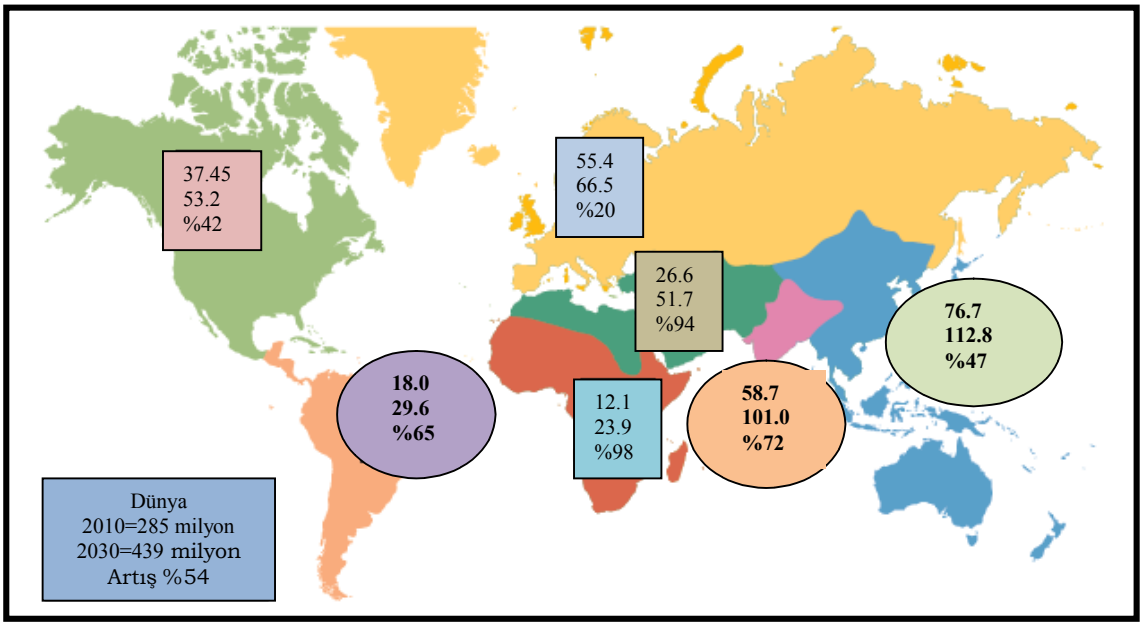
I. Tip-1 diyabet
    a. İmmun aracılı
    b. İdiyopatik
    c. İnsulin yetersizliği
II. Tip-2 diyabet
III. Gestasyonel diabetes mellitus (GDM)
IV. Diğer spesifik diyabet tipleri
    a. Beta hücre fonksiyonlarının genetik defekti
    b. İnsulinin etkisindeki genetik defektler
    c. Pankreasın ekzokrin doku hastalıkları
    d. Endokrinopatiler
    e. İlaç veya kimyasal ajanlar
    f. İmmun aracılı nadir diyabet formları
    g. Diyabetle ilişkili genetik sendromlar

2.3.1. Epidemiyoloji

Diyabet, dünyadaki ölüm nedenlerinin ilk beşi içerisinde yer almaktadır. 2010 yılında dünyadaki erişkinler arasında (20-79 yaş arası) yaklaşık 285 milyon diyabet hastası bulunmaktadır ve bu sayının 2030 yılına kadar 439 milyonu bulacağı tahmin edilmektedir.

Gelişmekte olan ülkelerde ki artışın % 69, gelişmiş ülkelerde ise % 20 civarında olabileceği bildirilmektedir. Her yıl diyabet komplikasyonlarına bağlı olarak 3.2 milyon civarı kişinin ölümünün gerçekleştiği böylece her bir dakikada 6 kişinin öldüğü belirtilmiştir (66, 70) (Şekil 5).

Diyabet insidansı, farklı etnik gruplar ve ülkeler arasında farklılık göstermektedir. Tip-2 DM tüm diyabet vakalarının % 80-90'ını oluştururken Tip-1 Diabetes Mellitus (Tip-1 DM) % 5-10'unu oluşturmaktadır (19, 68).



Şekil 5: 2010-2030 yılları arasında diyabetin Dünya'daki tahmini dağılımı. Dünya'daki 7 bölgeye ait diabetes mellitus'lu hastaların 2010 ve 2030 yıllarına ait tahmini değerleri (milyon), ayrıca artış yüzdeleri gösterilmekte (71)

2010 yılında, Türkiye'de dünya nüfusunun standart dağılımına göre diyabet prevelans % 8.0 iken 2030 yılında bu oranın % 9.4' yükseleceği tahmin edilmektedir. 2010 yılında % 7.4 olan ulusal prevalansın ise % 9.6 civarını bulacağı düşünülmektedir (70).

2.3.2. Tip-2 Diyabet

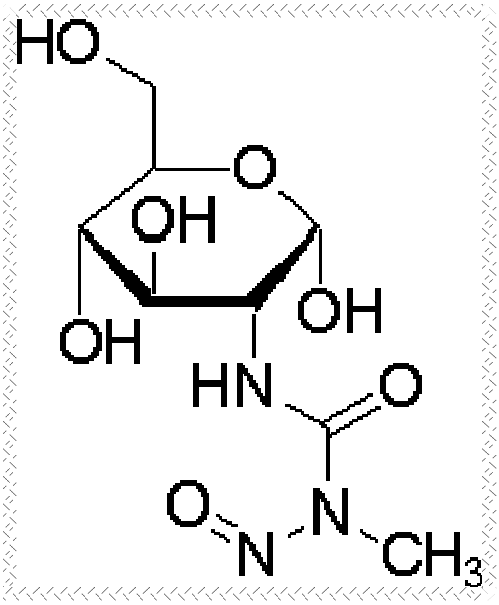
Tip-2 DM, tüm diyabet vakalarının % 80-90'ını oluşturmaktadır. Bozulmuş insulin direnci veya bozulmuş insulin sekresyonu sonucunda ortaya çıkar (19). Tip-2 DM'un gelişmesinde genetik faktörlerin yanında çevresel faktörlerin de büyük rolü vardır. Tip-2 DM'da önemli defektlerden biri glukagon sekresyonunun inhibe edilememesidir (68, 69). Dislipidemi,

sıklıkla diyabete eşlik eden bir bulgudur. Düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ve trigliserid (TG) seviyelerinde artma ve yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) seviyesinde düşüklük ile karakterizedir (72, 73). Dislipidemide ilk hedef LDL-kolesterolu düşürmek, ikinci hedef ise total kolesterol/HDL-kolesterol oranını düşürmektedir (69).

2.3.3. Deneysel Tip-2 Diyabet Modelleri

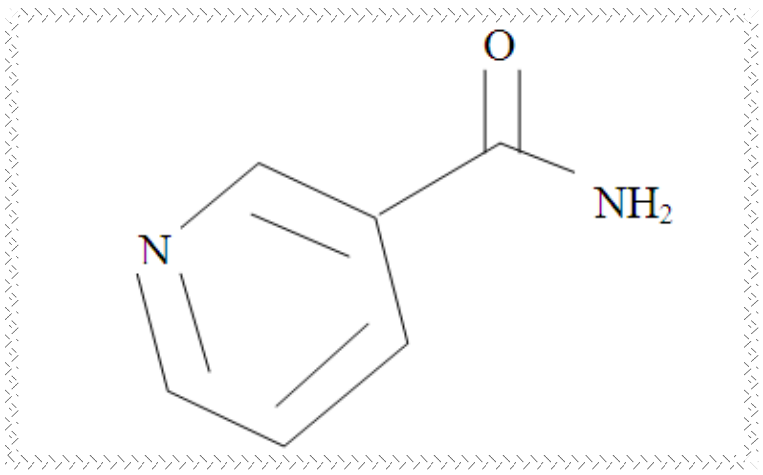
- Kimyasal modeller (streptozotosin, alloksan),
- Cerrahi modeller (pankreatektomi, hipotalamik lezyon),
- Diyet (yüksek yağlı ve şekerli diyetle beslenme),
- Hormonlar, insulin karşıtı hormonların yüksek dozları, hiperinsulinemiye uzun süreli maruz kalma gibi (74).

Streptomycetes achromogenes'den sentezlenen streptozotosin (STZ, 2-deoksi-2-[3-metil-nitrosourido]-D-glukopiranoz)'in yarılanma ömrü yaklaşık 15 dakikadır (Şekil 6). Tip-I ve Tip-2 DM'a neden olan geniş kullanıma sahip bir kimyasaldır. STZ vücutta serbest radikallerin üretimini arttırmaktadır. Özellikle pankreas beta hücrelerinde deoksiribonükleik asit (DNA) kırıklarına neden olur. Bu da pankreas beta hücrelerinin fonksiyonlarının zarar görmesine neden olur ve sonraki evrede de beta hücreleri nekrozla yok edilir. Bu süreç DNA tamiri için poli-ADP riboz sentezini aktive eder ve tamir için nikotinamid dinükleotid'in büyük bir miktarı tüketilir (25, 75, 76).



Şekil 6: Streptozotosin (STZ)'in yapısı (77)

B vitamini ailesinden olan nikotinamid (NAD), otoimmün mekanizmayla beta hücrelerinin yok edilmesi sırasında interlökin 1 (IL-1) ile aktive olan nitrik oksit sentetaz oluşumunu engeller (Şekil 7). Böylece nitrik oksit (NO) radikallerinin oluşumu önlenir. Ayrıca, poli-ADP riboz polimerazı inhibe ederek beta hücrelerinde NAD'ın azalmasını önler ve beta hücrelerinin hasarını azaltır (78).

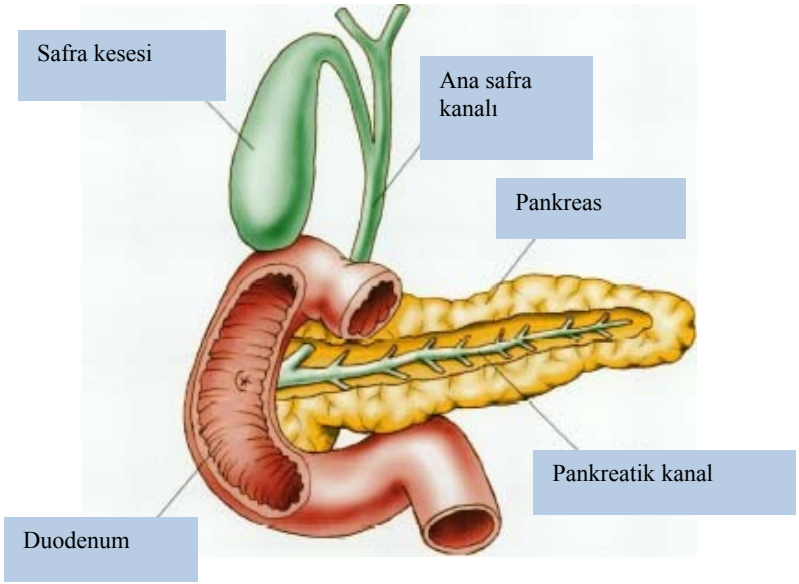


Şekil 7: Nikotinamid (NAD)'in yapısı (79)

Erişkin sıçanlarda tip-2 diyabet oluşturmak için STZ enjeksiyonu ile birlikte kısmi koruyucu dozda NAD'ın da uygulanması gerekmektedir. Böylece beta hücre kitlesi % 40 azalmış, orta derecede hiperglisemili bir model oluşturulur (74, 80-82).

2.3.4. Pankreas

Pankreas, sarımsı renkte, yumuşak ve üzüm salkımı biçiminde bir organdır. Baş, boyun, gövde ve kuyruk olmak üzere dört bölüme ayrılır. Pankreasın en geniş bölümü baş kısmı olup duodenum kavisinin içinde yer alır. Kuyruk kısmı ise dalağın hilusuna kadar uzanır (83, 84) (Şekil 8).

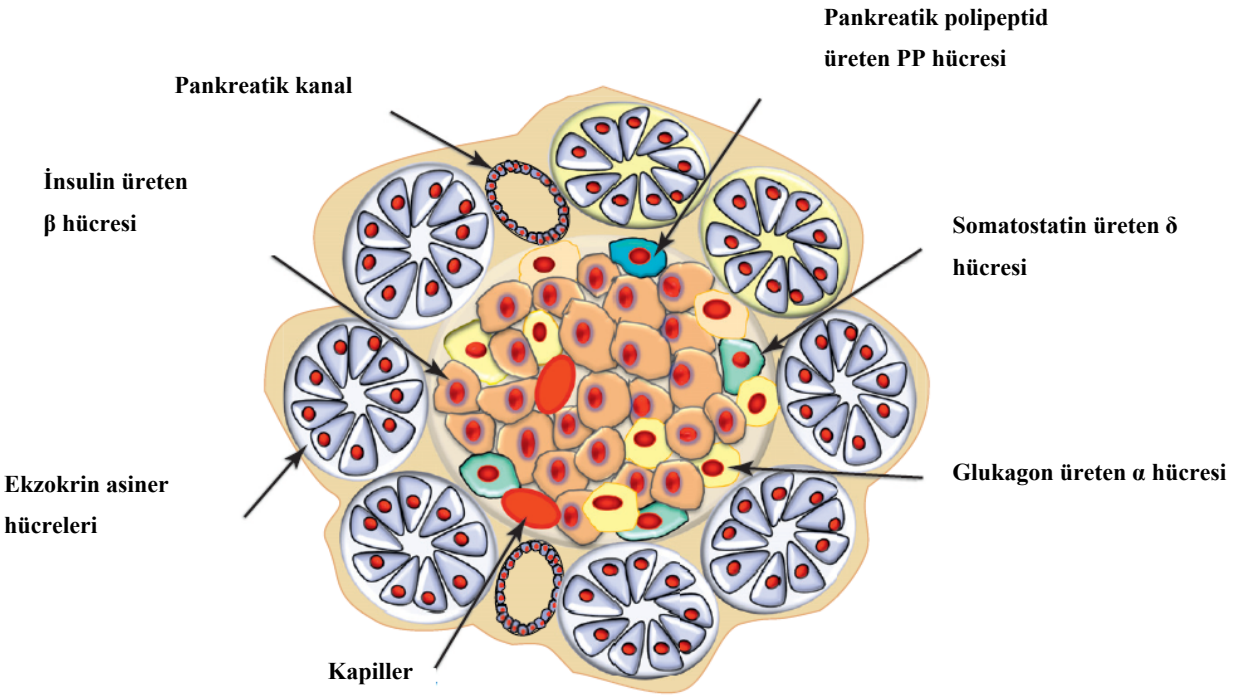


Şekil 8: Pankreas (85)

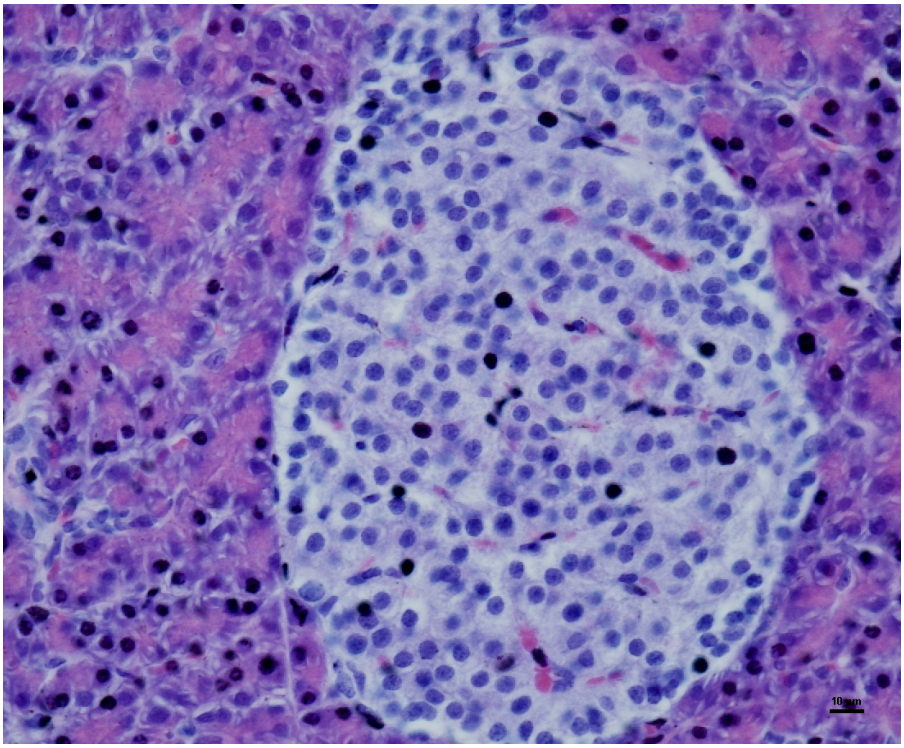
Pankreas sindirim enzimleri ve hormonları üreten karma (ekzokrin ve endokrin) bir bezdir. Ekzokrin kısımdaki hücreler enzimlerin depolanması ve salınmasında görevlidir. Endokrin kısım olarak bilinen Langerhans adacıkları tarafından da hormonlar sentez edilir. Pankreasın ekzokrin bölümünü asiner hücreler ve duktal (sentrosiner, kanal) hücreler olarak iki farklı hücre tipi oluşturur. Bu hücrelerin % 90'ını amilaz, proteaz ve lipaz enzimleri sentezleyen

asiner hücreler oluştururken sentrosiner hücreler % 5'lik kısmını oluşturur. Ekzokrin hücreler tüm pankreasın % 82'lik kısmını kapsar (83-86).

Pankreas dokusunun % 1-2'sini Langerhans adacıkları oluşturur. Paul Langerhans'ın 1869'da adacıklardaki hücre kümelerini tanımlamasının ardından Langerhans adacıkları olarak adlandırılmıştır. Langerhans adacıklar yoğun olarak kuyruk kısmında olmak üzere tüm pankreasda bulunur. Pankreas salgıları doğrudan kana karışır. Langerhans adacıklarında 5 majör hücre tipi mevcuttur. α hücreleri glukagon, β hücreleri insulin, δ hücreleri somatostatin, ε hücreleri ghrelin ve PP hücreleri ise pankreatik polipeptid (PP) salgılarlar (83-88) (Şekil 9, 10).



Şekil 9: Langerhans adacık hücre tipleri ve ekzokrin asiner hücrelerin şematik görüntüsü (89).



Şekil 10: Langerhans adacığının mikroskobik görüntüsü (H&E)

2.4. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

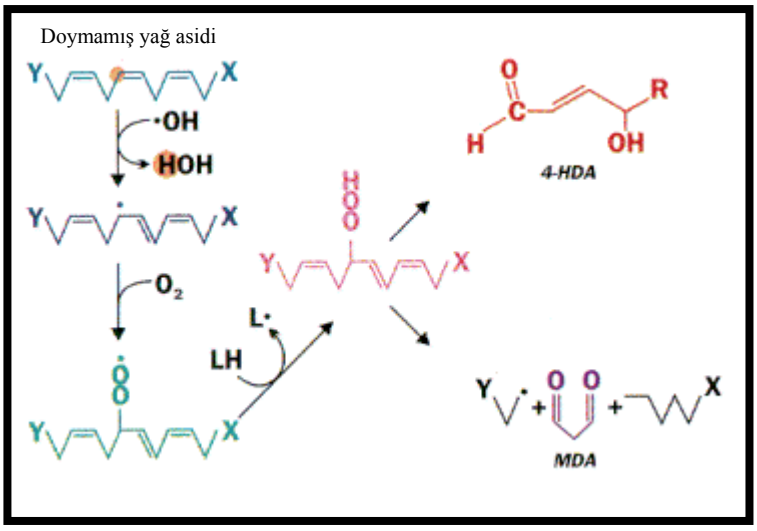
Serbest radikaller birçok fizyolojik veya patolojik reaksiyonlar esnasında oluşabilen, dış orbitalinde eşleşmemiş elektron bulunduran reaktif moleküllerdir. Reaktif halde bulunan moleküller protein, lipid ve nükleik asitler gibi önemli makromoleküllere hasar verebilirler. Serbest radikaller vücut dışından gelebileceği gibi endojen olarak da oluşturulabilirler (90-92).

Dayanıksız ve reaktif moleküller olan serbest radikallerin elektronları hücrelerdeki diğer moleküllerle etkileşime girerek oksidatif stres meydana getirirler. Oksidatif stres, organizmadaki pro-oksidan ve anti-oksidan dengenin pro-oksidanlar lehine bozulmasıdır. Lipid peroksidasyonu, protein karbonil ve DNA oksidasyonu oksidatif stres için biyolojik belirteçlerdir (93-95).

2.4.1. Lipid Oksidasyonu

Lipidlerin oksitlenmesi 3 farklı mekanizma ile gerçekleşir. Bunlar; enzimatik oksidasyon, enzimatik olmayan serbest radikal aracılı oksidasyon, enzimatik ve radikal aracılı olmayan oksidasyon. Her bir oksidasyon sonucunda ürün oluşur (96).

Serbest radikallerin oluşturduğu çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak tanımlanmaktadır. Yağ asitlerinin oksidasyonu serbest radikallerle reaksiyona giren yağ asitlerinin metilen gruplarından bir hidrojen atomunun koparılmasıyla başlar ve lipid radikalini oluşturur. Daha sonra oluşan lipid radikalinin oksijenle reaksiyona girmesiyle de lipid hidroperoksitleri meydana gelir. Lipid hidroperoksitlerin yıkımı ile malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksi alkenaller oluşur. Oluşan bu bileşikler hücre hasarına neden olurlar (96, 97) (Şekil 11).



Şekil 11: Doymamış lipid peroksidasyonu sonucu oluşan ürünler; 4-hidroksialkenaller (4-HDA) ve malondialdehit (MDA) (98).

2.4.2. Protein Oksidasyonu

ROT'lar ile proteinlerin reaksiyonu sonucunda protein oksidasyonu meydana gelmektedir. Proteinlerin oksidatif reaksiyonlarının olası sonuçları; amino asit yan zincirlerinin hidroksil ya da karbonil gruplarının modifikasyonu, protein-protein çapraz bağlarının oluşumu, polipeptid zincirlerinin parçalanmasıdır. Protein oksidatif modifikasyonlarının birçok türü bulunmasına rağmen oksidatif kaynaklı protein hasarının en genel belirteci protein karbonil gruplarıdır. Protein karbonil grupları en çok kullanılan protein oksidasyon belirtecidir (93, 99).

2.4.3. DNA Oksidasyonu

DNA molekülünün dayanıklı bir kimyasal yapıya sahip olduğu bilinmesine rağmen, oksidatif strese maruz kaldığında, farklı mekanizmalarla bir takım hasarlar meydana gelmektedir. Bunlardan bazıları, DNA üzerinde baz ve şeker modifikasyonları, tek ve çift zincir kırıkları, DNA-protein çapraz bağlanmasıdır. DNA bileşenleri içerisinde en düşük iyonizasyon potansiyeline sahip olan guanin serbest radikallerin etkilerine açıktır. Oksidatif hasar sonucunda guanin'in sekizinci karbon atomuna hidroksil radikali ataklarının sonucunda 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin oluşur. Bu da oksidatif DNA hasarının bir göstergesi olarak kabul görmektedir (100, 101).

2.5. Antioksidan Sistem

Antioksidanlar ve antioksidan enzimler, hücreleri serbest radikallere karşı korumada rol oynarlar. Organizmaların serbest radikallerin etkilerini önlemek veya geciktirmek için vücutta görev yapan savunma sistemlerine antioksidan savunma sistemleri adı verilir. Oksidatif strese karşı zincirleme şekilde ilerleyen lipid peroksidasyonu gibi serbest radikal üreten basamaklara etki ederek, direkt ROT konsantrasyonunu azaltarak, serbest radikal üretimini başlatan ilk

radikali etkisiz hale getirerek ya da geçiş metalleri ile şelat oluşturarak savunma yaparlar (98, 99).

C, E vitaminleri, enzimler (SOD ve CAT) ve substratlar (GSH) gibi antioksidan bileşikler antioksidan savunma mekanizmalarında rol oynar (93, 104) (Şekil 12).

2.5.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

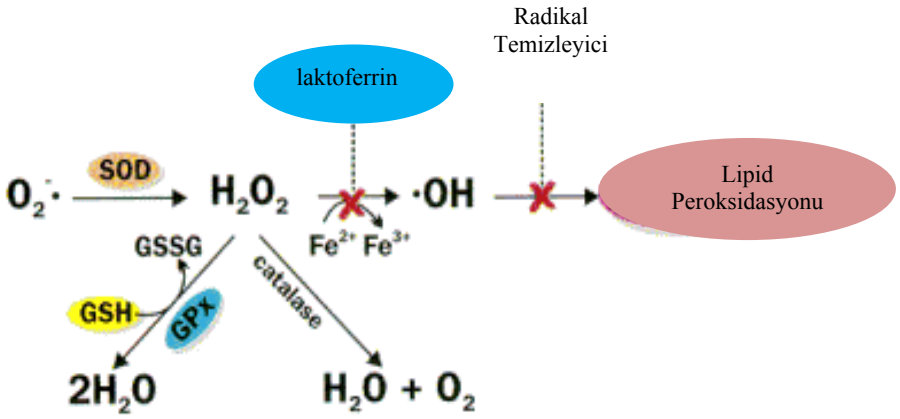
SOD süperoksidin hidrojen peroksid (H_2O_2)'e dismutasyonunu katalize eden bir metaloenzimdir. Bu enzim süperoksit radikallerini etkisizleştirerek, hücreleri süperoksit radikalinin zararlı etkilerinden korur. Mitokondride Mn-SOD, sitozolde Cu-Zn SOD ve plazmadaki süperoksid radikallerini metabolize eden vasküler endotele bağlı Cu-SOD yer alır. Demir süperoksit dismutaz (FeSOD) bitki ve bazı bakteri hücrelerinin sitozolünde bulunan prokaryotik bir enzimdir. En son tanımlanan süperoksit dismutaz enzimi ise Streptomyces bakterisinden izole edilen nikel süperoksit dismutazdır (NiSOD) (92, 97, 105).

2.5.2. Katalaz (CAT)

Peroksizomlarda ve sitozolde bulunan katalaz (CAT) yapısında hem içeren bir proteindir. CAT, SOD tarafından dismutasyon tepkimesinde veya ksantin oksidaz, ürat oksidaz, ve D-amino asid oksidazlar tarafından değişik tepkimelerde oluşan H_2O_2 molekülünün suya ve oksijene parçalanmasını katalizler ve böylece dokuyu yüksek reaktif hidroksil radikallerden korur. CAT enzimi başta karaciğer olmak üzere tüm organlarda bulunur. Özellikle peroksizomlarda, daha az oranda sitozol ve mikrozomal bölümde bulunan CAT antioksidan bir enzimdir (70, 106).

2.5.3. Glutatyon (GSH)

Organizmanın bütün hücrelerinde bulunan glutatyon (GSH) zararlı bileşiklerin etkisizleştirilmesinde önemli rol oynar. GSH antioksidan enzimlere substrat olarak görev yapar böylece radikal kaynaklı hasarı engeller. Ayrıca, okside hemoglobin glutatyonla indirgenmektedir. Proteinlerdeki sülfhidril (-SH) gruplarının redükte halde kalmasını sağlar ve bu grupları oksidasyona karşı korur (70, 107). Oksidatif stres GSH konsantrasyonunun azalmasına neden olur. GSH'ın DNA, protein ve lipid gibi hücresel makromoleküllerini çevresel ve sitotoksik ajanlara karşı koruyucu etkisi vardır. ROT'lar hücresel GSH'ı okside etmektedir (103, 107).



Şekil 12: Reaktif oksijen türevleri (ROT)'ne karşı savunma mekanizması. Süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon (GSH), glutatyon disülfid (GSSG), glutatyon peroksidaz (GPx) (98).

2.6. Diyabet ve Oksidatif Stres

Diyabet, yüksek kan glukoz konsantrasyonlarına maruz kalınması sonucunda ROT'ların artması nedeniyle oluşur. Diyabette lipid peroksidasyonunun arttığı ve antioksidan

mekanizmaların bozulduğu bildirilmektedir. Non enzimatik glukozilasyonun glukozun oto-oksidasyonu ile ilişkili olduğu ve glukozillenmiş proteinlerin serbest radikal oluşumunda çok önemli rol oynadığı bilinmektedir (97, 109, 110).

Oksidatif strese duyarlı beta hücrelerinde gözlenen hasar, hipergliseminin toksik etkilerinden kaynaklanmaktadır. Buna karşın antioksidan enzimler beta hücrelerini glukoz toksisitesinden korumaktadır. Beta hücrelerinde ROT'un en önemli kaynağı mitokondridir (110-112).

2.7. İmmunohistokimya Yöntemi

İlk kez 1941 yılında Coons ve ark. tarafından floresan işaretli bir antikor kullanılarak antijenlerin tespit edilmesi için kullanılmıştır. İmmunohistokimya, antijen-antikor etkileşimlerinden yararlanarak hücre veya dokulardaki spesifik makromoleküllerin varlığının tespit edilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem, her birine özgül antikorların kullanılması ile hücrelerin kökenlerinin, farklılaşma derecelerinin, çoğalma, invazyon, inflamasyon ve dejenerasyon gibi hücresel cevapların mikroskopik olarak gösterilmesini sağlar (86, 113).

Belirli antijenleri içeren doku kesiti, bu antijenlere karşı işaretlenmiş antikorlara sahip çözeltilerle inkübasyona bırakıldığında, antikorlar spesifik olarak antijenlere bağlanır ve böylece antijen-antikor kompleksi oluşur. Işık veya elektron mikroskopları kullanılarak antijen-antikor kompleksinin yerleri saptanabilir (86, 113).

İşaretli Antikor Yöntemi (86, 113)

Antikorların işaretlenmesinde en çok kullanılan üç yöntem;

- *Floresan bir bileşikle eşleşme:*

  Floresan mikroskop kullanılarak spesifik antijenlerin yerleri saptanabilir.

- *Kolloidal metal bir bileşikle eşleşme:*

  İşaretleyici olarak en çok her iki mikroskopta (ışık ve elektron) da izlenebilen altın partikülleri kullanılmaktadır.

- *Bir enzimle eşleşme:*

  En yaygın kullanılan işaretleme yöntemidir. Işık mikroskobunda immunohistokimyasal boyama yöntemleri ile işaretlenmenin görülebilir hale gelebilmesi için enzim-substrat reaksiyonuna bağlı olarak ortaya çıkan son ürünün renkli bir şekilde gözlenebilmesi gerekir. İşaretleme için en çok kullanılan enzimlerden biri peroksidaz diğeri ise alkali fosfataz'dır.

  Kullanılan renkli madde öncülleri (kromojen) şunlardır;

  1- Peroksidaz geliştirmek için kullanılan kromojenler,

  - 3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB): reaksiyon ürünü kahverengidir. Kanserojen bir maddedir. Solüsyon karanlıkta ve buzlukta saklanmalıdır.
  - 3-amino-9-ethyl carbazole (AEC): son ürün kırmızı renklidir. Işığa çok hassastır.
  - 4-chloro-1-naphthol (CN): reaksiyon ürünü koyu mavidir.
  - Tetrametil benzidin: reaksiyon ürünü mavidir.

  2- Alkali fosfataz geliştirmek için kullanılan kromojenler,

  - Fast Red/Naphthol AS: reaksiyon ürünü kırmızıdır.
  - 5-bromo-4chloro-3indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT): ürün rengi mavi mor'dur.

Antijenin Konumunun Belirlendiği Yöntemler (86, 113)

Direkt ve indirekt olarak iki yöntem bulunmaktadır.

- Direkt Yöntem

  Antijenin, spesifik işaretli antikoru ile direkt olarak bağlanması prensibine dayanır. En çok kullanılan antikor işaretleme yöntemleri; flurokrom, peroksidaz ve alkali fosfataz'dır.

- İndirekt Yöntem

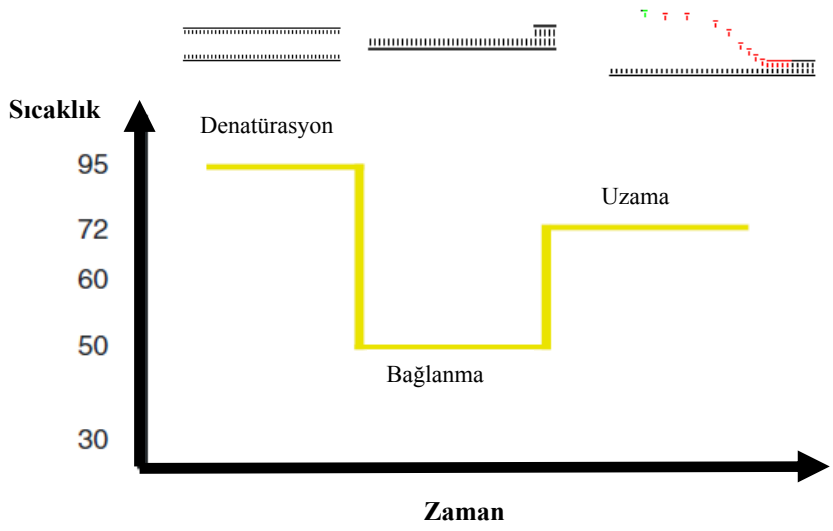
  Direkt yönteme göre daha hassas olan bu metodda, antijen ile bağlantıya girecek olan primer antikor işaretsizdir. İşaretlenmiş ikinci (sekonder) bir antikor kullanılır. Sekonder antikor, primer antikorun farklı antijenik bölgelerine bağlanması sonucu oluşan reaksiyon gözlenir. En yaygın kullanılan antikor işaretleme peroksidaz yöntemidir.

  - Avidin-Biotin Yöntemi

    Yumurta akından elde edilen bir glikoprotein olan avidin (MA 67 kD), suda eriyen bir vitamin olan biotine yüksek affinite gösterir. Biotinin bağlanması için dört yapı bulundurur. Biotin işaretleme maddesi olarak primer veya sekonder antikora bağlanabilir. Avidinin yüksek bir izoelektrik noktaya sahip olması (~ 10) ona dezavantaj sağlar. Avidinin yerine *Streptomyces avidinii* adlı bakteriden izole edilen ve biotine yüksek oranda bağlanma affinitesine sahip bir protein olan streptavidin molekülü (MA 60 kD) tercih edilebilir. İzoelektrik noktası nötr pH'ya yakın olduğu için daha kullanışlıdır.

2.8. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), *in vitro*'da spesifik bir DNA parçasının primerler tarafından yönlendirilerek, enzimatik olarak çoğaltılması işlemidir. DNA molekülünde hedef dizilere primerlerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır. Her bir PZR döngüsü denatürasyon, primerlerin bağlanması ve uzama aşamalarından oluşur. Denatürasyon evresi +95 °C'de gerçekleşir, çift iplikli DNA molekülü tek iplikli şekle dönüşür. Primerlerin bağlanma evresi +50-65 °C'de meydana gelir. Bu evreden sonra *taq* polimeraz için optimum sıcaklık olan +72 °C'ye çıkar, uzama aşaması bu sıcaklıktadır (114-116) (Şekil 13).



Şekil 13: PZR sıcaklık döngüleri; (1) denatürasyon +95 °C, (2) primerin bağlanması için düşük sıcaklıkta gerçekleşir, (3) sıcaklık uzama evresinde yeniden yükselir +72 °C'ye çıkar (116)

PZR bileşenleri; DNA molekülü, DNA polimeraz enzimi (*Taq* polimeraz), en az iki primer, magnezyum klorid ($MgCl_2$), deoksiribonukleotid trifosfat (dNTP) karışımı ve tampon'dur (114, 115).

2.8.1. PZR Çeşitleri: (114)

- Yuvalanmış (Nested) PZR
- Demirlenmiş (Anchored) PZR
- **Ters (Reverse) Transkripsiyon PZR (RT-PZR)**
- Asimetrik PZR
- Ters (Inverse) PZR
- *In situ* PZR
- Çoklu (Multipleks) PZR
- Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD)
- İmmuno PZR

Ters (Reverse) transkripsiyon PZR (RT-PZR)

RT-PZR iki aşamadan meydana gelir. Bunlar ribonükleik asit (RNA)'ten tamamlayıcı DNA (cDNA)'nın sentez edilmesi ve sentezlenen cDNA'nın standart PCR ile çoğaltılması aşamalarıdır. RT-PZR, mRNA miktarlarının belirlenmesi ile RNA düzeyinde gen anlatımı çalışmaları için uygun bir yöntemdir. Ayrıca, mRNA'lardan PZR yoluyla cDNA kitaplıklarının oluşturulması için kullanılan bir yöntemdir.

cDNA sentezi için farklı kaynaklardan izole edilmiş, DNA polimeraz aktivitesine sahip, ters transkriptaz enzimleri vardır. Avian myeloblastosis virus (AMV) ve Moloney murine leukemia virus (MMLV) ters transkriptazları bunlardan ikisidir. Bu viruslar enzimlerini RNA genomlarını DNA kopyalarına dönüştürmek için kullanırlar.

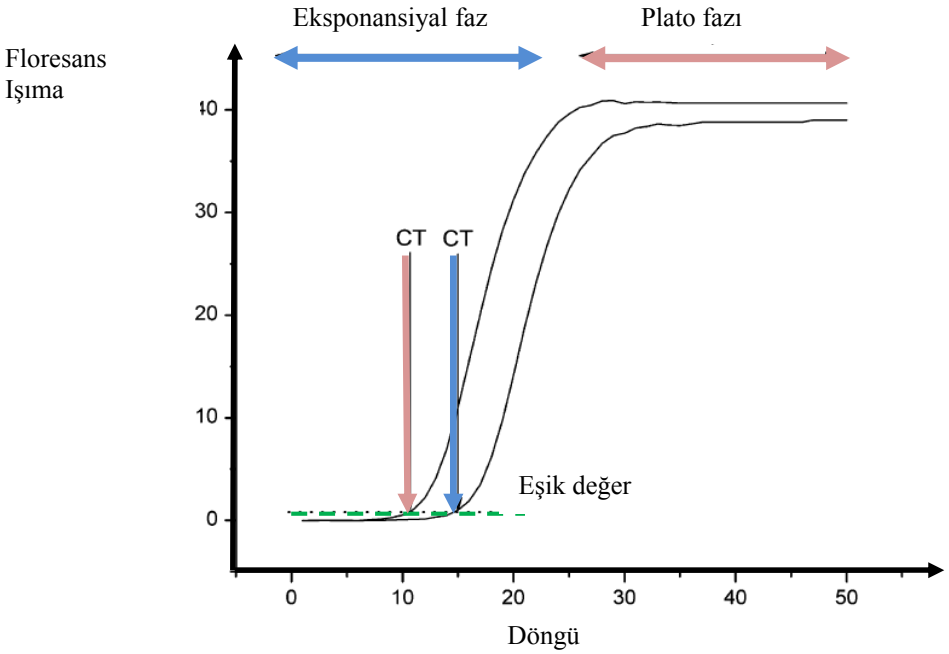
Ters transkriptaz; özgül primerler, raslantısal hekzamerler ya da oligo-dT primerleri kullanılarak gerçekleştirilir (114).

2.8.2. Real-Time PZR (Eş Zamanlı PZR)

Eş zamanlı PZR, nükleik asit çoğaltılması ile eş zamanlı olarak artan floresan sinyalin ölçülmesi ile kantitatif sonuç verebilen PZR yöntemidir. RNA'nın çoğaltılması ve analizi için uygun bir yöntemdir. Bu yöntemde kısa sürede sonuç alınır.

PZR ürünlerinin toplam sinyalinin arka plan sinyalini geçtiği an treshhold cycle (CT) (eşik) değeridir. Eş zamanlı PZR'da hesaplamalar kesin ve rölatif olmak üzere 2 şekildedir. Kesin miktar belirlenmesinde, miktarı bilinen RNA'dan farklı dilüsyonlar hazırlanır, elde edilen değerlerin standart grafiği çizilir ve örnek miktarları grafik değerleri içinde hesaplanır. Rölatif miktar tayininde ise, farklı koşullarda anlatımı değişmeyen referans bir gen (housekeeping gen, kontrol gen) kullanılır. Hedef gen kontrol gene göre normalize edilerek hesaplamalar yapılır.

Normal bir PZR dört fazda incelenebilir; lineer faz, erken eksponansiyel faz, log lineer faz (eksponansiyel faz) ve plato fazı. ***Lineer faz*** esnasında; PZR yeni başlamıştır ve her siklustaki floresan ışıma henüz arka plan ışıma arasında kaybolmaktadır. ***Erken ekponansiyel fazda*** floresan ışıma belirgin ölçüde eşik değere ulaşmıştır. Arka plan ışıma değerlerini geçmiştir. Bu eşik değer CT olarak tanımlanan değerdir. ***Log lineer fazda*** PZR, optimal çoğaltım değerlerine ulaşır ve her döngüde PZR ürün miktarı 2 katına çıkar. ***Plato fazı*** doygunluk fazıdır, bundan sonra elde edilecek floresan yoğunluğu ise ihmal edilebilecek düzeydedir (116, 117) (Şekil 14).



Şekil 14: Eş zamanlı PZR sonuç eğrisi (116)

Eş zamanlı PZR'da en yaygın kullanılan işaretleyiciler DNA'ya nonspesifik olarak bağlanan floresan işaretleyiciler (SYBR green, etidyum bromid) ve spesifik olarak bağlanan (işaretli poblar) floresan işaretleyicilerdir (117).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Kimyasal Maddeler

- 3-amino-9-ethyl carbazole (AEC) substrat kit (Invitrogen)
- Bakır (II) klorür ($CuCl_2$) (Merck)
- Bakır (II) sülfat pentahidrat ($CuSO_4$. $5H_2O$) (Sigma)
- Bovine Serum Albumin (Sigma)
- Cannabinoid 1 reseptör antikoru (Cayman)
- Cannabinoid 2 reseptör antikoru (Santa Cruz)
- cDNA sentez kiti (Fermentas)
- 5.5'-dithiobis-2-nitrobenzoik asit (Sigma)
- Δ^9-THC (Lipomed)
- Dipotasyum tartat (Sigma)
- EDTA (ICN Biomedicals)
- Etanol (Merck)
- Glasiyel metafosforik asit (Merck)
- Hidrojen peroksit (H_2O_2) (Riedel-de Haen)
- Hidroklorik asit (HCI) (Merck)
- High pure RNA doku izolasyon kiti (Roche)
- Histostain Plus Bulk boyama kiti (Invitrogen)
- Ketamin hidroklorid (Ketalar, Pfizer)

- Kloroform (Merck)
- Ksantin (Sigma)
- Ksantin oksidaz (XO) (Sigma)
- Ksilazin hidroklorid (Rompun, Bayer)
- LightCycler TaqMan Master kit (Roche)
- Mayer's hematoksilen (Lab vision)
- Metanol (Merck)
- NBT (Sigma)
- Nikotinamidin (Sigma)
- Parafin (+45 °C) (Merck)
- Paraffin wax (+56 °C) (BDH)
- Potasyum ferrisiyanür ($K_3Fe[CN]_6$) (Sigma)
- Potasyum siyanid (KCN) (Sigma)
- Primerler (IDT)
- Redükte glutatyon (Merck)
- Sodyum bikarbonat ($NaHCO_3$) (Sigma)
- Sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4)(Riedel-de Haen)
- Sodyum fosfat (Na_2HPO_4) (Riedel-de Haen)
- Sodyum hidroksit (NaOH) (Merck)
- Sodyum karbonat (Na_2CO_3) (Riedel-de Haen)
- Sodyum sitrat (Sigma)
- Sodyum klorür (NaCl) (Riedel-de Haen)
- Streptozotocin (Sigma)
- Tiyobarbiturik asit (Merck)

- Trikloroasetik asit (Sigma)
- UPL Prob CB1 (Roche)
- UPL Prob CB2 (Roche)
- UPL Prob, kontrol gen (aktin) (Roche)

3.2. Gereçler ve Sarf Malzemeler

- -20 °C'de Buzdolabı (Bosch)
- +4 °C'de Buzdolabı (Profilo)
- - 86 °C'de Buzdolabı (Thermo Scientific)
- Beher (10 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL, 500 mL ve 1000 mL) (Teknik cam)
- Bisturi (Aesculap)
- Cam Tüpler (15 mL) (Teknik cam)
- Ependorf tüpler (500 µL, 1.5 mL) (Fıratmed)
- Distile su cihazı (Millipore)
- Etüv (Elektro-mag)
- Homojenizatör (IKA Werke RW16)
- Hassas Terazi (Ohaus)
- Işık Mikroskobu (Nikon)
- Kapaklı Falkon Tüpler (15 mL ve 50 mL) (TPP)
- Lam (Isolab)
- Lamel (Isolab)
- Light Cycler ® 480 Real-Time PCR System (Roche)
- Mikropipet (10 µL, 20 µL,100 µL,1000 µL) (Thermo Scientific)
- Mikrodalga Fırın (Beko)

- Mikrotom (Leica)
- Mikrotom bıçağı (Sakura)
- Mikrotüp (0.2 mL, 0.5 mL, 1.5 mL) (Axygen)
- Nanodrop (Thermo Scientific nd-1000)
- Otoklav (Hirayama)
- PCR Cihazı (Applied Biosystems)
- pH-metre (Schott)
- Soğutmalı Santrifüj (Beckman Coulter)
- Spektrofotometre (Shimadzu UV-1800)
- Şeker Ölçüm Cihazı (Accu-check, Roche)

3.3. Deneyde Kullanılan Hayvanlar

Deneyde İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE)'nden sağlanan 8-10 haftalık Sprague-Dawley türü erişkin erkek sıçanlar kullanıldı. Hayvanların ± 21 derecede, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık periyoduna uygun olarak *ad libitum* olarak pellet ve çeşme suyu ile beslenmesi sağlandı.

3.3.1. Hayvanların Gruplandırılması

Deney grupları, rastgele seçilmiş sıçanlardan oluşan dört gruba ayrıldı.

1. Grup (n = 8): Fizyolojik su verilen kontrol grubu

Deney süresince (7 gün) intraperitoneal olarak serum fizyolojik su (9 g/L NaCl çözeltisi) verilen kontrol grubu.

2. Grup (n = 6): Δ^9-THC verilen kontrol grubu

Δ^9-THC 1 mL serum fizyolojik su içinde 7 gün boyunca 3 mg/kg/gün intraperitoneal enjeksiyon ile uygulanarak Δ^9-THC kontrol grubu oluşturuldu.

3. Grup (n = 8): STZ+NAD diyabetik deney grubu

Tip-2 diyabet grubu, serum fizyolojikte çözülen NAD'ın (85 mg/kg) intraperitoneal enjeksiyonundan 15 dk sonra serum fizyolojik su içerisinde çözülen STZ'nin (65 mg/kg) sıçanlara tek doz intraperitoneal enjeksiyonu ile oluşturuldu (81).

Deney grubunu oluşturan sıçanların enjeksiyondan 72 saat sonra kuyrukları kesilerek kan glukoz düzeyleri tayin edildi. Sıçanların kan glukoz seviyesi ≥ 200 mg/dL olarak saptanan

hayvanlar diyabet kabul edildi. Glukoz seviyeleri düşük olan hayvanlar ise deneye dahil edilmedi.

4. Grup (n = 7): Δ^9-THC verilen STZ+NAD diyabetik grubu (Diyabet+Δ^9-THC)

STZ+NAD enjeksiyonunu takiben diyabet olduğu düşünülen hayvanlara 3 mg/kg/gün intraperitoneal enjeksiyon ile Δ^9-THC 7 gün süre ile verildi.

Deneyin başladığı gün 0. gün olarak kabul edildi. 0., 7., 14., ve 21. günlerde tüm gruplardaki hayvanların kan glukoz düzeyi ölçümleri kuyruk veninden alınan kan kullanılarak yapıldı. Aynı zaman aralıklarında hayvanların vücut ağırlıkları da ölçüldü. Δ^9-THC enjeksiyonu takip eden 0., 7. ve 14. günlerde metabolik kafesler kullanılarak idrar örnekleri toplandı. 14. gün sonunda hayvanlar ketamin hidroklorid (50 mg/kg) ve ksilazin hidroklorid (10 mg/kg) anestezisi altında kalplerinden kan alınarak sakrifiye edildi ve pankreas doku örnekleri alındı. EDTA'lı tüplere alınan kanlar santrifüj edilerek plazmalar ayrıldı. Doku örnekleri ise ikiye ayrıldı bir kısmı fikse edilmek üzere % 10'luk nötral formaline alındı ve 16 saat +4 °C'de tespit edildikten sonra çeşme suyu ile yıkanarak % 70'lik alkole alındı. Doku örnekleri yükselen alkol serilerinden sonra toluole alınıp parafine gömüldüler. Diğer ayrılan kısım ise -86 °C'de çalışma gününe kadar saklandı.

3.4. Biyokimyasal İncelemeler

3.4.1. Örnek Hazırlanması

3.4.1.1. Plazma ve Eritrositlerin Hazırlanması

- EDTA'lı tüplere alınan örnekler +4 °C'de 7000 rpm de 5 dakika santrifüj edilerek eritrositlerin plazmadan ayrılması sağlandı.

- Elde edilen plazma örnekleri önce 1 gece -20 °C'de, sonra -86 °C dondurulmak üzere ependorf tüplere alikotlarak üzerleri etiketlendi.
- Plazmadan ayrılan eritrositlere hacimlerinin 5 katı kadar serum fizyolojik eklenerek iyice karıştırıldı. +4 °C'de 7000 rpm de 5 dakika santrifüj edilerek supernatant atıldı. Bu işlem eritrositler iyice yıkanana kadar (3 kez) tekrarlandı. Eritrositler aynı gün çalışıldı.

3.4.1.2. Pankreas Dokusu Homojenatlarının Hazırlanması

-86 °C'de muhafaza edilen pankreas doku örnekleri biyokimya çalışmaları öncesinde homojenize edilmek üzere çözdürüldü. Serum fizyolojik ile % 10'luk homojenatlar homojenizatör yardımıyla hazırlandı.

3.4.2. Lipid Peroksidasyonu Tayini

Yağ asitlerinin, serbest radikallerle reaksiyonu sonucu oluşan başlıca peroksidasyon ürünlerinden MDA, tiyobarbiturik asit (TBA) ile pembe kırmızı renkli oluşturduğu bileşik 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü.

3.4.2.1. Plazma Lipid Peroksidasyon Tayin Metodu

- Tüp içerisindeki 250 µl plazma üzerine,
- 1.5 mL TBA çözeltisi, 1 mL trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi, 0.2 mL hidroklorik asit (HCl) eklendi, vortekste iyice karıştırıldı.
- Tüpler kapakları sıkıca kapatılarak su banyosunda (+95 °C) 15-20 dk süresince kaynatıldı.
- Kaynatmadan sonra çözeltiler soğutularak havası çıkarıldı.

- Pembe renkli çözelti oluşturuldu. Santrifüj edilerek berrak olan üst sıvı alınarak 532 nm'de köre karşı okundu.
- Kör, çözelti içerisine örnek yerine sulandırma sıvısı eklenerek oluşturuldu.

Hesaplamada, MDA-TBA kompleksinin 532 nm'deki molar ekstinksiyon katsayısı olan $1.56x10^5$ M-1 cm-1'den faydalanılarak ve dilüsyon faktörü de dikkate alınarak MDA konsantrasyonları hesaplandı.

(Absorbans/$1.56x10^5$) x (Total hacim/Örnek hacmi) x (10^6) = mikromol/L

3.4.2.2. Pankreas Dokusu Lipid Peroksidasyon Tayin Metodu

- Tüp içerisine % 10 homojenattan 125 µL eklendi.
- % 10'luk homejanat üzerine 750 µL TBA çözeltisi, 500 µL TCA çözeltisi ve 100 µL HCI eklenerek, vortekste iyice karıştırıldı.
- Tüplerin kapakları sıkıca kapatılarak su banyosunda (+95 °C) 15-20 dk kaynatıldı.
- Kaynatmadan sonra tüpler soğutuldu ve çözeltilerin havası çıkarıldı.
- Oluşan pembe renkli çözelti santrifüj edildi ve berrak olan üst sıvı alınarak 532 nm'de köre karşı okundu.
- Kör için çözelti içerisine doku örneği yerine sulandırma sıvısı olan serum fizyolojik eklendi.

Hesaplamada, MDA-TBA kompleksinin 532 nm'deki molar ekstinksiyon katsayısı olan $1.56x10^5$ M-1 cm-1'den faydalanılarak ve dilüsyon faktörü de dikkate alınarak MDA konsantrasyonları hesaplandı. Çıkan sonuçlar dokunun protein miktarına oranlanarak nmol/mg olarak hesaplandı.

3.4.3. Eritrosit Hemoglobin Miktar Tayini

Hemoglobinin potasyum ferri siyanür ve potasyum siyanürle siyanmethemoglobine dönüşmesinden meydana gelen renkli bileşiğin absorbsiyonu 540-546 nm de spektrofotometrede okundu.

Metod:

- Tüplere 5 mL Drabkin çözeltisi (0.2 g $K_3Fe[CN]_6$, 0.05 g KCN ve 1g $NaHCO_3$ distile su ile 1 L'ye tamamlanır) kondu.
- 0.02 mL eritrosit eklendi.
- Oda ısısında 10 dk. bekletilen örnekler köre karşı 542 nm de okundu.
- Kör olarak Drabkin çözeltisi kullanıldı.
- Sonuçlar g/dL olarak verildi.

3.4.4. Glutatyon (GSH) Tayini

Glutatyondaki sülfidril (SH) gruplarının 5.5'-dithiobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) ile oluşturduğu sarı renkli bileşiğin absorbansı 412 nm'de spektrofotometre ile ölçüldü.

3.4.4.1. Eritrosit GSH Tayin Metodu

- Tüp içerisine 2 mL distile su ve 0.2 mL yıkanmış eritrosit eklenerek iyice karıştırıldı.
- Elde edilen hemolizattan 2 mL alınıp içerisine 3 mL prespite edici solüsyondan (16.7 g glasiyel metafosforik asit, 2g Na_2EDTA, 300 g NaCl distile su ile 1 L'ye tamamlanır) eklendi ve 5 dakika süresince oda ısısında inkübasyona bırakıldı.
- Kahverengi bir renk oluşan çözelti inkübasyon sonrasında 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.

- Oluşan berrak sıvıdan 0.5 mL alınarak üzerine 2 mL disodyum fosfat (0.3 M) çözeltisi eklendi. 412 nm'de absorbansı okundu.
- Sonrasında reaksiyon ortamına 1mM DTNB çözeltisinden 0.25 mL eklendi ve karıştırıldı. Absorbans tekrar okundu.
- DTNB eklenmeden önce ve sonraki absorbansların farkları alındı ve redükte glutatyon ile hazırlanmış (mikromol/L) standartın absorbansı ile kıyaslanarak numunelerin glutatyon miktarı mikromol/L olarak ifade edildi.

3.4.4.2. Pankreas Dokusu GSH Tayin Metodu

- % 10'luk pankreas doku homojenatı serum fizyolojik ile 5 kat sulandırıldı.
- Tüp içerisine 2 mL distile su ve 200 µL doku homojenatı eklendi ve tüp iyice karıştırıldı.
- Elde edilen homojenattan 2 mL alınarak üzerine 3 mL prespite edici solüsyondan (16.7 g glasiyel metafosforik asit, 2 g Na_2EDTA, 300 g NaCl distile su ile 1 L'ye tamamlanır) eklendi ve 5 dakika süresince oda ısısında inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrasında 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
- Supernatanttan 500 µL alınarak üzerine 2 mL disodyum fosfat (0.3 M) çözeltisi eklendi.
- Üzerine 1 mM DTNB çözeltisinden 250 µL eklendi ve reaksiyonun 412 nm'de verdiği absorbans okundu.
- Redükte glutatyon ile hazırlanmış (mikromol/L) standartın absorbansı ile kıyaslanarak numunelerin glutatyon miktarı mikromol/L olarak ifade edildi.
- Dokunun protein miktarına oranlanarak nmol/mg olarak ifade edildi.

3.4.5. Katalaz (CAT) Aktivitesinin Tayini

CAT enziminin aktivitesi, pH 7.0 ve oda ısısında H_2O_2 tüketilmesi sonucu meydana gelen absorbans değişimlerinin gözlenmesiyle belirlendi.

3.4.5.1. Plazma CAT Aktivite Tayin Metodu:

- Plazmadan 10 µL alınarak 240 µL serum fizyolojik su ile sulandırıldı.
- Üzerine 1 mL hazırlanan 30 mM H_2O_2 solüsyonu (50 mM, pH 7.0 fosfat tamponu içerisinde hazırlandı) eklendi.
- 240 nm'de 0. ve 1. dk'larda ölçümler alındı.
- Kör, H_2O_2 çözeltisine örnek yerine serum fizyolojik su konularak oluşturuldu.

Hesaplama; U/L= (Δ Absorbans/0.0436) x (total hacim/örnek hacmi) x seyreltme katsayısı formulü kullanılarak yapıldı. (ekstinksiyon katsayısı = 0.0436).

3.4.5.2. Pankreas Dokusu CAT Aktivite Tayin Metodu:

- Doku homojenatı 200 kat serum fizyolojik ile sulandırıldı.
- 2 mL doku homojenatı üzerine 1 mL hazırlanan 30 mM H_2O_2 solüsyonu (50 mM, pH 7.0 fosfat tamponu içerisinde hazırlandı) eklendi.
- 0. ve 1. dk'larda 240 nm'de köre karşı absorbansları ölçüldü.

Hesaplama; U/L= (Δ Absorbans/0.0436) x (total hacim/örnek hacmi) x seyreltme katsayısı formulü kullanılarak yapıldı. (ekstinksiyon katsayısı = 0.0436). Sonuçlar protein miktarına göre U/mg olarak hesaplandı.

3.4.6. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Tayini

Ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksitin nitroblue tetrazoliumu (NBT) indirgemesi esasına dayanır. Oluşan süperoksit radikalleri ortamdaki NBT'yi indirgeyerek renkli formazonlar oluşturur. Bu kompleks 560 nm de maksimum absorbans verir. Enzimin bulunmadığı veya aktivitenin düşük olduğu ortamda bu indirgenme meydana gelmesiyle birlikte mavi mor-renk oluşumu gözlendi.

3.4.6.1. Plazma SOD Aktivite Tayin Metodu

- 1 mL substrat çözeltisi [12 mL Na_2CO_3 (400 mmol/L) çözeltisi + 20 mL Na_2EDTA (0.6 mmol/L) çözeltisi + 40 mL ksantin (0.3 mmol/L) çözeltisi + 20 mL NBT (150 µmol/L) çözeltisi + 6 mL bovine serum albumin (BSA) (0.86 mg/mL) çözeltisi (pH=10.2)] üzerine 200 µL örnek ve 50 µL ksantin oksidaz (XO) eklendi. Kör için örnek yerine saf su (dH_2O) eklendi.
- Karanlık bir ortamda 20 dakika oda ısısında inkübasyona bırakıldı.
- Sonra tüplere reaksiyonu durdurmak için 50 µL $CuCl_2.2H_2O$ (0.8 mmol/L) eklendi.
- 20 dakika oda ısısında karanlık bir ortamda inkübasyona bırakıldı.
- Spektrofotometrede 560 nm'de okundu.

Hesaplama; 1 ünite SOD aktivitesi % 50 oranında XO aktivitesini inhibe etmektedir. Buna göre SOD enzimi % inhibisyonları hesaplandı.

3.4.6.2. Pankreas Dokusu SOD Aktivite Tayin Metodu

- % 10'luk doku homojenatından 500 µL alınarak üzerine 300 µL kloroform + 500 µL % 100 etanol eklendi ve 1 dk boyunca vortekslendi.
- +4 °C'de 10.000 rpm'de 20 dk santrifüjlenen örneklerin supernatantları kullanıldı.

- 125 µL örnek üzerine 600 µL substrat çözeltisi eklendi.
- 25 µL XO eklenerek 20 dk inkübasyona bırakıldı.
- 250 µL $CuCl_2.2H_2O$ ilavesinden sonra spektrofotometrede 560 nm'de absorbansları okundu.

Hesaplama; 1 ünite SOD aktivitesi % 50 oranında XO aktivitesini inhibe etmektedir. Buna göre SOD enzimi % inhibisyonları hesaplandı. Elde edilen sonuçlar protein miktarına oranlandı (U/mg).

3.4.7. Protein Miktar Tayini

Proteinlerin alkali ortamda bakır iyonları ile biüret tepkime vermesi esasına dayanır. Bu tepkimede peptid bağları alkali ortamda bakır tuzları ile mor renkli kompleks oluştururlar. Protein yapısındaki tirozin ve triptofan amino asitleri de fosfo molibdat-fosfotungustat çözeltisi (Folin-Ciocalteu) ile indirgenirler.

3.4.7.1. Pankreas Dokusunda Protein Miktar Tayin Metodu

- % 10'luk pankreas doku homojenatı 10 kat serum fizyolojik ile sulandırıldı.
- Tüplere 200 µL örnek ve 1 mL C reaktifi eklendi.

  A reaktifi: % 2 Na_2CO_3 (0.1 N NaOH içerisinde)

  B reaktifi: % 0,5 $CuSO_4$. $5H_2O$: % 1 dipotasyum tartat içerisinde hazırlandı.

  C reaktifi: 50 mL A reaktifi + 1 mL B reaktifi ile hazırlandı.

  E reaktifi: Folin. 1:2 oranında distile su ile sulandırılarak kullanıldı.
- Kör için örnek yerine sulandırma için kullanılan serum fizyolojik su kullanıldı.
- Tüm tüpler iyice vortekslenerek karanlıkta oda ısısında 10 dk bekletildi.
- Üzerlerine E reaktifinden 0,125 µL eklendi ve mavi renk oluşumu gözlendi.

- 30 dk karanlıkta bekletilen örnekler 660 nm'de okundu.

Hesaplama; BSA standartın absorbansı ile kıyaslanarak mg/mL olarak hesaplandı.

3.5. İmmunohistokimyasal İncelemeler

İmmunohistokimyasal boyama için toluolde parafini giderilen 5 µm'lik kesitler inen alkol (% 100 - % 96 - % 80 - % 70) serilerinden geçirilip distile suya alındılar. Kesitler CB1 reseptör ve CB2 reseptör antikorları ile inkübe edilerek streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemine göre boyandılar. Histostain Plus geniş spektrumlu boyama kiti kullanıldı. AEC substrat kit ile renk reaksiyonu alındıktan sonra Mayer's hematoksilen zıt boyama yapılarak peptid sinyalleri ışık mikroskobunda incelendi.

Boyama özgüllüğü için kullanılan negatif kontrol kesitlerde, CB1 reseptör ve CB2 reseptör antikorları yerine fosfat tamponu (PBS) koyularak işleme devam edildiğinde renk reaksiyonu görülmedi. CB1 reseptörü için pozitif kontrol olarak beyin dokusu, CB2 reseptörü için ise dalak dokusu kesitleri kullanıldı.

3.5.1. Kannabinoid 1 (CB1) Reseptörünün İmmunohistokimya Yöntemi ile Gösterilmesi

- Kesitler 45 dk toluolde parafini giderilmesi için ilk 25 dk +37 °C'de, sonrasında ise oda ısısında tutularak, inen alkol serilerinden (% 100 - % 96 - % 90 - % 70) geçirildiler ve dH_2O alındılar.
- 0.01 mol/L sodyum sitrat tamponu içerisinde (pH 6.0) 5 dk boyunca 3 kez mikrodalgada fırında (medium) kaynatıldı. Sonrasında oda ısısına gelmesi sağlandı.

- Oda ısısına gelen kesitlere % 0.3 H_2O_2 (methanol ile hazırlanmış) ile 10 dk muamele edildi.
- % 0.05 tween 20 (tris tampon (TBS) içerisinde) ile 3 kez 5 dk yıkandı.
- Bloklama solusyonu olarak %3 BSA, TBS içerisinde hazırlanarak dokuların üzeri kapanacak şekilde damlatıldı. Oda ısısında 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
- CB1 reseptör primer antikoru 1 : 150 dilüe edilerek (% 3 BSA) uygulandı. Kesitler bir gece +4 °C nemli ortamda bırakıldılar.
- % 0.05 tween 20 (TBS içerisinde) ile 3 kez 5 dk yıkandı.
- Biotin ile işaretlenmiş sekonder antikor ile 20 dk muamele edildi.
- % 0.05 tween 20 (TBS içerisinde) ile 3 kez 5 dk yıkandı.
- Kesitlerin yüzeyleri enzim konjugat ile kapatılarak 20 dk boyunca inkübasyona bırakıldı.
- % 0.05 tween 20 (TBS içerisinde) ile 5 dk boyunca iyice yıkanan kesitlerin,
- AEC kromojeni ile renk reaksiyonu 2 dk da alındıktan sonra kesitler reaksiyonun durması amacıyla distile suya alındılar.
- Mayer's hematoksilen ile zıt boyası yapılan kesitler çeşme suyuna alınarak yıkandı ve PBS ile mavimsi-mor renk oluştuktan sonra dH_2O ile yıkandılar.
- Gliserin jel kapama ortamı damlatılarak lamel ile kapatıldı.
- Kesitler +4 °C'de saklandılar.

3.5.2. Kannabinoid 2 (CB2) Reseptörlerinin İmmunohistokimya Yöntemi ile Gösterilmesi

- Parafini giderilmesi için kesitler 45 dk toluolde tutuldular ve sonrasında inen alkol serilerinden (% 100 - % 96 - % 90 - % 70) geçirilerek distile suya alındılar.

- 0.01 mol/L sodyum sitrat tamponu içerisinde (pH 6.0) 5 dk boyunca 3 kez mikrodalgada fırında (medium) kaynatılan kesitlerin oda ısısına gelmesi sağlandı.
- Oda ısısına gelen kesitler PBS+tween 20 ile 3 kez 5 dk yıkandı.
- Kesitlere % 0.3 H_2O_2 (methanol ile hazırlanmış) ile 10 dk muamele edildi.
- PBS+tween 20 ile 3 kez 5 dk yıkandı.
- Bloklama solusyonu ile 30 dk muamele edildi.
- CB2 reseptör primer antikoru 1 : 400 dilüsyonda kullanıldı ve kesitler bir gece +4 °C nemli ortamda inkübasyona bırakıldı.
- PBS+tween 20 ile 3 kez 5 dk yıkandı.
- Biotin ile işaretlenmiş sekonder antikor 15 dk uygulandı.
- PBS+tween 20 ile 3 kez 5 dk yıkandı.
- Kesit yüzeyleri enzim konjugat ile kapatılarak 15 dk boyunca muamele edildi.
- PBS+tween 20 ile 3 kez 5 dk yıkandı
- AEC kromojeni ile reaksiyonun gelişmesi 3 dk izlendikten sonra kesitler distile suda çalkalanarak reaksiyonun durması sağlandı.
- Mayer's hematoksilen ile zıt boyası yapılan kesitler çeşme suyuna alınarak yıkandı ve PBS ile renk mavimsi-mor olduktan sonra distile suya alındılar.
- Gliserin jel kapama ortamı damlatılarak lamel ile kapatıldı.
- Kesitler +4 °C'de saklandılar.

İmmunohistokimya uygulanan kesitlerde, her bir sıçana ait tek bir kesitteki tüm Langerhans adacıklarında CB1 reseptörü için immunpozitif olan hücre alan yüzdesi hesaplandı [% immunpozitif alan = (immunpozitif alan/total adacık alanı) x 100]. Aynı şekilde pankreatik kanal hücre alan yüzdeleri de CB2 reseptörü için değerlendirildi.

Nikon Eclipse 80i model ışık mikroskobu kullanılarak preparatların fotoğrafları çekildi (x 40), mikroskobik alan ölçümleri için NIS Elements-D 3.1 mikroskop görüntüleme yazılımı kullanıldı.

3.6. Kannabinoid 1 (CB1) ve Kannabinoid 2 (CB2) Reseptör mRNA Seviyelerinin İncelenmesi

3.6.1. Pankreas Dokusundan RNA İzolasyonu

Pankreas dokusundan total RNA izolasyonu için doku RNA izolasyon kiti kullanıldı.

Yöntem:

- 10 mg pankreas dokusu üzerine önce 200 µL liziz tamponu (4,5 M guanidin hidroklorid, 50 mM Tris-HCl ve % 30 Triton X–100 (w/v), pH 6.6) eklenek bisturi yardımıyla dokunun parçalanması sağlandı, üzerine tekrar 200 µL liziz tamponu eklendi ve doku tamamen parçalandı.
- Parçalanmış pankreas dokusu ependorf tüpe alınarak 13.000 rpm'de 2 dk boyunca santrifüj edildi.
- Supernatant temiz bir ependorf tüpe alınarak üzerine 200 µL soğuk saf etanol eklendi ve karıştırıldı.
- Temiz tüplere ayırıcı filtreler konuldu, örnek filtreden geçirildi ve 13.000 rpm'de +4 °C'de santrifüj edildi.
- Filtre temiz bir tüpe alındı ve üzerine 90 µL DNaz inkübasyon tamponu (1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl ve 10 mM MnCl2, pH7.0) + 10 µL DNaz I (10 kU DNAz 0.55 mL ayırma tampon içerisinde) eklendi 15 dk süresince oda ısısında inkübasyona bırakıldı.

- İnkübasyon sonrası filtre üzerine yıkama tamponu I (5 M guanidin hidroklorid ve 20 mM Tris-HCl, pH 6.6)'den 500 µL eklendi ve 8000 rpm'de 15 sn +4 °C'de santrifüj edildi.
- Filtre temiz bir tüpe alındıktan sonra üzerine yıkama tamponu II (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7.5)'den 500 µL eklenerek 8000 rpm'de 15 sn +4 °C'de santrifüj edildi.
- Filtre tekrar temiz bir tüpe alındı ve üzerine 300 µL yıkama tamponu II eklendi ve 13.000 rpm'de 2 dk (+4 °C) santrifüj edildi.
- Filtre temiz bir ependorf tüpe alındı ve üzerine 50 µL elusyon tamponu (serbest nükleaz, steril bidistile su) eklendi, 1 dk boyunca 8000 rpm'de santrifüj edildi.
- 20 dk buz içerisinde bekletilen örneğin saflık ve miktar tayini yapılarak –86 °C'ye kaldırıldı.

3.6.2. RNA Kalite Tayini

Elde ettiğimiz RNA'nın miktarının ve kalitesinin belirlenebilmesi için nanodrop spektrofotometre kullanıldı. Ölçüm 1 µL RNA kullanılarak 280, 260 ve 230 nm dalga boylarında spektrofotometrik olarak saflık ve konsantrasyon incelemeleri yapıldı. 260/280 ve 260/230 oranları saflık açısından uygun olan RNA'lar çalışmaya kabul edildi.

3.6.3. cDNA Sentezi

11 µL'de 100 ng RNA olacak şekilde örnekler sulandırıldı. 1µL raslantısal (random) hekzamer primer eklenerek +65 °C'de 5 dk kadar bekletildi. Örnekler reaksiyon karışımı ilave edilmek üzere buza alındı (Tablo 2). Bu karışım, örnekler üzerine eklendikten sonra +25 °C'de 5 dk, +42 °C'de 60 dk ardından da +70 °C'de 5 dk inkübe edildi. Oluşturulan cDNA örnekleri -86 °C'de sonradan kullanılmak üzere saklandı.

Tablo 2: cDNA sentezinde kullanılan reaksiyon karışımı

cDNA Eldesindeki Reaksiyon Karışımı	
- **5X reaksiyon tamponu***	4 µL
- **10 mM dNTP karışımı**	2 µL
- **RNaz inhibitör (20 U/µL)**	1 µL
- **Ters Transkriptaz (200 U/µL)**	1 µL
Toplam	**8 µL**

* 250mM Tris-HCl (pH 8.3), 250 mM KCl, 20 mM $MgCl_2$, 50 mM DTT

3.6.4. Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizi

Eş zamanlı PZR, cDNA'ların çoğalması ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesiyle kantitatif sonuç veren bir yöntemdir. Dokulardan elde edilen mRNA seviyelerindeki değişiklikler "Taqman hidroliz probları" kullanılarak eş zamanlı PZR yöntemi Light Cycler 480 cihazında incelendi.

CB1 ve CB2 reseptör genlerine ait mRNA seviyeleri incelendi. Kontrol gen (her dokuda fazla miktarda olduğu bilinen genler) olarak beta-aktin (Actb = *housekeeping gen*) kullanıldı (Tablo 3).

Tablo 3: Primer özellikleri. Kannabinoid 1 (CB1) reseptör, kannabinoid 2 (CB2) reseptör ve beta-aktin (Actb). İleri primer (F), geri primer (R).

Gen Adı	Primer Dizisi	Primer Boyu	Pozisyon	Tm	%GC
CB1 reseptör	F 5'- ggacatggagtgctttatgattc -3'	23	464 - 486	59	%43
	R 5'- gagggacagtacagcgatgg -3'	20	508 - 527	60	%60
CB2 reseptör	F 5'- aagccccaaagtcctcagtt -3'	20	992 - 1011	60	%50
	R 5'- cccaactcctgcttatccttc - 3'	21	1041 - 1061	60	%52
Actb	F 5'- cccgcgagtacaaccttct -3'	19	20 - 38	60	%58
	R 5'- cgtcatccatggcgaact - 3'	18	74 - 91	60	%56

mRNA seviyesindeki değişiklikleri inceleyebilmek için kullanılan eş zamanlı PZR yöntemi için iki farklı karışım kullanıldı. Bunlardan biri PZR için gerekli Taq DNA polimeraz, $MgCl_2$, dNTP ve tampon içeren master mix olarak bilinen karışımdır. Diğer karışım ise geri ve ileri primerlerin uygun floresan ışıma veren problarıyla belli miktarlarda karıştırılmasıyla oluşturuldu. Primerler 100 µM olarak sulandırılarak stoklar hazırlandı. Çalışma öncesinde ise primerler 10 µM olacak şekilde sulandırıldı. Her bir pankreas doku örneği, pozitif ve negatif kontroller için eş zamanlı PZR plaklarına (96 kuyu içerir) uygun primerlerle hazırlanan reaksiyon karışımı (Tablo 4) eklendi.

Pozitif kontroller çalışılan genlerin, incelenen örnekler açısından negatif olması durumunda, tekniğin düzgün çalışıp çalışmadığının kontrolü için kullanıldı. Pozitif kontrol olarak sağlıklı sıçanlardan alınan beyin dokuları incelendi. Pankreas ve beyin doku örneklerinin cDNA'larından 5 µL her bir tüpe eklendi. Negatif kontrol için ise cDNA yerine PZR-sudan (steril saf, deiyonize su) 5 µL pipetlendi.

Tablo 4: Eş zamanlı PZR yönteminde kullanılan reaksiyon çözeltisi

Eş Zamanlı PZR için Reaksiyon Karışımı	
- **Master Mix, 5x konsantrasyon**	4 µL
- **Steril saf, deiyonize su**	10.4 µL
- **Geri primer (R)**	0.2 µL
- **İleri primer (F)**	0.2 µL
- **Prob**	0.2 µL
Toplam	**15 µL**

Plaklar 3000 rpm'de 5 sn santrifüj edildi. Daha sonra plak Light Cycler 480 cihazına yerleştirildi. PZR döngü protokolü cihaza girildi (Tablo 5).

Tablo 5: Eş zamanlı PZR döngü protokolü

	Başlangıç İnkübasyonu	**45 döngü**			**Soğutma**
		Denatürasyon	**Bağlanma**	**Uzama**	
Sıcaklık (° C)	+95 °C	+95 °C	+60 °C	+72 °C	+40 °C
Zaman	10 dk	10 sn	30 sn	1 sn	30 sn

CB1 ve CB2 reseptörlerinin mRNA düzeyleri değerlendirilirken her gen için ışımanın başladığı CT değerine bakıldı. mRNA seviyelerini rölatif olarak hesaplamak için ΔCT yöntemi kullanıldı. Eş zamanlı PZR yöntemiyle elde edilen hedef ve kontrol genlerin CT

değerlerinin farkı (hedef gen CT – kontrol gen CT) alındı ve $2^{-(\Delta CT)}$ hesaplanarak istatiksel olarak analiz yapıldı.

3.7. İdrarda Δ^9-THC Metabolitlerinin Tespiti

0. 7. ve 14. günlerde idrar toplama kafeslerine alınan Δ^9-THC ve diyabet+Δ^9-THC gruplarına ait sıçanlardan idrar örnekleri 1.5 mL'lik ependorf tüplere toplandı ve çalışma gününe kadar -86 °C'de saklandı. İdrar örneklerinde Δ^9-THC metabolitlerinin analizi Hitachi 912 otoanalizöründe DRI® kannabinoid miktar tayin yöntemi ile yapıldı (Tablo 6).

Tablo 6: İdrarda analizi yapılan Δ^9-THC metabolitleri

Δ^9-THC Metabolitleri
11-Hidroksi-Δ^9-THC
11-Nor-Δ^8-THC-COOH
11-Nor-Δ^9-THC-COOH
8-β-Hidroksi-Δ^9-THC
8-β-11-Hidroksi-Δ^9-THC
Δ^9-THC Kannabinol

Bu yöntem, Δ^9-THC miktar tayini için kullanılan bir immun ölçüm yöntemidir. DRI® kannabinoid miktar tayin yöntemi idrarda kannabinoidlerin kalitatif veya semi kantitatif tespiti için kullanılmaktadır. Yöntemde, idrarda bulunan Δ^9-THC'nin başlıca metabolitlerini tespit edebilen spesifik bir monoklonal antikor kullanıldı. Miktar tayini glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PDH) enzimiyle işaretli metabolitlerin idrar örneğinden gelen metabolitlere sabit sayıda spesifik antikor (anti-Δ^9-THC) bağlanma bölgeleri için rekabet etmesine

dayanmaktadır. G6PDH enzim aktivitesi, bu enzimin nikotinamid adenin dinükleotidi NADH'ye dönüştürme yeteneğinin spektrofotometrik olarak 340 nm'de ölçülmesiyle tespit edildi.

Metod:

Antikor/Substrat Reaktifi: Fare monoklonal anti-Δ^9-THC antikorları, glukoz-6-fosfat (G6P), ve tris tamponu içinde nikotinamid adenin dinükleotid ve koruyucu olarak sodyum azid içerir.

Enzim Konjugat Reaktifi: Tris tamponu içinde glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PDH) ile işaretli Δ^9-THC ve koruyucu olarak sodyum azid bulunur.

- İdrar örneklerinden 25 µL alınarak örnek kuyucuklara konuldu.
- Antikor/substrat reaktifinden 100 µL ve enzim konjugat reaktifinden 100 µL alınarak örnek üzerine eklendi ve 340 nm'de okuma yapıldı.

0, 5, 10, 20, ve 50 ng/mL konsantrasyonlardaki kalibratörlerden dört noktalı standart bir eğri çizildi. Örneklerdeki Δ^9-THC metabolit miktarları bu eğriye göre hesaplandı.

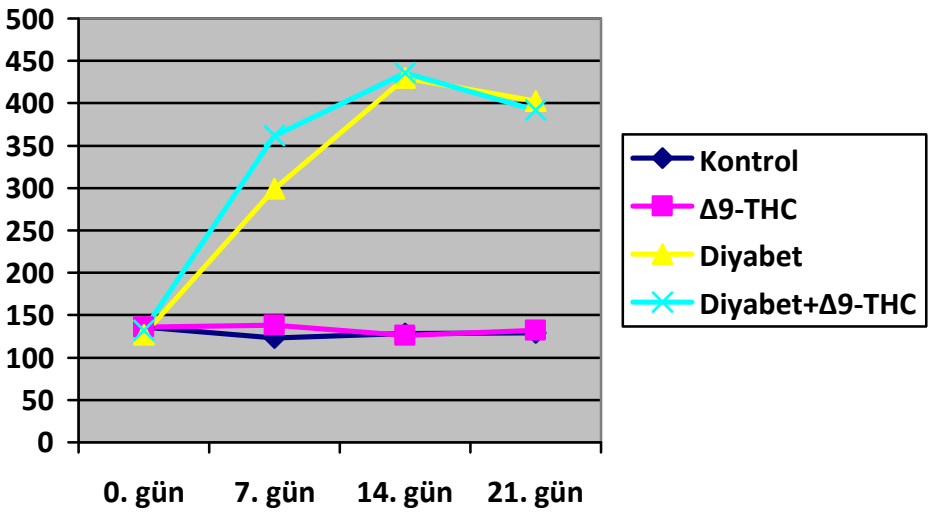
3.8. İstatistik

Sonuçlar ortalama ± SE olarak ifade edildi. GraphPad Prism 5 bilgisayar programı kullanılarak çoklu karşılaştırmalar One-Way ANOVA varyans analizi ile ikili karşılaştırmalar ise Mann-Whitney *U* testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. $P < 0.05$ değeri istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Kan Glukoz Değerleri

Deneyin başlangıcından itibaren her hafta ölçülen kan glukoz değerlerinin ortalaması tablo 7'de gösterildi. Tüm deney gruplarına ait hayvanlar arasında 7., 14. ve 21. günlerde çok ileri derecede anlamlılık saptandı ($P_{ANOVA} < 0.001$). 7., 14. ve 21. günlerde, STZ-diyabetik sıçanların kan glukoz seviyelerinde kontrol ve Δ^9-THC gruplarına göre çok ileri derecede anlamlı bir artış bulundu ($P < 0.001$). Diyabet+Δ^9-THC grubu ile kontrol ve Δ^9-THC grupları 7., 14. ve 21. günlerde karşılaştırıldığında çok ileri derecede artış vardı ($P < 0.001$). Diyabet+Δ^9-THC grubuna ait sıçanlar diyabetik hayvanlar ile karşılaştırıldığında 7. günde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış, 14. ve 21. günlerde ise bir azalma saptandı (Şekil 15) (Tablo 7).



Şekil 15: Deneklerin haftalara göre kan glukoz seviyelerinin dağılımı.

Tablo 7: Tüm grupların kan glukoz ortalama değerleri

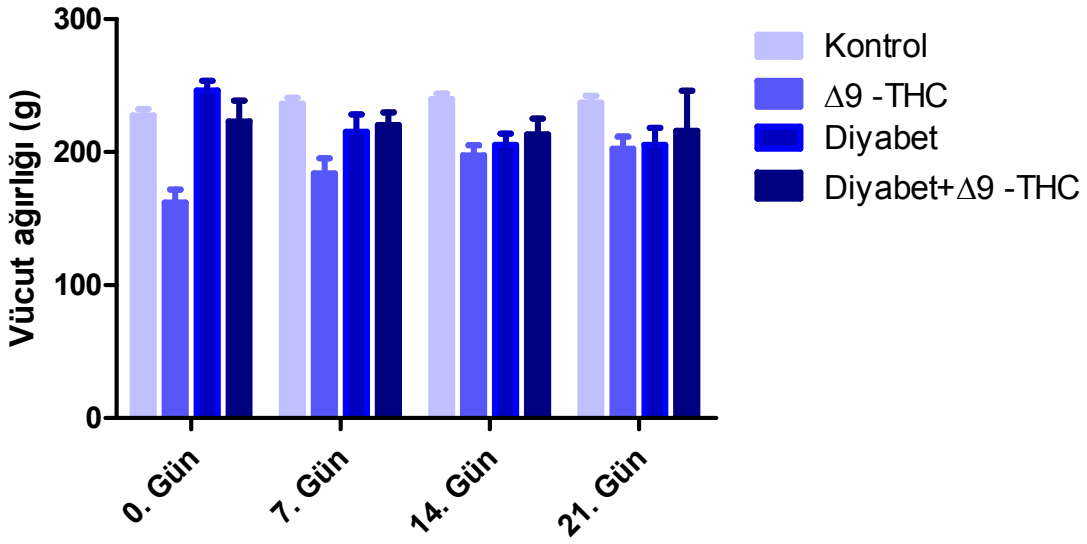
Grup	0. gün* (mg/dL)	7. gün* (mg/dL)	14. gün* (mg/dL)	21. gün* (mg/dL)
Kontrol (n = 8)	135.9 ± 5.23	123.4 ± 5.66	128.6 ± 4.64	129.1 ± 4.00
Δ^9-THC (n = 6)	135.8 ± 15.56	138.2 ± 8.06	126.0 ± 4.23	132.5 ± 5.18
Diyabet (n = 8)	122.0 ± 7.79	324.5 ± 35.16[a,b]	459.4 ± 34.13[a,b]	412.3 ± 41.00[a,b]
Diyabet +Δ^9-THC (n = 7)	132.0 ± 9.63	362.1 ± 30.52[a,b]	436.0 ± 50.65[a,b]	391.7 ± 45.98[a,b]
P_{ANOVA}	NS	< 0.001	< 0.001	< 0.001

***Ortalama ± Standart Hata (SE), NS: Anlamlı değil**

[a]P < 0.001 kontrol gruba göre, [b]P < 0.001 Δ^9-THC gruba göre.

4.2. Vücut Ağırlık Değerleri

Tüm gruplara ait sıçanların 0., 7., 14, ve 21. günlerde ölçülen vücut ağırlık değerleri tablo 8'de belirtildi. Dört gruba ait sıçanların vücut ağırlıkları kıyaslandığında 7. ve 14. günlerde ileri derecede ($P_{ANOVA} < 0.01$), 21. günde ($P_{ANOVA} < 0.05$) ise anlamlı değişimler gözlendi. STZ-diyabetik sıçanların vücut ağırlıklarında kontrol sıçanlara göre 7. ve 21. günlerde anlamlı ($P < 0.05$), 14. günde ise ileri derecede anlamlı bir azalma ($P < 0.01$) saptandı. Diyabet+Δ^9-THC grubuna ait hayvanların vücut ağırlıklarıyla diyabetik sıçanların vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında ise 7. 14. ve 21. günlerde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış tespit edildi (Şekil 16) (Tablo 8).



Şekil 16: Dört gruba ait 0., 7., 14. ve 21. günlerde vücut ağırlık ortalamaları.

Tablo 8: Deney süresince tüm gruplara ait vücut ağırlık değerleri

Grup	0. gün* (g)	7. gün* (g)	14. gün* (g)	21. gün* (g)
Kontrol (n = 8)	227.5 ± 3.41	236.3 ± 4.58	239.8 ± 4.15	237.1 ± 5.35
Δ^9-THC (n = 6)	162.2 ± 9.60[a]	183.9 ± 11.35[e]	197.5 ± 7.73[e]	202.7 ± 8.86[e]
Diyabet (n = 8)	246.3 ± 7.30[b,c]	215.4 ± 13.03[b,f]	205.3 ± 8.51[e]	205.3 ± 12.87[b]
Diyabet +Δ^9-THC (n = 7)	223.1 ± 15.56[d]	220.3 ± 9.59[f]	213.4 ± 11.71[b]	216.0 ± 30.13[b]
P_{ANOVA}	< 0.001	< 0.01	< 0.01	< 0.05

***Ortalama ± SE**

[a]P < 0.001 kontrol gruba göre,

[b]P < 0.05 kontrol gruba göre,

[c]P < 0.001 Δ^9-THC gruba göre,

[d]P < 0.01 Δ^9-THC gruba göre,

[e]P < 0.01 kontrol gruba göre,

[f]P < 0.05 Δ^9-THC gruba göre.

4.3. Biyokimyasal Bulgular

4.3.1. Plazma ve Pankreas Dokusu MDA Seviyeleri

Dört grup arasında istatistiksel olarak plazma MDA seviyesi anlamlı ($P_{ANOVA} < 0.05$) iken doku MDA seviyesi anlamlılık göstermedi.

Plazma MDA seviyesi Δ^9-THC grubunda kontrole göre ileri derecede anlamlı olarak arttı ($P < 0.01$). Diyabetik sıçanlardaki plazma MDA seviyesinde ise kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artma saptandı. Diyabet+Δ^9-THC gubu ile diyabet grubu karşılaştırıldığında plazma MDA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma tespit edildi (Tablo 9).

Doku MDA seviyesinde kontrol ve Δ^9-THC gruplarının her ikisinde de herhangi bir değişiklik saptanmadı. Diyabetik sıçanlarda ise dokuda ki MDA seviyesinin kontrol sıçanlarınkine göre anlamlı olarak arttığı gözlendi ($P < 0.05$). Diyabet+Δ^9-THC grubu ile diyabet grubu kıyaslandığında doku MDA seviyesinde istatistiksel olarak farklılık tespit edilmedi (Tablo 9).

Tablo 9: Deney gruplarının plazma ve doku malondialdehit (MDA) seviyeleri

Grup	Plazma MDA* (µmol/L)	Doku MDA* (nmol/mg)
Kontrol (n = 8)	3.52 ± 0.32	0.66 ± 0.11
Δ^9-THC (n = 6)	5.65 ± 0.52[a]	0.68 ± 0.05
Diyabet (n = 8)	4.40 ± 0.53	1.13 ± 0.23[c]
Diyabet +Δ^9-THC (n = 7)	3.58 ± 0.70[b]	1.17 ± 0.27[c]
P_{ANOVA}	< 0.05	NS

***Ortalama ± SE, NS: Anlamlı değil.**

[a]$P < 0.01$ kontrol grubuna göre, [b]$P < 0.05$ Δ^9-THC grubuna göre, [c]$P < 0.05$ kontrol grubuna göre.

4.3.2. Eritrosit ve Pankreas Dokusu GSH Seviyeleri

Tablo 10'da eritrosit ve pankreas dokusu glutatyon seviyeleri verilmektedir. Eritrosit GSH seviyesi, kontrol ile diyabetik hayvanlar karşılaştırıldığında diyabetik hayvanlarda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı ($P < 0.05$). Diyabet+Δ^9-THC grubuna ait eritosit GSH seviyesinde diyabetik sıçanlara ait eritrosit GSH seviyesine göre ileri derecede anlamlı bir artış saptandı ($P < 0.01$).

Pankreas dokusunda GSH seviyesinin diyabetik sıçanlarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı bulundu ($P < 0.05$). Diyabet+Δ^9-THC grubuna ait pankreas doku GSH seviyeleri diyabetik sıçanlar ile kıyaslandığında anlamlı bir artış gösterdi. ($P < 0.05$) (Tablo 10).

Tablo 10: Dört gruba ait eritrosit ve doku glutatyon (GSH) seviyeleri

Grup	Eritrosit GSH* (µmol/gr)	Doku GSH* (nmol/mg)
Kontrol (n = 8)	5.28 ± 0.50	54.27 ± 10.39
Δ^9-THC (n = 6)	5.18 ± 0.52	50.99 ± 21.66
Diyabet (n = 8)	3.93 ± 0.39[a]	39.76 ± 17.17[a]
Diyabet +Δ^9-THC (n = 7)	5.53 ± 0.22[b]	87.40 ± 26.50[c]
P_{ANOVA}	NS	NS

***Ortalama ± SE, NS: Anlamlı değil.**

[a]$P < 0.05$ kontrol grubuna göre, [b]$P < 0.01$ diyabet grubuna göre,

[c]$P < 0.05$ diyabet grubuna göre.

4.3.3. Plazma ve Pankreas Dokusunda CAT Aktivitesi

Plazma ve pankreas dokusu katalaz aktiviteleri tablo 11'de belirtildi. Dört grup arasındaki plazma katalaz aktivitesi istatistiksel olarak anlamlılık göstermezken, doku katalaz aktivitesi istatistiksel olarak anlamlılık gösterdi ($P_{ANOVA} < 0.05$).

Kontrol hayvanlar ile diyabetik sıçanlar karşılaştırıldığında, diyabetik sıçanlarda plazma katalaz aktivitesi anlamlı olarak arttı ($P < 0.05$). Δ^9-THC grubunda ise kontrol gubuna göre istatistiksel olarak anlamlılık ifade etmeyen bir katalaz aktivitesi artışı saptandı. Ayrıca, katalaz aktivitesinde diyabet+Δ^9-THC grubu ile diyabetik sıçanlar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı olmayan bir azalma bununla birlikte Δ^9-THC ve kontrol gruplarına göre ise bir artma tespit edildi (Tablo 11).

Doku katalaz aktivitesi diyabetiklerde kontrol grubundaki sıçanlara göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma tespit edildi. Δ^9-THC grubunda katalaz aktivitesinde kontrol ($P < 0.05$) ve diyabet ($P < 0.01$) gruplarına göre anlamlı bir artma belirlendi. Diyabet+Δ^9-THC grubu ile diyabet grubu doku katalaz aktivitesi bakımından karşılaştırıldığında, diyabet+Δ^9-THC grubunda anlamlı bir artış saptandı ($P < 0.05$) (Tablo 11).

Tablo 11: Deney grupları arasında plazma ve doku katalaz (CAT) aktiviteleri

Grup	Plazma CAT* (U/mL)	Doku CAT* (U/mg)
Kontrol (n = 8)	64.15 ± 11.33	12.22 ± 3.66
Δ^9-THC (n = 6)	76.93 ± 17.29	27.09 ± 5.14[a]
Diyabet (n = 8)	112.5 ±15.98[a]	11.36 ± 2.61[b]
Diyabet +Δ^9-THC (n = 7)	84.78 ± 15.68	17.07 ± 1.47[c]
P_{ANOVA}	NS	< 0.05

***Ortalama ± SE, NS: Anlamlı değil.**

[a]P < 0.05 kontrol grubuna göre, [b]P < 0.01 Δ^9-THC grubuna göre,

[c]P < 0.05 diyabet grubuna göre.

4.3.4. Plazma ve Pankreas Dokusunda SOD Aktivitesi

Plazma SOD aktivitesi tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bulundu (P_{ANOVA} < 0.05). Plazma SOD aktivitesi bakımından diyabet grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma gözlenirken, Δ^9-THC sıçanlarında kontrol sıçanlarına göre artma saptandı. Δ^9-THC uygulanan diyabetik sıçanların plazma SOD aktivitesi diyabet gruba göre ileri derecede anlamlı bir artış gösterdi (P < 0.01) (Tablo 12).

Pankreas dokusu SOD aktivitesi, Δ^9-THC uygulanan sıçanlar kontrol hayvanlar ile kıyaslandığında anlamlı olmayan bir artış görüldü. Δ^9-THC uygulanan diyabet grubu ile STZ-diyabetik grup SOD aktivitesi bakımından karşılaştırıldığında, Δ^9-THC uygulanan diyabetik sıçanların pankreas SOD aktivitelerinde anlamlı bir artış olduğu saptandı (P < 0.05) (Tablo 12).

Tablo 12: Deney grupları arasında plazma ve doku süperoksid dismutaz (SOD) aktiviteleri

Grup	Plazma SOD* (U/mL)	Doku SOD* (U/mg)
Kontrol (n = 8)	4.39 ± 1.37	10.97 ± 1.20
Δ^9-THC (n = 6)	5.41 ± 1.69	17.15 ± 6.17
Diyabet (n = 8)	3.70 ± 1.39[a]	10.10 ± 0.87
Diyabet +Δ^9-THC (n = 7)	8.64 ± 0.16[b]	15.65 ± 3.63[c]
P_{ANOVA}	< 0.05	NS

***Ortalama ± SE, NS: Anlamlı değil.**

[a]P < 0.05 Δ^9-THC grubuna göre, [b]P < 0.01 diyabet grubuna göre,

[c]P < 0.05 diyabet grubuna göre.

4.4. İmmunohistokimyasal Bulgular

Her gruba ait pankreas doku örneklerinde immunohistokimya yöntemi ile CB1 ve CB2 reseptör peptidlerinin lokalizasyonları ve yüzde dağılımları incelendi.

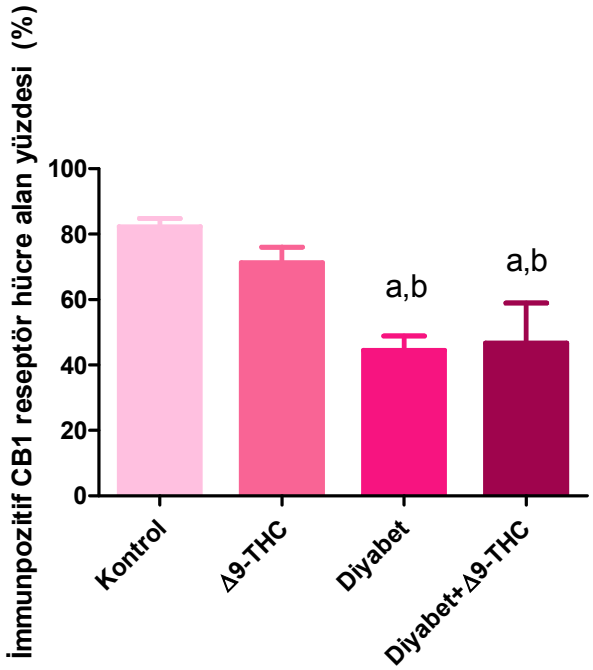
4.4.1. Kannabinoid 1 (CB1) Reseptör

İmmunohistokimyasal boyama sonucunda tüm gruplara ait pankreas Langerhans adacıklarındaki CB1 reseptör immunpozitif hücre alan yüzdeleri şekil 17'de gösterildi. Langerhans adacığında CB1 reseptör peptid içeriğinin bazı hücrelerde sitoplazmada bulunduğu bazı hücrelerde ise hem nukleusda hem de sitoplazmada yer aldığı gözlendi (Şekil 18).

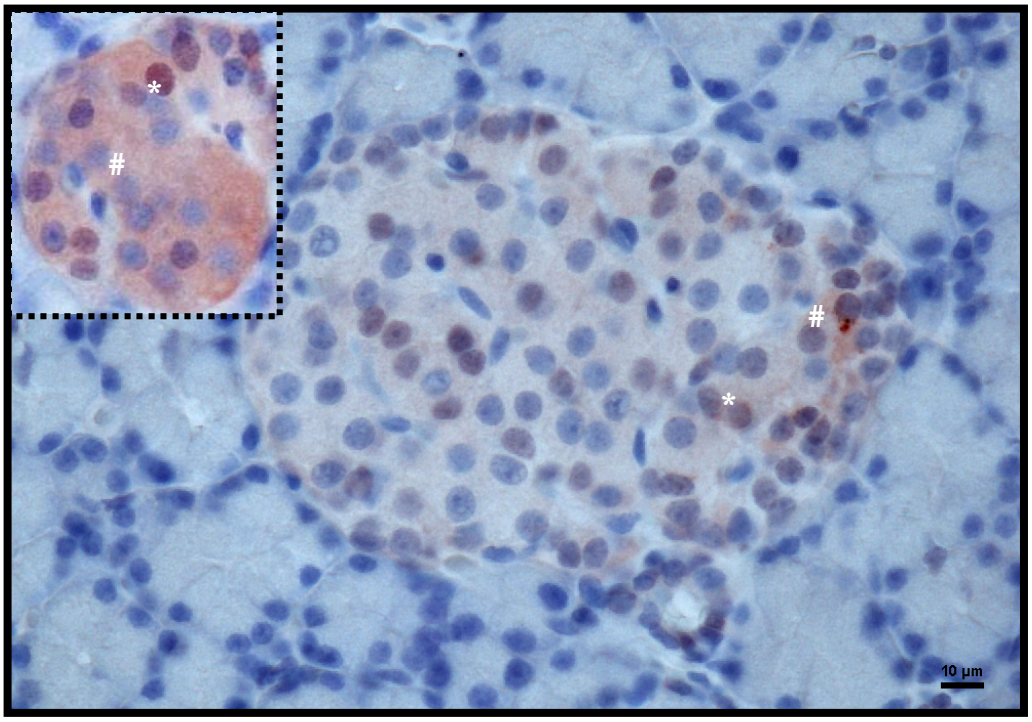
Pankreas dokusunda CB1 reseptör sinyalleri Langerhans adacıklarında yoğun bir şekilde gözlenirken pankreatik kanal bölgelerindeki hücrelerde çoğunlukla görülmedi (Şekil 19).

CB1 reseptör immunpozitif hücre yüzde alan ortalamaları kontrol grubunda 82.27 ± 2.49 (Şekil 20A); Δ^9-THC grubunda 71.30 ± 4.74 (Şekil 20B); diyabet grubunda 44.49 ± 4.34 (Şekil 21A) ve diyabet+Δ^9-THC grubunda ise 46.74 ± 12.26 (Şekil 21B) olarak saptandı. Bu verilere göre; dört grup kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bulundu ($P_{ANOVA} < 0.001$).

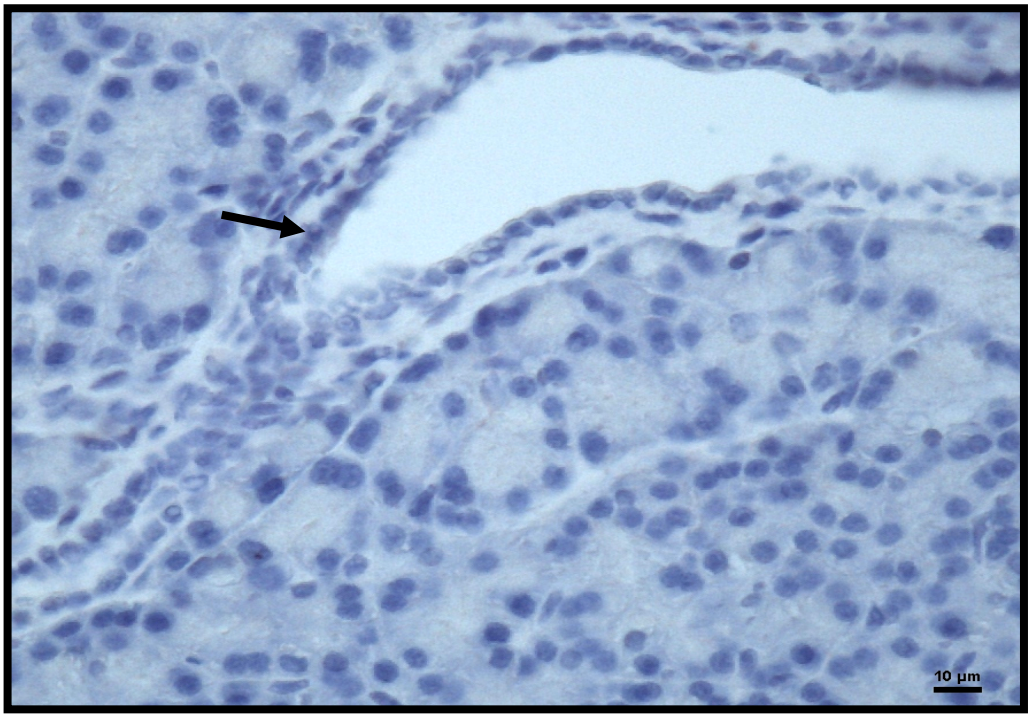
Langerhans adacıkları CB1 reseptör immunpozitif hücre alan yüzdeleri kontrol grubu (% 82) ile Δ^9-THC grubu (% 71) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik göstermezken, diyabetik sıçanlarda (% 44) CB1 reseptör alan yüzdesi kontrol ve Δ^9-THC gruplarına göre çok ileri derecede anlamlı olarak azaldı ($P < 0.001$). Δ^9-THC ile muamele gören diyabetik sıçanlarda (% 46), STZ-diyabetik sıçanlara (% 44) göre CB1 reseptör alan yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı olamayan bir artış gözlendi.



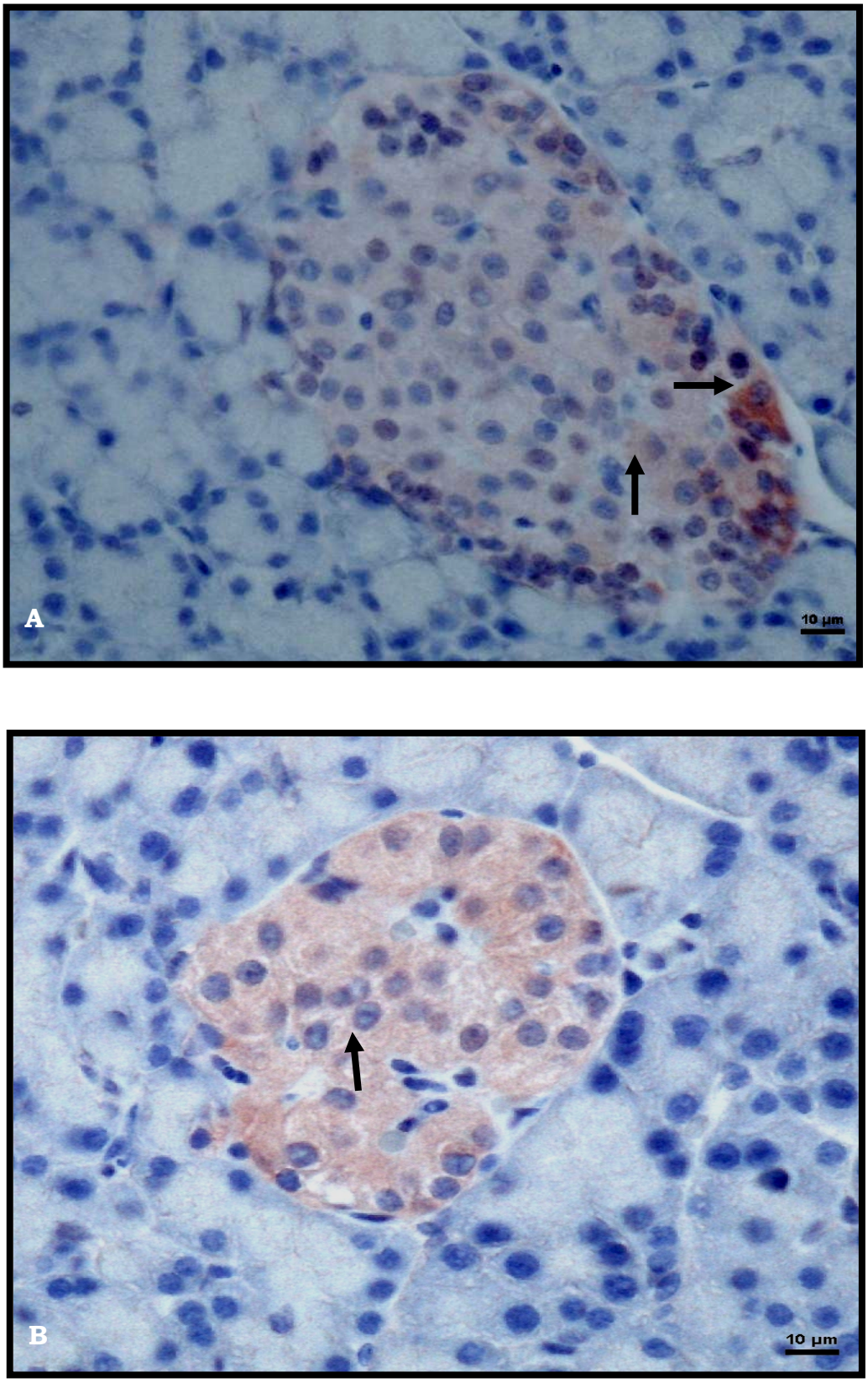
Şekil 17: Langerhans adacıklarındaki kannabinoid 1 (CB1) reseptör içeren immunpozitif hücrelerin alan yüzdesi. [a]$P < 0.001$ kontrol grubuna göre, [b]$P < 0.001$ Δ^9-THC grubuna göre.



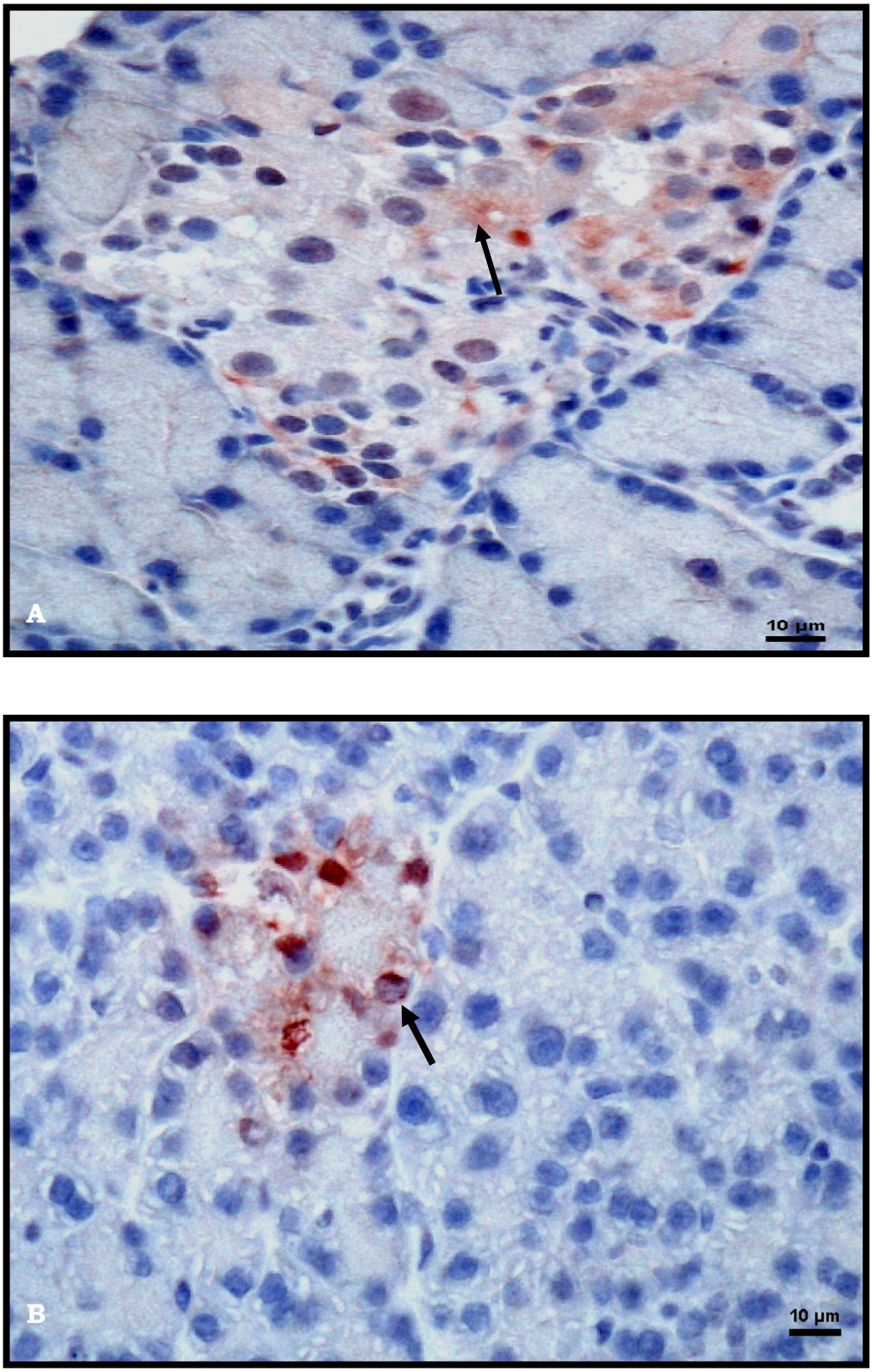
Şekil 18: Langerhans adacıklarında (sol üst köşe) CB1 reseptör immunpozitif hücreler sitoplazmik ve nuklear (*), sitoplazmik (#) yerleşimleri görülmekte. Streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi.



Şekil 19: Pankreatik kanallarda CB1 reseptör hücreleri negatif (ok).



Şekil 20: CB1 reseptör için işaretli antikor ile gösterilen immunpozitif hücreler (ok). A: Kontrol, B: Δ^9-THC gruplarının pankreas kesitleri. Streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi.



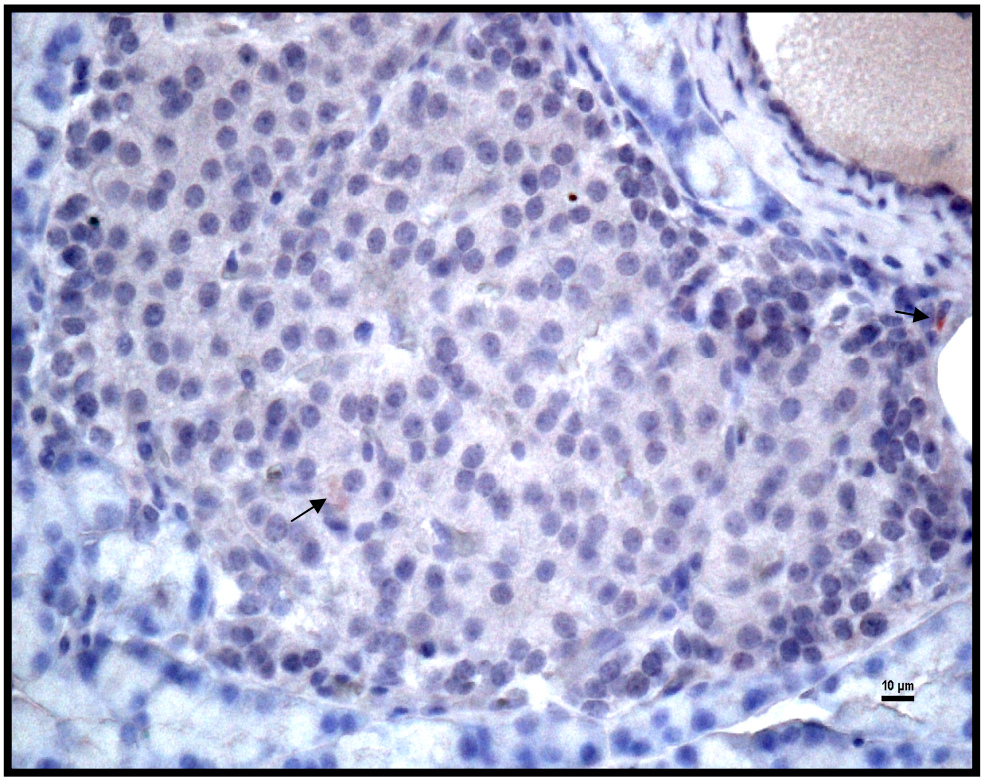
Şekil 21: CB1 reseptör immunpozitif hücreler (ok). A: STZ-diyabet, B: Diyabet+Δ^9-THC grupları. Streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi.

4.4.2. Kannabinoid 2 (CB2) Reseptör

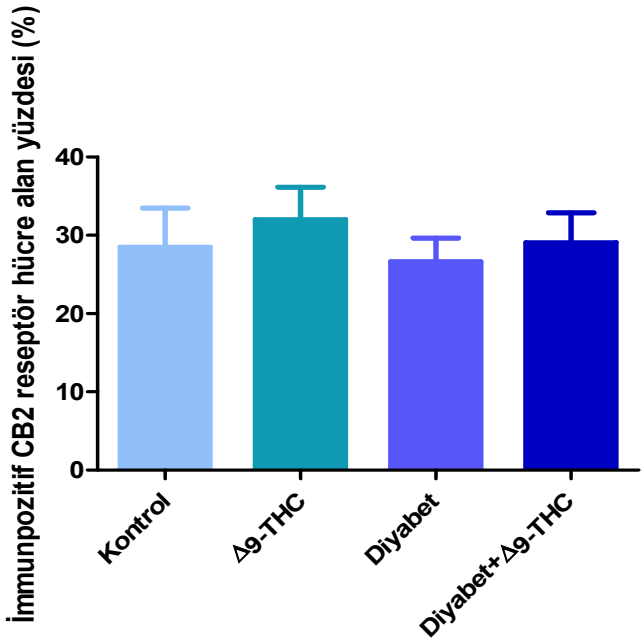
İmmunohistokimya yöntemi ile dört gruba ait tüm preparatlardaki Langerhans adacıkları incelendiğinde çoğunlukla CB2 reseptör immunpozitif hücreler saptanmazken bazı adacıklarda ise tek tek CB2 reseptör immunpozitif hücrelere rastlanıldı (Şekil 22). Buna karşılık pankreatik kanallarda CB2 reseptör immunpozitif hücre sinyalleri sıklıkla görüldü.

Dört grup birbirleri ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilmedi (Şekil 23). CB2 reseptör immunpozitif hücre alan yüzdeleri; kontrol grubunda 28.50 ± 4.99 (Şekil 24A); Δ^9-THC grubunda 32.02 ± 4.12 (Şekil 24B); diyabet grubunda 26.64 ± 3.00 (Şekil 25A) ve diyabet+Δ^9-THC grubunda ise 29.10 ± 3.79 (Şekil 25B) olarak saptandı.

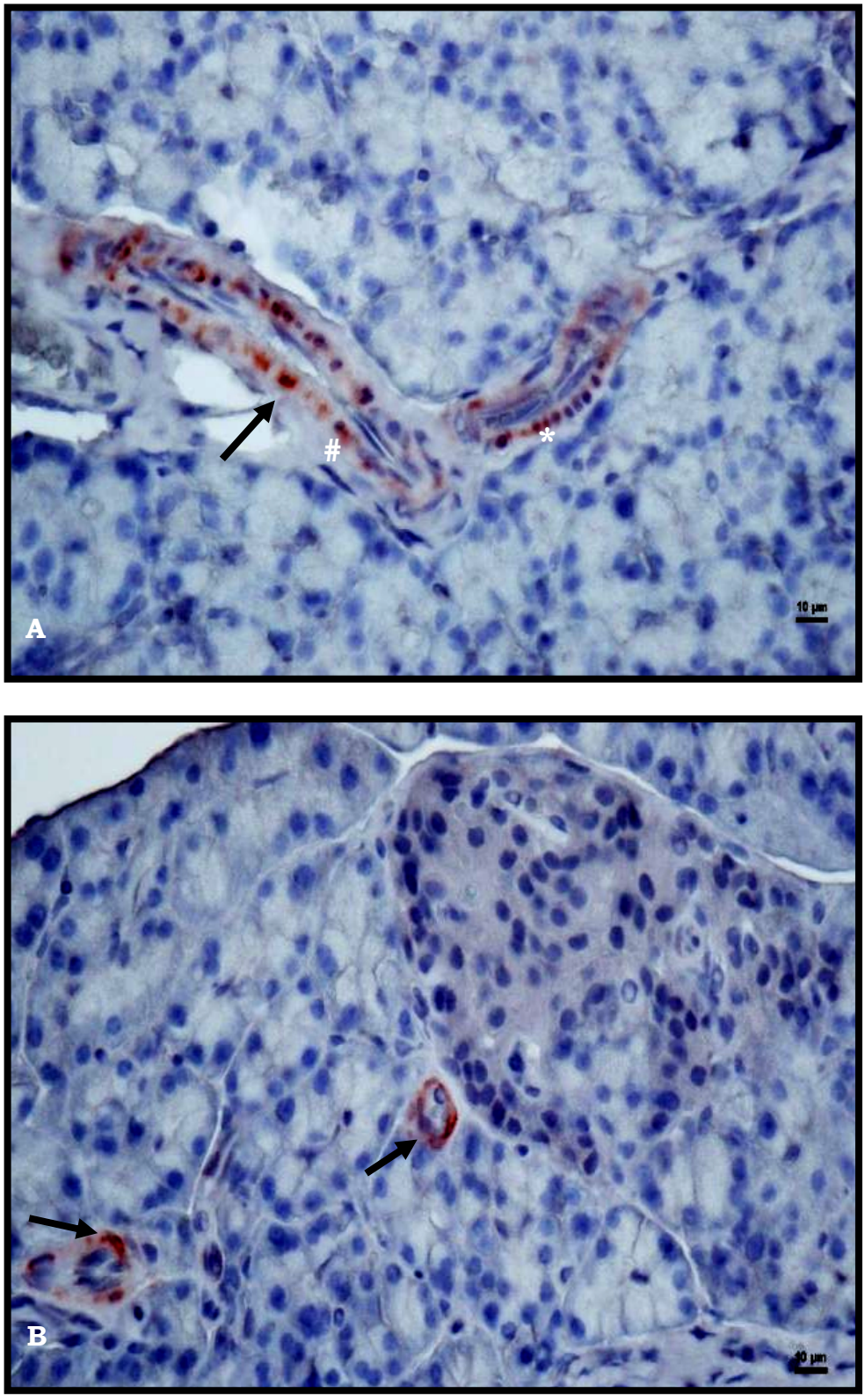
Nadir olarak adacık hücrelerinde görülen immunpozitif CB2 reseptör sinyalinin sitoplazmik bölgede lokalize olduğu görüldü (Şekil 22). Bunun aksine pankreatik kanal hücrelerinde ise hem sitoplazmik hem de nuklear bölgede CB2 reseptör sinyalleri görüldü (Şekil 24).



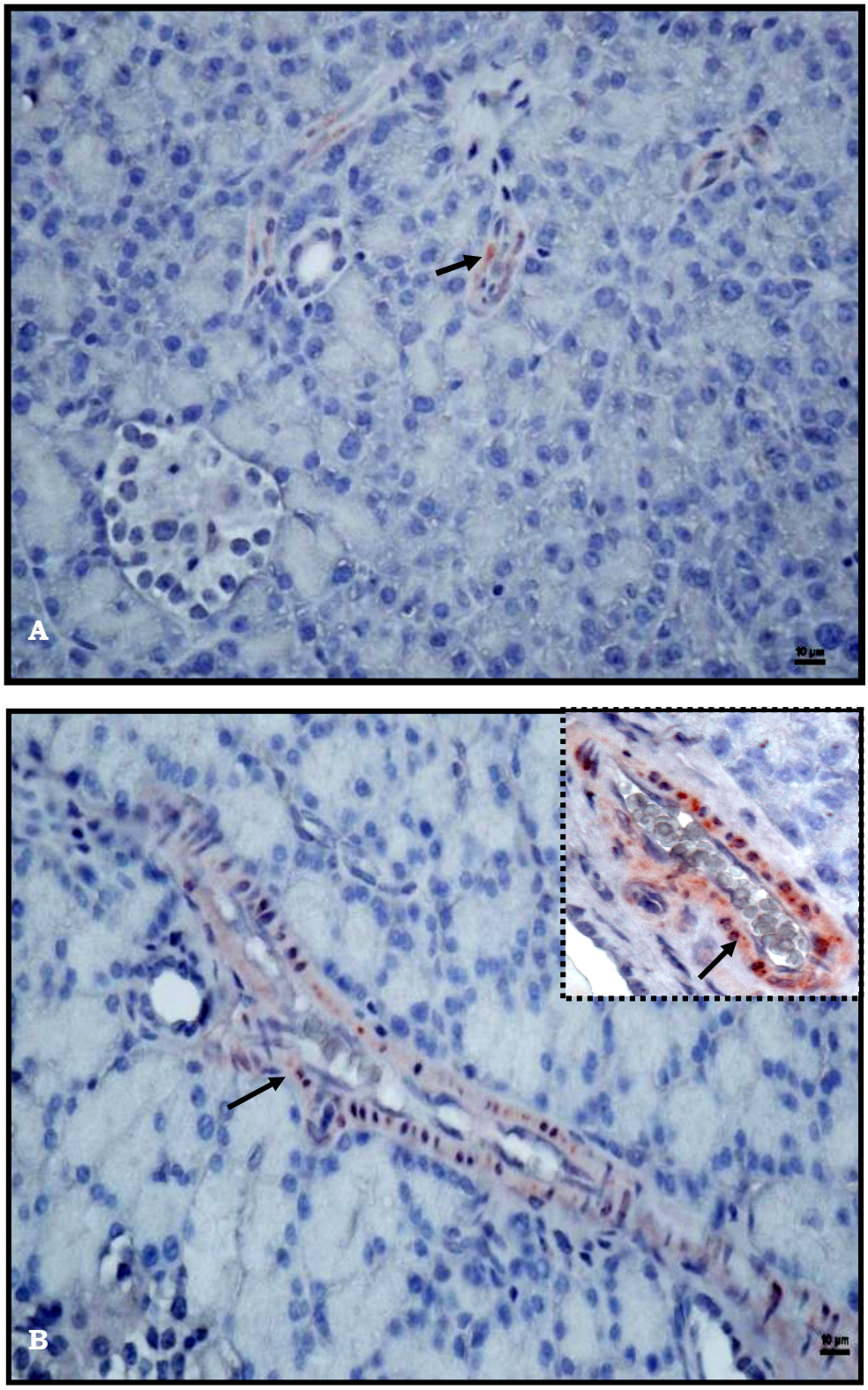
Şekil 22: Langerhans adacığında nadiren görülen CB2 reseptör immunpozitif hücreler (ok). Streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi.



Şekil 23: Pankreatik kanallardaki kannabinoid 2 (CB2) reseptör hücre alan yüzdesi (%).



Şekil 24: CB2 reseptör için pankreatik kanalda immunpozitif hücreler (ok). A: Kontrol, B: Δ^9-THC grubu. İmmunpozitif hücrelerin nuklear (*) ve sitoplazmik (#) yerleşimleri. Streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi.



Şekil 25: Pankreatik kanallardaki immunpozitif CB2 reseptör hücreleri (ok). A: Diyabet grubu, B: Diyabet+Δ^9-THC grubuna ait iki farklı pankreatik kanal. Streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi.

4.5. Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyon Bulguları

Kontrol (referans) gen olarak sıçanlarda bol miktarda bulunan Actb kullanıldı. Dört gruba ait pankreas dokularından RNA izolasyonu yapıldıktan sonra cDNA sentezi yapıldı. Daha sonra eş zamanlı PZR yöntemi ile Actb, CB1 ve CB2 reseptör genlerine ait CT değerleri elde edildi. Elde edilen CT sonuçları şekil 26-31'de gösterilmiştir.

4.5.1. Kannabinoid 1 (CB1) Reseptör mRNA Seviyesindeki Değişiklikler

Pankreas dokusunda CB1 reseptörüne ait mRNA seviye ölçümlerinde kontrol grubundan sekiz sıçandan beşinde, Δ^9-THC grubundan altı hayvandan üçünde pozitif sonuç alınırken diyabet ve diyabet+Δ^9-THC gruplarına ait hayvanların tümünde pozitif sonuç alındı. Alınan tüm sonuçlar CB1 reseptör mRNA seviyeleri bakımından dört grup arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunmadı. Buna rağmen, diyabetik pankreas dokularında CB1 reseptör mRNA seviyesi kontrole göre daha azdı. Diyabet+Δ^9-THC sıçan pankreas dokularında CB1 reseptör mRNA seviyesinde diyabetik hayvanlarınkine göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma tespit edildi (Tablo 13).

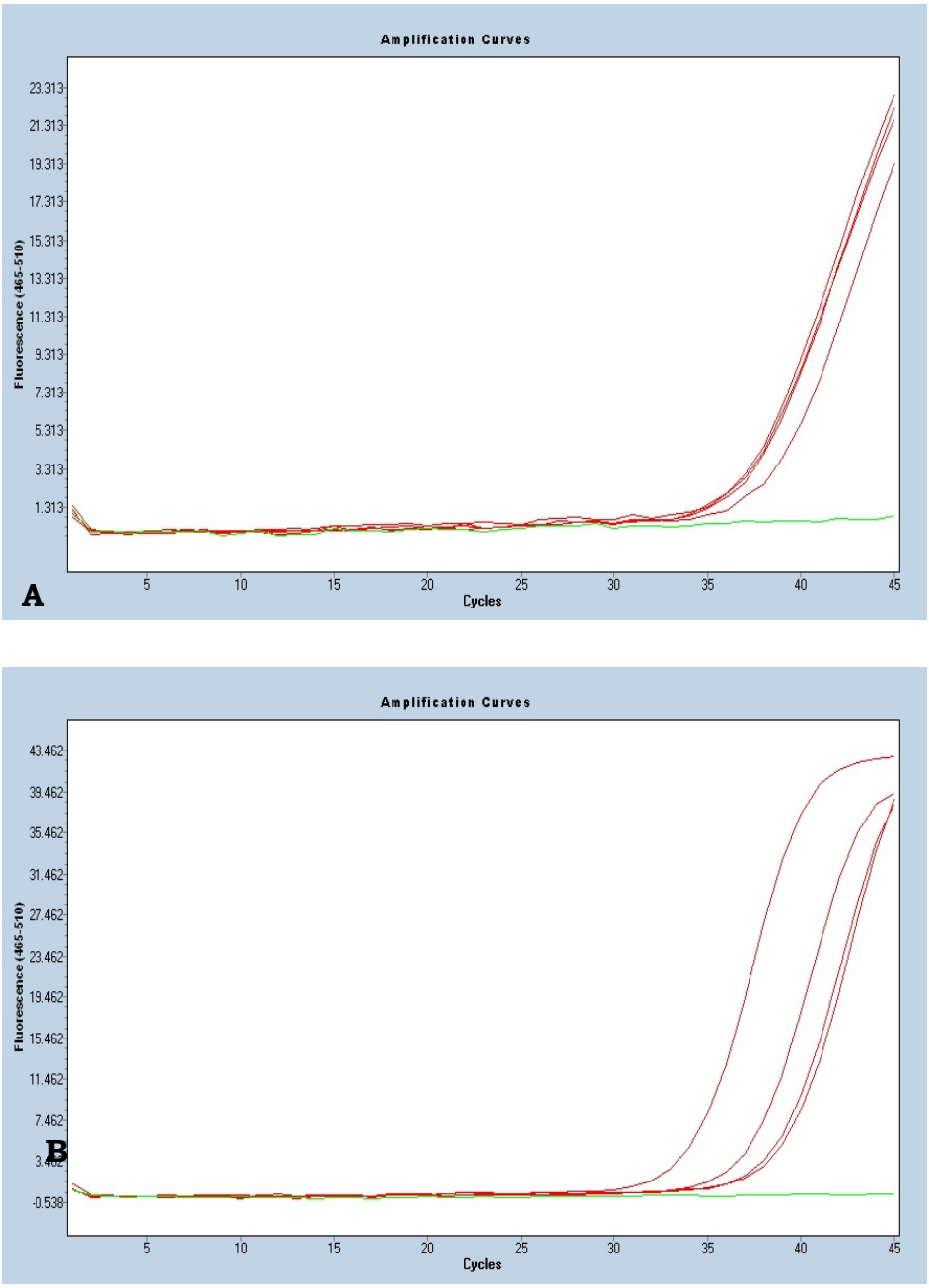
Tablo 13: Eş zamanlı PZR yöntemiyle CB1 reseptörüne ait mRNA seviyeleri

Grup	**CB1 reseptör mRNA seviyesi***
Kontrol (n =8)	$1.77x10^{10} \pm 1.20x10^{10}$
Δ^9-THC (n = 6)	$2.02x10^{11} \pm 1.79x10^{11}$
Diyabet (n = 8)	28.56 ± 26.31
Diyabet+Δ^9-THC (n = 7)	2.61 ± 2.25
P_{ANOVA}	NS

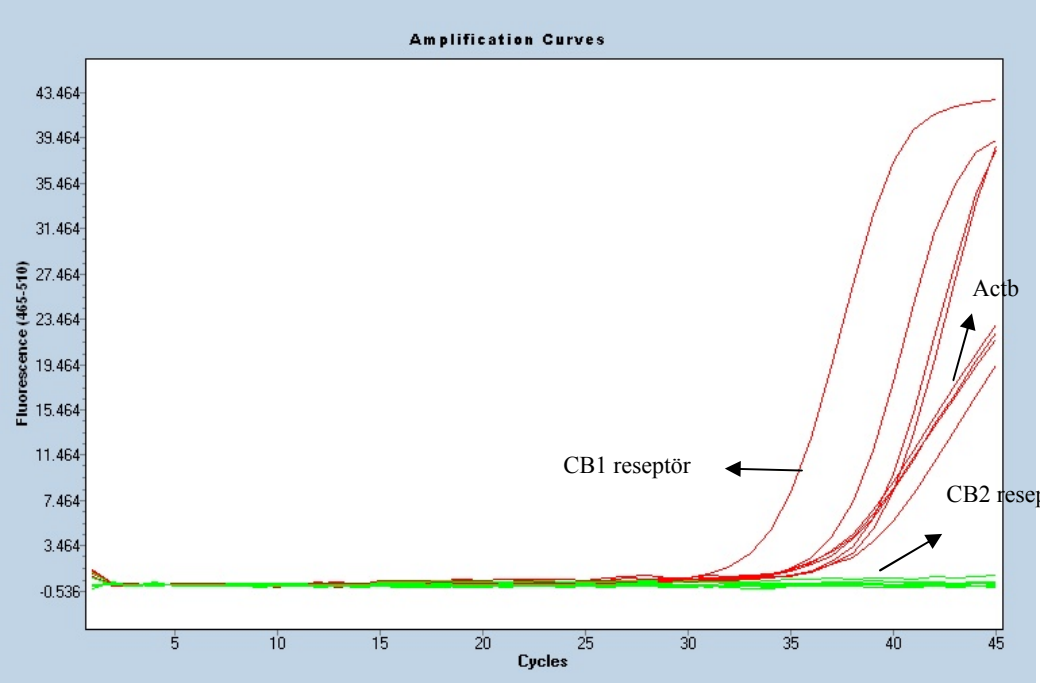
***Ortalama ± SE, NS: Anlamlı değil.**

4.5.2. Kannabinoid 2 (CB2) Reseptör mRNA Seviyesindeki Değişiklikler

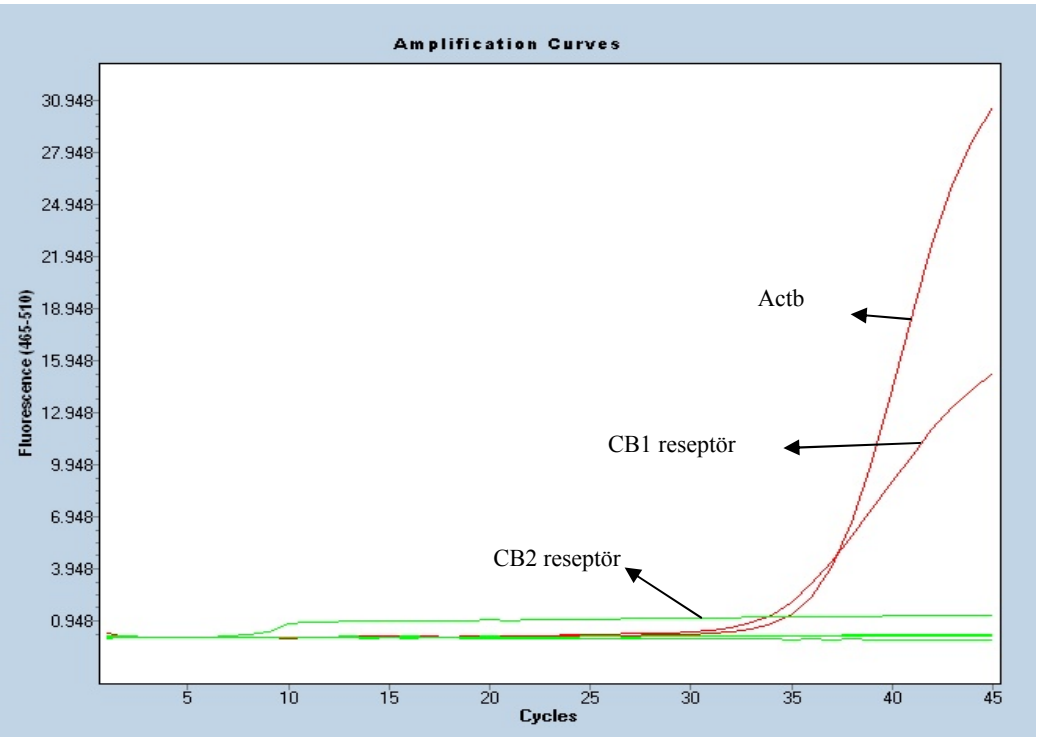
CB2 reseptörüne ait mRNA ölçümlerinde diyabet ve Δ^9-THC gruplarına ait sadece birer hayvanda pozitif sonuç alındı. Dört gruba ait negatif sonuç alınan örnekler tekrar çalışıldığında yine sonuçlar negatif olarak bulundu (Şekil 34).



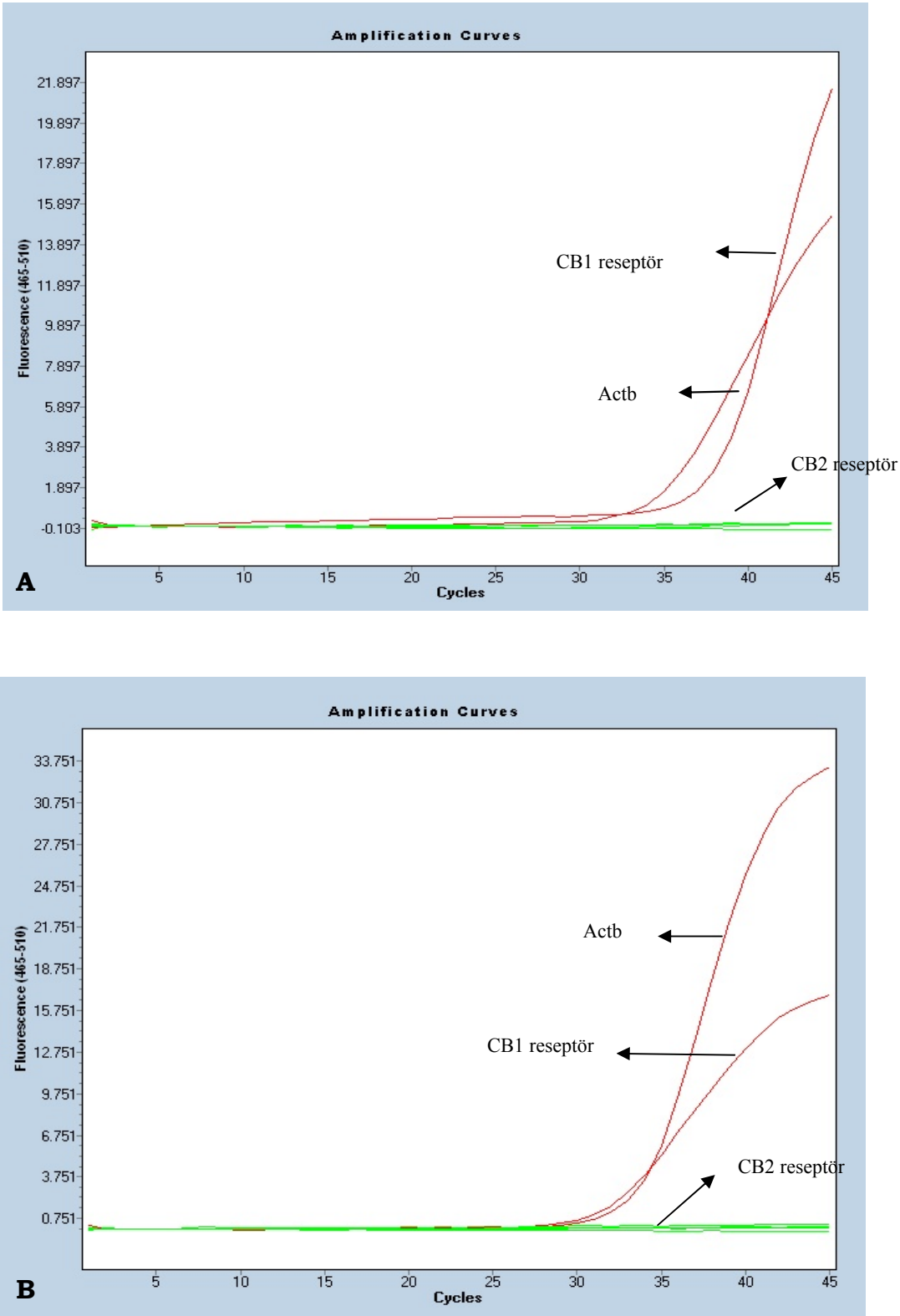
Şekil 26: Kontrol grubunda eş zamanlı PZR çoğaltım eğrilerinin Light Cycler 480 görüntüsü. A: Beta-aktin (Actb) (kırmızı), B: CB1 reseptör (kırmızı). Negatif kontrol (yeşil).



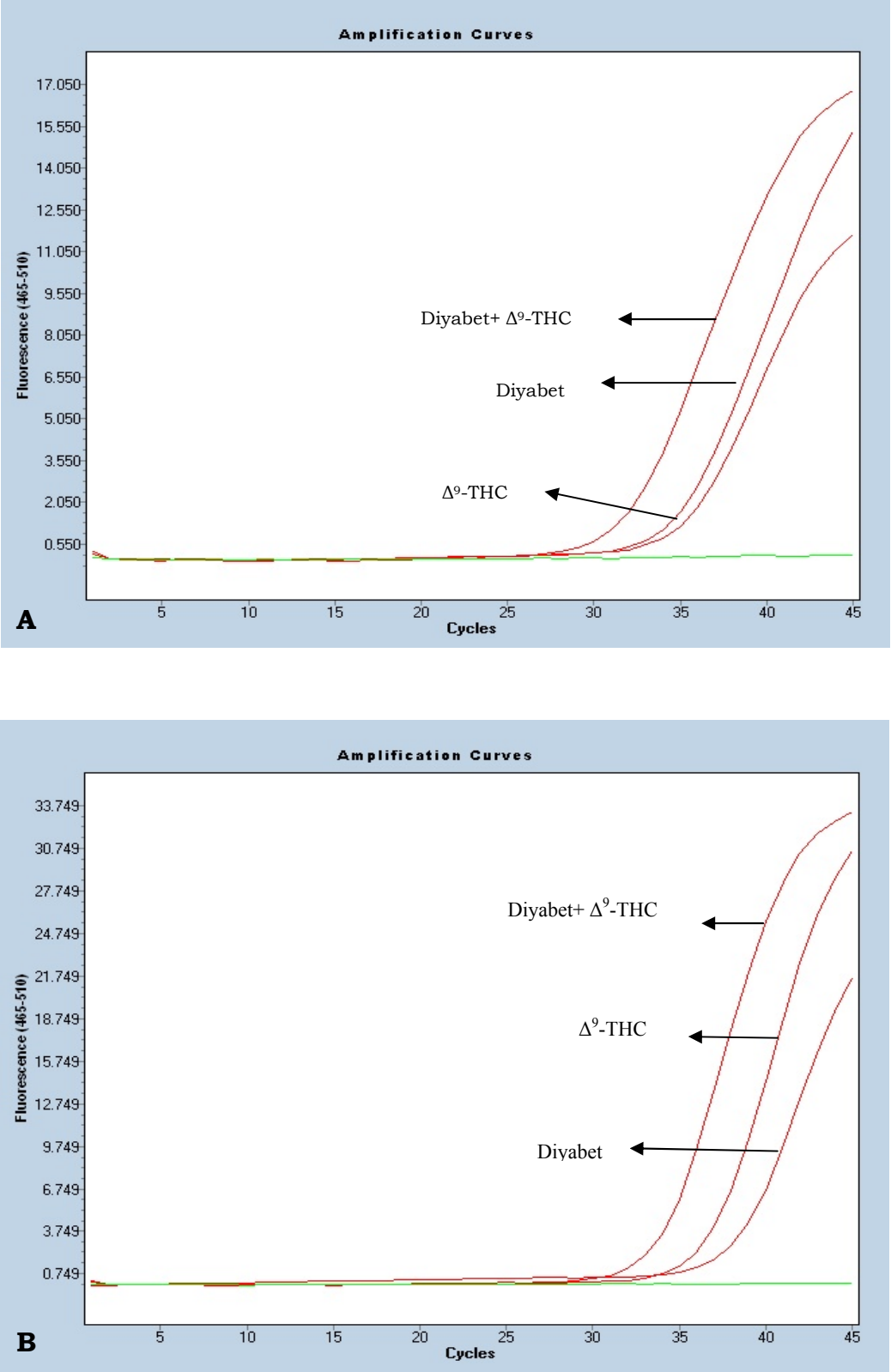
Şekil 27: Kontrol grubunda Actb, CB1 ve CB2 reseptör genlerinin eş zamanlı PZR çoğaltım eğrilerini gösteren Light Cycler 480 cihaz yazılımı görüntüsü. Negatif kontrol (yeşil).



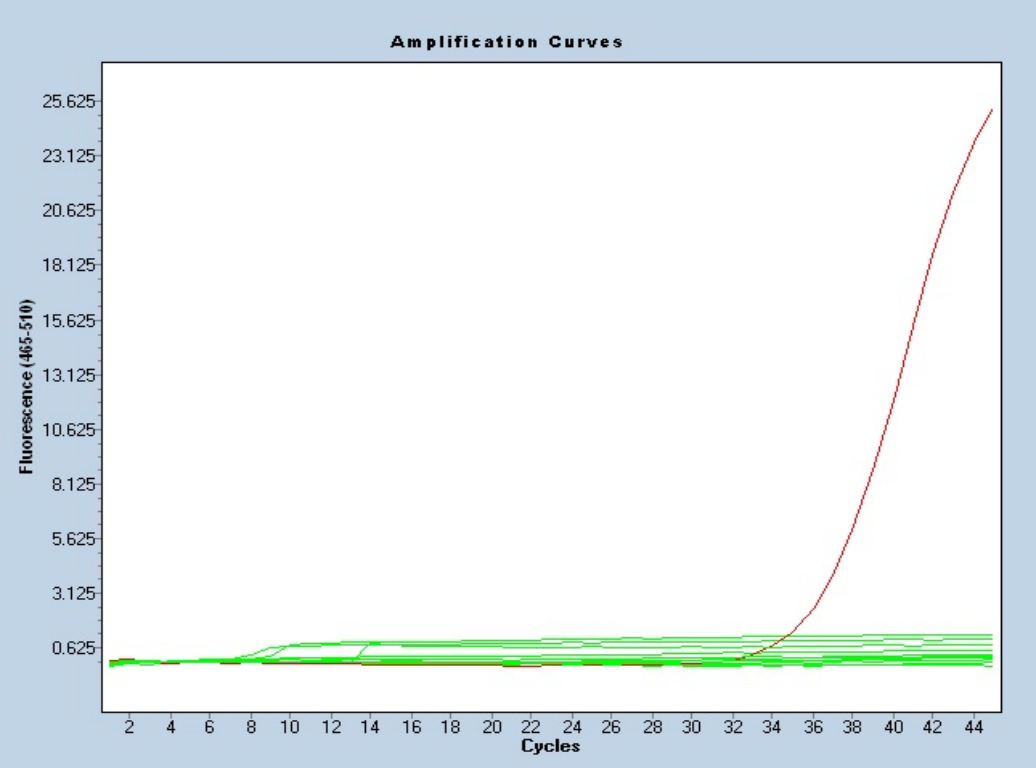
Şekil 28: Δ^9-THC grubuna ait bir sıçanın Actb, CB1 ve CB2 reseptör genlerine ait eş zamanlı PZR çoğaltım görüntüsü. Negatif kontrol (yeşil).



Şekil 29: Actb, CB1 ve CB2 reseptör genlerine ait eş zamanlı PZR çoğaltım görüntüsü A: STZ-diyabet grubu (kırmızı), B: Diyabet+Δ^9-THC grubu (kırmızı). Negatif kontrol (yeşil).



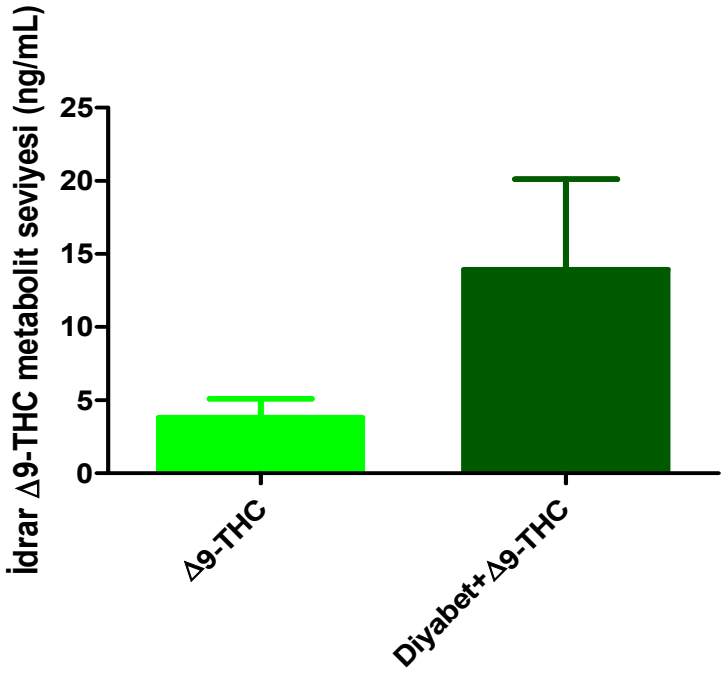
Şekil 30: Δ^9-THC, diyabet ve diyabet+Δ^9-THC gruplarına ait eş zamanlı PZR çoğaltım görüntüsü. A: Actb (kırmızı), B: CB1 reseptör (kırmızı). Negatif kontrol (yeşil).



Şekil 31: CB2 reseptör genine ait eş zamanlı PZR çoğaltım görüntüsü. Diyabetik hayvanda pozitif sonuç (kırmızı), negatif sonuçlar ve negatif kontrol (yeşil).

4.6. İdrar Analiz Bulguları

Δ^9-THC'nin enjeksiyonunu takip eden gün 0. gün olarak kabul edildi. 0. 7. ve 14. günlerde toplanan Δ^9-THC ve diyabet+Δ^9-THC gruplarına ait idrar örneklerinde Δ^9-THC metabolitlerinin analizleri DRI® kannabinoid miktar tayin yöntemi kullanılarak yapıldı (Tablo 6). 0. günde diyabet+Δ^9-THC grubu ile Δ^9-THC grubunun idrar metabolit atılımı istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, diyabet+Δ^9-THC grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış görüldü (Şekil 32). Her iki gruba ait sonuçlar 7. günde negatif olarak bulundu. Diyabet+Δ^9-THC grubuna ait yedi hayvandan sadece birinde 14. günde pozitif sonuç (9.5 ng/mL) alındı (Tablo 14).



Şekil 32: 0. gün, idrar Δ^9-THC metabolit miktarları

Tablo 14: 0., 7. ve 14. günlerde idrar Δ^9-THC metabolit miktarları

Grup	0. gün* (ng/mL)	7. gün* (ng/mL)	14. gün* (ng/mL)
Δ^9-THC (n = 6)	3.80 ± 1.28	0.00	0.00
Diyabet+Δ^9-THC (n = 7)	13.93 ± 6.18	0.00	1.36 ± 1.36
P_{ANOVA}	NS	NS	NS

***Ortalama ± SE, NS: Anlamlı değil.**

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Δ^9-THC uygulanan diyabetik sıçanların antioksidan sistemleri, pankreas kannabinoid reseptörlerinin gen anlatımları ve idrardaki Δ^9-THC metabolitleri incelendi.

Düşük dozdaki NAD'ın STZ'nin neden olduğu kilo kaybına, kan glukoz seviyesindeki yükselmeye ve hipoinsulinemiye karşı koruyucu olduğu, Yüksek dozda NAD uygulanmasının ise bu etkilere karşı daha da koruyucu rol üstlendiği bildirilmiştir. STZ-NAD modeli ile yapılan araştırmalarda, hayvanların vücut ağırlıklarında azalma, kan glukoz seviyelerinde ise artış gözlenmiştir (76, 81, 120). Erişkin sıçanlara verilen STZ ve uygun dozda koruyucu NAD ile pankreatik insulin stokları azaltılarak, insan NIDDM özelliklerini gösteren model oluşturulmuştur (81, 118, 119). Yapılan araştırmalarda fare ve sıçanlara farklı dozlarda STZ + NAD (180 mg/kg + 210 mg/kg, 60 mg/kg + 230 mg/kg, 65 mg/kg + 230 mg/kg, 50 mg/kg + 100 mg/kg, 100 mg/kg + 240 mg/kg) uygulanması sonucu tip-2 diyabet modelleri oluşturulmuştur ve tip-2 diyabet modeli oluşturulan hayvanlarda kan glukoz seviyesinin yükseldiği bildirilmiştir (66, 120-125). Çalışmada, 85 mg/kg NAD ve 65 mg/kg STZ enjeksiyonları ile oluşturulan tip-2 diyabetik sıçanların kan glukoz düzeyleri diğer çalışmalara benzer olarak artış gösterdi. Diyabetik sıçanlara 7 gün boyunca uygulanan Δ^9-THC sonrasında 14. günde kan glukoz seviyesinin artmasına rağmen 21. günde glukoz seviyesinde bir azalma saptandı. Bu bulgulara göre Δ^9-THC uygulama süresinin değiştirilmesiyle birlikte kan glukoz düzeyindeki azalmanın daha ideal bir değere ulaşabileceği düşünülmektedir.

Tedavi uygulanmamış diyabetiklerde kilo kaybı süreklilik gösterirken, Δ^9-THC'nin diyabetiklere uygulanmasıyla kilo kaybının minumuma indiği ve 21. günde az da olsa kilo alımı görüldü. Vücut ağırlık bulgularımıza göre Δ^9-THC'nin diyabetiklere verilmesiyle diyabet sırasında oluşan fazla kilo kayıpları önlenebilir. Yapılan çalışmalar kannabinoid reseptör agonisti olan Δ^9-THC'nin iştah hormonlarının düzenlenmesinde, besin alımını uyarmada rol üstlendiğini böylece iştah metabolizmasında değişimlere neden olduğunu göstermektedir (8, 9). Bunun aksine, kannabinoid reseptör antagonistlerinin endojen kannabinoidleri blokladığı bir çalışmada ise vücut ağırlıklarının azaldığı tespit edilmiştir (126). Klinikte kullanımı bulunan CB1 reseptör antagonistlerden biri olan rimonabantın, kilo alımını azalttığı gösterilmiştir (13). Çalışmada ki vücut ağırlık artışı Δ^9-THC'nin iştah metabolizmasındaki rolünü desteklemektedir.

Kan glukoz düzeyinin yüksek seyretmesine bağlı olarak oksidatif stresin geliştiği araştırma sonuçlarında rapor edilmiştir (109, 127). Tip-2 diyabetik bireylerde hipergliseminin sebep olduğu oksidatif durumun, diyabetin tedavi edilmesiyle normale döndüğü bildirilmiştir (128). Serbest radikallerin etkisini azaltmada katalizör olarak görev yapan SOD enziminin faaliyeti sonucunda oluşan toksik H_2O_2'nin su ve oksijene dönüşmesinde görevli CAT enzimi bulgularına göre diyabetik sıçan plazması kontrolle karşılaştırıldığında bir artış gösterdi. Bunun nedeni STZ toksisitesinin diyabetiklerde CAT aktivitesine olan ihtiyacı arttırmasıdır. Δ^9-THC uygulanmış diyabetik sıçanların plazma CAT aktivitesinde ki azalma toksisitenin azaldığının göstergesi sayılabilir. SOD enzim aktivasyonu diyabetiklerde kontrole göre azalırken, diyabet+Δ^9-THC grubuna ait sıçanlarda ciddi bir SOD aktivite artışı görüldü. Antioksidan enzim olan SOD aktivitesinin artması diyabetiklerde Δ^9-THC'nin oksidatif stresi azaltmadaki rolünü desteklemektedir. Serbest radikallerin temizlenmesinde görevli olan GSH'ın konsantrasyonunun azalmasının oksidatif stres ile ilişkili olduğu bilinmektedir (103).

Eritrosit GSH seviyesinin diyabetik sıçanlara Δ^9-THC uygulaması ile yükselmesinin sebebi Δ^9-THC'nin antioksidan olarak iş gördüğünü doğrulamaktadır. Lipid peroksidasyonu, oksidatif stresin göstergesi olan önemli paremetrelerden biridir. Deneysel hayvan modellerinde kullanılan STZ, pankreas dokularındaki MDA seviyelerinde bir artış gösterirken antioksidan enzimlerin aktivitelerinde azalmaya sebep olmaktadır (129, 130). Δ^9-THC diyabet olmayan hayvanlara uygulandığında MDA'nın plazmadaki seviyesini artırırken, Δ^9-THC'nin diyabetli sıçanlara uygulanmasının plazma MDA seviyesini azalttığı belirlendi. Bu bulgular; Δ^9-THC'nin diyabetiklere uygulandığı takdirde bir antioksidan madde gibi addedilebileceğini güçlendirmektedir.

Tip-2 diyabette ROT aktivasyonuna sebep olan çeşitli yolaklar bulunmaktadır (112). Deneysel ve klinik çalışmalar diyabetin oksidatif stres nedeniyle çeşitli organlarda doku tahribata neden olduğunu göstermiştir (129, 131-135). Manna ve ark. (129)'nın çalışmasına göre, diyabetik pankreas dokusunda antioksidan seviyesinin azaldığı belirtilmiştir. Diğer bir çalışmada, diyabet modellerinde GSH seviyesinin de azaldığı saptanmıştır (130). Yüksek kannabidiol (CBD) içeriğine sahip *Cannabis sativa* ekstraktının uygulandığı STZ-diyabetik hayvanların karaciğer dokularında GSH seviyesinin normale döndüğü gözlenmiştir. Aynı dokudaki MDA seviyesinde de bir azalma meydana geldiği bildirilmiş ve *Cannabis sativa* ekstraktının antioksidan potensiyele sahip olduğu belirtilmiştir (130). Pinto ve ark. (93)'nın karaciğer dokusu üzerine yaptıkları araştırmada, Δ^9-THC'nin 10 gün boyunca farelere uygulanması ile GSH seviyesinde herhangi bir değişiklik saptanmamıştır. Bu araştırmada ise pankreas doku GSH seviyesi Δ^9-THC uygulanan diyabetik sıçanlarda eritrositlerdekine benzer şekilde önemli derecede arttı. Çalışmada Δ^9-THC'nin kontrol ve diyabetik hayvanlara uygulanması sonucunda pankreas dokusundaki MDA seviyesinde herhangi bir değişiklik tespit edilmedi. GSH seviyesindeki artış 7 gün boyunca diyabetiklere uygulanan Δ^9-THC'nin pankreas

dokusunda oksidatif hasarı azaltıcı etkisinin olduğunu fakat MDA seviyesindeki belirgin azalma için diyabetiklere Δ^9-THC uygulama süresinin uzatılması gerektiğini düşündürmektedir. Diyabetiklerde doku CAT aktivitesinin azalmasının STZ'nin pankreasta oluşturmuş olduğu doku hasarı nedeniyle hücrelerde yeterince CAT gen anlatımı yapılamamasından kaynaklandığını düşündürmektedir. Diyabet+Δ^9-THC grubuna ait pankreas dokusunda CAT ve SOD enzim aktivitelerinin birbirine paralel olarak artmasının nedeni Δ^9-THC'nin doku hasarını engellemesi olabilir. Pinto ve ark. (93)'nın sağlıklı farelere 10 gün boyunca 10 mg/kg Δ^9-THC uygulaması ile karaciğer dokusunda oksidatif stres belirteçlerinde herhangi bir değişiklik saptayamamışlardır. Yüksek dozda Δ^9-THC uygulamasının sağlıklı hayvanlarda antioksidan etki göstermediği gözlenmesine rağmen çalışmada düşük dozda uygulanan Δ^9-THC'nin özellikle diyabetik sıçanlar için antioksidan bir madde gibi oksidatif stresi düzenleyebileceğinin kanıtı olabilir.

Kannabinoidlerin antioksidan etki gösterdikleri ve böylece oksidatif strese bağlı oluşan hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde kullanılabileceği ileri sürülmüştür (136). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, kannabinoidlerin hastalıklara karşı tedavi edici etkisinin geliştirilmesi ağırlık kazanmıştır. Kannabinoid araştırmalarının birçoğunu kapsayan nörodejeneratif hastalıklarda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir (2, 43, 137-139). Hiperglisemik koşullarda eksojen CB1 reseptör agonistinin sinir hücrelerine koruyucu etki yaptığı gösterilmiştir (140). Bir başka çalışmada ise Δ^9-THC uygulanmasının CB2 reseptörlerinin aktivasyonunu ve nitrik oksit üretimini arttırdığı böylece kalp hücrelerinin korunduğu savunulmaktadır (141). Hücre kültürü ile yapılan bir çalışmada ise Δ^9-THC'nin ROT oluşumunu engelleyerek hücre ölümünü önlendiğine işaret edilmektedir (49). Günümüzde endokannabinoid sistem ile ilgili metabolik araştırmalar diyabet tedavisi için devam etmektedir (13, 142).

Kannabinoid reseptör seviyelerinin adacık hücrelerindeki diğer hormonların üretiminde değişiklik meydana getirip getirmediği hala tartışmalıdır. İnsan ve fare pankreasından izole edilen adacıklar üzerinde yapılan çalışmalarda, pankreas dokusunda bulunan CB1 ve CB2 reseptörlerinin insulin sekresyonunu uyardığı ileri sürülmüştür (16, 143). *Cannabis sativa*'nın ana bileşeni olan Δ^9-THC, CB1 ve CB2 reseptörleri için agonisttir. Δ^9-THC'nin sentetik agonistlere göre CB1 ve CB2 reseptörlerine etkisinin daha zayıf olduğu belirtilmiştir (55, 144). Vilches-Flores ve ark. (145) hem kannabinoid agonist hem de antagonistlerinin pankreas adacıklarında CB1 reseptör gen anlatımının düzenmesiyle ilişkili olduğunu öne sürmüşlerdir. Langerhans adacıklarında kannabinoid reseptör genlerinin anlatımları rapor edilmesine rağmen endokrin hücrelere özgü kannabinoid reseptör alt tiplerinin varlığı ve lokalizasyonu ile ilgili henüz bir fikir birliğine varılamamıştır. CB1 ve CB2 reseptör pozitifliği yüksek yağlı diyet uygulanmış fare pankreas kesitlerinde immunohistokimya yöntemi ile gösterilmiştir (146). Bermudez-Silva ve ark. (147)'nın insan pankreas hücreleri üzerinde yaptıkları araştırmada, CB1 reseptörünün ekzokrin pankreasta görülmediğini aksine CB2 reseptörünün ekzokrin dokuda bulunduğunu ve adacıkta nadiren görülen CB2 pozitif hücrelerin de insulin içermeyen diğer endokrin hücreler olduklarını çift immunofloresans yöntemi ile göstermişlerdir. Fare ve insan pankreas adacıklarındaki endokrin hücre grubu olan alfa, beta ve delta hücrelerinde CB1 reseptörü bulunduğu ileri sürülmüştür (24, 148). Bazı araştırıcılar fare ekzokrin pankreasında CB1 ve CB2 reseptörlerinin bulunmadığını rapor etmişlerdir (143, 146). CB1 reseptörü çoğunlukla pankreas Langerhans adacıklarında bunun aksine, CB2 reseptörü ise çoğunlukla pankreatik kanal hücrelerinde görüldü. CB1 reseptörünün Langerhans adacıklarından salınan endokrin hormonların düzenlenmesi ile, CB2 reseptörünün ise pankreatik kanalda bulunan ve pH dengelemesinde görevli olan bikarbonat iyonu ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Diyabetiklerde azaldığı bilinen bikarbonat iyonunun sekresyonunu sekretin ve kolesistokinin hormonlarını uyardığı bilinmektedir.

Böylece CB2 reseptörünün sindirimde görevli sekretin ve kolesistokinin hormon mekanizmasıyla ilişkili olabileceğini söyleyebiliriz. G proteine bağlı reseptörlerin etkilerinden biri gen anlatımının aktivasyonudur. G proteine bağlı reseptör ailesine ait olan CB1 reseptör peptidinin nuklear olarak lokalize olması transkripsiyon faktörleri (cAMP response element binding protein-CREB gibi) üzerinde etkili olabileceğinin göstergesi olarak kabul edilebilir. cAMP glikojen fosforilazı aktif hale getirerek glikojeni glukoza dönüşütürür ve kan glukoz seviyesi yükselir. CB1 reseptörünün adenil siklaz enzim inhibisyonunda görev aldığı ve böylece cAMP düzeyinin düşmesinde rol oynadığı ileri sürülmüştür. CB1 reseptörünün nukleustaki lokalizasyonu CREB üzerinden endokrin hormon sentezinde görev alabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca nukleusta görevli olan diğer proteinlerin nukleus içerisine taşınmasında da işlevi olabileceği varsayımlar arasındadır. Aynı şekilde G proteine bağlı reseptörlerden bir diğeri olan pankreatik kanal hücrelerindeki CB2 reseptör peptidinin hem nuklear hem de sitoplazmik işlevinin olduğu düşünülmektedir.

Çeşitli çalışmalarda CB1 ve CB2 reseptör gen anlatımları fare, sıçan ve insan adacıklarında araştırılmıştır (1, 147, 148, 150-152). STZ ile oluşturulan diyabet modelinde CB1 reseptör mRNA seviyesinin beynin hipokampüs bölgesinde azaldığı izlenmiştir (149). Yüksek glukoz seviyesi CB1 reseptör mRNA seviyesinde yaklaşık % 50 civarında bir düşüşe sebep olmaktadır (140). Fare insulinoma beta hücreleri (MIN6) üzerinde yapılan bir çalışmada endokannabinoidlerin sentezinin CB1 ve CB2 gen anlatımlarını arttırarak insulin sekresyonunu uyardığı ileri sürülmüştür (153). Pankreas beta hücre modeli olarak geniş kullanıma sahip olan sıçan insulinoma RIN-m5F hücrelerinde CB1 ve CB2 reseptör mRNA'larının anlatımlarının olduğu bildirilmiştir (152). Aynı yıl yapılan başka bir çalışmada da CB1 ve CB2 reseptör mRNA'larının fare adacıklarında bolca görüldüğü gösterilmiştir (1). Nakata ve Yada (151) ise yaptıkları bir araştırmalarında fare adacıklarında CB1 reseptör

mRNA anlatımının olduğunu fakat CB2 reseptör mRNA anlatımının olmadığını öne sürmüşlerdir. Ayrıca, fare pankreasında CB2 reseptörlerinin eksikliğini immunohistokimya yöntemi ile de desteklemişlerdir. Zhang ve ark. (154)'nın PC12 hücreleri ve deneysel hayvan modeli ile yaptıkları çalışmalarında CB1 gen anlatımı ve glukoz konsantrasyonu arasında zıt bir ilişki olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmaya paralel olarak CB1 reseptör gen anlatımının diyabetiklerde azalması, kan glukoz seviyesinin artması sonucu olabilir. Diyabet+Δ^9-THC grubunda CB1 reseptör immunpozitif hücre alanı diyabetiklere göre artış gösterirken, mRNA seviyesi diyabetiklere göre azaldığı bulundu. Böylece, Δ^9-THC'nin diyabetik sıçanlara uygulanması CB1 reseptör sentezinin hızlanmasına ya da peptid salınımının azalmasına neden olmuş olabilir. Birkaç kez düşük dozda STZ enjeksiyonunun neden olduğu otoimmun diyabetik farelerde yapılan bir çalışmaya göre, immun sistem beta hücre hasar artışına sebep olmaktadır ve Δ^9-THC tedavisi bazı otoimmun yanıtları azaltabilmektedir (25). Lunn ve ark. (155) CB2 reseptörlerinin immun hastalık etkilerinin hafifletilmesinde rolü olduğunu bildirmişlerdir.

Diyabet grubuna göre diyabet+Δ^9-THC sıçan pankreatik kanallarında CB2 reseptör immunpozitif hücre alan yüzdelerinde artış görüldü. Antioksidan bir madde olarak Δ^9-THC'nin muhtemelen CB2 reseptörü aracılığıyla beta hücre hasarının azalmasına ve ayrıca yeni beta hücrelerinin oluşmasında görev alan pankreatik kanalları uyararak hücre yenilenmesine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. Böylece bir agonist tarafından CB2 reseptör üreten hücrelerin aktive edilmesiyle tip-2 diyabet tedavisinin olumlu yönde gelişebileceğini söyleyebiliriz. CB2 reseptör mRNA seviyelerinin iki hayvanda sonuç vermesinin sebebi bireysel farklılık olarak düşünülebilir. Diğer yandan tüm örneklerden yeterli cDNA elde edilmesine ve döngü sayısının yeterli olmasına rağmen CB2 reseptör mRNA seviyesinin pankreas dokusunda tespit edilebilecek düzeyde olmaması düşünülebilir.

Bunun sebebi kontrol doku olarak kullanılan beyin örneğinde CB2 reseptör mRNA seviyesinin pozitif sonuç vermiş olmasıdır. Diyabetik sıçanlarda CB1 ve CB2 reseptörlerinin azalmasının diyabetteki kilo kayıplarının nedeni olduğu düşünülebilir. CB1 ve CB2 gen anlatım değişiklikleri sonucunda sentetik kannabinoidler yerine bitkisel kannabinoid olan Δ^9-THC tercih nedeni olabilir.

Cannabis kullanımının tespit edilmesinde kan ve idrar örneklerinde yararlanılır (46). Çalışmalar kan ve idrar örneklerinde Δ^9-THC ve metabolitleri olan 11-nor-9-karboksi-Δ^9-tetrahidrokannabinol (THC-COOH), 11-hidroksi-Δ^9-tetrahidrokannabinol (THC-OH)'nin bulunabildiğini göstermiştir (5, 46, 156-158). Farklı örnek türlerinde Δ^9-THC metabolitlerinin analizleri için GC-MS, LC-MS ve cedia immun ölçüm test yöntemleri kullanılmıştır (10, 46, 159, 160). Solunum yoluyla kannabise maruz kalmış kişilerden alınan idrar örneklerinden yapılan bir çalışmaya göre 6. ve 14. saatler arasında maksimum sonuç alınmıştır ve hiçbir idrar örneğinde kannabinoid konsantasyonu 25 ng/mL'yi aşmamıştır (46).

Δ^9-THC'nin yarılanma ömrü sigara olarak içilmesini takiben 20-40 saat kadardır ve ağır marijuana kullanımında birkaç hafta tespit edilmesi mümkündür (10). Oral yoldan son doz alımından sonraki 22.5 saatte kandaki Δ^9-THC konsantrasyonunun % 80'inden daha fazlasının azaldığı bildirilmiştir (159). Bazı araştırmacılar idrar örneklerinde 24-95 gün sonra dahi kannabinoid metabolitlerinin saptanabildiğini ileri sürmüşlerdir (5, 156, 162, 163). Çalışmamızda intraperitoneal olarak enjekte edilen Δ^9-THC'nin sıçan idrarlarında yalnızca enjeksiyondan sonraki gün toplanan idrarlarda Δ^9-THC metabolitlerine rastlandı. Diyabet+Δ^9-THC grubunun metabolit seviyesinin Δ^9-THC grubuna göre yüksek bulunması diyabetik hayvanlarda Δ^9-THC'nin daha hızlı metabolize olarak poliüriye eşlik ettiğini düşündürmektedir. Diyabetiklerdeki Δ^9-THC metabolitlerinin sağlıklı gruba göre hızlı

atılmasındaki bu durum, adli bilimler açısından ülkemizde yasaklı madde olan Δ^9-THC'yi kullanan diyabetik kişilerin tespit edilebilmesi için farklı bir bakış açısı sağlayabilir.

Sonuç olarak, diyabetiklere uygulanan Δ^9-THC'nin kilo alımı ve kan glukoz seviyesinin düzenlenmesinde etkin olduğu görülmektedir. Δ^9-THC'nin diyabetik sıçanlar için antioksidan olarak oksidatif stresi azaltmada ki rolü ilk kez gösterilmiştir. Ayrıca endokrin ve ekzokrin pankreas dokusunda CB1 ve CB2 reseptörlerinin tartışmalı olan varlığı bu çalışma ile desteklenmiştir. Düşük dozda Δ^9-THC uygulanan diyabetik sıçan pankreasında kannabinoid reseptörlerinin gen anlatımı ilk defa gösterilmiştir. İlk kez Δ^9-THC metabolitlerinin diyabetik idrarlarındaki atılımları değerlendirildi. Δ^9-THC metabolitlerinin diyabetik sıçanlarda sağlıklılara göre daha fazla miktarda atılımının tespiti adli bilimlere katkı sağlayabilir.

Kannabinoid reseptörleri ile etkileşimi olan diğer moleküllerin mekanizmalarının açıklanması çalışmaya katkı sağlayacaktır. Çalışmaların bu yönde devam etmesi ve diğer araştırmalarla desteklenmesi durumunda, birçok ülkede yasaklı madde olan Δ^9-THC'nin kompleks bir hastalık olan tip-2 diyabet tedavisi için belli süre ve dozlarda kullanımına izin verilmesine öncülük edebilir.

6. ÖZET

Kannabinoidlerin bağımlılık yapıcı ve bellek fonksiyonlarında bozulma etkilerinin yanısıra eksitotoksisite ve kalsiyum düzenlenmesinde ayrıca antioksidan olarak iş gördüğü ileri sürülmektedir. Tip-2 diyabet insulin salgılanmasındaki bozukluk ve glukoz artışı sonucu insulin direnci ile karakterize olan multifaktöriyel bir hastalıktır. Diyabetik hastalardaki hiperglisemi oksidatif hasara yol açarak reaktif oksijen türevlerinin meydana gelmesine neden olmaktadır. Bu çalışmada; Δ^9-THC uygulanmış diyabetik sıçanlarda, Δ^9-THC'nin metabolitlerinin idrardaki miktar değişimlerinin saptanması, tip-2 diyabetik pankreas dokusunda oluşan oksidatif hasar üzerine etkileri ve pankreasta kannabinoid reseptörlerinin varlığının gösterilmesi amaçlandı.

8-10 haftalık Sprague-Dawley sıçanlar dört gruba ayrıldı. Grup I: Fizyolojik su intraperitonal (i.p) olarak verildi (n=8). Grup II: 7 gün Δ^9-THC verilen grup (3 mg/kg/gün) (n=6) (i.p). Grup III: Streptozotosin (STZ) (65 mg/kg) + Nikotinamid (NAD) (85 mg/kg) (n=8) (i.p). Grup IV: diyabetik sıçanlara 7 gün boyunca Δ^9-THC (3 mg/kg/gün) uygulanan grup (n=7) (i.p). Δ^9-THC muamelesinden sonraki 0.,7. ve 14. günlerde idrar analizi yapıldı. Sıçanların kan ve pankreas doku örneklerinde malondialdehit (MDA) ve glutatyon (GSH) seviyeleri, süperoksit dizmutaz (SOD) ve katalaz (CAT) aktiviteleri ölçüldü. CB1 ve CB2 reseptörleri immunohistokimya, gen anlatım düzeyleri de eş zamanlı PZR yöntemi ile incelendi.

Diyabet+Δ^9-THC grubuna ait sıçanların 14. ve 21. günlerde vücut ağırlıklarının diyabetik hayvanlara göre arttığı bunun aksine kan glukoz seviyesinin ise azaldığı saptandı. Diyabet+Δ^9-THC grubunda diyabet grubuna göre plazma MDA seviyesinde azalma eritrosit

GSH seviyesinde ise artış saptandı. Doku CAT ve SOD aktiviteleri de diyabet+Δ^9-THC grubunda diyabetik sıçanlara göre arttı. Diyabet+Δ^9-THC grubuna ait pankreas Langerhans adacıklarında CB1 reseptör immunpozitif hücre alan yüzdesi diyabet grubu ile karşılaştırıldığında bir artış görüldü. Benzer şekilde pankreatik kanallarda CB2 reseptör immunpozitif hücre alan yüzdeleri de diyabet+Δ^9-THC grubunda arttı. Diyabetik sıçanların pankreas dokularında CB1 reseptör mRNA seviyesinin kontrol gruba göre azaldığı gözlendi. Δ^9-THC enjeksiyonundan sonraki günde idrar metabolit atılımının diyabet+Δ^9-THC grubunda Δ^9-THC grubuna göre arttığı saptandı.

Sonuç olarak kilo alımı ve kan glukoz seviyesinin düzenlenmesiyle ilişkili olduğu saptanan Δ^9-THC'nin tip-2 diyabet tedavisinde uygun dozda kullanımı antioksidan etkileri nedeniyle tercih edilebilir. Ayrıca, diyabetik sıçan idrarlarında Δ^9-THC atılımının kontrollerden daha hızlı olması nedeniyle diyabetik hastalar için adli tıp değerlendirmelerinde gözönüne alınabilir.

Anahtar Kelimeler: Δ^9-THC, tip-2 diyabet, CB1 reseptör, CB2 reseptör, antioksidan

7. ABSTRACT

Cannabinoids are suggested to have a role in excitotoxicity and calcium regulation, and also function as an antioxidant. Besides they have an effect on cognitive function disorders and addictive. Type-2 diabetes is a multifactorial disease characterized by insulin resistance due to impairment of insulin secretion and increase in glucose levels. Hyperglycemia in diabetic patients causes reactive oxygen species by inducing oxidative stress. In this study, we aimed to determine the changes in the levels of Δ^9-THC metabolites in urine, their effect on oxidative damage in type-2 diabetic pancreas tissue and the existence of cannabinoid receptors in pancreas.

8-10 week-old Sprague-Dawley rats were divided into 4 groups. Group I: Physiological saline was administered intraperitoneally (i.p) (n=8). Group II: Group that is given Δ^9-THC for 7 days (3 mg/kg/day) (n=6) (i.p). Group III: Streptozotocin (STZ) (65 mg/kg) + Nicotinamide (NAD) (85 mg/kg) (n=8) (i.p). Group IV: Diabetic rats group that is given Δ^9-THC (3 mg/kg/day) for 7 days (n=7) (i.p). Urine analysis was performed on days 0, 7 and 14 after the administration of Δ^9-THC. Malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) levels, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities were measured in rat blood and pancreatic tissue samples. CB1 and CB2 receptors were examined with immunohistochemistry and their gene expression levels were analyzed with real-time PCR.

When the body weights of the diabetes+Δ^9-THC group were determined to increase, their blood glucose levels were determined to decrease in day 14 and 21 compared to diabetic rats. Diabetes+Δ^9-THC group was assessed to have a decreased MDA level in plasma and an

increased GSH level in erythrocyte compared to diabetes group. CAT and SOD activities in tissue were also increased in diabetes+Δ^9-THC group compared to diabetic rats. An increase was determined in pancreatic Langerhans islets of diabetes+Δ^9-THC group for the percentage of CB1 receptor immunopositive cell area as compared to diabetes group. Accordingly, the percentages of CB2 receptor immunopositive cell area in pancreatic ducts were also increased. CB1 receptor mRNA levels in the pancreatic tissues of diabetic rats were observed to decrease in comparison with the control group. Urine metabolite excretion after the day of Δ^9-THC administration was determined to increase in diabetes+Δ^9-THC group compared to Δ^9-THC.

In conclusion, Δ^9-THC that is determined to be related to weight gain and the regulation of blood glucose levels may be preferred in diabetes treatment with an appropriate dose due to its antioxidant effects. Furthermore, since the urine excretion of Δ^9-THC in diabetic rats is faster than controls, this fact may be considered during forensic medicine evaluations.

Key Words: Δ^9-THC, type-2 diabetes, CB1 receptor, CB2 receptor, antioxidant

8. KAYNAKLAR

1. Juan-Pico, P., Fuentes, E., Bermudez-Silva, F.J., Diaz-Molina, F.J., Ripoll, C., Rodriguez de Fonseca, F., Nadal, A. (2006) Cannabinoid receptors regulate Ca2+ signals and insulin secretion in pancreatic β-cell, Cell Calcium., 39 : 155–62.

2. Sagredo, O., García-Arencibia, M., De Lago, E., Finetti, S., Decio, A., Fernández-Ruiz, J. (2007) Cannabinoids and neuroprotection in basal ganglia disorders, Mol Neurobiol., 36(1) : 82-91.

3. Kochanowski, M., Kala, M. (2005) Tetrahydrocannabinols in clinical and forensic toxicology, Przegl Lek., 62(6) : 576-80.

4. Gallant, M., Odei-Addo, F., Frost, C.L., Levendal, R.A. (2009) Biological effects of THC and a lipophilic cannabis extract on normal and insulin resistant 3T3-L1 adipocytes, Phytomedicine., 16 : 942-9.

5. Lowe, R.H., Abraham, T.T., Darwin, W.D., Herning, R., Cadet, J.L., Huestis, M.A. (2009) Extended urinary Δ9-tetrahydrocannabinol excretion in chronic cannabis users precludes use as a biomarker of new drug exposure, Drug and Alcohol Depend., 105 : 24-32.

6. Levendal, R.A., Schumann, D., Donath, M., Frost, C.L. (2012) Cannabis exposure associated with weight reduction and -cell protection in an obese rat model, Phytomedicine, 19 : 575-82.

7. Banerjee, B.N., Sofia, R.D., Erikson, D., Ivins, N.J. (1976) Toxicity of delta9-tetrahydrocannabinol (THC) administered subcutaneously for 13 days to female rabbits, J Toxicol Environ Health., 1(5) : 769-76.

8. Riggs, P.K., Vaida, F., Rossi, S.S., Sorkin, L.S., Gouaux, B., Grant, I., Ellis, R.J. (2012) A pilot atudy of the effects of cannabis on appetite hormones in HIV-infected adult men, Brain Res., 1431 : 46-52.

9. Koch, J.E. (2001) Delta(9)-THC stimulates food intake in Lewis rats: effects on chow, high-fat and sweet high-fat diets, Pharmacol Biochem Behav., 68(3) : 539-43.

10. Frazee III, C.C., Kiscoan, M., Garg, U. (2010) Quantitation of total 11-nor-9-carboxy-delta9-tetrahydrocannabinol in urine and blood using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), Methods Mol Biol., 603 : 137-44.

11. Herkenham, M., Lynn, A.B., Johnson, R.M., Melvin, L.S., Costa, B.R., Rice, K.C. (1991) Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: A quantitative in vitro autoradiographic study, J Neurosci., 11(2) : 563-83.

12. Pertwee, R.G. (1997) Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors, Pharmacol Ther., 74 : 129-80.

13. Scheen, A.J. (2007) Cannabinoid-1 receptor antagonists in type-2 diabetes, Best Pract Res Clin Endocrinol Metab., 21(4) : 535-53.

14. Quarta, C., Mazza, R., Obici, S., Pasquali, R., Pagotto, U. (2011) Energy balance regulation by endocannabinoids at central and peripheral levels, Trends Mol Med., 17(9) : 518-26.

15. Cardinal, P., Bellocchio, L., Clark, S., Cannich, A., Klugmann, M., Lutz, B., Marsicano, G., Cota, D. (2012) Hypothalamic CB1 cannabinoid receptors regulate energy balance in mice, Endocrinology., 153(9) : 4136-43.

16. Li, C., Bowe, J.E., Huang, G.C., Amiel, S.A., Jones, P.M., Persaud, S.J. (2011) Cannabinoid receptor agonists and antagonists stimulate insulin secretion from isolated human islets of Langerhans, Diabetes Obes Metab,. 13(10) : 903-10.

17. Barutta, F., Piscitelli, F., Pinach, S., Bruno, G., Gambino, R., Rastaldi, M.P., Salvidio, G., Di Marzo, V., Cavallo Perin, P., Gruden, G. (2011) Protective role of cannabinoid receptor type 2 in a mouse model of diabetic nephropathy, Diabetes,. 60(9) : 2386-96.

18. http://www.worlddiabetesfoundation.org/composite-35.htm. (Erişim tarihi: 31 Ağustos 2012).

19. Laakso, M. (2004) Tip 2 diyabet: (Goldstein B.J., Müller-Wieland D., Eds) 1. baskı, AND Danışmanlık, İstanbul.

20. Golbidi, S., Ebadi, S.A., Laher, I. (2011) Antioxidants in the treatment of diabetes, Current Diabetes., 7(2) : 106-25.

21. Wolfsdorf, J., Glaser, N., Sperling, M.A. (2006) Diabetic ketoacidosis in infants, children, and adolescents, Diabetes Care., 29(5) : 1150-59.

22. Dagon, Y., Avraham, Y., Link, G., Zolotarev, O., Mechoulam, R., Berry, E.M. (2007) The synthetic cannabinoid HU-210 attenuates neural damage in diabetic mice and hyperglycemic pheochromocytoma PC12 cells, Neurobiol Dis., 27(2) : 174-81.

23. Ayaz, M., Tuncer, S., Okudan, N., Gökbel, H. (2008) Coenzyme Q and α-Lipoic acid supplementation in diabetic rats: conduction velocity distributions, Methods Find Exp. Clin. Pharmaco., 30(5) : 367-74.

24. Kim, W., Doyle, M.E., Liu, Z., Lao, Q., Shin, Y.K., Carlson, O.D., Kim, H.S., Thomas, S., Napora, J.K., Lee, E.K., Moaddel, R., Wang, Y., Maudsley, S., Martin, B., Kulkarni, R.N., Egan, J.M. (2011) Cannabinoids inhibit insulin receptor signaling in pancreatic β-cells, Diabetes., 60(4) : 1198-209.

25. Li, X., Kaminski, N.E., Fischer, L.J. (2001) Examination of the immunosuppressive effect of d9-tetrahydrocannabinol in streptozotocin-induced autoimmune diabetes, Int Immunopharmacol., 1 : 699-712.

26. Tanker, M., Tanker, N. (1990) Famakognozi, Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, 2. cilt, Ankara.

27. Gönen, S. (2009) Cannabis sativa L. Bitkisinin morfolojisi ve anatomisi üzerine bir araştırma, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

28. Baytop, T. (1999) Türkiye'de bitkiler ile tedavi, 2. baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.

29. Gieringer, D. (2008) Marijuana medical handbook: Practical guide to the therapeutic uses of marijuana (Rosenthal, E., Carter, G.T., Eds), Berkley, CA, USA.

30. Özden, S.Y. (1992) Uyuşturucu madde bağımlılığı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.

31. Dökmeci, İ. (2001) Toksikoloji: Zehirlenmelerde tanı ve tedavi, Nobel Tıp Kitabevi, 3. baskı, İstanbul.

32. Kaygısız, M. (2005) Adli bilimler, Seçkin Yayıncılık, 2. baskı, Ankara.

33. Baysal, A. (2008) Endokannabinoidler ve obezite, Beslenme ve Diyet Dergisi., 36 (1-2): 5-8.

34. Vural, N. (2005) Toksikoloji, Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Yay. No: 73, Ankara.

35. García, C.M. (2006) Cannabis II, Informes de la comision clinica, Madrid- España.

36. United Nations Office on Drugs and Crime. (2009) Recommended methods for the identification and analysis of cannabis and cannabis products, United Nations New York.

37. Turan, N., Tırtıl, L., Koç, S. (2009) Alkol, uyuşturucu, uyarıcı ve benzeri madde entoksikasyonların adli tıbbi özellikleri, Klinik Gelişim., 22 : 132-40.

38. Beyazyürek, M., Şatır, T.T. (2000) Madde kullanım bozuklukları, Psikiyatri Dünyası., 4 : 50-6.

39. Grotenhermen, F. (1999) The effects of cannabis and THC, Forschende Komplementarmedizin., 3 : 7-11.

40. Massi, P., Solinas, M., Cinquina, V., Parolaro, D. (2012) Cannabidiol as potential anticancer drug, Br J Clin Pharmacol., doi: 10.1111/j.1365-2125.2012.04298.x. (baskıda).

41. Sacerdote, P., Martucci, C., Vaccani, A., Bariselli, F., Panerai, A.E., Colombo, A., Parolaro, D., Massi, P. (2005) The nonpsychoactive component of marijuana cannabidiol modulates chemotaxis and IL-10 and IL-12 production of murine macrophages both in vivo and in vitro, J Neuroimmunol., 159(1-2) : 97–105.

42. ElSohly, M.A. (2007) Marijuana and the cannabinoids, chapter 1 cannabis and natural cannabis medicines, Humana Pres, Totawa, New Jersey.

43. Krishnan, S., Cairns, R., Howard, R. (2009) Cannabinoids for the treatment of dementia, Cochrane Database Syst Rev., 15(2) : CD007204.

44. ElSohly, M.A., Slade D. (2005) Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids, Life Sci., 78 : 539-548.

45. Mechoulam, R., Parker, L.A. (2012) The endocannabinoid system and the brain, Annu Rev Psychol., doi: 10.1146/annurev-psych-113011-143739 (baskıda).

46. Röhrich, J., Schimmel, I., Zörntlein, S., Becker, J., Drobnik, S., Kaufmann, T., Kuntz, V., Urban, R. (2010) Concentrations of delta9-tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxytetrahydrocannabinol in blood and urine after passive exposure to cannabis smoke in a coffee shop, J Anal Toxicol,. 34(4) : 196-203.

47. Iversen, L.L. (2000) The science of marijuana, Oxfort University Press, Great Britain.

48. Kalofoutis, A., Dionyssiou-Asteriou, A., Maravelias, C., Koutselinis, A. (1985) Changes of HDL-lipid composition as related to delta 9-THC action, Pharmacol Biochem Behav., 22(2) : 343-5.

49. Chen, J., Errico, S.L., Freed, W.J. (2005) Reactive oxygen species and p38 phosphorylation regulate the protective effect of delta9-tetrahydrocannabinol in the apoptotic response to NMDA, Neurosci Lett. 389(2) : 99-103.

50. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts K., Walter, P. (2002) Molecular biology of the cell, 4. Edition, New York.

51. Wess, J. (1997) G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition, FASEB J., 11(5) : 346-54.

52. Küçükkkaya, B., Kan B. (2007) Heterotrimerik G proteinleri, Turk J Biochem., 32(1) : 39-50.

53. Bayewitch, M., Avidor-Reiss, T., Levy, R., Barg, J., Mechoulam, R., Vogel, Z. (1995) The peripheral cannabinoid receptor: adenylate cyclase inhibition and G protein coupling. FEBS Lett., 375(1-2) : 143-7.

54. Matsuda, L.A., Lolait, S.J., Brownstein, M.J, Young, A.C, Bonner, T.I. (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA, Nature., 346 : 561-4.

55. Howlett, A.C., Barth, F., Bonner, T.I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W.A., Felder, C.C., Herkenham, R.G., Mackie, K., Martin, B.R., Mechoulam, R., Pertwee, R.G. (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of Cannabinoid Receptors, Pharmacol Rev., 54 : 161–202.

56. Herkenham, M., Lynn, A.B., Johnson, R.M., Melvin, L. S., Costa, B.R., Rice, K. C. (1991) Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study, J Neurosci., 11(2) : 563-83.

57. Zhuang, S., Kittler, J., Grigorenko, E.V., Kirby, M.T., Sim, L.J., Hampson, R.E., Childers, S.R., Deadwyler, S.A. (1998) Effects of long-term exposure to delta9-THC on expression of cannabinoid receptor (CB1) mRNA in different rat brain regions, Brain Res Mol Brain Res., 62(2) : 141-9.

58. Bermúdez-Siva, F.J., Serrano, A., Diaz-Molina, F.J., Sánchez Vera, I., Juan-Pico, P., Nadal, A., Fuentes, E., Rodríguez de Fonseca, F. (2006) Activation of cannabinoid cb1 receptors induces glucose intolerance in rats, Eur J Pharmacol., 531(1-3) : 282-4.

59. Munro, S., Thomas, K.L., Abu-Shaar, M. (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids, Nature., 365 : 61-5.

60. Romero-Zerbo S.Y., Rafacho, A., Díaz-Arteaga, A., Suárez J., Quesada, I., Imbernon M., Ross R.A., Dieguez, C., Rodríguez de Fonseca, F., Nogueiras, R.,

Nadal, A., Bermúdez-Silva, F.J. (2011) A role for the putative cannabinoid receptor GPR55 in the islets of Langerhans, J Endocrinol., 211(2) : 177-85.

61. Pacher, P., Batkai, S., Kunos, G. (2006) The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy, Pharmacol. Rev., 58 : 389-462.

62. Sawzdargo, M., Nguyen, T., Lee, D.K., Lynch, K.R., Cheng, R., Heng, H.H., George, S.R., O'Dowd, B.F. (1999) Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, CGPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain, Brain Res Mol Brain Res., 64 : 193–8.

63. Tüfekçi Alphan, E., Yılmaz, N. (2007) Endokannabinoid sistemin, enerji metabolizması ve obezite etkisi, Marmara Medical Journal., 20(3) : 202-14.

64. Tanveer, R., McGuinness, N., Daniel, S., Gowran, A., Campbell V.A. (2012) Cannabinoid receptors and neurodegenerative diseases, WIREs Membr Transp Signal., 1 : 633-9.

65. Demirci, M. (2006) Tip 2 diyabetik hastalarda insülin direnci ile serum ekstrasellüler süperoksit dismutaz aktivitesi, serum adiponektin ve hs-CRP düzeyleri arasındaki ilişki, Uzmanlık Tezi, Gülhane Askeri Tıp Akademisi, İstanbul.

66. Li, H.T. (2011) Antihyperglycemic effects of baicalin on streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats, Phytother Res., 25(2) : 189-94.

67. Krishnamurthy, G., Lakshman, K., Pruthvi, N., Chandrika, P.U. (2011) Antihyperglycemic and hypolipidemic activity of methanolic extract of Amaranthus viridis leaves in experimental diabetes, Indian J Pharmacol., 43(4) : 450-4.

68. Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E.Y. (2002) İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık, Ankara.

69. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği (2011) Diabetes mellitus ve komplikasyonlarının tanı, tedavi ve izlem kılavuzu, 5. baskı, Ankara.

70. Shaw, J.E., Sicree, R.A., Zimmet, P.Z. (2010) Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030, Diabetes Res Clin Pract., 87(1) : 4-14.

71. Chen, L., Magliano, D.J., Zimmet, P.Z. (2011) The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus—present and future perspectives, Nat Rev Endocrinol., 8(4) : 228-236.

72. Chew, B.H., Ismail, M., Lee, P.Y., Taher, S.W., Haniff, J., Mustapha, F.I., Bujang, M.A. (2012) Determinants of uncontrolled dyslipidaemia among adult type 2 diabetes in Malaysia: The Malaysian diabetes registry 2009, Diabetes Res Clin Pract., 96(3) : 339-47.

73. Nassar, P.O., Walker, C.S., Salvador, C.S., Felipetti, F.A., Orrico, S.R., Nassar, C.A. (2011) Lipid profile of people with diabetes mellitus type 2 and periodontal disease, Diabetes Res Clin Pract. 96 (1) : 35-9.

74. İrer, S.V., Alper, G. (2004) Deneysel diyabet modelleri, Türk Klinik Biyokimya Dergisi., 2(3) : 127-36.

75. Szkudelski, T. (2001) The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas, Physiol Res., 50 : 536-46.

76. Nakamura, T., Terajima, T., Ogata, T., Ueno, K., Hashimoto, N., Ono, K., Yano, S. (2006) Establishment and pathophysiological characterization of type 2 diabetic mouse model produced by streptozotocin and nicotinamide, Biol Pharm Bull., 29(6) : 1167-74.

77. http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s0130?lang=en&region=TR (Erişim tarihi: 10 Ağustos 2012).

78. Tukek, T. (2006) Diyabet önlenebilir mi?, 8. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi, 13 -17 Eylül, Antalya, Türkiye.

79. http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/n3376?lang=en&region=TR (Erişim tarihi: 10 Ağustos 2012).

80. Novelli, M., Pocai, A., Lajoix, A.D., Beffy, P., Bezzi, D., Marchetti, P., Gross, R., Masiello, P. (2004) Alteration of β-cell constitutive NO synthase activity is involved in the abnormal insulin response to arginine in a new rat model of type 2 diabetes, Mol Cell Endocrinol., 219(1-2) : 77-82.

81. Masiello, P., Broca, C., Gross, R., Roye, M., Manteghetti, M., Hillaire-Buys, D., Novelli, M., Ribes, G. (1998) Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide, Diabetes., 47(2) : 224-9.

82. Samuel, V.T., Beddow, S.A., Iwasaki, T., Zhang, X.M., Chu, X., Still, C.D., Gerhard, G.S., Shulman, G.I. (2009) Fasting hyperglycemia is not associated with increased expression of PEPCK or G6Pc in patients with type 2 diabetes, Proc Natl Acad Sci U S A., 106(29) : 12121-6.

83. Alptuna, E.N. (1984) Pankreas hastalıkları, Anadolu Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayıncılık, Eskişehir.

84. Fisher, W.E., Andersen, D.K., Bell, R.H., Saluja, A.K., Brunicardi, F.C. (2004) Schwartz's Principles of Surgery: (Brunicardi, F.C., Andersen, D.K., Billiar, T.R., Dunn, D.L., Hunter, J.G., Pollock, R.E., Matthews, J.B., Eds), single volume 8th revised edition, McGraw-Hill, New York.

85. http://www. miami transplant institute.com (Erişim tarihi: 3 Haziran 2012).

86. Junqueira, L.C., Carneiro, J., Kelley, R.O. (1998) Temel histoloji, Barış Kitabevi, İstanbul.

87. Islam, S. (2010) Advances in experimental medicine and biology: The islets of Langerhans, volume 654, Springer Dordrecht Heidelberg, London, New York.

88. Turk, N., Dağistanli, F.K., Sacan, O., Yanardag, R., Bolkent, S. (2012) Obestatin and insulin in pancreas of newborn diabetic rats treated with exogenous ghrelin, Acta Histochem., 114(4) : 349-57.

89. Efrat, S., Russ, H.A. (2012) Making beta cells from adult tissues, Trends Endocrinol Metab., 23(6) : 278-85.

90. Delibaş, N., Özcankaya, R. (1995) Serbest radikaller, SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi., 2(3) : 11-7.

91. Erden, M. (1992) Serbest radikaller, T Klin Tıp Bilimleri., 12 : 201-7.

92. Çavdar, C., Sifil, A., Çamsarı, T. (1997) Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma, Turk Neph Dial Transpl., 3-4 : 92-5.

93. Pinto, C.E., Moura, E., Serrão, M.P., Martins, M.J., Vieira-Coelho, M.A. (2010) Effect of (-)-delta(9)-tetrahydrocannabinoid on the hepatic redox state of mice, Braz J Med Biol Res., 43(4) : 325-9.

94. Kopáni, M., Celec, P., Danisovic, L., Michalka, P., Biró, C. (2006) Oxidative stress and electron spin resonance., Clin Chim Acta., 364(1-2) : 61-6.

95. Kangralkar, A., Patil, S.D., Bandivadekar, R.M. (2010) Oxidative stress and diabetes: A review, Int J Pharmaceut Appl., 1(1) : 38-45.

96. Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y., Noguchi, N. (2005) Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects, Biochem Biophys Res Commun., 338 : 668-76.

97. Memişoğulları, R. (2005) Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi, Düzce Tıp Fakültesi Dergisi., 3 : 30-9.

98. http://www.rndsystems.com/mini_review_detail_objectname_MR97_ROS.aspx / (Erişim tarihi: 3 Temmuz 2012).

99. Gülbahar, Ö. (2007) Protein oksidasyonunun mekanizması, önemli ve yaşlılıkla ilişkisi, Türk Geriatri Dergisi., 10(1) : 43-8.

100. Yokuş, B., Çakır, D.Ü. (2002) İnvivo oksidatif DNA hasarı biyomarkeri; 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine, T Klin J Med Sci., 22 : 535-43.

101. Kryston, T.B., Georgiev, A.B., Pissis, P., Georgakilas, A.G. (2011) Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis, Mutat Res., 711 : 193-201.

102. Çaylak, E. (2011) Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar, Tıp Araştırmaları Dergisi., 9(1) : 73-83.

103. Sadi, G., Eryilmaz, N., Tütüncüoğlu, E., Cingir, Ş., Güray, T. (2012) Changes in expression profiles of antiokxidant enymes in diabetic rat kidneys, Diabetes Metab Res Rev., 28(3) : 228–35.

104. Yarube, I.U., Abdel-Halim, M., Okasha, M.E., Ayo, J. O., Olorunshola, K.V. (2009) Antioxidant vitamins C and E alleviate the toxicity induced by chronic sodium nitrate administration on sperm count and serum testosterone level in wistar rats, Eur J Sci Res., 25(1) : 35-41.

105. Abreu I.A., Cabelli D.E., (2010) Superoxide dismutases-a review of the metal-associated mechanistic variations, Biochim Biophys Acta., 1804(2) : 263–74.

106. Arulselvan, P., Subramanian, S.P. (2007) Beneficial effects of Murraya koenigii leaves on antioxidant defense system and ultrastructural changes of pancreatic β - cells in experimental diabetes in rats, Chem Biol Interact., 165(2) : 155-164.

107. Maher, P., Lewerenz, J., Lozano, C., Lluís Torres, J. (2008) A novel approach to enhancing cellular glutathione levels, J Neurochem., 107(3) : 690-700.

108. Circu, M.L., Aw, T.Y. (2012) Glutathione and modulation of cell apoptosis, Biochim Biophys Acta., 1823(10) : 1767-77.

109. Altan, N., Sepici Dinçel, A., Koca, C. (2006) Diabetes mellitus ve oksidatif stres, Türk Biyokimya Dergisi., 31(2) : 51–56.

110. Victor, V.M., Rocha, M., Herance, R., Hernandez-Mijares, A. (2011) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in type 2 diabetes, Curr Pharm Des., 17(36) : 3947-58.

111. Robertson, R.P., Harmon, J., Tran, P.O., Poitout, V. (2004) β-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative street in type 2 diabetes, Diabetes., 53(1) : 119-24.

112. Kassab, A., Piwowar, A. (2012) Cell oxidant stress delivery and cell dysfunction onset in type 2 diabetes, Biochimie., 94(9) : 1837-48.

113. Bancroft, J.D., Gamble, M. (2002) Theory and practice of histological techniques, 5. edition. Churchill livingstone.

114. Temizkan, G., Arda, N., (2008) Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, Nobel Tıp Kitabevi, 3. baskı, İstanbul.

115. Goodwin, W., Linacre, A., Hadi, S. (2007) An introduction to forensic genetics, John Wiley&Sons Ltd. England.

116. Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jona´k, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Sta˚hlberg, A., Zoric, N. (2006) The real-time polymerase chain reaction, Mol Aspects Med., 27 : 95-125.

117. Wong, M.L., Medrano, J.F. (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation, Biotechniques., 39 : 75-85.

118. Pari, L., Sankaranarayanan, C. (2009) Beneficial effects of thymoquinone on hepatic key enzymes in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats, Life Sci., 85(23-26) : 830-4.

119. Islam, M.S., Loots du, T. (2009) Experimental rodent models of type 2 diabetes: a review, Methods Find Exp Clin Pharmacol., 31(4) : 249-61.

120. Novelli, M., D'Aleo, V., Lupi, R., Paolini, M., Soleti, A., Marchetti, P., Masiello, P. (2007) Reduction of oxidative stress by a new low-molecular-weight antioxidant improves metabolic alterations in a nonobese mouse diabetes model, Pancreas., 35(4) : e10-7.

121. Nakamura, T., Terajima, T., Ogata, T., Ueno, K., Hashimoto, N., Ono, K., Yano, S. (2006) Establishment and pathophysiological characterization of type 2 diabetic mouse model produced by streptozotocin and nicotinamide, Biol Pharm Bull., 29(6) : 1167-74.

122. Masiello, P. (2006) Animal models of type 2 diabetes with reduced pancreatic beta-cell mass, Int J Biochem Cell Biol., 38(5-6) : 873-93.

123. Ortiz-Andrade, R.R., Sánchez-Salgado, J.C., Navarrete-Vázquez, G., Webster, S.P., Binnie, M., García-Jiménez, S., León-Rivera, I., Cigarroa-Vázquez, P., Villalobos-Molina, R., Estrada-Soto, S. (2008) Antidiabetic and toxicological evaluations of naringenin in normoglycaemic and NIDDM rat models and its implications on extra-pancreatic glucose regulation, Diabetes Obes Metab., 10(11) : 1097-104.

124. Islam, M.S., Loots du, T. (2009) Experimental rodent models of type 2 diabetes: a review, Methods Find Exp Clin Pharmacol., 31(4) : 249-61.

125. Tahara, A., Matsuyama-Yokono, A., Nakano, R., Someya, Y., Hayakawa, M., Shibasaki, M. (2009) Antihyperglycemic effects of ASP8497 in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats: comparison with other dipeptidyl peptidase-IV inhibitors, Pharmacol Rep., 61(5) : 899-908.

126. Cluny, N.L., Chambers, A.P., Vemuri, V.K., Wood, J.T., Eller, L.K., Freni, C., Reimer, R.A., Makriyannis, A., Sharkey, K.A. (2011) The neutral cannabinoid CB1 receptor antagonist AM4113 regulates body weight through changes in energy intake in the rat, Pharmacol Biochem Behav., 97(3) : 537-43.

127. Huang, H.Y., Korivi, M., Chaing, Y.Y., Chien, T.Y., Tsai, Y.C. (2012) Pleurotus tuber-regium polysaccharides attenuate hyperglycemia and oxidative

stress in experimental diabetic rats, Evid Based Complement Alternat Med., doi: 10.1155/2012/856381.

128. Halifeoğlu, İ., Karataş, F., Çolak, R., Canatan, H., Telo, S. (2005) Tip 2 diyabetik hastalarda tedavi öncesi ve tedavi sonrası oksidan ve antioksidan durum, Fırat Tıp Dergisi., 19(3) : 117-22.

129. Manna, P., Sinha, M., Sil, P.C. (2009) Protective role of arjunolic acid in response to streptozotocin-induced type-I diabetes via the mitochondrial dependent and independent pathways, Toxicology., 257(1-2) : 53-63.

130. Comelli, F., Bettoni, I., Colleoni, M., Giagnoni, G., Costa, B. (2009) Beneficial effects of a Cannabis sativa extract treatment on diabetes-induced neuropathy and oxidative stres, Phytother Res., 23(12) : 1678-84.

131. Baynes, J.W., Thorpe, S.R. (1999) Role of oxidative stres in diabetic complications, a new perspective on a old paradigm, Diabetes., 48 : 1-9.

132. Kanter, M., Aktas, C., Erboga, M. (2012) Protective effects of quercetin against apoptosis and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rat testis, Food Chem Toxicol., 50(3-4) : 719-25.

133. Small, D.M., Coombes, J.S., Benetti, N., Johnson D.W., Gobe, G.C. (2012) Oxidative stress, anti-oxidant therapies and chronic kidney disease, Nephrology., 17(4) : 311-21.

134. Videla L.A. (2009) Oxidative stres signaling underlying liver disease and hepatoprotective mechanism, World J Hepatol., 1(1) : 72-8.

135. Gottschling, B.C., Maronpot, P.R., Hailey J.R., Peddada S., Moomaw, C.R., Klaunig J.E., Nyska, A. (2001) The role of oxidative stress in indium phosphide-induces lung carcinogenesis in rats, Toxicol Sci., 64 : 28-40.

136. Chen, Y., Buck, J. (2000) Cannabinoids protect cells from oxidative cell death: a receptor-independent mechanism, J Pharmacol Exp Ther., 293(3) : 807-12.

137. Alvarez, F.J., Lafuente, H., Rey-Santano, M.C., Mielgo, V.E., Gastiasoro, E., Rueda, M., Pertwee, R.G., Castillo, A.I., Romero, J., Martínez-Orgado, J. (2008) Neuroprotective effects of the nonpsychoactive cannabinoid cannabidiol in hypoxic-ischemic newborn piglets, Pediatr Res., 64(6) : 653-8.

138. Lee. J.H., Agacinski, G., Williams, J.H., Wilcock, G.K., Esiri, M.M., Francis, P.T., Wong, P.T., Chen, C.P., Lai, M.K. (2010) Intact cannabinoid CB1 receptors in the Alzheimer's disease cortex, Neurochem Int., 57(8) : 985-9.

139. Wu, J., Bie, B., Yang, H., Xu, J.J., Brown, D.L., Naguib, M. (2012) Activation of the CB(2) receptor system reverses amyloid-induced memory deficiency, Neurobiol Aging., doi:10.1016/j.neurobiolaging.2012.06.011.

140. Zhang, F., Challapalli, S.C., Smith, P.J. (2009) Cannabinoid CB(1) receptor activation stimulates neurite outgrowth and inhibits capsaicin-induced Ca(2+)

influx in an in vitro model of diabetic neuropathy, Neuropharmacology., 57(2) : 88-96.

141. Shmist, Y.A., Goncharov, I., Eichler, M., Shneyvays, V., Isaac, A., Vogel, Z., Shainberg, A. (2006) Delta-9-tetrahydrocannabinol protects cardiac cells from hypoxia via CB2 receptor activation and nitric oxide production, Mol Cell Biochem., 283(1-2) : 75-83.

142. Scheen, A.J. (2009) The endocannabinoid system: a promising target for the management of type 2 diabetes, Curr Protein Pept Sci., 10(1) : 56-74.

143. Li, C., Bowe, J.E., Jones, P.M., Persaud, S.J. (2010) Expression and function of cannabinoid receptors in mouse islets, Islets., 2(5) : 293-302.

144. Pertwee, R.G. (2008) The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabivarin, Br J Pharmacol., 153(2) : 199-215.

145. Vilches-Flores, A., Delgado-Buenrostro, N.L., Navarrete-Vázquez, G., Villalobos-Molina, R. (2010) CB1 cannabinoid receptor expression is regulated by glucose and feeding in rat pancreatic islets, Regul Pept., 163(1-3) : 81-7.

146. Starowicz, K.M., Cristino, L., Matias, I., Capasso, R., Racioppi, A., Izzo, A.A., Di Marzo, V. (2008) Endocannabinoid dysregulation in the pancreas and adipose tissue of mice fed with a high-fat diet, Obesity (Silver Spring)., 16(3) : 553-65.

147. Bermúdez-Silva, F.J., Suárez, J., Baixeras, E., Cobo, N., Bautista, D., Cuesta-Muñoz, A.L., Fuentes, E., Juan-Pico, P., Castro, M.J., Milman, G., Mechoulam, R., Nadal, A., Rodríguez de Fonseca, F. (2008) Presence of functional cannabinoid receptors in human endocrine pancreas, Diabetologia., 51(3) : 476-87.

148. Tharp, W.G., Lee, Y.H., Maple, R.L., Pratley, R.E. (2008) The cannabinoid CB1 receptor is expressed in pancreatic delta-cells, Biochem Biophys Res Commun., 372(4) : 595-600.

149. Duarte, J.M.N., Nogueira, C., Mackie, K., Oliveira, C.R., Cunha, R.A., Köfalvi, A. (2007) Increase of cannabinoid CB1 receptor density in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats, Exp Neurol., 204(1) : 479-84.

150. Bermudez-Silva, F.J., Sanchez-Vera, I., Suárez, J., Serrano, A., Fuentes, E., Juan-Pico, P., Nadal, A., Rodríguez de Fonseca, F. (2007) Role of cannabinoid CB2 receptors in glucose homeostasis in rats, Eur J Pharmacol., 565(1-3) : 207-11.

151. Nakata, M., Yada, T. (2008) Cannabinoids inhibit insulin secretion and cytosolic Ca2+ oscillation in islet beta-cells via CB1 receptors, Regul Pept., 145 (1-3) : 49-53.

152. Matias, I., Gonthier, M.P., Orlando, P., Martiadis, V., De Petrocellis, L., Cervino, C., Petrosino, S., Hoareau, L., Festy, F., Pasquali, R., Roche, R., Maj, M., Pagotto, U., Monteleone, P., Di Marzo, V. (2006) Regulation, function, and

dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia, J Clin Endocrinol Metab., 91(8) : 3171-80.

153. Li, C. Jones, P.M., Persaud, S.J. (2010) Cannabinoid receptors are coupled to stimulation of insulin secretion from mouse MIN6 β-cells, Cell Physiol Biochem., 26 : 187-196.

154. Zhang, F., Hong, S., Stone, V., Smith, P.J. (2007) Expression of cannabinoid CB1 receptors in models of diabetic neuropathy, J Pharmacol Exp Ther., 323(2) : 508-15.

155. Lunn, C.A., Reich, E.P., Bober, L. (2006) Targeting the CB2 receptor for immune modulation, Expert Opin Ther Targets., 10(5) : 653-63.

156. Mørland, J., Bugge, A., Skuterud, B., Steen, A., Wethe, G.H., Kjeldsen, T. (1985) Cannabinoids in blood and urine after passive inhalation of cannabis smoke, J Forensic Sci., 30(4) : 997-1002.

157. Giardino, N.J. (1997) An indoor air quality-pharmacokinetic simulation of passive inhalation of marijuana smoke and the resultant buildup of 11-nor-delta-9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in urine, J Forensic Sci., 42(2) : 323-5.

158. Brenneisen, R., Meyer, P., Chtioui, H., Saugy, M., Kamber, M. (2010) Plasma and urine profiles of delta9-tetrahydrocannabinol and its metabolites 11-hydroxy-delta9-tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy-delta9-tetrahydrocannabinol

after cannabis smoking by male volunteers to estimate recent consumption by athletes, Anal Bioanal Chem., 396(7) : 2493-502.

159. Karschner, E.L., Schwope, D.M., Schwilke, E.W., Goodwin, R.S., Kelly, D.L., Gorelick, D.A., Huestis, M.A. (2012) Predictive model accuracy in estimating last Δ(9)-tetrahydrocannabinol (THC) intake from plasma and whole blood cannabinoid concentrations in chronic, daily cannabis smokers administered subchronic oral THC, Drug Alcohol Depend., 125(3) : 313-9.

160. Westin, A.A., Huestis, M.A., Aarstad, K., Spigset, O. (2009) Urinary excretion of 11-nor-9-carboxy-delta(9)-tetrahydrocannabinol in a pregnant woman following heavy, chronic cannabis use, J Anal Toxicol., 33(9) : 610-4.

161. Lafolie, P., Beck, O., Blennow, G., Boréus, L., Borg, S., Elwin, C.E., Karlsson, L., Odelius, G., Hjemdahl, P. (1991) Importance of creatinine analyses of urine when screening for abused drugs, Clin Chem., 37(11) : 1927-31.

162. Kielland, K.B. (1992) Urinary excretion of cannabis metabolites, Tidsskr Nor Laegeforen., 112(12) : 1585-6.

163. Goodwin, R.S., Darwin, W.D., Chiang, C.N., Shih, M., Li, S.H., Huestis, M.A. (2008) Urinary elimination of 11-nor-9-carboxy-delta9-tetrahydrocannnabinol in cannabis users during continuously monitored abstinence, J Anal Toxicol., 32(8) : 562-9.

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Zeynep Mine COŞKUN

Doğum Tarihi: 13. 11. 1983

Unvanı: M.Sc. Biyolog

Öğrenim Durumu: Doktora Öğrencisi

- Lisans: İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü 2001-2005
- Yan Dal: İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü 2002-2005
- Y. Lisans: Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Genel Biyoloji 2005-2007
- Y. Lisans: İstanbul Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Alan Öğretmenliği 2005-2007
- Doktora: İstanbul Üniversitesi, Adli Tıp Enstitüsü, Fen Bilimleri 2008-….

Yayınlar

Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler (SCI & SSCI & Arts and Humanities)

- Karatug, A., Sacan, O., **Coskun, Z.M.**, Bolkent, S., Yanardag, R., Turk, N., Bolkent, S.; (2012) Regulation of gene expression and biochemical changes in small intestine of newborn diabetic rats by exogenous ghrelin, *Peptides*., 33(1):101-118.

- İsmailoğlu, I., **Coşkun, Z.M**., Keskin, M., Ünal,M; Development and Cytochemical Studies of Embryo Sac, Embryo and Endosperm in *Allium Peroninianum*, *Pak. J. Bot*., 42(4): 2711-2718, 2010.
- **Coşkun, Z.M**., Ünal,M; Embryological and cytochemical features of *Scilla autumnalis* L. *Turk J Bot*, 34: 291-301, 2010.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (*Proceedings*) basılan bildiriler

- S. Bolkent, A. Karatug, O sacan, **Z.M. Coskun**, N. Turk, R. Yanardag, S. Bolkent; What is The Antioxidant Role of Exogenous Ghrelin Administration in Small Intestine of Type 2 Diabetic Rats?. III International Conference of Oxidative Stress, January 27-29, 2011 Havana-Cuba.
- S. Bolkent, A. Karatug, O sacan, **Z.M. Coskun**, N. Turk, R. Yanardag, S. Bolkent; The Influence of Ghrelin Supplementation in Stomach of Neonatal Diabetic Rats: A Biochemical and Immunohistochemical Study. IMC17 International Microscopy Congress September 19-24, 2010 Rio-Brazil.
- I. İsmailoğlu, **Z.M. Coşkun,** M. Keskin, M. Ünal; Embryo and endosperm development in *Allium peroninianum* Aznav. IV Balkan Botanical Congress 20-26 June 2006 Sofia, Bulgaria.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

- **Z.M. Coskun**, S. Bolkent; Δ^9-THC uygulanan diyabetik sıçan idrarlarında Δ^9-THC metabolik değişiklikleri. X. Adli Bilimler Kongresi 22-24 Kasım 2012, İstanbul.

- **Z.M. Coskun**, S. Bolkent; Diyabetik sıçanlara Δ^9-tetrahidrokannabinol uygulanmasının serum lipidleri, insulin ve glukagon peptidleri üzerindeki etkileri. XXIV. Ulusal Biyokimya Kongresi 25-28 Eylül 2012, Konya.
- **Z.M. Coskun**, O. Sacan, A. Karatug, N. Turk, S. Bolkent, R. Yanardag, S. Bolkent; Ghrelinin Mide Antioksidan Enzimleri ve Kolesistokinin, Somatostatin, Apelin mRNA'ları Üzerine Etkileri. XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi 27-30 Ekim 2011, Antalya.
- **Z.M. Coskun**, S. Bolkent; Oksidatif Stres ve Lipid Metabolizması Üzerine Delta-9-Tetrahidrokannabinolün Etkileri. XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi 27-30 Ekim 2011, Antalya.
- A. Karatug, **Z.M. Coskun**, S. Bolkent, O. Sacan, N. Turk, R. Yanardag, S. Bolkent; Ghrelin Verilen Yenidoğan Diyabetik Sıçanların Duodenumunda Kolesistokinin, Somatostatin ve Apelin. XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi 27-30 Ekim 2011, Antalya.
- M. Ersoz, **Z.M. Coskun**, G. Cobanoglu, B. Acikgoz, C. Sesal, T. Altug; Cladonia Rangioformis, Cladonia Convoluta ve Cladonia Pocillum Liken Türlerinin MCF-7 İnsan Meme kansei Hücrelerinde Apoptotik Etkileri. XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi 27-30 Ekim 2011, Antalya.
- **Z.M. Coşkun**. Reproductive Biology of *Scilla autumnalis* L., 19. National Biology Congress 20-27 June 2008, Trabzon, Turkey.

Diğer Bilimsel Etkinlikler

Çalıştay

- New Perspectives in Molecular Life Sciences Education, Bogazici University Istanbul, 5-6 November 2012

- Radical Stress and Defenses COST Chemistry CM0603 Free Radicals in Chemical Biology, Inter Working Group Scientific Meeting, Bogazici University Istanbul, 2-3 December 2010

Kongre

- X. Adli Bilimler Kongresi 22-24 Kasım 2012, İstanbul.
- XXIV. Ulusal Biyokimya Kongresi 25-28 Eylül 2012, Konya.
- XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi 27-30 Ekim 2011, Antalya.
- International Congress of Medicine, 5-8 May 2009.
- Ulusal Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi, İstanbul Teknik Üniversitesi, 28-31 Ağustos 2008, İstanbul.
- 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, 20-17 Haziran 2008, Trabzon.
- 3. Clinic Practical Stem Cell and Gene Therapy Congress, Istanbul, 29 May-1 June 2008.

Kurs

- 2. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası Kursu, Bezmialem Vakıf Üniversitesi – İstanbul, (Davetli konuşmacı). 5-12 Mart 2012.
- IV. Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu, T.C. Sağlık Bakanlığı Bağcılar Eğitim ve Araştırma Hastanesi-İstanbul (Davetli konuşmacı), 18-27 Haziran 2011.
- Basic Molecular Cell Biology Technique Course, Tubitak MAM Gene Engineering and Biotechnology Institu, 10-14 May 2010.
- İstanbul Üniversitesi, Cerrahpasa Tıp Fakültesi, Deneysel Hayvan Kullanımı ve Etik Kursu, 2005.

Sempozyum

- 4. DETAE Günleri, İstanbul Üniversitesi, DETAE Enstitüsü, 14-15 Kasım 2012.
- Membran Yapısı ve Etkileşimleri Sempozyumu, Acıbadem Üniversitesi, 30 Mayıs 2012.
- Bilimsel Çalışmalarda İstatistiğin Rolü: Bilinmesi Gereken Yöntemler ve Uygulama Alanları Kursu, 26-27 Mart 2012, İstanbul.
- Uluslararası Sağlıkta Bilişim ve İletişim Zirvesi (HEALTH – TIC), 3-4 Mart 2012, İstanbul.
- III. DETAE Günleri, İstanbul Üniversitesi, DETAE Enstitüsü, 17-18 Kasım 2011.
- Sağlık Kurumlarında Çalışan Güvenliği Sempozyumu, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi 13-15 Ekim 2010.
- II. DETAE Günleri, İstanbul Üniversitesi, DETAE Enstitüsü, 8-9 Kasım 2010.
- Stem Cell Symposium, Marmara University, Istanbul, 5 March 2010.
- Proteomic Research Basic Informations and Practise, Istanbul, 10-14 December 2009.
- VI. Science Education Symposium, Istanbul 3 May 2009.
- International VI. IUGEN Molecular Biology and Genetic Students Winter School, Istanbul University, 6-8 March 2009.
- Apoptosis Symposium, Istanbul University, Cerrahpasa Medical Faculty, 9 April 2008.
- Project Research Meeting, Bogazici Universty, Istanbul, 2007

Projeler

- Sanayi kirliliğine maruz kalan topraklara hümik asit uygulanması sonucu yetişen *Triticum aestivum* L. (Buğday)'ın hücre kültüründe toksisite, proliferasyon ve

oksidatif stres etkilerinin belirlenmesi, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi, FEN-B-090512-0164, **Yardımcı Araştırmacı**, 2012.

- Borik Asitle Muamele edilen Çay (*Camellia sinensis* L.) Antioksidanlarının Tespit Edilerek Meme Kanseri Hücrelerine Uygulanması ve Meydana Gelen Biyokimyasal ve Apoptotik Değişikliklerin Araştırılması, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi, FEN-A-040712-0277, **Yardımcı Araştırmacı**, 2012.

- Delta-9-tetrahidrokannabinol uygulanan diyabetik sıçanların idrar metabolitlerinin, pankreas kannabinoid reseptör ekspresyonlarının ve antioksidan sistemlerinin incelenmesi, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi, 7823, **Proje Yürütücüsü** (Doktora tez projesi), 2010.

- Yeni doğan diyabetik sıçanlara ghrelin uygulamasının gastrointestinal kanaldaki apelin, somatostatin, kolesistokinin gen ekspresyonları, apoptoz ve antioksidan sistem üzerine etkileri. İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi tarafından desteklenen 1901 no'lu proje**, Yardımcı Araştırıcı**, (tamamlandı).

Bilimsel ve Mesleki Kuruluşlara Üyelikler

- Tıbbi Biyoloji ve Genetik Derneği
- Türk Biyokimya Derneği

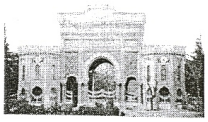
Burslar ve Ödüller

- Adli Tıp Uzmanları Derneği tarafından Genç Araştırmacı Bilimsel Teşvik Ödülü X. Adli Bilimler Kongresi 22-24 Kasım 2012, İstanbul.
- XXIV. Ulusal Biyokimya Kongresi Roche Diagnostik Kayıt Bursu
- Bilimsel Çalışmalarda İstatistiğin Rolü: Bilinmesi Gereken Yöntemler ve Uygulama Alanları Kursu Kayıt Bursu (% 50), Türk Biyokimya Derneği, İstanbul Şubesi, Mart 2012.
- ULAKBİM Bilimsel yayın teşvik ödülü, 2012
- TUBİTAK 2223 - Yurt İçi Bilimsel Etkinlikleri Destek Ödülü 2011
- ULAKBİM Bilimsel yayın teşvik ödülü, 2010

10. EKLER

EK-1 Etik Kurul Onayı

T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayı: 103

24/06/2010

Sn. Prof. Dr. Sema BOLKENT
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Karar No: 103
Başvuru Tarihi: 11/06/2010

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, Doktora Öğrencisi Zeynep M COŞKUN'a ait "Delta-9-tetrahidrokannabinol uygulanan diyabetik sıçanların idrar metabolitlerinin, pankreas kannabinoid reseptör ekspresyonlarının ve antioksidan sistemlerinin incelenmesi" isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul İlkelerine uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Alev A. KAYMAZ İ. Ü. HADYEK Başkanı	Prof. Dr. Müjdat UYSAL Üye	Prof. Dr. Gülderen ŞAHİN Üye
Prof. Dr. Nuriye AKEV Üye	Prof. Dr. Alper YILMAZ Üye	Prof. Dr. Mehmet YALTIRIK Üye
Uzm. Vet. Hek. Fatma TEKELİ Üye	Avukat Safiye ALTUN Üye	Mak. Müh. Seyfettin AVCI Üye

İstanbul Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı
İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü 34119 Beyazıt-İSTANBUL
TEL : (0 212) 440 00 00/ 10013
E mail : hadyek@istanbul.edu.tr