



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



Yüksek Lisans Tezi

**PANKREATİK BETA HÜCRE FARKLILAŞMASINDA
MOLEKÜLER ENERJİ ALGILAYICILARI VE METABOLİK
DEĞİŞİMLERİN ROLÜ**

Ertan ÇELİK

Biyoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Selda OKTAYOĞLU**

Haziran, 2019

İSTANBUL

Bu çalışma, 26.06.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi



Prof. Dr. Selda OKTAYOĞLU (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Şehnaz BOLKENT
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Elif Damla ARISAN
İstanbul Kültür Üniversitesi
Fen ve Edebiyat Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 26194 numaralı projesi ile desteklenmiştir ve 116Z560 numaralı TÜBİTAK projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Prof. Dr. Selda GEZGİNCİ OKTAYOĞLU danışman hocam olmasının ötesinde benim için o kadar çok ve büyük duygular ifade ediyor ki kelimeler yetersiz kalır. İlk kez Gelişim Biyolojisi laboratuvarında grup hocam olarak tanıdığım ve o zamanlar asistan olan danışman hocam çok kısa sürede profesörlüğe kadar yükselerek çoğu insanın ulaşamayacağı tarzda bir başarıyı azmi, çalışkanlığı ve yetenekleri sayesinde elde etmeyi başardı. Hem bir kadın hem bir anne hem bir akademisyen ve bilim insanı olmasının kendisine yüklediği ağır sorumlulukları başarması azminin büyüklüğünü de göstermektedir. Herkesin imrenerek baktığı böyle bir hocanın danışmanım olması benim de ne kadar şanslı biri olduğumu göstermektedir. Böyle nitelikli bir tezin ortaya çıkmasında esas rolü oynayan ve tezin tamamlanması aşamasında da benimle birlikte sabahlayan hocamın tez sürecindeki asıl kahraman olduğunun bilinmesini isterim. Üzerimde karşılığı ödenemeyecek kadar çok hakkı ve emeği olan, ilerleme konusunda kararlı olduğum bilim yolunda, rol model kabul ettiğim ve canımdan kıymetli saydığım danışman hocama binlerce kez teşekkür eder ve kendisine hayatım boyunca minnettar kalacağımı bilmesini isterim.

Anabilim dalındaki herkesin üzerinde emeği olan, laboratuvarlarda çalışma imkanı sağlayan, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Şehnaz BOLKENT'e her şey için çok teşekkür eder ve kendisinin benim için özel ve değerli olduğunu bilmesini isterim.

Lisans eğitimimin başından beri bende emeği geçen, bilgisinden ve malzemelerinden yararlandığım, manevi desteğini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Serap SANCAR BAŞ'a, cana yakınlığından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Ayşe KARATUĞ KAÇAR'a, görüntüleme cihazı, floresan mikroskopu için Prof. Dr. Füsün ÖZTAY'a, fluorimetre cihazı için İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden Prof. Dr. Elif Damla ARISAN'a, Dounce homojenizatör için Eczacılık Fakültesi'nden Doç. Dr. Sibel Özden'e, p-mTOR molekülü için Doç. Dr. Engin KAPTAN'a ve görüntüleme cihazı için Biyoloji Bölümü'nden Dr. Öğr. Üyesi Vahap ELDEM'e ve spektrofotometri ve Commasie R-250 için Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden Dr. Öğr. Üyesi Murat PEKMEZ'e teşekkür ederim.

Tezimdeki ve ilişkili olduğu projedeki yardımlarından dolayı ekip arkadaşım Araş. Gör. Merve ERÇİN'e, manevi desteklerinden ötürü Dr. Özgecan KAYALAR'a, Uzm. Biyo. Merve YILDIRIM'a ve Biyolog Ezgi SARI'ya, Uzm. Biyolog Cansu ÖZAL'a, Biyolog Sevgi BİNAY'a, Biyolog Suna BEKTAŞ'a teşekkür ederim.

Üniversitenin ilk yılında tanıştığım kardeşim Uzman Biyolog Ediz ÇOŞKUN'a dostluğundan dolayı canı gönülden teşekkür eder ve Türk Silahlı Kuvvetlerinin değerli bir subayı olma yolunda ilerlediği bu zamanda, kendisine başarı ve şans dilerim. Bunun yanı sıra dostluklarından ötürü Abdurrahman GÜLER'e, Mehmet EVLİ'ye, Kutsal ERKAN'a ve Özkay Kara'ya çok teşekkür ederim.

Hiçbir zaman maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürler.

Haziran 2019

Ertan ÇELİK

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ.....	xi
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xii
ÖZET	xv
SUMMARY	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	5
2.1.PANKREAS.....	5
2.1.1. Pankreasın Anatomisi ve Histolojisi	5
2.1.2. Pankreasın Embriyonik Gelişimi.....	6
2.2. DİYABET	10
2.2.1.Yapay Tatlandırıcılar ve Moleküler Etki Mekanizmaları	13
2.2.2. Metformin.....	14
2.3. METABOLİZMA	15
2.3.1. Glikoliz	16
2.3.2. Sitrik Asit Döngüsü	17
2.3.3. Pentoz-fosfat yolağı.....	18
2.3.4. Elektron Taşıma Zinciri ve Oksidatif Fosforilasyon	19
2.4. MİTOKONDRİ	21
2.4.1. Mitokondriyal Metabolizmanın Düzenlenmesi	22
2.5. KÖK HÜCRELER	23
2.5.1. Kök Hücre Kaderinin Metabolik Olarak Düzenlenmesi	24
2.6. KÖK HÜCRE KADERİNİN BELİRLENMESİNDE MOLEKÜLER ENERJİ ALGILAYICILARININ ROLÜ.....	27
2.6.1. İnsülin-FOXO Sinyal Yolağı.....	27
2.6.2. mTOR.....	29
2.6.3. AMPK.....	30
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	32

3.1. MALZEMELER	32
3.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ	32
3.3.PANKREATİK BETA HÜCRE FARKLILAŞMASININ TESPİTİ İÇİN YAPILAN ÇALIŞMALAR	33
3.3.1. İnsülin Üreten Hücrelerin ve ROS Seviyelerinin Akım Sitometri Yöntemi ile Tespiti	33
3.3.2. İnsülin Üreten Hücrelerin İmmünohistokimyasal Teknik ile İşaretlenmesi.....	34
3.3.3. Pankreatik Beta Hücrelerine Özgü Gen Ekspresyon Seviyelerinin Analizi.....	34
3.3.3.1. Total RNA İzolasyonu ve RNA Miktarının Tespit Edilmesi	35
3.3.3.2. Komplementer DNA (cDNA) Eldesi ve Miktar Tayini.....	36
3.3.3.3. qRT-PCR Yöntemi ile Gen Ekspresyon Seviyelerinin Tespit Edilmesi.....	36
3.4. METABOLİT ÖLÇÜMÜ	38
3.4.1. NAD ⁺ /NADH Seviyelerinin Ölçülmesi.....	38
3.4.2. NADP ⁺ /NADPH Seviyelerinin Ölçülmesi	39
3.4.3. Laktat Seviyelerinin Ölçülmesi	40
3.5. SİTOPLAZMİK KALSİYUM SEVİYESİNİN ÖLÇÜLMESİ	41
3.6. HÜCRE İÇİNE ALINAN GLUKOZ MİKTARININ ÖLÇÜLMESİ.....	42
3.7. HÜCRE LİZATLARININ ELDESİ VE HEDEF PROTEİNLERİN MİKTAR TAYİNİ	44
3.7.1. Lizis, Membran ve Sitoplazmik Fraksiyonlarının İzolasyonu	44
3.7.2. Lizis, Sitoplazmik ve Nükleer Fraksiyonların İzolasyonu	44
3.7.3. Lizis, Sitoplazmik ve Mitokondriyal Fraksiyonların İzolasyonu	45
3.7.4. Bradford Yöntemi ile Protein Miktar Tayini	46
3.8. SODYUM DODESİL SÜLFAT POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ (SDS-PAGE)	47
3.8.1. Örneklerin Hazırlanması	47
3.8.2. SDS-PAGE Jellerin ve Tamponların Hazırlanması.....	47
3.8.3. Elektroforez ve Proteinlerin Membrana Aktarılması	48
3.8.4. Hedef Proteinlerin İşaretlenmesi	48
3.9. MİTOKONDRIYAL KÜTLE TESPİTİ	50
3.10. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	50
4. BULGULAR.....	51
4.1. PANKREATİK BETA HÜCRE FARKLILAŞMASI İLE İLGİLİ BULGULAR	51
4.2.METABOLİZMA İLE İLGİLİ BULGULAR	55
4.3. MİTOKONDRIYAL DEĞİŞİMLER İLE İLGİLİ BULGULAR.....	58
4.4. TATLI TAT SİNYALİ İLE İLGİLİ BULGULAR.....	61

4.5.MOLEKÜLER ENERJİ ALGILAYICILARI İLE İLGİLİ BULGULAR.....	63
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	66
KAYNAKLAR.....	88
ÖZGEÇMİŞ	107



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 2.1:** Pankreatik morfogenez ve gelişimin düzenlenmesi (Benitez ve diğ., 2012'den alınmıştır).7
- Şekil 2.2:** Erken endokrin progenitör hücrelerden alfa ve beta hücre soylarına farklılaşma aşamalarında eksprese edilen belirteçler (van der Meulen and Huising, 2014'den alınmıştır).9
- Şekil 2.3:** Metforminin hiperglisemi üzerine etkisi (An ve He, 2016'den alınmıştır).15
- Şekil 2.4:** Glikoliz yolağının basamakları (www.byjus.com.tr'den alınmıştır).17
- Şekil 2.5:** TCA döngüsünün basamakları (www.images.app.goo.tr'den alınmıştır).....18
- Şekil 2.6:** Pentoz-fosfat yolağı ve glikoliz arasındaki ilişki (www.memorangapp.com'dan alınmıştır.)19
- Şekil 2.7:** ETZ ve oksidatif fosforilasyon (www.nhvweb.com.tr'den alınmıştır.).....21
- Şekil 2.8:** Pluripotent kök hücre farklılaşması ve yeniden programlanması sırasında mitokondri ve metabolizmanın yeniden şekillenmesi. (Wanet ve diğ., 2015'ten alınmıştır).27
- Şekil 2.9:** Kök hücrelerde besin algılama sinyal yolları (Rafalski ve diğ., 2012'den alınmıştır).31
- Şekil 3.1:** Glukoz alım testinin çalışma prensibi.42
- Şekil 4.1:** Beta hücre farklılaşması ile ilgili bulgular. (A) Akım sitometri ile ölçülen insülin⁺ hücre oranlarını gösteren histogram plotları (üst panel) ve ilgili sütun grafiği (alt panel). Sütun grafiğinde beyaz sütunlar WZB117 uygulanmayan, siyah sütunlar ise WZB117 uygulanan grupların sonuçlarını göstermektedir. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 FM'ye göre; #p<0.05 G'ye göre; ^{oo}p<0.01 G+M'ye göre; ^{VV}p<0.01 A+M'ye göre; ^op<0.05, ^{ooo}p<0.001 FM+WZB117'ye göre ve ^{ooo}p<0.001 A+G+M'ye göre. (B) Beta hücre farklılaşmasının temel düzenleyici genlerinin ekspresyonunu gösteren RT-PCR ürünleri. (C) İmmünohistokimyasal olarak işaretlenen insülin üreten hücreler (→), X200. FM:Tam medyum, M:Metformin, G:Glukoz, G+M:Glukoz+Metformin, A:Aspartam, A+M: Aspartam+Metformin, A+G: Aspartam+Glukoz, A+G+M: Aspartam+Glukoz+Metformin.54
- Şekil 4.2:** Metabolizma ile ilgili bulgular. (A) Hücre içi glukoz alımı oranları (µmol/mg protein/20 dk), (B) Membran fraksiyonunda GLUT1 ve yükleme kontrolü olarak kullanılan Pan-kaderin protein bantları (solda) ile bu bantların optik yoğunluk oranlarını gösteren GLUT1 seviyeleri (AU) (sağda), (C) Medyuma salınan laktat

seviyeleri (mM/ μ g protein), **(D)** Hücre içi NAD⁺/NADH oranları, **(E)** Hücre içi NADP⁺/NADPH oranları, **(F)** Hekzokinaz ve Laktat dehidrojenaz A mRNA ekspresyon seviyeleri ($2^{\Delta\Delta CT}$), **(G)** ROS seviyesi DCFDA⁺ hücre sayısının ölçülmesi ile belirlenmiştir. Sol panelde akım sitometrik noktasal grafiği, sağ panelde ise ilgili grafik verilmiştir. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 FM'ye göre; #p<0.01, ###p<0.001 G'ye göre; +p<0.05, ++p<0.01, +++p<0.001 A'ya göre; $\Delta\Delta$ p<0.01, $\Delta\Delta\Delta$ p<0.001 A+G'ye göre; Φ p<0.05, $\Phi\Phi\Phi$ p<0.001 M'ye göre; $\omega\omega$ p<0.01, $\omega\omega\omega$ p<0.001 G+M'ye göre; $\vee\vee\vee$ p<0.001 A+M'ye göre. Beyaz kolonlar metformin uygulanmayan, siyah kolonlar ise metformin uygulanan grupları temsil etmektedir. FM: Tam medyum, G: Glukoz, A: Aspartam, A+G: Aspartam+Glukoz.....57

Şekil 4.3: PAK-PH'lerdeki mitokondriyal kütle değişimleri. **(A)** MitoTracker Green yoğunluğu ölçülerek elde edilen grafik. **(B)** UCP2, MDH2 ve sitrat sentaz seviyelerinde meydana gelen değişimler. Üst kısımda UCP2, MDH2, sitrat sentaz ve Commasie R-250 bantları, alt kısımda bu bantların optik yoğunluklarının Commasie R-250 yoğunluğuna normalizasyon değerleri (AU) ile oluşturulan grafik verilmiştir. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 FM'ye göre; #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 G'ye göre; ++p<0.01, +++p<0.001 A'ya göre; $\Delta\Delta\Delta$ p<0.001 A+G'ye göre; Φ p<0.05, $\Phi\Phi$ p<0.01, $\Phi\Phi\Phi$ p<0.001 M'ye göre; γ p<0.01, $\gamma\gamma$ p<0.001 A+M'ye göre. Beyaz renkte olan sütunlar metformin uygulanmayan grupları temsil ederken, siyah renkteki sütunlar metformin uygulanan grupları temsil etmektedir. FM: Tam medyum, G: Glukoz, A: Aspartam, A+G: Aspartam+Glukoz.....60

Şekil 4.4: Tatlı tat sinyali ile ilgili bulgular. **(A)** T1R2, T1R3 ve pan-kaderin protein bantları ile T1R2 ve T1R3 bantlarının optik yoğunluklarının pan-kaderin yoğunluğuna normalizasyon değerleri (AU); PLC β 2 ile beta aktin bantları ve PLC β 2 bandının optik yoğunluğunun beta aktin yoğunluğuna normalizasyon değerleri (AU) ile oluşturulan grafikler. **(B)** Sitoplazmik Ca⁺² seviyeleri fluorometrik ve mikroskopik yöntemle gösterilmiştir, x100. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 FM'ye göre; ###p<0.001 G'ye göre; +p<0.05, +++p<0.001 A'ya göre; Δ p<0.05, $\Delta\Delta$ p<0.01, $\Delta\Delta\Delta$ p<0.001 A+G'ye göre; Φ p<0.05 M'ye göre ve γ p<0.05 A+M'ye göre. Beyaz kolonlar metformin uygulanmayan, siyah kolonlar ise metformin uygulanan grupları temsil etmektedir. FM: Tam medyum, G: Glukoz, A: Aspartam, A+G: Aspartam+Glukoz.....62

Şekil 4.5: Moleküler enerji algılayıcılarının seviyelerindeki değişimler. CAMKK2, LKB1, p-AMPK(Thr172) ve β -aktin bantları ile altta bu bantların optik yoğunluklarının beta Aktin yoğunluğuna normalizasyon değerleri (AU) ile oluşturulan grafikler verilmiştir *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 FM'ye göre; #p<0.05, ##p<0.01 G'ye göre; +++p<0.001 A'ya göre; $\Delta\Delta\Delta$ p<0.001 A+G'ye göre, Φ p<0.05, $\Phi\Phi\Phi$ p<0.01 M'ye göre ve γ p<0.01 A+M'ye göre. Beyaz kolonlar metformin uygulanmayan, siyah kolonlar ise metformin uygulanan grupları temsil etmektedir. FM: Tam medyum, G: Glukoz, A: Aspartam, A+G: Aspartam+Glukoz.....64

Şekil 4.6: **(A)** p-Akt(Thr308), p-Akt(Ser473), total Akt, p-mTOR (Ser 2448) ve β -aktin bantları ile p-Akt bantların optik yoğunluklarının total Akt yoğunluğuna normalizasyon değerleri ve p-mTOR (Ser 2448) bantların optik yoğunluklarının beta aktin yoğunluğuna normalizasyon değerleri (AU) ile oluşturulan grafikler. **(B)** FOXO1 ve TFIIB bantları ile bu bantların optik yoğunluklarının TFIIB yoğunluğuna normalizasyon değerleri (AU) ile oluşturulan grafik. *p<0.05,

p<0.01, *p<0.001 FM'ye göre; #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 G'ye göre; +++p<0.001 A'ya göre; $\Delta\Delta$ p<0.01 A+G'ye göre, $\phi\phi$ p<0.01, $\phi\phi\phi$ p<0.001 M'ye göre ve ω p<0.05, $\omega\omega$ p<0.01, $\omega\omega\omega$ p<0.001 G+M'ye göre. Beyaz kolonlar metformin uygulanmayan, siyah kolonlar ise metformin uygulanan grupları temsil etmektedir. FM: Tam medyum, G: Glukoz, A: Aspartam, A+G: Aspartam+Glukoz.....65



TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1: High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit 'in kullanım talimatında önerilen cDNA çevrim programı.....	36
Tablo 3.2: qRT-PCR analizi için reaksiyon karışımının hazırlanması.	37
Tablo 3.3: qRT-PCR için kullanılan Primer+Prob karışımları (Applied Biosystems).	37
Tablo 3.4: qRT-PCR için kullanılan program.....	38
Tablo 3.5: NAD standartlarının hazırlanışı.....	39
Tablo 3.6: NADP Standartların hazırlanışı.	40
Tablo 3.7: L-Laktat standart çözeltilerin hazırlanışı.	41
Tablo 3.8: 2-DG6P (μ M) standartların hazırlanışı.....	43
Tablo 3.9: SDS-PAGE jellerinin hazırlanması.	47
Tablo 3.10: Western Emdirimi yönteminde kullanılan antikorlar ve bu antikorların uygulama koşulları.	49
Tablo 4.1: Deney gruplarında meydana gelen metabolik değişimlerin özeti. Baskın metabolik yollar temel olarak laktat ve ROS üretim seviyelerine göre belirlenerek koyu yazılmıştır. FM: Tam medyum, M:Metformin, G:Glukoz, G+M:Glukoz+Metformin, A:Aspartam, A+M:Aspartam+Metformin, A+G:Aspartam+Glukoz, A+G+M: Aspartam+Glukoz+Metformin.	58

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gama
δ	: Delta
ε	: Epsilon

Kisaltmalar	Açıklama
μ l	: Mikrolitre
μ m	: Mikrometre
μ M	: Mikromolar
2-DG	: 2-deoksiglukoz
2-DG6P	: 2-deoksiglukoz 6-fosfat
A	: Aspartam
A+G	: Aspartam + Glukoz
A+G+M	: Aspartam+ Glukoz+ Metformin
A+M	: Aspartam +Metformin
ADP	: Adenozin difosfat
AKT	: Protein kinaz B
AMP	: Adenozin monofosfat
AMPK	: AMP ile aktive olan protein kinaz
APS	:Amonyum persülfat
Arx	: Aristaless ilişkili homeobox
ATP	: Adenozin 5' trifosfat
BSA	: Sığır serum albumin
CAMKK2	: Kalsiyum/kalmodulin bağlı protein kinaz kinaz 2
cAMP	: Siklik adenozin mono fosfat
cDNA	: Komplementer DNA
CHOP	: C/-EBP homolog protein
DCFDA	: 2',7' dikloroflouresin diasetat
DEPC	: Dietil pirokarbonat
dH ₂ O	: Distile su
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
E	: Embriyonik gün
EDTA	:Etilen diamintetra asetik asit
Em	: Emisyon
ETZ	: Elektron taşıma zinciri
Ex	: Eksitasyon
FAD	: Flavin adenin dinükleotid

FBS	: Fetal sığır serumu
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
FITC	: Floresan izotiyosiyanat
FM	: Tam medyum
FOXO1	: Forkhead box O1
G	: Glukoz
G+M	: Glukoz+ Metformin
G6PDH	: Glukoz 6-fosfat dehidrojenaz
GAPDH	: Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz
GD	: Gebelik diyabeti
GLUT2	: Glukoz taşıyıcı 2
GRP	: Glukoz ile düzenlenen protein
H₃PO₄	: Fosforik asit
HIF1	: Hipoksi ile uyarılan faktör 1
HPKH	: Hematopoietik kök hücre
HRP	: Yaban turpu peroksidazı
IAPP	: Adacık amiloid polipeptit
IGF1	: İnsülin büyüme faktörü 1
Ins2	: İnsülin 2
IP	: İnositol 1,4,5-trifosfat
IP3	: İnositol 1,4,5-trifosfat
IRS1	: İnsülin reseptör substratı 1
KATP	: ATP'ye duyarlı potasyum kanalı
Kb	: Kilo baz
KoQ	: Koenzim Q
LDHA	: Laktat dehidrojenaz A
LKB1	: Karaciğer kinaz B1
M	: Metformin
MafA	: Musküloaponeotik fibrosarkom onkogen homolog A
MafB	: Musküloaponeotik fibrosarkom onkogen homolog B
MCU	: Mitokondriyal kalsiyum uniporter
MDH	: Malat dehidrojenaz
MEM	: Minimum esansiyel medyum
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
mPTP	: Mitokondriyal permeabilite geçiş poru
mtDNA	: Mitokondriyal DNA
mTOR	: Rapamisinin memeli hedefi/ Rapamisinin mekanik hedefi
mTORC	: Memeli hedefli rapamisin kompleksi
MTT	: 3-(4,5-Dimetiltiyazolil-2)-2,5-difeniltetrazolyum bromid
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADP	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NaOH	: Sodyum hidroksit
NCD	: Bulaşıcı olmayan hastalıklar
NeuroD1	: Nöronal farklılaşma 1
ng	: Nanogram
Ngn3	: Neurogenin 3
NKH	: Nöral kök hücre
NKX6	: NKX homeobox 6

nm	: Nanometre
NO	: Nitrik oksit
NYP	: Nöropeptit Y
OCT	: Oktamer bağlayıcı transkripsiyon faktör
OD	: Optik yoğunluk
OXPHOS	: Oksidatif fosforilasyon
PAK-PH	: Pankreatik adacık kaynaklı progenitör hücreler
p-AKT	: Fosforile AKT
Pax 6	: Paired box 6
PBS	: Fosfat tamponlu tuz
PDX	: Pankreas ve duodenal homeobox 1
PI3K	: Fosfotidilinositol 3-kinaz
PIP2	: Fosfotidilinositol 4,5-bifosfat
PLCβ2	: Fosfolipaz C β 2
PP	: Pankreatik peptid
PPP	: Pentoz-fosfat yolağı
PTEN	: Fosfataz ve tensin homologu
Ptf 1α	: Pankreasa özgü transkripsiyon faktörü
qRT-PCR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	: Ribo nükleik asit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
rRNA	: Ribozomal RNA
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat jel elektroforezi
Ser	: Serin
SGK	: Serum-glukokortikoid ile düzenlenen kinaz
SGLT1	: Sodyuma bağlı glukoz taşıyıcı-1
SOX2	: Sry-box 2
SOX9	: Sry-box 9
T1D	: Tip 1 diyabet
T1R2	: Tatlı tat reseptörü 1 alt ünite 2
T1R3	: Tatlı tat reseptörü 1 alt ünite 3
T2D	: Tip 2 diyabet
TCA	: Trikarboksilik asit
TEMED	: Tetrametiletildamin
TGFβ	: Dönüştürücü büyüme faktörü beta
Thr	: Treonin
tRNA	: Taşıyıcı RNA
Tyr	: Trozin
UCP	: Uncoupling protein
WR	: Çalışma Solüsyonu
ZDF	: Zucker diyabetik şişman sıçan

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PANKREATİK BETA HÜCRE FARKLILAŞMASINDA MOLEKÜLER ENERJİ ALGILAYICILARI VE METABOLİK DEĞİŞİMLERİN ROLÜ

Ertan ÇELİK

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Selda OKTAYOĞLU

Bu tez çalışmasının amacı, klinikte insülin direnci tedavisinde sıklıkla kullanılan metformin'in doğal bir şeker olan glukoz veya yapay bir tatlandırıcı olan aspartam ile birlikte pankreatik adacık kaynaklı progenitör hücre (PAK-PH)'lere uygulanarak, bu maddelerin *in vitro* ortamda beta hücre farklılaşması üzerine etkisinin olup olmadığının araştırılması ve olası moleküler mekanizmanın ortaya konmasıdır. Glukoz ve/veya aspartam ve/veya metformin varlığında meydana gelen PAK-PH'lerin beta hücrelerine farklılaşması ile ilgili sinyal yolağının tatlı tat reseptörü ile uyarılan, moleküler enerji algılayıcıları ile etkileşen ve aynı zamanda kök hücre karakterlerinin korunmasında önemli olduğu bilinen Warburg etkisini ortadan kaldıran bir yolak olabileceğini düşünerek çalışmamızı mitokondri merkezli metabolik değişimler üzerine odakladık.

Beta hücre farklılaşmasının tespiti için insülin ve reaktif oksijen türleri (ROS) üreten hücreler akım sitometri yöntemi ile belirlendi. Ayrıca, insülin üreten hücreler immuohistokimyasal olarak işaretlendi. Bu farklılaşma mekanizmasında GLUT1'in rolünü göstermek amacıyla hücrelere özgün GLUT1 inhibitörü olan WZB117 uygulandı. *NGN3*, *PAX4*, *NKX2.2*, *PDX1*, *NKX6.1*, *INS2*, *GLUT2*, *Hekzokinaz* ve *laktat dehidrojenaz A* genlerinin ekspresyon seviyeleri ters çevrim-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) metoduyla gösterildi. Hücre metabolizması ile ilgili fikir sahibi olabilmek için laktat, $NAD^+/NADH$, $NADP^+/NADPH$ ve hücre içine glukoz alımı seviyeleri kolorimetrik yöntemle ölçüldü. Mitokondriyal kütle mitotracker green işaretlemesi ile fluorometrik olarak belirlendi. Ayrıca, GLUT1, MDH2, UCP2, Sitrat Sentaz,

T1R2, T1R3, PLC β 2, CAMKK2, LKB1, p-AMPK(Thr172), p-Akt(Th308)/(S473), Akt, p-mTOR(Ser2448) ve FOXO1 seviyelerindeki değişimler western emdirimi tekniği ile ölçüldü. Hücre içi Ca²⁺ seviyelerindeki değişiklikler fluorometrik yöntemle belirlendi ve hücreler fluoressans mikroskop ile görüntüledi. Tüm bu işlemler sonucunda elde ettiğimiz bulgular ve ulaştığımız sonuçlar aşağıda listelenmiştir:

- Aspartam ve aspartam+glukoz uygulanmasının istatistiksel olarak anlamlı oranlarda beta hücre farklılaşmasına neden olduğu, metformin'in tek başına veya diğer uyananlarla birlikte uygulanmasının ise daha yüksek oranda beta hücre farklılaşmasını sağladığı tespit edilmiştir.
- GLUT1 inhibisyonunun metformin+aspartam ve metformin+aspartam+glukoz gruplarında beta hücre farklılaşmasını baskıladığının tespit edilmiş olması aspartam ve metformin varlığında GLUT1'in beta hücre farklılaşmasında önemli bir rol oynadığını göstermektedir.
- Beta hücre farklılaşması sırasında anaerobik glikolizden oksidatif fosforilasyona geçiş şeklinde gerçekleşen bir metabolik yeniden programlanma söz konusudur. Özellikle glukoz ile aspartam ve aspartam+glukoz gruplarında kontrol grubuna daha yakın bir metabolik profilin gözlenmesi bu gruplarda farklılaşan hücrelerin yanı sıra PAK-PH'lerin sayıca fazla olabileceğini düşündürmektedir.
- Metformin uygulanan tüm gruplarda uygulanmayan gruplara göre mitokondriyal kütlede artış gözlenirse de bu artış yalnızca glukoz+metformin ve aspartam+glukoz+metformin gruplarında istatistiksel olarak anlamlıydı, en belirgin artışın aspartam+glukoz+metformin grubunda meydana geldiği ve UCP2'nin mitokondriyal kütle ile paralel değişim gösterdiği belirlendi.
- Metformin+aspartam+glukoz grubu hariç T1R2 alt ünitesinin seviyelerinin korunuyor olması sinyalin baskın olarak bu alt ünite aracılığıyla algılandığını düşündürmektedir.
- Aspartam grubunda sitoplazmik Ca²⁺ seviyeleri kontrol grubuna kıyasla düşük olsa da Ca²⁺ ile aktive olan CAMKK2'nin belirgin olarak artmış olması sitoplazmada tatlı tat sinyalini iletmeye yetecek kadar Ca²⁺'nin bulunduğunu düşündürmektedir. Bu grupta PLC β 2 seviyesinin korunması da tatlı tat sinyalinin tamamen baskılanmadığının diğer bir göstergesidir.
- Metformin uygulanan gruplarda en belirgin değişiklik sitoplazmik PLC β 2 ve Ca²⁺ seviyelerinin belirgin olarak azalmasıdır. Buna karşın, yalnızca metformin uygulanan grupta CAMKK2 aracılığı ile artan AMPK aktivasyonu dikkat çekmektedir.
- Glukoz+metformin grubunda aktif AMPK seviyelerinin değişmemesi ve aktif AKT seviyelerindeki azalmaya karşın artan mTOR aktivasyonun yüksek seviyede bulunan glukoz aracılığıyla meydana gelmesi olasıdır.
- Metformin ve metformin+glukoz gruplarında FOXO1 seviyeleri artmakta ve bu antioksidan savunmaya işaret etmektedir.

Haziran 2019, 125 sayfa.

Anahtar kelimeler: Aspartam, farklılaşma, glukoz, metformin, moleküler enerji algılayıcıları, pankreatik beta hücresi, pankreatik adacık kökenli progenitör hücre, tip 2 diyabet.

SUMMARY

M.Sc. THESIS

THE ROLE OF MOLECULAR ENERGY SENSORS AND METABOLIC CHANGES IN PANCREATIC BETA CELL DIFFERENTIATION

Ertan CELIK

Istanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Selda OKTAYOGLU

The aim of this thesis study is to evaluate the effects of metformin, which is commonly used in the treatment of insulin resistance in clinical practice, with natural sugar glucose or artificial sweetener aspartame on beta cell differentiation from pancreatic islet-derived progenitor cells (PID-PC) *in vitro* and to determine the possible molecular mechanisms. The signaling pathway associated with the differentiation of PID-PCs into beta cells in the presence of glucose and/or aspartame and/or metformin might be sweet taste receptor-stimulated, molecular energy sensors interacted and also eliminates the Warburg effect, which is known to be important in maintaining stem cell characters. We have focused our study on mitochondrial metabolic changes based on this idea.

For the determination of beta cell differentiation, insulin and reactive oxygen species (ROS) producing cells were determined by flow cytometry. Insulin-producing cells were also immunohistochemically labeled. In order to demonstrate the role of GLUT1 in this differentiation mechanism, a specific GLUT1 inhibitor WZB117 was applied to the PID-PCs. Expression levels of *NGN3*, *PAX4*, *NKX2.2*, *PDX1*, *NKX6.1*, *INS2*, *GLUT2*, *Hexokinase* and *lactate dehydrogenase A* genes were demonstrated by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) method. Lactate, NAD^+/NADH , $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ and glucose uptake levels were measured by colorimetric methods. Mitochondrial mass was determined fluorometrically with mitotracker green staining. Furthermore, GLUT1, MDH2, UCP2, Citrate

synthase, T1R2, T1R3, PLC β 2, CAMKK2, LKB1, p-AMPK (Thr172), p-Akt (Th308)/(S473), Akt, p-mTOR (Ser2448) and FOXO1 levels were measured by western blotting technique. Changes in intracellular Ca²⁺ levels were determined by fluorometric method and the cells were visualized by a fluorescence microscope. The findings and results we have obtained as a result of all these procedures and findings are listed below:

- Aspartame and aspartame + glucose administration causes statistically significant beta cell differentiation, and metformin alone or in combination with other stimuli provides a higher rate of beta cell differentiation.
- The fact that GLUT1 inhibition suppresses beta cell differentiation in the groups metformin+aspartame and metformin+aspartame+glucose indicates that GLUT1 plays an important role in beta cell differentiation in the presence of aspartame and metformin.
- During beta cell differentiation, there is a metabolic reprogramming that takes place from anaerobic glycolysis to oxidative phosphorylation. The observation of a metabolic profile closer to the control in the groups especially glucose, aspartame and aspartame+glucose suggests that PID-PCs may be more numerous in these groups besides differentiated cells.
- Although the increase in mitochondrial mass was observed in all metformin treated groups, this increase was statistically significant only in the groups glucose+metformin and aspartame+glucose+metformin. The most significant increase occurred in the group aspartame+glucose+metformin and UCP2 levels were in parallel with the mitochondrial mass.
- Preservation of the levels of T1R2 subunit in the groups except of metformin+aspartame+glucose suggests that the signal is predominantly detected by this subunit.
- Although the cytoplasmic Ca²⁺ level in the group aspartame was lower compared to the control group, the Ca²⁺-induced CAMKK2 increased significantly. This finding suggested that cytoplasmic Ca²⁺ concentration was enough to improve the sweet taste signal. In this group, maintaining the PLC β 2 level is another indication that the sweet taste signal is not completely suppressed.
- The most significant change in metformin-treated groups is the marked decrease in cytoplasmic PLC β 2 and Ca²⁺ levels. However, increasing AMPK activation through CAMKK2 is noteworthy in only metformin-treated group.
- It is possible that the preserved activated AMPK levels and increased mTOR activation may occur through high glucose in the group glucose+metformin.
- FOXO1 levels increase in the groups metformin and metformin+glucose this indicates antioxidant defense.

This study was funded by project number 26194 Scientific Research Projects Coordination Unit of Istanbul University and funded by project number 116Z560 of Scientific and Technological Research Council of Turkey.

June 2019, 125 pages.

Keywords: Aspartame, differentiation, glucose, metformin, molecular energy sensors, pancreatic beta cell, pancreatic islet-derived progenitor cell, type 2 diabetes.

1. GİRİŞ

En yaygın metabolik endokrin hastalık olan diyabet, organlar üzerinde büyük etkileri olan evrensel bir sağlık problemidir (Jaacks ve diğ., 2016). 2015 yılında dünya genelinde yaklaşık 415 milyon insan diyabetten etkilenmiş iken, 2017 verilerine göre bu sayının 425 milyona ulaştığı görülmektedir. Diyabet, dünyada giderek artmakta ve bu sayının 2040 yılına kadar 642 milyona ulaşacağı ön görülmektedir. Dünyada sağlık harcamalarına ayrılan bütçenin %12'sini diyabet tedavisi için yapılan harcamalar oluşturmakta ve bu miktar yaklaşık 727 milyar dolara denk gelmektedir (Uluslararası Diyabet Derneği, 2015; 2017).

Heterojen bir hastalık olan diyabetin büyük çoğunluğu tip 1 (T1D) ve tip 2 (T2D) olmak üzere iki büyük etyopatogenetik sınıfa ayrılır (Amerikan Diyabet Derneği, 2004). Diyabet vakalarının yaklaşık %80'nini T2D, %5-10'unu T1D ve yaklaşık %7'sini de gebelik diyabeti (GD) olarak da bilinen gestasyonel diyabet oluşturur (Lima ve diğ., 2017). T1D ve T2D için uygulanan tedavi yöntemlerinden olan vücuda dışarıdan insülin desteği veya hipoglisemik ajan uygulamaları tam anlamıyla bir tedavi sağlamaz ve diyabet ile bağlantılı olarak ortaya çıkan komplikasyonların gelişmesini geciktirse de engellemede yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle araştırmalar son yıllarda yeni hücresele tedavi yöntemleri geliştirmeye yönelmiştir. Diyabet tedavisi için uygulanan hücresele tedavi yöntemlerinden biri kadavradan elde edilen pankreatik beta hücrelerinin hasta bireye nakledilmesidir. Ancak bu yöntemden nakledilen pankreatik beta hücrelerinin yetersiz sayıda olması ve hasta bireye nakledilmesi sonrasında bu hücrelere karşı immünolojik reaksiyonlar gelişmesinden dolayı istenilen sonuçlar alınamamaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, hastanın kendisinden izole edilen mezenkimal kök/progenitor hücrelerin *in vitro* ortamda beta hücrelerine farklılaştırılması sonrasında hastaya tekrar nakledilmesi üzerine yoğunlaşmıştır (Sharma ve Roni, 2017). Bu yöntem aynı zamanda yetersiz sayıda pankreatik beta hücresi ve immünolojik reaksiyonlar gibi mevcut sorunları da ortadan kaldırabilecek bir yöntemdir. Hücresele tedavi kapsamında bir diğer yaklaşım da hastanın pankreasındaki endojen kaynaklı beta hücre kütlelerini büyüme faktörü uygulamalarıyla artırılması olabilir. Ancak, her iki yöntemin de uygulanabilmesi için pankreatik beta hücre kütlelerini düzenleyen mekanizmaların aydınlatılması gereklidir.

Bu çalışmada esas olarak ele alınan konu T2D'nin ortaya çıkmasında rol oynayan aşamalardan biri olan pankreatik beta hücre kütlelerinde artışın meydana geldiği kompenzasyon aşamasıdır (Bonner-Weir ve diğ., 2000). Kompenzasyon aşamasında yeni oluşan pankreatik beta hücrelerinin kaynağı ve bu hücrelerin nasıl oluştuğuna dair mekanizma henüz tam olarak aydınlatılmamıştır.

Diyabetin merkezinde rol alan pankreatik beta hücreleri dolaşımdaki glukoz düzeyini fizyolojik aralıkta tutmak için insülin salgılar. Bu hormon glukagon, büyüme hormonu, glukokortikosteroidler, epinefrin gibi hiperglisemik hormonlara antagonist olarak çalışır (Marchetti ve diğ., 2017). Pankreatik beta hücreleri uzun süre yaşayamazlar (Bonner-Weir ve diğ., 2000), ancak bazı durumlarda kendilerini yenileyebilirler. Bu bilgi pankreatik kök/progenitör hücrelerin beta hücre rejenerasyonundaki olası rolünü düşündürmektedir (Bonner-Weir ve Sharma, 2002). Hasta bireylere nakledilen adacıkların işlevlerini sürdürebilmesi pankreatik adacıklarda kök/progenitör hücrelerin var olması ya da beta hücrelerinin kendisini yenilemesi ile açıklanabilir (Can, 2014b). Bununla birlikte pankreatik adacık kaynaklı progenitör hücreler ile ilgili bilgiler kısıtlıdır. Bu hücreler mezenkimal kök hücre belirteçleri taşımaktadır ve *in vitro* ortamda gerekli şartlar sağlandığında insülin üreten beta hücrelerine, osteositlere ve adipositlere farklılaşabilmektedirler (Karaöz ve diğ., 2010; Gezgin-Oktayoğlu ve diğ., 2018). Bu bilgi pankreatik progenitör hücrelerin diyabet tedavisi için yeni hücre tedavisi yaklaşımlarını geliştirebilme bakımından önemli bir potansiyel taşıdığını göstermektedir.

Kök hücre farklılaşmasının moleküler mekanizmasında önemli rol alan, bu süreci daha iyi anlamamızı sağlayabilecek, belki de diyabetin tedavisinde yeni kök hücre terapileri geliştirmemize katkı sağlayacak olan ve bu nedenlerden ötürü üzerine ciddi bir şekilde çalışılması gereken konulardan biri de kök hücre metabolizmasıdır. Metabolizma, canlı hücrelerde uygun fizyolojik şartlar altında meydana gelen yapım (anabolizma) ve yıkım (katabolizma) olaylarının tümüne denir. Hücre metabolizma hücreyi hayatta tutmak için meydana gelen kimyasal reaksiyonlar dizisidir. Geleneksel hücre metabolizma çalışmaları hücrenin enerji sağlamasındaki ve bunun yanında hücrenin işlevi üzerindeki rollerini araştırmaya yönelik çalışmaları kapsamaktadır. Ancak, yakın geçmişte yapılan çalışmalar, metabolizmanın hücre kaderini ve kök hücrelerin işlevi üzerine etkilerini ortaya çıkardı (Gascon ve diğ., 2016). Metabolizmanın kök hücre karakterini yönlendirici etkileri ile ilgili

moleküler mekanizmalar keşfedilmeye başlanmıştır. Metabolik değişimler bunu, en azından kısmen, kalıtım ötesi (epigenetik) düzeni etkileyip gen anlatımını değiştirerek yapmaktadır (Harvey ve diğ., 2016). Metabolik düzen denildiğinde akla ilk gelen organel bu tez çalışmasının da merkezinde bulunan mitokondridir. Metabolik sürecin büyük kısmı mitokondrilerde gerçekleşir ve hücreler için gerekli olan adenosin 5' trifosfat (ATP)'in çoğunluğu bu organelde oluşturulur. Mitokondri kök hücre etkinliğinin ve kaderinin düzenlenmesinde de merkezi bir görev üstlenmiştir (Buck ve diğ., 2016; Khacho ve diğ., 2016).

T2D tedavisinde en çok tercih edilen anti-diyabetik ilaç metformindir. Metformin yaklaşık 60 yıldır T2D'nin tedavisi için kullanılmaktadır. Bu ilaç, hepatik glukoneogenezi baskılama yoluyla insülin sinyalini düzelterek hiperglisemiye indirger (An ve He, 2016). Metformin'in T2D'nin ilk aşaması olan kompenzasyon fazı üzerine etkileriyle ilgili yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada metformin'in beta hücre farklılaşması üzerindeki etkileri, bu süreçte metabolizmada meydana gelen değişimler ve bu değişimlerin farklılaşmadaki rollerinin belirlenmesi hedeflenmektedir.

Yapay tatlandırıcılar düşük kalorili olmalarından ötürü dünyada çok fazla tercih edilirler. En çok tercih edilen yapay tatlandırıcılardan biri de aspartamdır. Ancak düşük kalorili olsalar da yapay tatlandırıcılarla ilgili yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular bu katkı maddelerinin çok da masum olmadıklarını göstermektedir. İçinde aspartam'ın da yer aldığı yapay tatlandırıcıların her ne kadar düşük kalorili olsalar da glukoz benzer şekilde T2D ve obezite gibi metabolik hastalıklara yol açtıkları belirtilmektedir (Feijo Fde ve diğ., 2013). Pre-diyabetik, insülin dirençli veya T2D'li hastalarda sahip kişilerde kalori alımını kısıtlamak amacıyla aspartam gibi yapay tatlandırıcıların yanında insülin direncini kırabilmek için metformin önerilir. Ancak bu maddelerin birlikte alınmasının pankreas üzerindeki etkileri bilinmemektedir. Ayrıca metformin, yapay bir tatlandırıcı olan aspartam ve doğal bir şeker olan glukozun insülin direnci gelişmesinde rol alan beta hücre kütleindeki değişiklikler üzerindeki etkilerinin yanı sıra, bu üç maddenin ayrı ayrı ve birlikte uygulanmaları sonrasında pankreatik adacık kaynaklı progenitör hücreler (PAK-PH)'lerin beta hücrelerine farklılaşmaları sürecinde hücrelerde bulunan moleküler enerji algılayıcılarında ve hücrelerin metabolizmalarında meydana gelen değişiklikler de bilinmemektedir.

Bu çalışmanın amacı, *in vitro* ortamda PAK-PH'lere glukoz, aspartam ve metformin'in ayrı ayrı ve birlikte uygulanması sonucunda PAK-PH'lerin beta hücrelerine farklılaşma sürecinde

moleküler enerji algılayıcılarında ve metabolizmada meydana gelen değişimlerin araştırılmasıdır. Bu çalışma, PAK-PH'lerin beta hücrelerine farklılaşması sürecinde metabolizmanın işlevini temel alarak T2D'in gelişim sürecini anlamaya yönelik katkı sağlayacak ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yön verebilecek özgün bir çalışmadır.



2. GENEL KISIMLAR

2.1.PANKREAS

2.1.1. Pankreasın Anatomisi ve Histolojisi

Pankreas, büyük bir kısmı midenin alt yarısının posterior bölgesine yerleşmiş olan ince uzun bir organdır, endokrin ve ekzokrin bileşenlerden meydana gelir.

Ekzokrin kısım, pankreas dokusunun büyük bir bölümünü oluşturur. Pankreasın bu kısmı duktal ve asinar hücrelerden oluşur, ancak ekzokrin kısımdaki hücre popülasyonunun çok büyük bölümünü asinar hücreler oluşturur. Asinar hücreler apikal kısımlarında amilaz, nükleazlar, proteazlar ve lipazlar gibi sindirim enzimlerinin bulunduğu çok sayıda zimojen granülleri içeren piramit şeklinde hücrelerdir. Duodenuma salgılanan bu enzimler karbohidratların, lipidlerin ve proteinlerin sindirimini gerçekleştirir. Başlangıçta proenzim olarak duodenuma salgılanan bu enzimler aktif değildir. Ancak sindirim kanalına girdikten sonra sınırlı proteoliz işlevi ile aktifleşirler (Shih ve diğ., 2012).

Endokrin kısım, ekzokrin doku içerisinde hücre kümeleri şeklinde sıkıca yerleşen Langerhans adacıklarından oluşur. Langerhans adacıkları alfa hücreleri, delta hücreleri, beta hücreleri, gama hücreleri (pankreatik peptid, PP) ve epsilon hücreleri olmak üzere beş tip hücre içerirler; bu hücreler sırasıyla glukagon, somatostatin, insülin, pankreatik polipeptid ve ghrelin salgılar. Bu hormonların neredeyse hepsi glukoz metabolizması ile bağlantılıdır. Bu endokrin hormonlar birbirlerinin salgılarını düzenleyerek glukoz metabolizması üzerinde etkili olurlar. Beta hücreleri diğer dört tip hücreye göre pankreasta daha yoğun olarak bulunup insülinin yanı sıra amilin ve diğer peptidleri salgılar (Can, 2014b). İnsan pankreasında sayıları yaklaşık bir milyon olan her bir Langerhans adacığında hemen hemen 2000 ile 3000 arasında pankreatik beta hücresi bulunur (Stefan ve diğ., 1982).

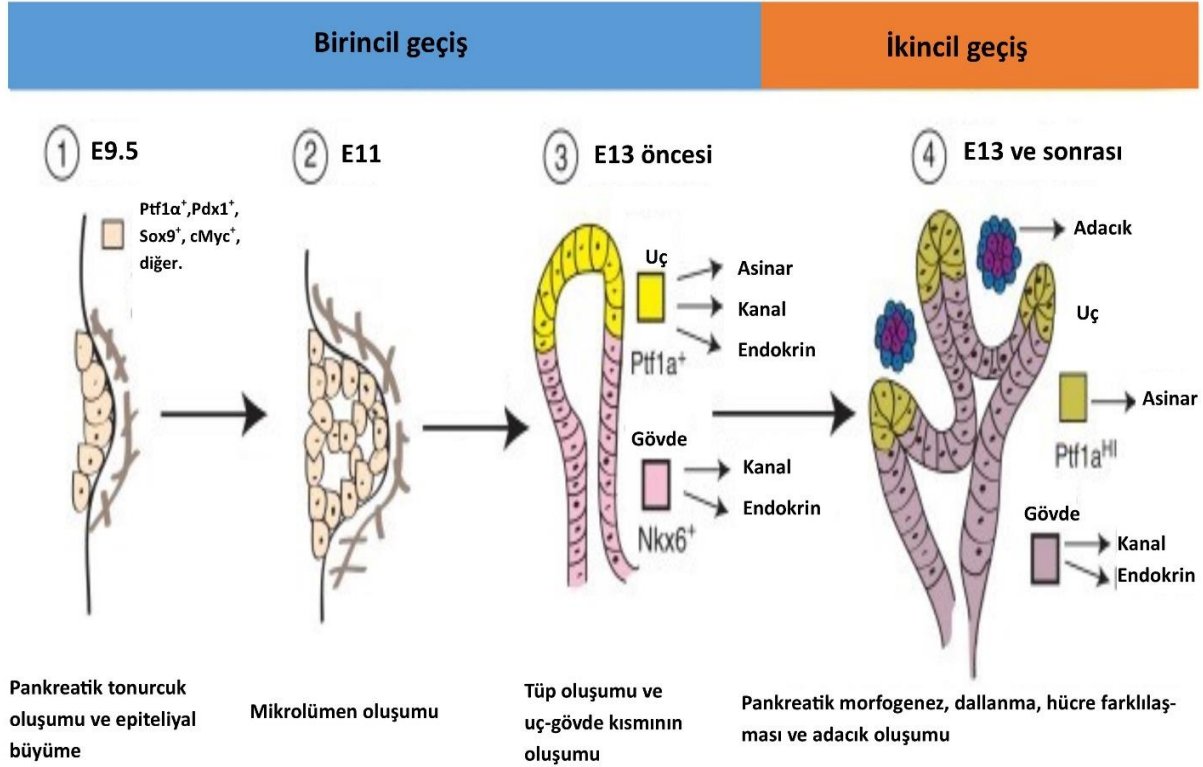
Ekzokrin kısım, pankreas dokusunun büyük bir bölümünü oluşturur. Pankreasın bu kısmı duktal ve asinar hücrelerden oluşur, ancak ekzokrin kısımdaki hücre popülasyonunun çok büyük bölümünü asinar hücreler oluşturur. Asinar hücreler apikal kısımlarında amilaz, nükleazlar, proteazlar ve lipazlar gibi sindirim enzimlerinin bulunduğu çok sayıda zimojen granülleri içeren piramit şeklinde hücrelerdir. Duodenuma salgılanan bu enzimler karbohidratların, lipidlerin ve proteinlerin sindirimini gerçekleştirir. Başlangıçta proenzim olarak duodenuma salgılanan bu

enzimler aktif değillerdir. Ancak sindirim kanalına girdikten sonra sınırlı proteoliz işlevi ile aktifleşirler (Shih ve diğ., 2012).

2.1.2. Pankreasın Embriyonik Gelişimi

Fare pankreasının oluşumu ve gelişimi üç ana dönemde incelenebilir: Embriyonik gün (E) 9.5'ten 12.5'e kadar olan birincil geçiş dönemi, E 12.5'ten doğuma kadar olan ikincil geçiş dönemi ve farenin doğumundan süttten kesilmesine kadar olan üçüncü dönemdir (postnatal dönem) (Benitez ve diğ., 2012). Endodermin kalınlaşması, pankreatik progenitörlerin çoğalması ve sırasıyla dorsal, ventral tomurcukların E9.5 ve E9.75'te çıkıntı yapmasıyla pankreasın gelişimi başlar (Zaret ve Grompe, 2008). Bu süreç aynı zamanda birincil geçiş süreci olarak kabul edilir. Tomurcuk gelişimi sırasında, geçici epitelial tabakalaşma ile mikrolümenler oluşur ve bunlar kısa bir süre sonra birleşerek pankreas morfolojisine özgü olan kalıcı tübular yapıları oluştururlar (Villasenor ve diğ., 2010). Tübülogenez sırasında aynı zamanda pankreatik progenitörlerin özelleşmesi ile pankreasın bipotent olan gövde kısmı ve multipotent olan uç kısmı oluşturulur. Pankreatik dalın gövde kısmında bulunan hücrelerin kanal ve endokrin hücrelerini oluşturan, uç kısmında bulunan hücrelerin ise endokrin ve ekzokrin hücreleri oluşturan öncül hücreler olduğu düşünülmektedir. Pankreatik dalın uç kısmında bulunan multipotent öncül hücreler birincil geçişten sonra multipotent özelliklerini kaybederler ve yaklaşık olarak E13'te preasinar hücrelere dönüşürler. Fare pankreas gelişimi E9.5'ten E12.5 kadar olan "birincil geçiş" ve E13'ten doğuma kadar olan "ikincil geçiş" ile tanımlanır. Pankreatik tomurcuklanma ve proliferasyon yaklaşık olarak E9.5'te ortaya çıkar ve bu aşamada bir epitel hücre alt kümesi pankreasa özgü transkripsiyon faktörü 1α (Ptf1 α), pankreas ve duodenal homeobox 1 (PDX1), sry-box 9 (Sox9), c-Myc ve diğer transkripsiyon faktörlerini ifade eder. E11'de epitel hücrelerin proliferasyonu mikrolümenlerin oluşumunu sağlar. Mezenkimal hücreler gelişmekte olan pankreas tomurcuğunun üzerine gelir ve çeşitli büyüme ve farklılaşma faktörleri salgılar. Tübülogenez ile birlikte multipotent "uç" ve bipotent "gövde" kısımları oluşur. Ptf1 α^+ uç progenitörleri asinar, kanal ve endokrin hücrelerini oluştururken, bipotent NKX homeobox 6 (NKX6 $^+$) gövde progenitörleri kanal ve endokrin hücrelerini oluşturur. E13 sonrası ve ikincil geçiş sırasında pankreatik dallanma, hücre farklılaşması, asiner hücre büyümesi ve adacık oluşumu pankreatik morfogenezi gerçekleştirir. Bu aşamada, "uç" kısım asinar hücreleri türetirken "gövde" kısmı kanal ve endokrin hücrelerini türetir (Benitez ve diğ., 2012) (**Şekil 2.1:**). Pankreas oluşumu ve hücre kaderinin özelleşmesi,

hücre-hücre etkileşimleri, mezenkim ve kan damarları gibi pankreatik olmayan dokulardan gelen dış sinyaller tarafından karmaşık bir şekilde düzenlenir (Puri ve Hebrok, 2010; Magenheim ve diğ., 2011).

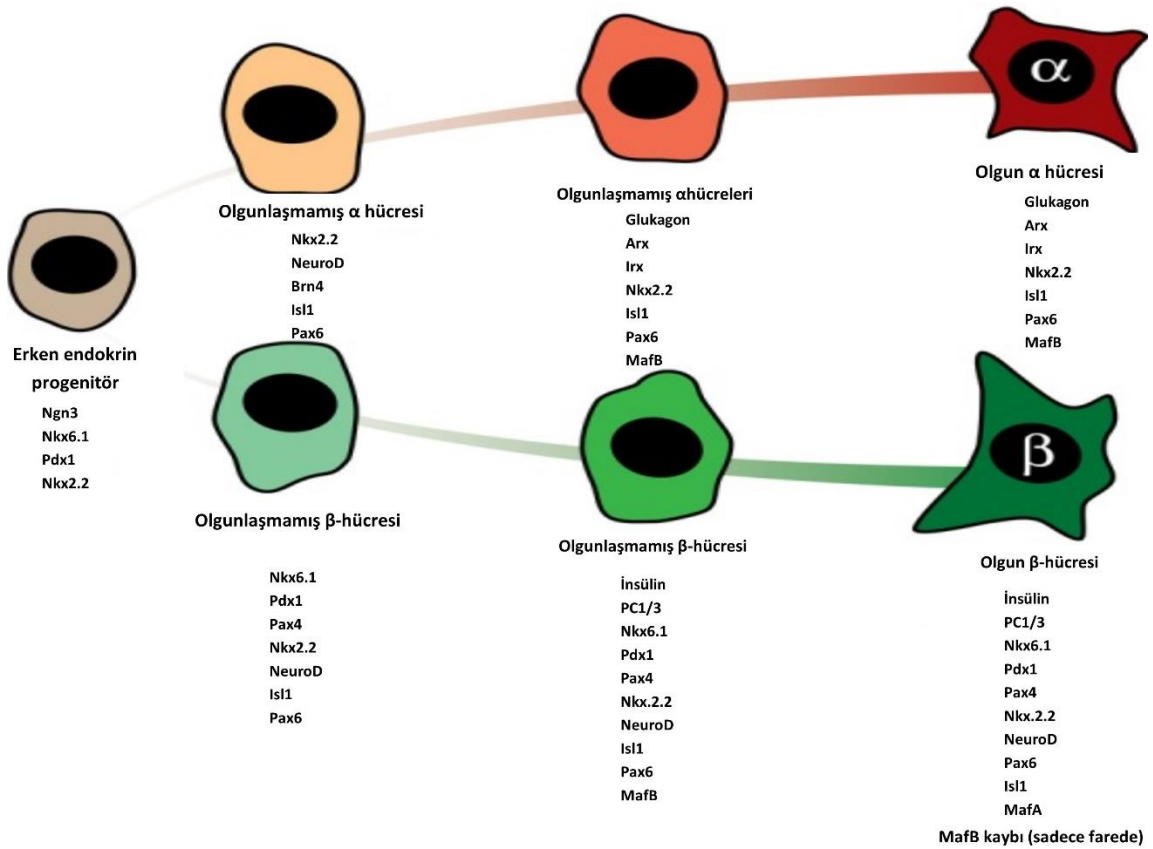


Şekil 2.1: Pankreatik morfogenez ve gelişimin düzenlenmesi (Benitez ve diğ., 2012'den alınmıştır).

Asinar hücreler, $Ptf1\alpha$ eksprese eden multipotent öncül hücreler tarafından oluşturulurlar. $Ptf1\alpha$ daha sonra asinar hücrelerde de eksprese edilir (Hald ve diğ., 2008). $Ptf1\alpha$ 'nın yokluğunda asinar hücre oluşumu gerçekleşmemektedir. Zebra balığında yapılan çalışmalara göre, $Ptf1\alpha$ 'nın ekspresyonundaki artışın pankreatik progenitörleri asinar hücre farklılaşmasına yönlendirirken, ekspresyonundaki azalma ise endokrin oluşumuna izin vermektedir (Hesselson ve diğ., 2011). $Ptf1\alpha$ ve $NKX6$ transkripsiyon faktörleri arasındaki ilişkinin asinar hücre gelişimine katkı sağladığı gösterilmiştir. $Ptf1\alpha$ asinar hücre gelişimini teşvik etmek için $NKX6$ faktörlerini baskımlarken, $NKX6.1$ veya $NKX6.2$ gibi $NKX6$ faktörleri kanal veya endokrin hücre gelişimi için $Ptf1\alpha$ 'yı baskılar (Schaffer ve diğ., 2010). *In vitro* çalışmalar, histon deasetilasyonunun da asinar hücre kaderini etkilediğini göstermiştir (Haumaitre ve diğ., 2008). Asinar hücre gelişimi ayrıca dış sinyaller ve hücre-hücre etkileşimleri tarafından da

düzenlenirler. Pankreatik mezenkimal hücreler tarafından salgılanan FGF10 ve follistatin sırasıyla fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF β) sinyal yollarının aktivasyonu ve inhibisyonunu sağlayarak asinar hücre gelişimini teşvik ederler (Duvillie ve diğ., 2006). Ayrıca Notch ve Wnt sinyalinin asinar hücre kaderini baskıladığı gösterilmiştir (Miyamoto ve diğ., 2003; Esni ve diğ., 2004).

Asinar hücreler piramit şeklinde kutuplaşırlar. Yüksek salgı kapasitesine sahip olan bu hücreler çok sayıda mitokondriye, aşırı derecede yayılmış Golgi ve endoplazmik retikulum ile belirgin ve elektronca yoğun zimojen granüllere sahiptirler (Pictet ve diğ., 1972). Kanal hücreleri bikarbonat ve musin salgılayan, yaygın tübül ağı oluşturan kutuplaşmış epitel hücreleridir. Kanal hücrelerinin gelişimine ve fonksiyonuna etki eden transkripsiyonel sistem iyi anlaşılammıştır (Kopp ve diğ., 2011). Silindir yapıdaki epitel ana kanalları oluştururken, çok katlı yassı epitel ve tek katlı yassı epitel sırasıyla interlobular ve intralobular kanalları oluştururlar (Githens, 1988). Embriyonik gelişim sırasında, pankreatik hücreler kanallardan göç eder, kümeler oluşturmak için farklılaşır ve en sonunda adacık haline gelirler (Gu ve diğ., 2003). Bu nedenle, doğum sonrası pankreas kanalı, pankreas büyümesi ve yenilenmesi için ana progenitör kaynağı olabilir. Birçok *in vitro* çalışmada insülin üreten hücrelerin yetişkin pankreas duktal dokularından üretilebileceği gösterilmiştir (Noguchi ve diğ., 2003; Yatoh ve diğ. 2007). Endokrin hücreler, geçici olarak Neurogenin 3 (Ngn3) ifade eden epitel hücre alt grubunun Langerhans adacıkları olarak adlandırılan kümeler halinde bir araya gelmesi ile oluşurlar. Ngn3⁺ endokrin öncül hücreler alfa, beta, delta, PP ve epsilon hücreleri olmak üzere beş ayrı endokrin hücre tipini oluştururlar (Miyatsuka ve diğ., 2011). Ancak yetişkin adacıklarda ϵ hücrelerinin devamlılığı saptanamamıştır (Johansson ve diğ., 2007). Yapılan çalışmalar Ngn3 ekspresyonunun eşik değerinin pankreatik progenitörlerinin endokrin yolda yönlendirilmesinde önemli olabileceğini ileri sürmektedir (Wang ve diğ., 2010) (**Şekil 2.2:**).



Şekil 2.2: Erken endokrin progenitör hücrelerden alfa ve beta hücre soylarına farklılaşma aşamalarında eksprese edilen belirteçler (van der Meulen and Huising, 2014'den alınmıştır).

Paired box 6 (Pax6) mutantlarında glukagon ve musküloapnörotik fibrosarkom onkogen homolog B (MafB) ekspresyonunun azalması Pax6'nın önemli bir glukagon ekspresyon düzenleyicisi olduğunun bir göstergesidir (Gosmain ve diğ., 2010). Glukagon ekspresyonunun düzenlenmesinde rol alan diğer bir faktör forhead box A2 (Foxa2)'dir (Lee ve diğ., 2005). PP ve α-hücrelerinde ifade edilen bir transkripsiyon faktörü olan aristaless ilişkili homeobox (Arx), alfa hücrelerinin oluşumu ve yetişkin alfa hücrelerinin varlıklarını devam ettirebilmelerinde rol alır (Collombat ve diğ., 2007). Pax4, beta hücrelerinin ve delta hücrelerinin gelişimi için gerekli olan bir homeodomain faktördür. Pax4 mutant farelerde alfa hücre hiperplazisi gelişir (Sosa-Pineda ve diğ., 1997).

Glukozu algılayan ve insülin salgılayan beta hücrelerinin oluşumu farklılaşma sürecini yöneten transkripsiyon faktörlerinin sırayla ifadenmesini gerektirir (Puri ve Hebrok, 2010; Seymour ve Sander, 2011). Olgun beta hücreleri glukozu ve diğer salgı uyarıcılarını algılayıp fizyolojik sinyallere cevap olarak uygun seviyelerde insülin salgılar. Embriyonik gelişimin İkincil geçiş

döneminde yani yaklaşık E13.5'te fetal insülin pozitif beta hücreleri ortaya çıkar. Ancak olgun olmayan bu beta hücrelerinde salgı uyarıcılara cevap olarak insülinin sentezi ve salınma seviyeleri düşüktür (Boschero ve diğ., 1990; Rozzo ve diğ., 2009). Yetişkin beta hücrelerine kıyasla, neonatal beta hücreleri, yüksek bazal insülin salgısı ile birlikte nispeten depolarize bir dinlenme membran potansiyeline sahiptir (Rozzo ve diğ., 2009). Laktat dehidrojenaz A (LDHA) olgun beta hücrelerinde düşük iken olgun olmayan beta hücrelerinde yüksektir (Gu ve diğ., 2010). Olgun olmayan beta hücrelerinde bazal O₂ tüketim oranında artış olmasına rağmen, olgun beta hücreleri ile kıyaslandığında yüksek glukoz etkisine cevap olarak oksitadif metabolizmalarını artırmada başarısız olurlar ve böylece yetişkin adacıklarda olduğu gibi bifazik yerine daha düşük ve monofaziktir (Freinkel ve diğ., 1984; Hole ve diğ., 1988).

Beta hücre olgunlaşmasının transkripsiyonel düzenleyicilerinden olan PDX1 ve NeuroD1 ekspresyonları sıçanlarda doğum ve süttten kesilme dönemleri arasında geçici olarak artar (Aguayo-Mazzucato ve diğ., 2011). PDX1'in *insülin 2 (INS2)*, *glukoz taşıyıcı 2 (GLUT2)*, *glukokinaz (Gck)* ve *adacık amiloid polipeptit (IAPP)*'i kapsayan anahtar beta hücre genlerinin ifadenmesini düzenlediği bilinmektedir. Farelerde PDX1'in inaktif hale gelmesi beta hücre fonksiyonunda azalma ve erken başlayan ile sonuçlanmıştır (Ahlgren ve diğ., 1998). Musküloaponevrotik fibrosarkom onkogen homolog A (MafA)'nın ise insülin biyosentezi ve salgılanması ile ilgili olan genlerin ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir (Zhang ve diğ., 2005; Wang ve diğ., 2007). MafA eksik olan beta hücrelerinin glukoz veya arjinine cevap olarak insülin salgılama yeteneklerinde bozukluk ortaya çıkmıştır (Zhang ve diğ., 2005; Artner ve diğ., 2010). NeuroD1 transkripsiyon faktörünün beta hücre olgunlaşmasının sağlanmasında ve sürdürülmesinde rol aldığı gösterilmiş ve nöronal farklılaşma 1 (NeuroD1) eksik olan beta hücrelerinde kusurlu insülin salgısının meydana geldiği ve artan glikoliz, bazal oksijen tüketimi, LDHA ve nöropeptit Y (NYP)'nin ekspresyonu ile olgun olmayan beta hücrelerine benzediği ileri sürülmüştür (Gu ve diğ., 2010).

2.2. DİYABET

Bulaşıcı Olmayan Hastalıklar (NCD) Risk Faktörü İşbirliği'nin 2016 yılında yayınladığı makalede yer alan 1980-2014 yılları arasında 146 ülkedeki yaşa bağlı gelişen diyabet sıklığındaki artış endişe vericidir. Bu çalışmaya göre dünyada diyabetli yetişkin sayısı 1980 yılında 108 milyon iken 2014 yılında 422 milyona yükselmiştir. Ülkemizdeki T2D sıklığı 2010 yılında yaklaşık %13 seviyelerinde iken 2025 yılında bu oranın %20'ye çıkacağı tahmin

edilmektedir (NCD Risk Faktörü İşbirliği, 2016). Ayrıca Uluslararası Diyabet Federasyonu'nun tahminlerine göre 2013 yılında dünya çapında 20-70 yaş arası yaklaşık 382 milyon yetişkin birey T2D iken, 2035 yılına kadar bu sayının 592 milyona ulaşması tahmin edilmekte ve T2D vakalarının yaklaşık %80'ninin gelişmemiş ve orta düzey ülkelerde ortaya çıktığı görülmektedir. T2D vakası erkeklerde kadınlara göre biraz daha yüksektir (Uluslararası Diyabet Federasyonu, 2013).

Diyabet, insülinin salgılanmasında ve/veya etkisinde meydana gelen kusurlar sonucu ortaya çıkan ve hiperglisemi ile tanımlanan metabolik bir hastalıktır (Amerikan Diyabet Derneği, 2004). T1D insülinin üretiminden, salgılanmasından ve depolanmasından sorumlu olan pankreatik beta hücrelerinin yıkımı ile tanımlanmaktadır. Diyabet vakalarının yaklaşık olarak %5-10'unu oluşturan T1D vakalarının yaklaşık olarak %70-90'ında immün aracılı pankreatik beta hücre kaybı söz konusudur (Atkinson ve diğ., 2014; Lima ve diğ., 2017). İmmün aracılı ortaya çıkan T1D patolojisinde adacık hücrelerine, insüline, glutamat dekarboksilaza veya tirozin fosfataza karşı oluşan otoantikörler pankreatik beta hücre yıkımına yol açarlar. Ayrıca, immün aracılı T1D vakalarının çoğu genetik yatkınlık gösterir ve soyağacında pozitiflik olan bireylerde risk söz konusudur (Lima ve diğ., 2017; Amerikan Diyabet Derneği, 2019). T1D'li bireylerin yaklaşık olarak %10-30'unda ise genetik olarak ya da otoimmün bir mekanizma ile bağlantı gösterilememiştir (Atkinson ve diğ., 2014). İnsülin tedavisini gerektiren T1D'nin ortaya çıkmasında otoimmün süreç önde gelir ve toksinler ya da enfeksiyonlar diyabetin bu tipinin başlamasını tetikleyebilir (Horenstein ve diğ., 2004; Lima ve diğ., 2017).

T2D karbohidrat, lipid ve protein metabolizmasındaki düzensizlikler ile tanımlanan diyabet tipidir ve başlangıçta insülin direnci, hastalığın ilerleyen aşamalarında ise insülin üretimi ve salgısındaki azalma meydana gelmektedir (DeFronzo ve diğ., 2015). Diyabet vakalarının %80'inden fazlasını oluşturan T2D'nin fizyopatolojik yolları tam olarak tespit edilememiştir (Bastard, 2006). Bu hastalıkta beta hücrelerinin otoimmün yıkımı söz konusu değildir. Diyabetin bu türüne sahip olan bireylerin çoğu aşırı kilolu veya obez olan bireylerdir. Yaş, obezite ve hareketsizlik ile gelişim riski artış gösteren T2D'nin ana nedeni iskelet kasında, karaciğerde ve yağ dokuda genellikle önceden var olan insülin direncinin etkisi ile pankreatik beta hücreleri tarafından insülin salgısının giderek azalmasıdır (DeFronzo ve diğ., 2009; Amerikan Diyabet Derneği, 2019). T2D'de de tıpkı T1D'deki gibi genetik yatkınlık söz konusudur ve aile geçmişi pozitif olanlarda risk daha yüksektir (Horenstein, 2004; Bastard,

2006). T2D birbirini izleyen birçok basamakta meydana gelir ve bu basamakların her biri pankreastaki beta hücrelerinde meydana gelen işlevsel, kütleli ve fenotipik değişiklikler ile tanımlanırlar. T2D'nin ortaya çıkmasına neden olan bu basamaklardan ilki ve en uzun süreni kompenzasyon aşamasıdır. Bu basamakta kandaki yüksek glukoz seviyesinden kaynaklanan uyarı pankreatik beta hücrelerinin kütleli artışa neden olur ve kan glukoz seviyelerinin normal değerlerde korunabilmesi için insülin salgısının artışı sağlanır (Bonner-Weir ve diğ., 2000). Bu durum hareketsizlik, genetik yatkınlık ve obeziteye bağlı olarak gelişen insülin direncinin işaretidir. İnsülin direncinde, hedef hücreler pankreatik beta hücrelerinden salınan insüline yanıt veremez ve dolayısıyla insülin hedef dokular üzerinde etkisini gösteremez. Kompenzasyon aşamasında yeni oluşan pankreatik beta hücrelerinin nereden kökenlendiği ve nasıl oluştuğu henüz tam olarak anlaşılamamıştır.

Diyabet hastalarında patofizyoloji ve hastalık gelişim süreci bireyler arasında büyük değişimler gösterebilir. Hastalarda bazen tipik olmayan bulgular görülebilir ve bu durum T2D'nin açık olarak sınıflandırılmasını zorlaştırabilir. Hastalığın teşhisi sırasında T2D'li hastaların bazıları bulgu göstermezken diğerlerinde şiddetli hiperglisemi veya hatta diyabetik ketoasidoz mevcut olabilir. Pre-diyabetin yaygın olmasından ötürü riskli bireylerde tarama yapılması önemlidir ve T2D'nin yaklaşık olarak %30'u teşhis edilememektedir. Genetik ve/veya çevresel faktörler T2D gelişimine yol açabilir. T2D ile ilişkili olarak meydana gelen patofizyolojik değişimler arasında insülin direnci, kronik inflamasyon ve beta hücrelerindeki fonksiyon bozuklukları öne çıkmaktadır. Tüm bu değişimler kan glukoz seviyelerinin kontrolünü zorlaştırırken mikro- ve makro-vasküler sorunların ortaya çıkmasına da yol açar. Pankreatik beta hücrelerinden insülin salınımının azalması ve alfa hücrelerinden glukagon salınımının artması, vasküler insülin direnci, inflamasyon, azalan hücreli glukoz alımı, lipolizin artması, karaciğerden glukoz salınımının artması, glukoz hemostazının bozulmasına ve hiperglisemiye yol açar (DeFronzo ve diğ.,2009,2015).

GD, hamileliğin ikinci ya da üçüncü üç aylık döneminde teşhis edilebilen ve hiperglisemi ile tanımlanan diyabet türüdür. Gebelikten önce belli olmayan ve ilk kez hamilelikte fark edilebilen GD, T2D'nin habercisidir (Metzger ve diğ., 1998; Amerikan Diyabet Derneği, 2019). GD'li kadınların yaklaşık %25'inde hamilelikten sonra T2D gelişir ve bu bireylerde İnsülin direncinin hamilelikten önce rapor edilmesi, GD'nin gelişiminin patolojisinde insülin

direncinin önemli rol oynayabileceğini göstermektedir (Catalano ve diğ., 1993; Bellamy ve diğ., 2009).

2.2.1.Yapay Tatlandırıcılar ve Moleküler Etki Mekanizmaları

Yapay tatlandırıcılar bir asırdan fazla bir süre önce kalorili şekerlerin yüksek enerji içeriğine karşın kullanılabilir bir alternatif olarak yiyeceklere tat katma özellikleriyle tanıtılmışlardır. Günümüzde yapay tatlandırıcılar ucuz, düşük kalorili, kan şekeri seviyesini düzenleyici ve kilo vermeye yardımcı olması dolayısıyla oldukça fazla tercih edilmektedir. Örneğin, yaygın olarak tüketilen gıda takviyeleri olan diyet içecekler, mısır gevreği, sakız ve şekerli tatlılar gibi birçok besinde bulunmakta, kilo problemi olan veya glukoz intoleransı/diyabetik bireylere şekerli gıdalar yerine tüketilmeleri önerilmektedir (Gardner ve diğ., 2012).

Yüksek kalorili ve yüksek glisemik indeksli besinlerin fazla tüketimi besin alımından sonra meydana gelen (postprandial) glukoz seviyelerinin aşırı yükselmesine ve buna bağlı olarak metabolik/hormonal değişikliklerin gelişmesine, yağ birikiminin artmasına neden olmaktadır. Yapay tatlandırıcı kullanımının enerji alımı ve vücut ağırlığının indirgenmesi, dolayısıyla T2D ve ilişkili metabolik hastalıkların riskinin azaltılması açısından faydalı olabileceği düşünülebilir (de la Hunty, 2006; Gardner ve diğ., 2012). Bu hastalıkların sıklığı göz önüne alındığında yapay tatlandırıcılar doğal kalorili tatlandırıcıların yerine kullanılabilir önemli bir alternatif gibi görünmektedir. Ancak, yapay tatlandırıcıların enerji alımı ve vücut ağırlığı artışı üzerine etkilerini araştıran çalışmaların bulguları çelişkilidir. Bazı çalışmalar yapay tatlandırıcıların tüketiminin faydalarından, glukoz cevabını çok az artırdığından ve obezite/T2D gelişiminin engellenmesinde kullanılabilirliğinden bahsederken, diğerleri yapay tatlandırıcıların tüketimi ve kilo alımı ile T2D riskinin artışı arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktadır (Nettleton ve diğ., 2009; Feijo Fde ve diğ., 2013). Mitsutomi ve arkadaşlarının (2014) yaptıkları çalışmada, yapay tatlandırıcı uygulanmasının hiperglisemiye engellediği, vücut yağlanmasını artırdığı ve hiperinsülinemi gelişimine neden olduğu gösterilmiştir. Ancak, yapay tatlandırıcıları tüketen kişiler genel olarak zaten metabolik bozukluklara sahip olduğundan, bu konuda yorum yapmak oldukça güçtür. Suez ve arkadaşları (2014) farklı bir bakış açısıyla yaklaşarak yapay tatlandırıcıların tüketiminin hem fareler hem de insanlarda glukoz intoleransı riskini artırdığını ve bu metabolik yan etkisini barsak mikrobiotasının fonksiyonunu ve bileşimini değiştirerek ortaya çıkardığını göstermişlerdir.

Aspartam, en çok tercih edilen tatlandırıcılar arasında yer almaktadır. Araştırmalar genel olarak bu tatlandırıcının glukoz gibi bir doğal şekere kıyasla metabolik etkilerini ortaya koymaya odaklanmıştır. Yapılan araştırmaların çoğunlukla sıçan ve fare olmak üzere deney hayvanlarında (Feijo Fde ve diğ., 2013; Mitsutomi ve diğ., 2014) veya obezite/T2D gibi metabolik hastalıklı bireylerde gerçekleştirilen *in vivo* araştırmalar olduğu dikkat çekmektedir (de la Hunty, 2006; Gardner ve diğ., 2012).

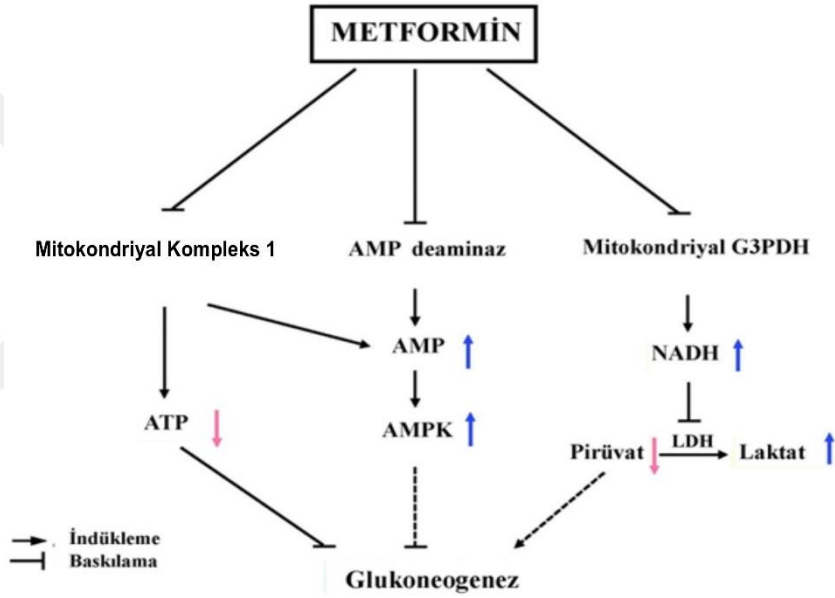
Tatlı tat reseptörleri genel olarak heterodimer olup G-proteinine bağlı reseptör alt üniteleri olan T1R2 ve T1R3'tür. Glukoz gibi şekerler her iki alt üniteye de bağlanırken, aspartam gibi yapay tatlandırıcılar genel olarak T1R2'ye bağlanarak aktivite gösterirler (Fernstrom ve diğ., 2012). Esasen tatlı tat algılama sinyali dildeki tat tomurcuklarında tanımlanmış olmasına rağmen, çalışmalar bu reseptörlerin beyin, idrar kesesi, pankreas ve bağırsakta da yer aldığını göstermiş ve böylelikle bu reseptörlerin, yer aldıkları dokulardaki metabolik önemine dikkat çekilmiştir. Örneğin, pankreatik beta hücrelerinde T1R2/T1R3'ün tatlandırıcıların glukoz ile uyarılan insulin sekresyonu üzerindeki etkisine aracılık ettiğinin gösterilmesi önemli bir bulgu olarak literatüre geçmiştir (Nagakawa ve diğ., 2009). Yapay tatlandırıcıların kök hücreler üzerindeki etkilerini araştıran çalışmalar çok kısıtlıdır. Bir çalışmada Simon ve arkadaşları (2013) yapay tatlandırıcıların pre-adipositlerde adipogenezi uyardığını, ancak bu etkinin tatlı tat reseptörlerinden bağımsız olarak gerçekleştiğini bildirmiştir.

Tatlı tat reseptörleriyle uyarılan sinyal yolları özellikle nakavt fareler kullanılarak kapsamlı çalışmalarda araştırılmıştır. Tatlı tat reseptörleri tatlı moleküllerle uyarıldığında fosfolipaz C β 2 (PLC β 2), iki farklı aracı molekül olan inositol 1,4,5-trifosfat (IP3) ve diaçilgliserol'ün üretilmesini sağlar. IP3, endoplazmik retikulumdan Ca⁺² salınmasını uyarır. Tatlı moleküller ile uyarılan tat tomurcuklarında siklik adenzin mono fosfat (cAMP)'nin arttığı gösterilmiştir. Sonraki yapılan çalışmalar genel olarak doğal şekerlerin cAMP aracılı, yapay tatlandırıcıların ise IP3 aracılı yolağı aktive ettirdiğini düşündürmüştür (Lindemann, 2001; Kojima ve diğ., 2014).

2.2.2. Metformin

Metformin, T2D hastalarında insülin direnci tedavisinde uzun yıllardır kullanılmakta olan bir ilaçtır. Bu ilaç, T2D'nin tedavisinde en fazla tercih edilen anti-diyabetik ilaçtır ve dünya genelinde her yıl 150 milyondan fazla kişi tarafından kullanılmaktadır (An ve He, 2016). 2012

yılında Amerika ve Avrupa Diyabet Dernekleri tarafından yayınlanan T2D tedavisi kılavuzunda metformin tedaviye başlangıç ilacı olarak tavsiye edilmiştir (Inzucchi ve diğ., 2012). Metformin, AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK)'ı aktif hale getirerek mitokondriyal solunum zinciri kompleks-1'i ve AMP deaminazı inaktif hale getirir ve hepatic glukoz üretimini baskılayarak hiperglisemiği indirger (Ouyang ve diğ., 2011). Ayrıca metformin'in T2D'li bireylerde dolaylı olarak insülin direncini azaltma yoluyla hiperglisemiği indirgediği belirtilmiştir (Şekil 2.3:) (An ve He, 2016).



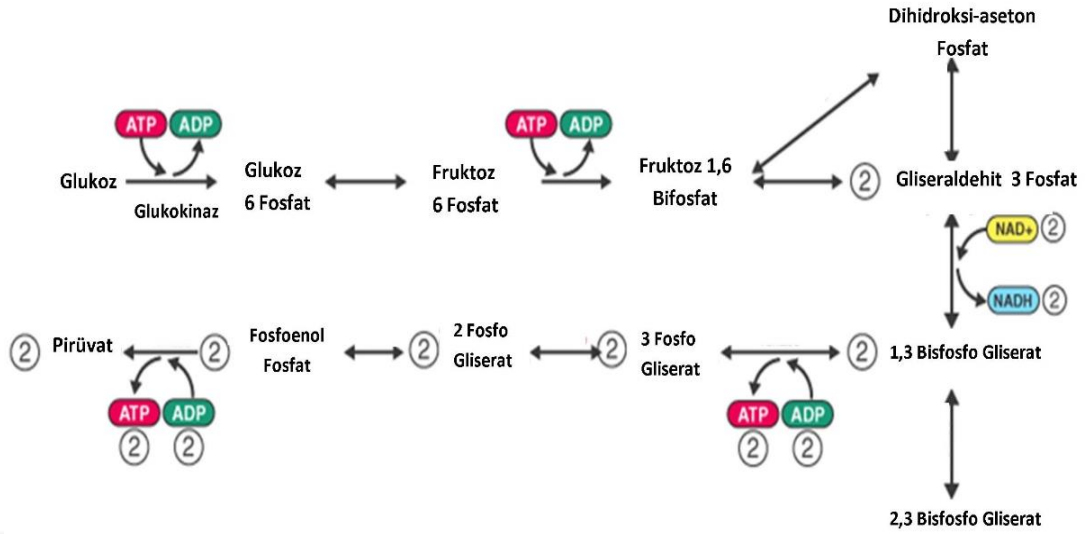
Şekil 2.3: Metforminin hiperglisemi üzerine etkisi (An ve He, 2016'den alınmıştır).

2.3. METABOLİZMA

Metabolizma hücrenin hayatta kalması için gerekli ve karmaşık olan bir dizi kimyasal reaksiyondan oluşur. Metabolik süreçler temelde yapım (anabolizma) ve yıkım (katabolizma) olmak üzere ikiye ayrılır. Yapım metabolizmasında yağ asitleri, nükleotidler ve amino asitler gibi yeni biyomoleküllerin oluşumu gerçekleşir ve bu süreçte enerjiye gereksinim duyulur. Yıkım metabolizmasında ise moleküller daha basit alt birimlerine ayrılırlar, diğer sürecin aksine enerji üretilir ve karmaşık moleküllerin sentezi için gerekli olan yapı taşlarının oluşumu sağlanır (Mathieu ve Ruohola-Baker, 2017).

2.3.1. Glikoliz

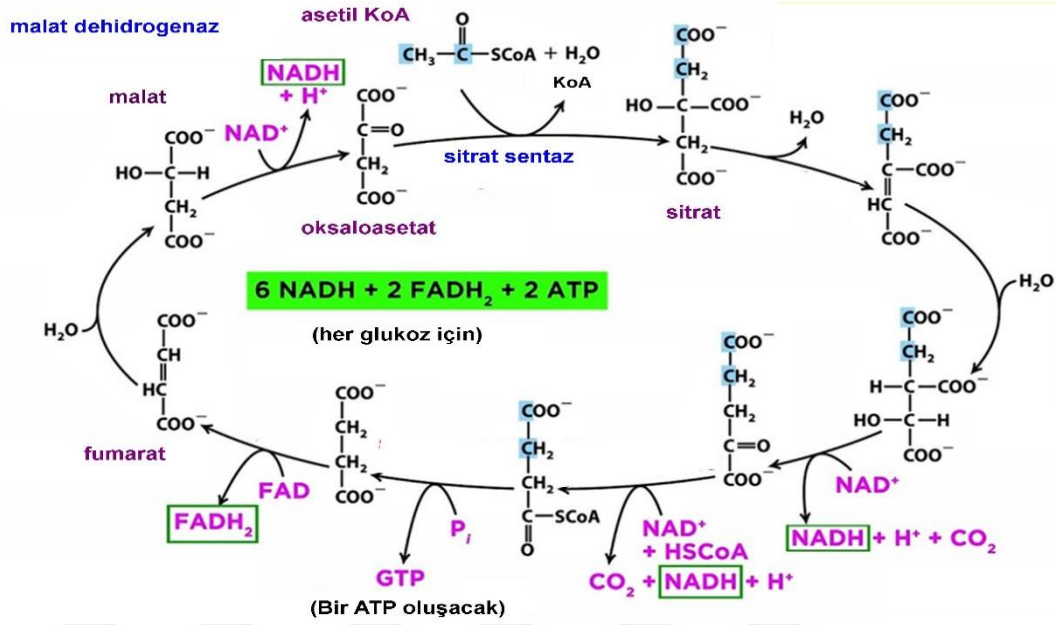
Tüm bitki ve hayvan hücrelerinde meydana gelen glikoliz, hücrenin sitoplazmasında gerçekleşir. Glikoliz yolağı canlı hücrelerin ihtiyaç duyduğu ATP ve NADH gereksinimlerine göre düzenlenir ve glikoliz tepkimelerini oluşturan aşamaların gerçekleşmesi için oksijene gerek yoktur. Dolayısıyla aerobik canlılar gibi anaerobik canlılar da bu metabolik yolağı kullanabilirler. Glikolizde kullanılacak asıl şeker glukozdur. Bunun yanı sıra fruktoz ve galaktoz gibi diğer monosakkaritler de bu yolda kullanılabilir ve pirüvata kadar indirgenebilir (**Şekil 2.4:**). Anaerobik canlılarda ATP ve NADH üretimi yalnızca glikoliz ile olur. NADH indirgeyici enerji kaynağıdır ve aerobik metabolizmada oksidatif fosforilasyon ile ATP üretimi için kullanılır. Pirüvat ve diğer sitoplazmik moleküllerin aerobik solunumda sürece katılabilmeleri için sitoplazmadan mitokondriyal zarlar boyunca matrikse taşınmaları gerekir. Pirüvat, polar ve iyonik özellikte olan bir moleküldür ve bu özelliğı sayesinde nispeten polar olan mitokondriyal dış zardan difüzyon ile geçebilirken iç zardan basit difüzyon ile geçemez. Ancak bir permeaz olan pirüvat translokaz enzimi aracılığıyla taşınır ve mitokondri matriksine geçerek burada aerobik solunuma katılır. Aerobik solunum mitokondri matriksinde gerçekleşen bir yoldur ve matrikse alınan pirüvatın burada pirüvat dehidrojenaz kompleksi aracılığıyla asetil koenzim A (asetil KoA)'ya çevrilmesi ile başlar. Devamında asetil KoA aerobik solunumun merkezinde yer alan sitrik asit döngüsüne katılarak CO₂, NADH ve FADH₂'ye okside olur (Boyer, 2004).



Şekil 2.4: Glikoliz yolağının basamakları (www.byjus.com.tr’den alınmıştır).

2.3.2. Sitrik Asit Döngüsü

Trikarboksilik asit (TCA) döngüsü veya Krebs çevrimi olarak da bilinen sitrik asit döngüsü bir yıkım döngüsüdür. TCA döngüsü asetil KoA ve oksaloasetatın sitrat sentaz enzimi tarafından katalizlenen bir tepkimeyle sitrik asit (sitrat)’e dönüştürülmesiyle başlayıp malat dehidrojenaz aracılığı ile oksaloasetat üretilmesi ile sona erer (Şekil 2.5:). Bu döngüde açığa çıkan NADH ve FADH₂ molekülleri solunum zincirine ve ATP üretimine katılırlar. Ayrıca sitrik asit döngüsünde yeni moleküllerin sentezinde kullanılacak öncül moleküller de üretilir. Bu nedenle sitrik asit döngüsü katabolik süreçte önemli rol oynadığı gibi anabolik süreçler için de önemlidir. Sitrik asit döngüsü aerobik yaşayan tüm formlarda mevcuttur, fakat bitkiler ve bazı mikroorganizmalar bu döngüyü modifiye etmiştir. ATP enerji değişiminde esas role sahip olan moleküldür ve devamlı olarak üretilip tüketilir. ATP, yapısındaki fosfat gruplarını başka bileşiklere aktararak adenozin difosfat (ADP)’a dönüşür. Yapısında yüksek enerjili fosfat bağları bulunduran ATP’nin ADP veya AMP’ye hidrolizinde yüksek enerjili bağların kopması sonucu serbest enerji salınır. Salınan bu serbest enerji vücutta enerjiye ihtiyaç duyan tepkimelerin gerçekleşebilmesi için kullanılır (Boyer, 2004).

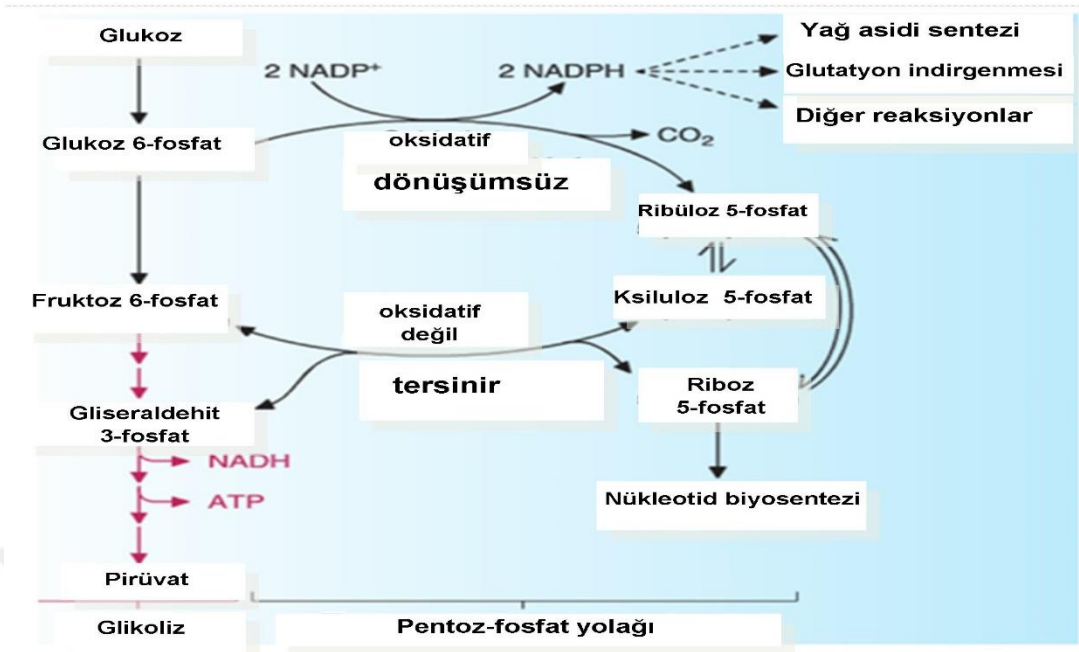


Şekil 2.5: TCA döngüsünün basamakları (www.images.app.goo.tr'den alınmıştır).

2.3.3. Pentoz-fosfat yolağı

Bazı hayvan ve bitki hücreleri glukozu özelleşmiş ürünler oluşturmak üzere pentoz-fosfat yolağı (PPP) adı verilen ikincil bir metabolik yolakta da kullanabilirler. Glukoz bu yolakta beş karbonlu bir şeker (pentoz) olan riboz-5-fosfat ve indirgenmiş enerji formu olan NADPH üretilmesi için okside olur (Şekil 2.6:). Glukozun oksidasyonu sonucu oluşan riboz-5-fosfat nükleotidlerin, nükleik asitlerin ve çeşitli enzim kofaktörlerinin sentezi için kullanılan öncül bir bileşiktir. PPP'de oluşan NADPH, yağ asidi ile steroid oluşumundan sorumlu adrenal korteks, yağ (adipoz) doku, meme bezi, karaciğer dokularındaki indirgenme tepkimeleri için gereklidir (Boyer, 2004).

Pentoz-fosfat yolağı kök hücrelerin kendini yenilemesi için çok önemli bir metabolik yoldur (Varum et al., 2011; Manganelli et al., 2012). Nükleotid ve lipid biyosentezi için gerekli olan metabolitlerin üretildiği bu yolak özellikle pluripotent kök hücrelerde somatik hücrelere kıyasla çok daha aktiftir ve pluripotensi ile farklılaşma arasındaki dengenin sağlanmasında önemli olduğu gösterilmiştir (Rafalski ve diğ., 2012).



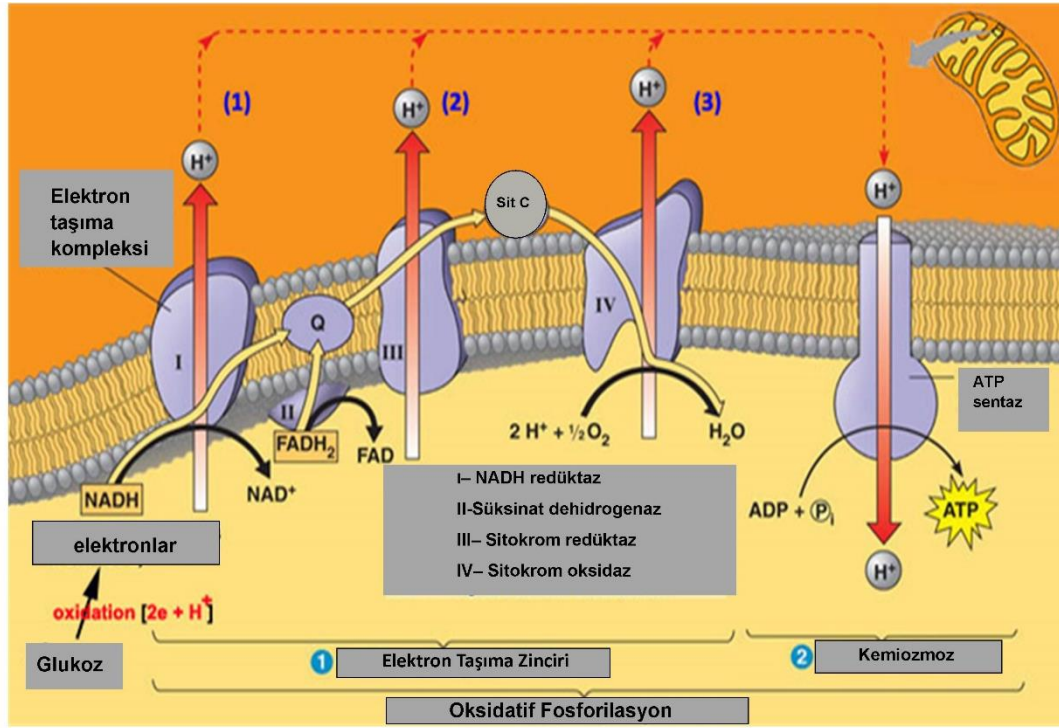
Şekil 2.6: Pentoz-fosfat yolağı ve glikoliz arasındaki ilişki (www.memorangapp.com'dan alınmıştır.)

2.3.4. Elektron Taşıma Zinciri ve Oksidatif Fosforilasyon

Elektron taşıma zinciri (ETZ), sitrik asit döngüsü ve oksidatif fosforilasyon mitokondride gerçekleşir. Mitokondri iç zarının geniş kıvrımları yüksek oranda ATP üretiminde rol alan birçok moleküler sistemin yerleşebilmesi için matriks üzerinde geniş bir yüzey oluşturur. Elektronlar oksidatif tepkimeler sırasında yapı maddelerinden ve metabolik araçlardan dehidrojenazlar aracılığıyla kofaktörler olan nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+) ve flavin adenin dinükleotid (FAD)'e aktarılır ve böylece NAD^+ NADH 'ye ve FAD ise FADH_2 'ye indirgenir. Bunun sonucunda elektronlar NADH ve FADH_2 'de toplanmış olur. Ancak hücreler sınırlı miktarda NAD^+ ve FAD içerirler. Bu sebeple metabolizmanın devamlılığı NAD^+ ve FAD'ın geri dönüşümünü gerektirir. Bunun için NADH ve FADH_2 'den son elektron alıcısı olan O_2 'ye elektronların aktarılmasıyla NAD^+ ve FAD'nin geri dönüşümü gerçekleşir ve böylelikle metabolik süreçler devam edebilir. Elektronlar NADH ve FADH_2 'den bir dizi taşıyıcı boyunca O_2 'ye taşınır. Bu zincir dört geniş protein kompleksi içerir. Bu kompleksler sırasıyla kompleks I (NADH -koenzim Q (KoQ) redüktaz), kompleks II (süksinat-koenzim Q redüktaz), kompleks III (sitokrom c redüktaz) ve kompleks IV (sitokrom c oksidaz)'dir (Şekil 2.7:). Her kompleksin içindeki taşıyıcıların çoğu elektronları alabilen ve verebilen prostetik gruplu integral membran

proteinleridir. Bu taşıyıcılar artan elektron ilgisine göre düzenlenirler ve bunun sonucunda elektronlar sırasıyla bir taşıyıcıdan diğer taşıyıcıya kendiliğinden akarlar. Buna elektronların yukarıdan aşağıya enerji akışı da denebilir. Bir taşıyıcıdan diğerine elektron aktarımı sırasında salınan enerjinin miktarı önemlidir, bu değer ADP ve Pi'den ATP oluşturabilmek için yeterli enerjinin var olup olmadığını gösterir. Tüm enerji, tek adımdaki elektron aktarımında üretilemez. Enerji, her bir redoks adımında artan miktarlarda salınır. Serbest kalan enerji miktarı bitişik taşıyıcılar veya zincirin herhangi bir aralığında hesaplanabilir. Zincirde salınan enerji bir transmembran proton gradyanı formunda toplanır ve ATP üretmek için kullanılır (Boyer, 2004).

Oksidatif fosforilasyon süreci kısaca elektronların NADH ya da FADH₂'den ETZ yoluyla moleküler oksijene akışı ile ATP sentezi için ADP ve inorganik fosfatın birleştirilmesidir. İkinci aşama olan ADP'nin Pi ile fosforilasyonu ATP sentaz tarafından katalizlenir. ATP sentaz enzimi iç mitokondriyal zarıda konumlanır. Elektron taşınmasından elde edilen enerji toplanır ve ATP sentez tepkimesini devam ettirmek için uygun bir hale çevrilir. Bozulmamış, sağlam bir mitokondride elektron aktarım süreci ve ATP sentez süreci birbiri ile bağlantılıdır. Elektron aktarımından kaynaklanan enerji olmaz ise oksidatif fosforilasyon ile ATP üretilmez. Pirüvat dehidrojenaz kompleksi tarafından oksitlenen her bir pirüvat molekülü, bir tane NADH molekülünün oluşumuna yol açar. İndirgenmiş kofaktör içindeki iki elektron, ETZ'den geçtiğinde, her bir oksijen atomu için yaklaşık olarak üç tane ATP molekülü indirgenir. Süksinat dehidrojenaz tarafından okside edilen her bir süksinat molekülü, bir tane FADH₂ oluşumuna neden olur. FADH₂'deki iki elektron buradan KoQ'ya geçerek ETZ'ye girer ve O₂'nin indirgenmesi için yaklaşık olarak iki tane ATP'nin üretilmesine neden olur (Boyer, 2004) (**Şekil 2.7:**).



Şekil 2.7: ETZ ve oksidatif fosforilasyon (www.nhvweb.com.tr'den alınmıştır.)

2.4. MİTOKONDİRİ

Mitokondri, kırmızı kan hücreleri ve bazı protozoalar dışındaki ökaryotik hücrelerin tümünde bulunan bir organeldir. Mitokondri primidin biyosentezi, iyon dengesi, yağ asidi oksidasyonu ve programlı hücre ölümü (apoptoz) gibi birçok hücrel süreçte önemli rol oynar (Danial ve Korsmeyer, 2004). Mitokondrinin en önemli işlevlerinden biri canlı hücreler için gerekli olan ATP'nin oluşumunu sağlamaktır (Sadaf ve diğ., 2015). Hücrelerin metabolik etkinliğinin büyük kısmının gerçekleştiği organel olan mitokondri hücrelerin ana enerji kaynağıdır. Mitokondri kendi DNA'sına sahip olan ancak buna rağmen hücre genomuna bağımlı olan yarı otonom bir organeldir. Mitokondri, insanlarda 16.6 kb uzunluğunda, son derece yoğun bir DNA'ya sahiptir. Mitokondriyal DNA (mtDNA) sadece iki tane kodlayıcı olmayan bölge içerir ve bitişik genler arasında intron bulunmaz. Mitokondri DNA'sı mitokondriyal protein sentezi için gerekli olan yirmi iki tane taşıyıcı RNA (tRNA)'nın yanı sıra iki tane ribozomal RNA (rRNA) kodlar (Anderson ve diğ., 1981; Attardi, 1985). Mitokondri oksidatif fosforilasyon yoluyla üretilen ATP'nin üretildiği asıl organeller olduğu için ATP üretimi sonucu oluşan ve yüksek seviyeleri

protein karbonilasyonuna, lipid peroksidasyonuna ve DNA hasarına yol açabilen reaktif oksijen türleri (ROS)'nin ana kaynağı olan organelerdir (Sena ve Chandel, 2012).

2.4.1. Mitokondriyal Metabolizmanın Düzenlenmesi

Uncoupling Protein (UCP) 2, UCP ailesinin üyesi olan mitokondriyal taşıyıcı proteindir. İsmine rağmen bir UCP'den çok bir metabolit taşıyıcı olduğu kabul edilmektedir. UCP2, oksidatif stresi ve /veya enerji metabolizmasını düzenleyebilir. Ayrıca kemirgenlerde alfa ve beta hücre kütlelerinin kontrol edilmesinde rol aldığı gibi insülin ve glukagon salgısının kontrolünde görev alır (Broche ve diğ., 2018). Kahverengi yağ dokusunda UCP1'in bir UCP olarak proton taşıyıcısı kabul edilen rolüne karşın UCP2'nin mitokondriyal uncoupling işlevinin az olduğu veya hiç olmadığı ve bir metabolit taşıyıcısı olduğu gösterilmiştir (Vozza ve diğ., 2014). UCP2 pankreasta, akciğerde, dalakta, midede ve yağ dokusunda ifade edilir (Pecqueur ve diğ. 2001; Robson-Doucette ve diğ., 2011). Ayrıca çeşitli çalışmalar UCP2'nin farklı hücre türlerinde ROS üretiminin baskılayıcısı olduğunu göstermektedir (Arsenijevic ve diğ., 2000; Pecqueur ve diğ., 2008). Ek olarak, UCP2 kemirgen embriyonik fibroblastlarında (Pecqueur ve diğ., 2008) ve farklı kanser hücresi türlerinde (Esteves ve diğ., 2014) glikoliz ve oksidatif fosforilasyon arasındaki dengeyi de düzenleyebilir. Son zamanlarda insanlarda UCP2 mutasyonları keşfedilmiş ve bu mutasyonlar konjenital hiperinsülinizm ile ilişkilendirilmiştir (González-Barroso ve diğ., 2008). Farelerde UCP2'nin yokluğu insülin salgısının artmasına yol açar (Zhang ve diğ., 2001). UCP2'nin etkisiz hale getirilmesi endokrin hücrelerin sayısında artışa neden olur (Joseph ve diğ., 2002; Lee ve diğ., 2009).

Malat dehidrojenaz 2 (MDH2) mitokondri matriksinde gerçekleşen ve merkezi oksidatif yol olan TCA döngüsünde rol alan mitokondriyal bir proteindir. NAD/NADH koenzim sisteminden yararlanarak malat ve oksaloasetatın birbirine dönüşmesini katalizler (Goward ve Nicholls., 1994; Ban ve diğ., 2016). MDH'lerin aerobik enerji üretim metaboizmasında önemli görevlerinin yanı sıra aspartat biyosentezi, malat-aspartat mekiği, glukoneogenez ve lipogenez dahil olmak üzere çeşitli metabolik aktiviteleri vardır (Labrou ve Clonis, 1997). Ayrıca, MDH2 aktivitesi engellediğinde mitokondriyal solunumun baskılandığı da gösterilmiştir (Ban ve diğ., 2016).

Sitrat Sentaz hemen hemen bütün canlı hücrelerde var olan ve sitrik asit döngüsünün ilk basamağında bulunan bir proteindir. Bu enzim sitrik asit döngüsünü hızlandırır (Wiegand ve

Remington, 1986). Mitokondri matriksinde yerleşen sitrat sentaz, nükleer DNA tarafından kodlanır. Sitrat Sentaz mitokondride asetil KoA ve oksaloasetattan sitrat sentezini sağlar (Iacobazzi ve Infantino, 2014).

2.5. KÖK HÜCRELER

Organizmada temelde üç çeşit hücre bulunur: Kök hücreler, çeşitli farklılaşma aşamalarında bulunan somatik hücreler ve germ hücreleri. Kök hücre kavramına ilk olarak eski botanik yazılarında rast gelinmiştir. Bu terim ilk olarak bitkinin kök meristeminin ucunda bulunan ve çok hızlı bölünen hücreleri tanımlamak için kullanılmıştır (Can, 2014a). Günümüzde diğer canlılarda bulunan ve benzer davranışlar gösteren hücreler için de kök hücre kavramı kullanılmaktadır. Kök hücreler kendini yenileyebilen, değişik tipte hücrelere farklılaşabilen ve klon oluşturabilen hücrelerdir (Smith, 2001; Weissman ve diğ., 2001). Bu hücreler asimetric bölündüklerinde bir taraftan kendi varlıklarını koruyabilmek için yedeklerini oluştururken diğer yandan yenilenmesi ya da onarılması gereken dokunun ihtiyaç duyduğu farklılaşmış hücreleri vermek için farklılaşma yolunda ilerleyecek hücreleri oluştururlar. Böylece kök hücre olarak varlıklarını sürdürürlerken aynı zamanda doku onarımı ya da yenilenmesi gibi hayati bir görevi yerine getirmiş olurlar (Can, 2014a).

Kök hücreleri sınıflandırırken organizmanın yaşam süreci içinde bulunduğu döneme (embriyo, fetüs veya yetişkin) ve köken verebileceği hücre türlerinin zenginliğine göre sınıflandırmak en doğru olanıdır. Organizmanın oluşumunun başlangıcında, yaşamsal öneme sahip olan embriyo kök hücreleri, çok kısa ömürlü hücreler olup hızla embriyo gövdesini oluşturan katmanlara farklılaşırlar. Oysa yetişkin kök hücreler, organizmada yaşam boyu süregelen yenilenme ve doku onarımı gibi yaşamsal süreçlerden sorumlu olan kök hücrelerdir.

Beta hücresi araştırmalarındaki en önemli sorulardan birisi yetişkin pankreasında bu hücrelerin yenilenmesinin ne oranda gerçekleştiği ve bunun kaynağının hangi hücre olduğudur. Yeni hücreler oluşuyorsa bunlar kök/öncül hücrelerden mi kaynaklanmaktadır, yoksa mevcut hücrelerin bölünmesiyle mi ortaya çıkmaktadır? Literatürde birbiriyle çelişen bulgulara rastlanmaktadır. Gebelikte, obezitede ve kısmi pankreatektomiden sonra beta hücrelerinin kendini yenilediği görülür. Bu bulgu pankreatik kök hücreleri kavramının doğmasına yol açmıştır (Bonner Weir ve Sharma, 2002). Pankreatik kök hücrelerin var olduğunu ileri süren görüşler nakillerden sonra adacıkların işlev görmeyi sürdürmesinden de destek almaktadır. Beta

hücrelerinin uzun süre yaşam sürmedikleri bilinir (Bonner-Weir ve diğ., 2000). Bu nedenle nakledilen adacıkların işlevlerini sürdürmesi, adacık içinde pankreatik kök hücrelerin veya en azından kendini yenileyebilen işlevsel beta hücrelerinin varlığıyla açıklanabilir (Can, 2014b). Karaöz'ün (2010) ve ekibimizin (Gezginci-Oktayoğlu ve diğ., 2018) önceki çalışmaları kapsamında PAK-PH'lerin CD29 (Integrin- β 1 zinciri Ha2/5), CD54, CD90 (Thy-1/Thy-1.1) ve CD106 taşıırken, CD45-negatif olduklarını gösterilmiştir. Ayrıca, bu hücrelerin nestin, fibronektin, endoglin ve vimentin gibi mezenkimal kök hücre belirteçlerini taşıdığı da belirtmiştir. İlâveten bu çalışmalar kapsamında PAK-PH'lerin uygun uyaran varlığında kültür ortamında insülin üreten beta hücrelerine, adipositlere ve osteositlere farklılaşabildikleri de gösterilmiştir.

2.5.1. Kök Hücre Kaderinin Metabolik Olarak Düzenlenmesi

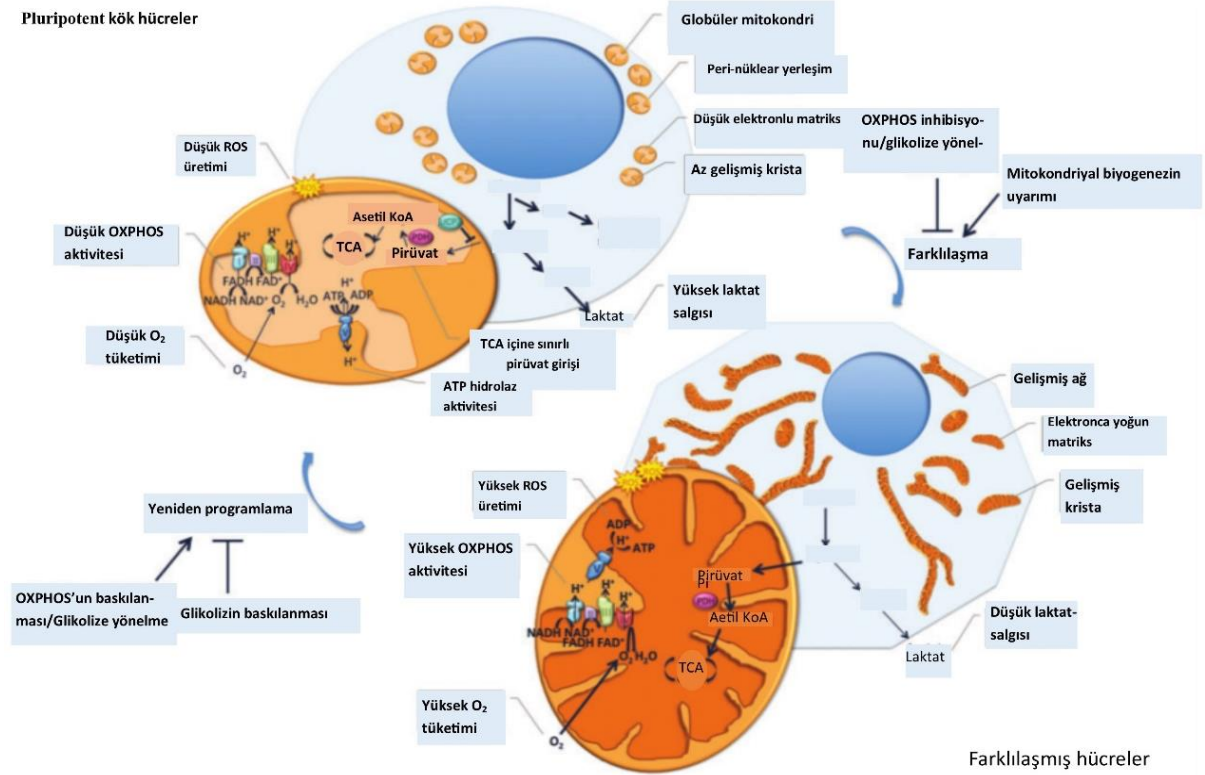
Başlangıçta hücre metabolizması ile ilgili yapılan çalışmalar çoğunlukla metabolizmanın hücreye enerji sağlamasında ve hücrenin yaşamını devam ettirebilmesinde oynadığı önemli rolleri araştırılmak ile sınırlı iken, son zamanlarda yapılan çalışmalar metabolizmanın farklı yönlerden hücre kaderinin belirlenmesi ve kök hücrelerin aktivitesi üzerindeki etkileri üzerine yoğunlaşmıştır (Buck ve diğ., 2016; Gascon ve diğ., 2016). Yakın zamanda hücrelerde meydana gelen metabolik değişimlerin kök hücrelerin kalıtım ötesi (epigenetik) düzenini etkileyip gen anlatımını değiştirerek etkili olduğu gösterilmiştir (Harvey ve diğ., 2016). Hücrenin metabolik olaylarının büyük kısmının gerçekleştiği organel olan mitokondri de doğal olarak kök hücrelerin kaderinin ve aktivitesinin düzenlenmesinde etkindir (Buck ve diğ., 2016; Khacho ve diğ., 2016). Kök hücre metabolizması temelde oksijen seviyelerine bağlı olarak değişir ve bu değişim kök hücre karakterlerini ve farklılaşmasını yönlendirir. Buna örnek olarak blastokistin rahim duvarına tutunması ile iç hücre kütlelerini oluşturan pluripotent embriyonik kök hücrelerin metabolik değişimi ve farklılaşma süreci arasındaki ilişki incelenebilir. Blastokist rahim duvarına tutunduğunda rahim duvarında düşük oksijen seviyesi mevcuttur. Burada oksijen seviyesi değiştiğinde rahim duvarına tutunmuş olan blastokist ve içindeki pluripotent kök hücrelerin metabolizması yeniden düzenlenir. Benzer olarak pluripotensi özelliğinin kaybedilmesi de önemli metabolik yeniden düzenlemeler ile ilişkilidir (Mathieu ve Ruohola-Baker, 2017). Hücrelerin farklılaşmasında ve olgunlaşmasında meydana gelen metabolik değişimler enerji üretimi için gerekli olan madde seçimindeki değişimleri, anabolik yollar için yeni ara ürünlerin üretilmesini ve ayrıca enerji üretimi için mitokondrinin

kullanılmasını kapsar (Zhang ve diğ., 2011a; Diano ve Horvath, 2012). Yüksek çoğalma yeteneğine sahip olunan pluripotent aşamadan çoğalmanın azaldığı ve farklılaşmanın arttığı sonraki aşamalara geçişte nasıl ki kök hücrelerin metabolizmasında değişimler meydana geliyor ve farklılaşmış hücre metabolizmasına uygun hale getiriliyorsa yeniden programlama ile farklılaşmış bir hücrenin pluripotent aşamaya dönüşümünde de geriye dönen hücrenin metabolizmasında yeniden düzenlenmeler meydana gelir ve pluripotent aşamadaki bir hücrenin metabolizmasına uygun hale getirilir (Mathieu ve Ruohola-Baker, 2017). Beta oksidasyonu ya da oksidatif fosforilasyon ile glikolize göre çok daha fazla enerji (ATP) elde edilmesine rağmen, bazı hücreler enerji üretimi için glikolizi kullanırlar. Bu durum mitokondriyal aktivite olmaksızın enerji üretimi sağlar, glikoliz ile oluşan ürünler anabolik yollar için kullanılır ve bu sayede çoğalan hücreler için gerekli olan moleküller üretilmiş olur. Mitokondriyal aktiviteyi devre dışı bırakmanın diğer bir yararı ise ATP üretiminde bir tıkanıklığa neden olmaksızın hasarlı mitokondriilerin elenmesinin sağlanmasıdır (Khacho ve diğ., 2016; Sieber ve diğ., 2016).

Yüksek oranda bölünebilme kapasitesine sahip kök hücrelerin farklılaşmış, bölünemeyen somatik hücrelere göre çok farklı metabolik ihtiyaçları vardır (Heiden ve diğ., 2009). Kök hücrelerin çoğalması enerji gerektiren bir olay olmakla birlikte bölünme sonucu oluşan yavru hücreler için lipidlerin, aminoasitlerin ve nükleotidlerin sentezini gerektirir. Bilindiği üzere oksidatif fosforilasyonla 36 ATP molekülü üretilirken glikoliz ile sadece 2 ATP molekülü üretilmektedir. Ancak buna rağmen pluripotent kök hücreler oksidatif fosforilasyon yerine glikolizi tercih ederler çünkü tüm glukozun ATP üretiminde kullanılması çoğalan hücreleri kısıtlayacaktır. Bunun için glukozun bir kısmı yağ asidi oluşturmak için asetil KoA, zorunlu olmayan amino asitler için glikolitik ara ürünler ve nükleotid sentezi için riboz gibi öncül moleküllerin oluşumunda kullanılır. Muhtemelen yüksek çoğalma özelliğine sahip olan hücreler bu nedenden dolayı mitokondride gerçekleşen pirüvat oksidasyonu yerine oksijenin varlığına bakılmaksızın anaerobik glikolizi tercih etmektedir. Aynı metabolik yolu yüksek derecede çoğalma özelliğine sahip olan kanser hücreleri de izler. Kök hücre metabolizmasında glikoliz dışında diğer önemli metabolik yolak lipid ve nükleotid sentezi için gerekli olan öncül moleküllerin üretildiği pentoz fosfat yolağıdır. Pluripotensi ile farklılaşmanın başlaması arasındaki dengede önemli olan bu yolak, embriyonik kök hücrelerde somatik hücrelere göre daha etkindir (Varum ve diğ., 2011; Manganelli ve diğ., 2012). Hipoksik ortamda bulunan hematopoietik kök hücrelerin ATP üretmek için oksidatif fosforilasyonu değil de anaerobik glikolizi kullanması bu bağlamda değerlendirilebilir. Ayrıca farklı metabolik yollar

arasındaki geçişler sessiz hücrelerin etkinleşmesi ve farklılaşmasının başlaması açısından da önemlidir (Simsek ve diğ., 2010).

Embriyonik kök hücreler daha az sayıda, küresel ve olgunlaşmamış, düşük solunum işlevine sahip mitokondriler içerirler ve enerji üretimi için anaerobik glikolizi kullanırlar (Prigione ve diğ., 2010; Folmes ve diğ., 2011). Bunun yanı sıra EKH'ler yüksek mitokondriyal membran potansiyeline sahiptir (Zhang ve diğ., 2011a). Glikoliz ile daha az enerji üretilir. Ancak düşük ROS oluşumu nedeniyle enerji üretimi daha hızlıdır. Bu durum hipoksik koşullar altında pluripotent özelliğin korunmasında önemlidir. Hipoksik şartlar altında glikolizin uyarılması ve mitokondriyal solunumun engellenmesi pluripotensiyi artırır. Yetişkindeki kök/progenitör hücre türlerinden biri olan hematopoietik kök hücreler öncü hücreler ile karşılaştırıldığında düşük solunum hızına ve düşük mitokondriyal zar potansiyeline sahip mitokondriler içerdiğini düşündüren kısmen olgunlaşmamış mitokondri içerir (Seita ve Weissman, 2010). Farklılaşmış hücrelerde, elektronca daha yoğun matris ve gelişmiş kristaller ile tanımlanan gelişmiş bir mitokondriyal ağ vardır ve artan oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) aktivitesi ile ATP üretimi sağlanır. OXPHOS'un inhibe edilmesi veya glikolizin uyarılması, pluripotent hücrelere yeniden programlamayı desteklerken farklılaşmayı engeller. (Wanet ve diğ., 2015) (**Şekil 2.8**).



Şekil 2.8: Pluripotent kök hücre farklılaşması ve yeniden programlanması sırasında mitokondri ve metabolizmanın yeniden şekillenmesi. (Wanet ve diğ., 2015'ten alınmıştır).

2.6. KÖK HÜCRE KADERİNİN BELİRLENMESİNDE MOLEKÜLER ENERJİ ALGILAYICILARININ ROLÜ

Besin algılama sinyal yolları canlılardaki enerji değişimlerini algılayarak metabolizmayı düzenler (Rafalski ve diğ., 2012). Bu sinyal yolları ve ilişkili moleküller arasında kök hücre karakterini etkileyenler aşağıda listelenmiştir.

2.6.1. İnsülin-FOXO Sinyal Yolağı

İnsülin/insülin büyüme faktörü 1 (IGF1) sinyali forkhead box protein O (FOXO) transkripsiyon faktörlerinin Protein Kinaz B (AKT) ve serum-glukokortikoid ile düzenlenen kinaz (SGK) tarafından fosforillenmesine neden olur. Fosforile ve inaktif halde bulunan FOXO, sitoplazmada tutularak nükleusa geçişi engellenir (Greer ve Brunet, 2005). Ters bir durumda insülin/IGF1 sinyali azaldığında ise FOXO transkripsiyon faktörleri nükleusa geçebilir. Memelilerde forkhead box O (FOXO) 1, FOXO3, FOXO4 ve FOXO6 olmak üzere FOXO ailesine ait dört üye bulunur (Willcox ve diğ., 2008; Pawlikowska ve diğ., 2009). Bu proteinler

kök hücreler için oldukça önemli olan transkripsiyon faktörleridir. FOXO1, FOXO3 ve FOXO4 yetişkin farelerdeki hematopoietik kök hücre (HPKH) ve nöral kök hücre (NKH) gibi yetişkin kök/progenitör hücre karakterlerinin korunması için önemlidir. FOXO ailesi üyelerinin kaybı yetişkin kök/progenitör hücre havuzunun erken tükenmesine neden olur (Miyamoto ve diğ., 2007; Paik ve diğ., 2009). Ayrıca FOXO proteinleri EKH'nin pluripotensisi için de oldukça önemlidir (Rafalski ve diğ., 2012). Bu transkripsiyon faktörlerinin NKH ve HPKH'lerde yetişkin kök hücrelerin anahtar bir özelliği olan hücre sessizliğini teşvik ederek kök hücrelerin sık bir şekilde hücre döngüsüne girişini engellemeye yönelik fonksiyonları vardır. FOXO'ların yokluğu daha kararlı olan progenitörlerin aşırı çoğalmasına ve böylece sessiz kök hücre havuzunun normalden hızlı tükenmesine yol açmaktadır (Tothova ve diğ., 2007; Paik ve diğ., 2009).

Kök hücrelerde hücrel sessizliği sağlama eğiliminde olan FOXO transkripsiyon faktörleri farklılaşmış, bölünmeyen hücrelerde ise hücrel strese yanıt olarak geniş ölçüde apoptozu teşvik ederler. Ayrıca, hücrelerin protein ve genomik bütünlüğünü bozan ROS birikimini engelleyen FOXO'lar bu fonksiyonları sayesinde kök hücrelerin korunmasına yardım etmektedir. FOXO transkripsiyon faktörleri birçok hücre tipinde oksidatif stres direnci ile ilişkili çeşitli genleri düzenlemektedir (Salih ve Brunet, 2008).

FOXO1 yetişkin farelerdeki spermatogonyal kök hücrelerin homeostazı için çok önemlidir (Goertz et al., 2011). Hem insan hem de fare EKH'lerinin pluripotensisi için önemli olan FOXO1 aynı zamanda insan EKH'lerinde köklülük programı için çok önemli olan iki transkripsiyon faktörünün yani oktomer bağlayıcı transkripsiyon faktörü (OCT4) ve sry-box 2 (SOX2)'nin ifadenmesini düzenler (Zhang ve diğ., 2011b). İnsanda normalden uzun ömürlü olmayla ilişkilendirilen FOXO3 özellikle HPKH ve NKH'lerin devamlılığının sağlanması için önemlidir. FOXO3'ün yokluğunda HPKH ve NKH'lerin tükenmesi durumu ortaya çıkar (Miyamoto ve diğ., 2007; Renault ve diğ., 2009). FOXO3 transkripsiyon faktörü insan EKH'lerinin pluripotensisini etkilememekte ise de, fare EKH'lerinin pluripotensisini düzenleyebilir (Zhang ve diğ., 2011b; Vilchez ve diğ., 2012). NKH'lerde, FOXO3 hipoksi sinyali ile ilişkili genlerin ifadenmesini düzenler. *In vitro*'da FOXO3'ü eksik olan NKH'lerin düşük oksijene (%2) cevaben proliferatif cevabı azalır. Hipoksi ile uyarılan faktör 1 (HIF1) de FOXO3'e benzer bir şekilde glikoliz ve fruktoz metabolizması ile ilişkili genlerin ifadesini düzenler (Renault ve diğ., 2009). HIF1'i eksik olan HPKH fenotipleri ile FOXO3'ü eksik olan

HPKH fenotipleri özellikle hücrel sessizliğin kaybı ve HPKH havuzunun zamanından önce tükenmesi bakımından birbirine benzerlerdir (Miyamoto ve diğ., 2007; Takubo ve diğ., 2010).

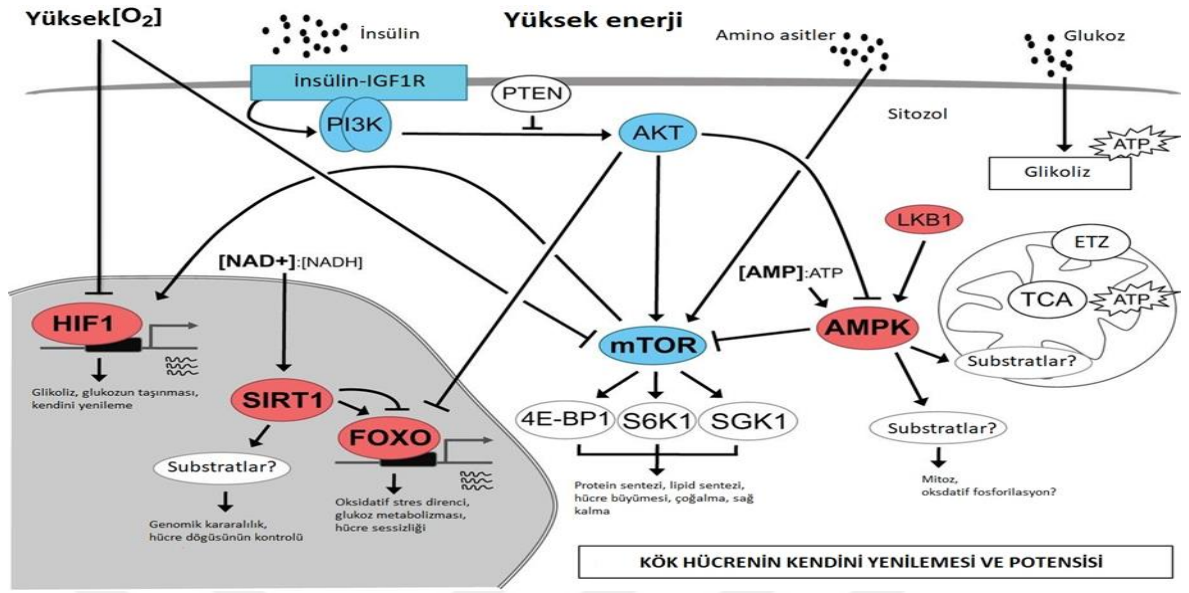
2.6.2. mTOR

Bir protein kinaz olan mTOR memelilerde hücrel ve organizmal metabolizmanın önemli bir parçasıdır. Aminoasitlerin varlığında veya fosfotidilinositol 3-kinaz (PI3K)/AKT sinyal yolağı tarafından aktive edilir. mTOR hücrenin büyümesini, çoğalmasını ve yaşamını düzenleyen rapamisin kompleksinin memeli hedefi 1 (mTORC1) ve rapamisin kompleksinin memeli hedefi 2 (mTORC2)'nin bir bileşenidir (Lapante ve Sabatini, 2012). Organizmal seviyede, mTOR enerji metabolizmasının düzenlenmesi, kanser ve yaşlanma ile ilişkilidir (Kapahi ve diğ., 2010; Lapante ve Sabatini, 2012). Örneğin, mTOR aktivitesi rapamisin ile engellenen farelerin yaşam sürelerinde uzama meydana gelmektedir (Harrison ve diğ., 2009). *In vitro*'da mTOR aktivitesi EKH'lerin kendini yenileme özelliği için oldukça önemlidir. İnsan ve fare EKH'lerinde rapamisin susturma yoluyla engellendiğinde, pluripotensi belirteçlerinin ifadesinde ve kendini yenileme özelliklerinde azalma meydana gelmektedir (Schieke ve diğ., 2008; Zhou ve diğ., 2009). mTOR'un kaybı erken fare embriyolarında hücre çoğalmasını engeller (Murakami ve diğ., 2004). Ayrıca mTOR, EKH farklılaşmasını da teşvik eder. EKH'lerden farklılaşmış hücre tiplerine dönüşüm mTORC1 sinyalinin artan aktivasyonu ile ilişkilidir, mTORC1 kompleksinin bir substratı olan S6 kinaz 1'in aktif formunun aşırı ifadenmesi EKH'lerin farklılaşmasını teşvik eder (Sampath ve diğ., 2008; Easley ve diğ., 2010). Yetişkin kök/progenitor hücrelerin kendini yenileme özelliği EKH'lerin kendini yenileme özelliğinin aksine mTOR'un azalan aktivitesinden faydalanır. Bu durumun nedeni, EKH'ler ile kıyaslandığında yetişkin kök/progenitor hücrelerin nispeten daha sessiz kök hücreler olması olabilir (Chen ve diğ., 2008). Korunan düşük mTOR aktivitesi yetişkin kök/progenitor hücre havuzunun tükenmesini engeller. Örneğin, farelerin epidermisinde, mTOR aktivitesinin artması epidermal kök hücrelerin zamanından önce tükenmesine neden olmaktadır. Korunan düşük mTOR aktivitesi yetişkin kök/progenitor hücreler için yararlı olmakta iken, mTOR aktivitesinin tamamen kaybolması bu kök hücreler için zararlıdır. mTORC1 kompleksinin anahtar bileşeni olan Raptor molekülünün kaybı HPKH fonksiyonunda bozukluklara yol açmaktadır (Kalaitzidis et al., 2012). Yetişkin HPKH'lerde mTOR'un aşırı aktivasyonu mitokondri sayısındaki artış ve yüksek ROS seviyeleri ile ilişkilidir. Raptor kaybı nedeniyle oluşan mTOR'un yetersiz, düşük aktivasyonu, özellikle HPKH'lerde lipid ve

kolesterol metabolizmasındaki değişimler ile ilişkilidir (Chen ve diğ., 2008; Kalaitzidis ve diğ., 2012). mTOR aktivitesi EKH'lerin büyümesi ve çoğalması için çok önemli iken, aşırı mTOR aktivitesi yetişkin kök hücre havuzları için zararlıdır ve erken yaşlanmalarına neden olur (Tothova ve diğ., 2007; Chen ve diğ., 2008). Hem mTOR hem de FOXO'lar insülin sinyalinin aşağı akış araçlarıdır ve insülin sinyali mTOR aktivasyonunu uyarırken FOXO transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu engeller. Kök hücrelerde FOXO ve mTOR birbirlerine geniş ölçüde zıt fonksiyonlara sahiptirler. mTOR'un aşırı aktif olması kök hücre havuzunun zamanından önce tükenmesine ve oksidatif stres birikimine neden olurken, FOXO transkripsiyon faktörleri yetişkin kök/progenitör hücrelerin devamlılığını sağlar ve oksidatif stresin en aza indirgenmesine yardım eder (Morshead ve diğ., 1994; Kippin ve diğ., 2005).

2.6.3. AMPK

AMPK, düşük enerji ve hücrel stres de dahil olmak üzere geniş bir uyarıcı yelpazesi tarafından aktif hale getirilebilir. Hücre içi AMP veya ADP seviyesi ATP seviyesinden daha yüksek olduğunda AMPK aktif hale gelir. Ayrıca AMPK aktivasyonu için tümör baskılayıcı karaciğer kinaz B1 (LKB1 veya STK11) veya kalsiyum-kalmodulin-bağımlı protein kinaz kinaz β (CAMKK β) uyarısı gerekir (Kahn ve diğ., 2005). AMPK, enerji tüketim yollarını durdurur ve glukoz metabolizması, lipid metabolizması, otofaji, mitofaji, transkripsiyon ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde yer alan birçok substratın fosforlanması aracılığıyla enerji üretim yollarını tetikler (Banko ve diğ., 2011; Mihaylova ve Shaw, 2011). Uzun yaşam ve tümör baskılanması için önemli olan AMPK, T2D'nin engellenmesi için çok önemlidir (Shaw ve diğ., 2004; Li ve diğ., 2011). Yetişkin HPHK'lerde AMPK mitokondriyal homeostazı etkilemede rol oynamaktadır. AMPK'nın α -alt ünitesi eksik olan HPHK'lerde ATP seviyesinde ve mitokondriyal DNA seviyesinde azalma meydana gelmektedir. AMPK aktivitesi ortadan kaldırıldıktan birkaç ay sonra kemik iliğindeki HPHK sayısında önemli ölçüde azalma meydana gelmiştir. AMPK tarafından mitokondriyal homeostazın düzenlenmesinin HPHK çoğalmasının kontrolüne katkı sağladığı düşünülmektedir (Nakada ve diğ., 2010). AMPK sinir sisteminde kök hücre mitozunu düzenlemektedir. Örneğin, gelişen fare beyninde ortadan kaldırılan normal AMPK aktivitesi nöral progenitör hücrelerin mitozunda kusurlara ve anormal beyin gelişimine neden olmaktadır (Dasgupta ve Milbrandt, 2009).



Şekil 2.9: Kök hücrelerde besin algılama sinyal yolları (Rafalski ve diğ., 2012'den alınmıştır).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. MALZEMELER

Tez kapsamında kullanılan hücre kültürü malzemeleri Gibco'dan; kimyasal malzemler Sigma'dan; Histostain-Plus IHC Kit; High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit Applied Biosystems'ten; Qubit ssDNA Assay Kit, Qubit RNA BR Assay Kit Invitrogen'den; iTag Universal Probes Supermix Bio-rad'dan; EnzyChrom NAD⁺/NADH Assay Kit (E2ND-100), EnzyChrom NADP⁺/NADPH Assay Kit (ECNP-100), EnzyChrom L-Lactate Assay Kit (ECLC-100), EnzyFluo Glucose Uptake Assay Kit (EFGU-100) BioAssay Systems'ten; Fluoforte Calcium Assay Kit (ENZ-51017) Enzo'dan; Mem-PER Plus Membrane Protein Extraction Kit, Mitokondri İzolasyon Kiti Thermo Scientific'ten; Nuclear Extraction Kit Millipore'den; MitoTracker Green FM Cell Signaling Technology'den temin edildi.

3.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ

Bu çalışmada kullanılan PAK-PH'ler, araştırma ekibimizin önceki çalışmaları kapsamında erişkin erkek *Wistar albino* sıçanların pankreatik adacıklarından Eberhardt ve grubunun uyguladıkları protokol (2006) temel alınarak izole edilip karakterizasyonu yapılmıştır: Erişkin erkek *Wistar albino* sıçanlar (250-300 gr) ketazol (200 mg/kg ketanin) ile bayıltılarak, pankreatik kanal aracılığı ile kollejenaz (1 mg/mL) uygulanmıştır. Pankreatik adacıklar pankreasın ekzokrin kısmından Ficoll 400 gradiyent santrifügasyon yöntemiyle ayrıştırılmıştır (Gezginci-Oktayoglu ve diğ., 2012; 2015). Bu aşamadan sonra pankreatik adacıklar kültür kaplarına alınarak tam medyum (%15 fetal sığır serumu (FBS), 100 IU/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin 2 mM L-GLUTamin içeren Minimum Esansiyel Medyum (MEM) içinde, standart kültür şartları sağlayan 37 °C, %5 CO₂ ve %95 nem içeren inkübatörde (Thermo Scientific Heracell 150i) tutulmuş ve PAK-PH'lerin pankreatik adacıklardan ayrılarak kültür kaplarına tutunması ve çoğalması beklenmiştir. PAK-PH'ler, zemini %90 doldurduktan sonra (Pasaj 0) fosfat tamponu ile yıkanmış ve tripsin-etilen diamin tetra asetik asit (Tripsin-EDTA; %0,25) solüsyonunu uygulanarak tutunmuş oldukları yüzeyden kaldırılarak pasajlanmıştır (Gezginci-Oktayoglu ve diğ., 2018). Bu çalışma kapsamında pasajlama yapılırken medyum alınıp, hücreler kalsiyum ve magnezyum içermeyen fosfat tamponu (PBS, 0.01M, pH 7.4) ile yıkandı. Tripsin-EDTA 3 dakika süreyle 37 °C'de uygulandıktan sonra tam medyum eklenerek Tripsin-EDTA inhibe edildi. Bu çalışmada 4-15. Pasaj aralıklarındaki PAK-PH'ler kullanıldı.

Bu çalışmada sekiz deney şartı oluşturuldu: 1. Kontrol olarak kullanılan %10 FBS içeren tam medyum (FM), 2. Glukoz (G; 25mM; Gezginici-Oktayoglu ve diğ., 2018), 3. Aspartam (A; 100 µg/mL; Sawadsopanon ve diğ., 2017), 4. Aspartam+ Glukoz (A+G), 5. Metformin (M; 1mM; Cufi ve diğ., 2012), 6. Glukoz+Metformin (G+M), 7. Aspartam+Metformin (A+M), 8. Aspartam+ Glukoz+ Metformin (A+G+M). Bu maddeler 10 gün süreyle %10 FBS içeren tam medyumda çözülerek standart kültür şartlarında uygulandı. Glukoz taşıyıcısı olarak bilinen GLUT1'in doğal şeker (glukoz), yapay tatlandırıcı (aspartam) ve/veya metformin'in PAK-PH'lerin beta hücrelerine farklılaşma mekanizmasındaki muhtemel rolünün gösterilmesi amacı ile GLUT1 inhibitörü WZB117 (20 µM), bu çalışma için oluşturulan sekiz deney şartı ile birlikte aynı düzende PAK-PH'lere uygulandı. Glukozun hücre içine alınma seviyeleri ölçülerek GLUT1 inhibisyon etkinliği kontrol edildi.

3.3.PANKREATİK BETA HÜCRE FARKLILAŞMASININ TESPİTİ İÇİN YAPILAN ÇALIŞMALAR

3.3.1. İnsülin Üreten Hücrelerin ve ROS Seviyelerinin Akım Sitometri Yöntemi ile Tespiti

Bu çalışmada insülin üreten hücrelerin akım sitometri tekniği ile gösterilmesi yolu ile beta hücre farklılaşma oranı belirlendi. Deney bitiminde hücreler 40 µm porlu süzgeçler kullanılarak ayrıldı. Hücreler 1500 rpm'de 5 dakika boyunca santrüfuj edilerek oluşan süpernatant döküldü ve PBS ile tüpün içindeki pelet süspansiyon edilerek akım sitometri tüplerine alındı. %2 paraformaldehit ile hücreler fikse edilerek %0,05 triton X-100 içeren PBS ile 10 dakika boyunca permeabilizasyon yapıldı. İnsülin primer antikoru (1:10) oda ısısında çalkalayıcı üzerinde 30 dakika boyunca inkübe edildikten sonra hücreler PBS ile yıkanarak fluoressan izotiyosiyanat (FITC) bağlı sekonder antikor (1:10) uygulandı ve 30 dakika boyunca karanlıkta inkübe edildi . Hücreler PBS ile tekrar yıkanarak FL-1 kanalında 1×10^4 hücre analize alındı. Analiz için BD FACS Calibur cihazı ve BD Cell Quest Pro programı kullanıldı (Coskun ve diğ., 2018; Ercin ve diğ., 2018).

Ayrıca, hücrelerdeki ROS seviyelerinin gösterilebilmesi için 2',7'-diklorofloresin diasetat (DCFDA) kullanıldı. Plazma zarından kolay bir şekilde geçebilen ve fluoressans ışığı yapabilen DCFDA hücre içindeki hidroksil ve peroksil gibi ROS seviyelerinin ölçülmesi için kullanılır. DCFDA, hücre içine girdiğinde önce asetil grubu hücredeki esterazlar tarafından koparılarak

fluoresans özelliği olmayan bir yapıya dönüşür. Ancak sonrasında hücrelerdeki ROS ile etkileşime girip oksitlenir ve yüksek seviyede fluoresans ışımaya yapabilen 2',7'-diklorofloresin (DCF) formuna dönüşür. DCFDA'nın ROS ile etkileşimden ortaya çıkan fluoresans ışımının yoğunluğu akım sitometri cihazı ile ölçülerek analiz edilebilir.

ROS seviyesinin ölçümü için 10. günün sonunda kültür kaplarındaki medyumlar toplanarak hücreler Tripsin-EDTA ile tutundukları yüzeyden kaldırıldı ve PBS ile yıkandı. Yıkama işleminin ardından hücreler 40 µm porlu süzgeçlerde ayrılarak 1500 rpm'de 5 dakika santrüfuj edildi. Süpernatant döküldü ve PBS ile pelet süspanse edildikten sonra akım sitometri tüplerine alındı. Karanlık ortamda 10 µM DCFDA konularak 30 dakika boyunca standart kültür şartlarında inkübe edildi ve hücreler akım sitometri cihazında FL-1 kanalında analize alındı. Analiz için BD FACS Calibur cihazı ve BD Cell Quest Pro programı kullanıldı (Coskun ve diğ., 2018; Ercin ve diğ., 2018).

3.3.2. İnsülin Üreten Hücrelerin İmmünohistokimyasal Teknik ile İşaretlenmesi

24 kuyulu plakalara ekilen hücreler zemini %90 doldurduktan sonra sekiz deney şartı 10 gün boyunca uygulandı. 10. günün sonunda hücreler, %2 paraformaldehit içeren tam medyumda +4 °C'de bir gece boyunca fikse edildikten sonra 0,1 M TBS ile 10 dakika yıkandı. %3 Triton X-100 ve %1 FBS içeren TBS'te 1 saat boyunca oda ısısında inkübe edilen hücreler, FBS içeren TBS ile 10 dakika yıkandı. Bu aşamadan sonra Histostain-Plus IHC Kit kullanıldı. Bloklama solüsyonu ile 10 dakika oda ısısında inkübasyonu takiben 1:100 oranında seyreltilen insülin antikoru bir gece + 4 °C'de ve oda ısısında 1 saat inkübe edildikten sonra FBS içeren TBS ile 10 dakika yıkandı. Biotinli sekonder antikor kuyulara konularak 30 dakika boyunca oda ısısında inkübe edildi. FBS içeren TBS ile 10 dakika boyunca tekrar yıkanarak Streptavidin peroksidaz eklendi ve 30 dakika oda ısısında inkübe edildi. Hücreler TBS ile 10 dakika yıkandı ve AEC uygulanarak 10 dakika oda ısısında ve karanlık ortamda inkübe edildi. Reaksiyon su ile durdurulduktan sonra invert mikroskopta (Nikon ECLIPSE Ti-S) X10 oküler ve X20 objektif sistemi kullanılarak NIS-Elements D 3.1 programı ile görüntülendi.

3.3.3. Pankreatik Beta Hücrelerine Özgü Gen Ekspresyon Seviyelerinin Analizi

Gen ekspresyon seviyelerinin analizi için izlenen yol aşağıda sırasıyla belirtilmiştir.

3.3.3.1. Total RNA İzolasyonu ve RNA Miktarının Tespit Edilmesi

Total RNA izolasyonu için hücreleri parçalayarak hücre içeriğinin açığa çıkmasını sağlayan Trizol kullanıldı. Kısaca, hücreler kalsiyum ve magnezyum içermeyen soğuk PBS ile birkaç kez yıkandıktan sonra 1×10^6 hücreye 1 ml Trizol eklenerek pipetaj yapıldı ve Trizol ile karışmış olan hücresel bileşenler steril mikrosantrüfjü tüplerine toplandı. Mikrosantrüfjü tüpleri buz içerisinde 5 dakika bekletildi. Eklenen her 1 ml Trizol için 200 μ l soğuk kloroform eklenerek 15 saniye vortekslendi. Mikrosantrüfjü tüpleri tekrar 5 dakika boyunca buzda bekletildikten sonra $+4$ °C'de 12.000 rpm'de 15 dakika boyunca santrüfjüldü. Santrüfjü işlemiyle üst faza kloroformla birlikte nükleik asitlerin geçişi gerçekleşir. DNA beyaz tortu şeklinde mikrosantrüfjü tüpünün yüzeyine yapışır. Alt faza ise Trizol ile birlikte protein ve diğer bileşenler geçer. Üstteki şeffaf kloroform fazı dikkatlice toplanarak steril mikrosantrüfjü tüplerine aktarıldı. Mikrosantrüfjü tüplerine toplanan kloroform miktarı kadar soğuk isopropanol eklenerek yavaşça yaklaşık 10 kez çalkalandı. İsoopropanol nükleik asitlerin ayrılarak çökmesini sağlar. Mikrosantrüfjü tüpleri buz içerisinde 10 dakika bekletildikten sonra $+4$ °C'de 12.000 rpm'de 10 dakika santrüfjülenerek kloroform ve isopropanolden oluşan süpernatant atıldı. Mikrosantrüfjü tüplerine dietil pirokarbonat (DEPC) içeren suda hazırlanan soğuk %78 etanol 1 ml hacimde eklenerek vortekslendi ve tüpler $+4$ °C'de 7600 rpm'de 5 dakika boyunca santrüfjülenerek oluşan üst sıvı yavaşça dököldü. Etanolün nükleik asitlerden ayrılması için mikrosantrüfjü tüplerinin kapakları açılarak oda ısısında bekletildi ve pelet 20 μ L DEPC içeren su ile çözüldü. Mikrosantrüfjü tüpleri vortekslendikten sonra DNA'nın parçalanarak RNA'nın saflaştırılabilmesi için DNaz I eklendi ve kuru blok ısıtıcıda, 37 °C'de 30 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. 15 mM EDTA eklenerek tüpler vortekslendi ve kuru blok ısıtıcıda, 75 °C'de 5 dakika inkübe edildi. EDTA DNaz'ın aktivitesi için gerekli olan kalsiyum iyonunu bağlar ve bu sayede DNaz inhibisyonuna neden olur. Tüpler 5 dakika buzda bekletilerek miktar tayini aşamasına geçildi.

Total RNA miktar tayini için Qubit RNA BR Assay Kit kullanıldı. Kitin uygulama talimatına göre RNA BR reaktifi ve RNA BR tamponu 1:200 oranında karıştırıldı. Örnekler 1:200 oranında, standartlar (0 ng/ μ L ve 100 ng/ μ L) ise 1:20 oranında reaksiyon karışımı ile seyreltilerek karanlık ortamda ve oda ısısında 2 dakika boyunca inkübe edildi ve Qubit 2.0 Fluorimetre (Invitrogen) cihazında RNA miktarları (ng/mL) tespit edildi.

3.3.3.2. Komplementer DNA (cDNA) Eldesi ve Miktar Tayini

Total RNA'dan cDNA elde etmek için High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit kullanıldı. Kitin kullanım talimatına uyularak cDNA elde edilmesi için şu yol izlendi: 2X Reverse Transkripsiyon (RT) Master Mix elde edebilmek için 2 µL 10X RT tamponu + 0.8 µL 25X dNTP Mix (100 mM)+ 2 µL 10X RT Random Primer + 1 µL MultiScribe Reverse Transkriptaz + 4.2 µL Nükleaz içermeyen su ile 10 µL'lik bir karışım hazırlandı. Her deney şartı için steril PCR tüplerine 10 µL 2X Reverse Transkripsiyon (RT) Master Mix ve 10 µL 1µg RNA eklenerek yavaşça karıştırıldıktan sonra kısa bir santrüfuj yapıldı. High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit'in kullanım talimatında önerilen ve **Tablo 3.1:**'de belirtilmiş olan program Termal Cycler (Techne, TC-PLUS) cihazında yürütüldü.

Tablo 3.1: High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit 'in kullanım talimatında önerilen cDNA çevrim programı.

	1.Adım	2.Adım	3.Adım	4.Adım
Sıcaklık	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
Zaman	10 dakika	120 dakika	5 dakika	∞

cDNA miktarlarının tayini için Qubit ssDNA Assay Kit (1-200 ng)'tin kullanım talimatları uygulandı. ssDNA reaktifi ve ssDNA tamponu içinde 1:200 oranında seyreltilerek reaksiyon karışımı elde edildi. Her deney şartı için örnekler boya + tampon karışımının içerisinde 1.200 oranında seyreltildi. Standartlar (0 ng/µL ve 10 ng/µL) ise 1:20 oranında reaksiyon karışımı ile seyreltildi. Karanlık ortamda ve oda ısısında 2 dakika inkübe edildi. Floresans yoğunluk Qubit 2.0 Fluorimetre (Invitrogen) cihazında ölçülerek cDNA miktarları (ng/ml) tespit edildi.

3.3.3.3. qRT-PCR Yöntemi ile Gen Ekspresyon Seviyelerinin Tespit Edilmesi

Farklılaşmanın tespit edilebilmesi için pankreatik beta hücrelerine özgü olan PDX-1, NKX6.1, PAX4, NGN3, NKX2.2, INS2 ve GLUT-2 transkripsiyon faktörlerinin gen ekspresyon düzeyinde analizleri kantitatif geri çevrim polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) tekniği kullanılarak yapıldı. Analizi gerçekleştirmek için iTag Universal Probes Supermix kiti kullanıldı. Reaksiyon karışımının hazırlanışı **Tablo 3.2:**'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2: qRT-PCR analizi için reaksiyon karışımının hazırlanması.

İçerik	Hacim/20 uL Reaksiyon, uL
iTag universal probes supermix (2x)	10
Primer + Prob karışımı (10X)	2,5
DNA kalıbı (300 ng)	Değişir
Nukleik asit içermeyen su	Değişir
Toplam reaksiyon karışım hacmi	20 uL

Bu çalışmada kullanılan Primer+Prob karışımlarının detaylı bilgisi **Tablo 3. 3:**'de verilmiştir. İnternal kontrol olarak *gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH)* kullanıldı.

Tablo 3.3: qRT-PCR için kullanılan Primer+Prob karışımları (Applied Biosystems).

Gen	Katalog Numarası	Amplikon Uzunluğu
<i>PDX1</i>	Rn00755591_m1	53
<i>NKX6.1</i>	Rn00820751_g1	69
<i>PAX4</i>	Rn016466003_g1	68
<i>NGN3</i>	Rn00572583_s1	70
<i>NKX2.2</i>	Rn04244749_m1	78
<i>INS2</i>	Rn01774648_g1	148
<i>GLUT2</i>	Rn00563565_m1	61
<i>GAPDH</i>	TaqMan/Rn99999916_s1	87

Tablo 3.4: qRT-PCR için kullanılan program

Aşamalar	Sıcaklık (°C)	Süre (saniye)
Denatürasyon	95	25
<u>Amplifikasyon (40 döngü)</u>		
Denatürasyon	95	1
Bağlanma/Uzama ve Okuma	60	20

3.4. METABOLİT ÖLÇÜMÜ

3.4.1. NAD⁺/NADH Seviyelerinin Ölçülmesi

Hücrelerin NAD⁺/NADH seviyelerinin ölçülmesi için EnzyChrom NAD⁺/NADH Assay Kit kullanıldı. Testin prensibi laktat dehidrojenaz çevrim reaksiyonu esas alınarak oluşan NADH'nin bir formazan kristali olan 3-(4,5-dimetiltiyazolil-2)-2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT) reaktifini azaltmasına dayanmaktadır. 565 nm'de ölçülen ürünün rengi, numunedeki NAD⁺/NADH ile orantılıdır. Kitin kullanım talimatına uyularak gerçekleştirilen ölçüm için hücreler soğuk PBS ile yıkandı. Her deney şartı için 1X10⁵ hücre içeren iki ayrı mikrosantrüfuj tüpü hazırlandı. Bu tüplerden birine 100 µL NAD ekstraksiyon tamponu, diğerine ise 100 µL NADH ekstraksiyon tamponu eklendi. Tüpler 60°C'de 5 dakika tutulduktan sonra 20 µL Test Tamponu eklendi. Ekstraktları nötralleştirmek amacıyla NAD ekstraksiyon tamponu konulan tüpe 100 µL NADH ekstraksiyon tamponu, NADH ekstraksiyon tamponu konulan tüpe ise 100 µL NAD ekstraksiyon tamponu eklendi. Tüpler kısa bir vorteksin ardından 14.000 rpm'de 5 dakika boyunca santrüfuj edilerek oluşan süpernatantlar örnek olarak kullanıldı. Standartlar **Tablo 3. 5:**'de belirtildiği gibi hazırlandı.

Tablo 3.5: NAD standartlarının hazırlanışı.

Ön karışım+ dH ₂ O	NAD (µM)
100 µL + 0 µL	10
60 µL + 40 µL	6
30 µL + 70 µL	3
0 µL + 100 µL	0

Çalışma Solüsyonu bir reaksiyon için 60 µL Test Tamponu + 1 µL Enzim A + 1 µL Enzim B + 14 µL Laktat + 14 µL MTT karıştırılarak hazırlandı. Plakanın kuyularına 40 µL örnek ve 80 µL Çalışma Solüsyonu eklenerek 565 nm’de ilk absorbans (0.dakika, OD₀) alındı. Oda ısısında 15 dakikalık inkübasyondan sonra tekrar absorbansı (15.dakika, OD₁₅) alındı. Her standart ve örnek için ΔOD (ΔOD= OD₁₅- OD₀) hesaplandı. Standart grafik çizilerek eğim belirlendi ve örneklerdeki NAD(H) konsantrasyonu [NAD(H)]= [(ΔOD_{ÖRNEK} - ΔOD_{KÖR}) / Eğim (µM-1)] x sulandırma faktörü (µM) formülü ile hesaplandı.

3.4.2. NADP⁺/NADPH Seviyelerinin Ölçülmesi

Hücrelerin NADP⁺/NADPH seviyelerinin ölçülmesi için EnzyChrom NADP⁺/NADPH Assay Kit kullanıldı. Testin prensibi glukoz dehidrojenaz çevrim reaksiyonunda oluşan NADPH'nin bir formazan reaktifi olan MTT'yi indirgemesine dayanmaktadır. Ürün renginin yoğunluğundaki azalma 565 nm'de ölçülür ki elde edilen sonuç numunedeki NADP⁺/ NADPH konsantrasyonu ile orantılıdır. Kitin kullanım talimatına göre hücreler soğuk PBS ile yıkanarak her deney şartı için iki ayrı mikrosantrüfuj tüpü hazırlandı ve her bir tüpe 1X10⁵ hücre koyuldu. Bu mikrosantrüfuj tüplerinden birine 100 µL nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP) ekstraksiyon tamponu, diğer mikrosantrüfuj tüpüne ise 100 µL NADPH ekstraksiyon tamponu eklendi. Tüpler 60°C’de 5 dakika tutulduktan sonra 20 µL Test Tamponu eklendi. Ekstraktları nötralize etmek için NADP ekstraksiyon tamponunun olduğu tüpe 100 µL NADPH ekstraksiyon tamponu, NADPH ekstraksiyon tamponunun olduğu tüpe ise 100 µL NADP ekstraksiyon tamponu eklenerek kısa süre vortekslenen tüpler 14.000 rpm’de 5 dakika boyunca santrüfuj edildi. Oluşan süpernatantlar NADP⁺/NADPH ölçümü için örnek olarak kullanıldı. Standartlar **Tablo 3.6:** ’da belirtildiği gibi hazırlandı. 500 µL 10 µM NADP Ön karışımın hazırlanması için 5 µL 1 mM Standart + 495 µL distile su (dH₂O) karıştırıldı.

Tablo 3.6: NADP Standartların hazırlanışı.

Ön karışım+ dH ₂ O	Hacim (µL)	[NADP] (µM)
100 µL + 0 µL	100	10
80 µL + 20 µL	100	8
60 µL + 40 µL	100	6
40 µL + 60 µL	100	4
30 µL + 70 µL	100	3
20 µL + 80 µL	100	2
10 µL + 90 µL	100	1
0 µL + 100 µL	100	0

Her reaksiyon için 60 µL Test Tamponu + 1 µL Enzim Karışımı + 10 µL Glukoz + 14 µL MTT karıştırılarak Çalışma Solüsyonu hazırlandı. Örnekler ve standartlardan ayrı ayrı 40 µL alınıp 96 kuyulu mikropalakalanın kuyucuklarına eklendikten sonra 80 µL Çalışma Solüsyonu eklenerek kısa bir süre iyice ve hızlıca karıştırıldı. 565 nm dalga boyunda 0.dakika (OD₀)’da ilk absorbans alındıktan sonra oda ısısında 30 dakika inkübe edildi ve 30.dakika (OD₃₀)’da örneklerin ikinci absorbansları ölçüldü. NADP⁺/NADPH konsantrasyonu şu şekilde hesaplandı: Öncelikle her standart ve örnek için ΔOD (ΔOD= OD₃₀- OD₀) hesaplandı. Örneklerdeki NADP(H) konsantrasyonu [NADP(H)]= [(ΔOD_{ÖRNEK} - ΔOD_{KÖR}) / Eğim (µM⁻¹)] x sulandırma faktörü (µM) formülü ile hesaplandı.

3.4.3. Laktat Seviyelerinin Ölçülmesi

Laktat, hipoksik veya anaerobik koşullarda laktat dehidrojenaz (LDH) aracılığıyla oluşturulur ve laktat seviyelerinin izlenmesi dokuların oksijen ihtiyacı ve kullanımı arasındaki dengenin iyi bir göstergesidir. Bu çalışmada laktat seviyelerinin ölçümü için EnzyChrom L-Lactate Assay Kit kullanıldı. Kitin kullanım talimatına göre 100 µL 20 mM Standart ve 900 µL distile su karıştırılarak 1000 µL 2.0 mM L-laktat Ön karışımı hazırlandı. Standart çözeltiler bu ana stoktan sulandırılarak **Tablo 3.7:**’de belirtildiği gibi hazırlandı. 96 kuyulu plakaya, hazırlanan standartlardan 20 µL koyuldu.

Tablo 3.7: L-Laktat standart çözeltilerin hazırlanışı.

Ön karışım+ dH ₂ O	L-Laktat (mM)
100 µL + 0 µL	2.0 veya 1.0
80 µL + 20 µL	1.6 veya 0.8
60 µL + 40 µL	1.2 veya 0.6
40 µL + 60 µL	0.8 veya 0.4
30 µL + 70 µL	0.6 veya 0.3
20 µL + 80 µL	0.4 veya 0.2
10 µL + 90 µL	0.2 veya 0.1
0 µL + 100 µL	0

Deney süresinin sonunda toplanan kültür medyumları ultrafiltrasyon tekniği ile konsantre edildi. Bu amaçla 10K filtreli mikrosantrüfuj tüplerine koyulan örnekler +4 °C’de 15.000 x g’de 5 dakika santrüfuj edildi. Konsantre hale getirilen örneklerden 20 µL alınarak kuyulara koyuldu. Her örnek ve her standart için ikişer kuyu çalışıldı. Çalışma Reaktifi bir reaksiyon için 60 µL Test Tamponu, 1 µL Enzim A, 1 µL Enzim B, 10 µL NAD ve 14 µL karıştırılarak hazırlandı. Standartların ve örneklerin bulunduğu her kuyuya 80 µL Çalışma Reaktifi eklendi. Bu analiz enzim katalizli kinetik bir reaksiyon olduğu için kuyulara Çalışma Reaktifi eklenirken hızlı olunmalı ve karıştırma kapsamlı ancak kısa süreli olmalıdır. Örneklerin optik yoğunluğu 0.dakikada (OD₀) ve 20 dakika oda ısısında inkübe edildikten sonra (OD₂₀) 565 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucuda (µQuant, BioTek) kolorimetrik olarak okundu. Elde edilen değerleri hesaplamak için öncelikle standart ve örneklerin 20. dakikasındaki optik yoğunluğundan 0.dakikadaki optik yoğunluğu çıkarıldı ($\Delta OD = OD_{20} - OD_0$). Elde edilen değerler ile çizilen standart eğriden yararlanılarak örneklerdeki L-Laktat seviyeleri belirlendi.

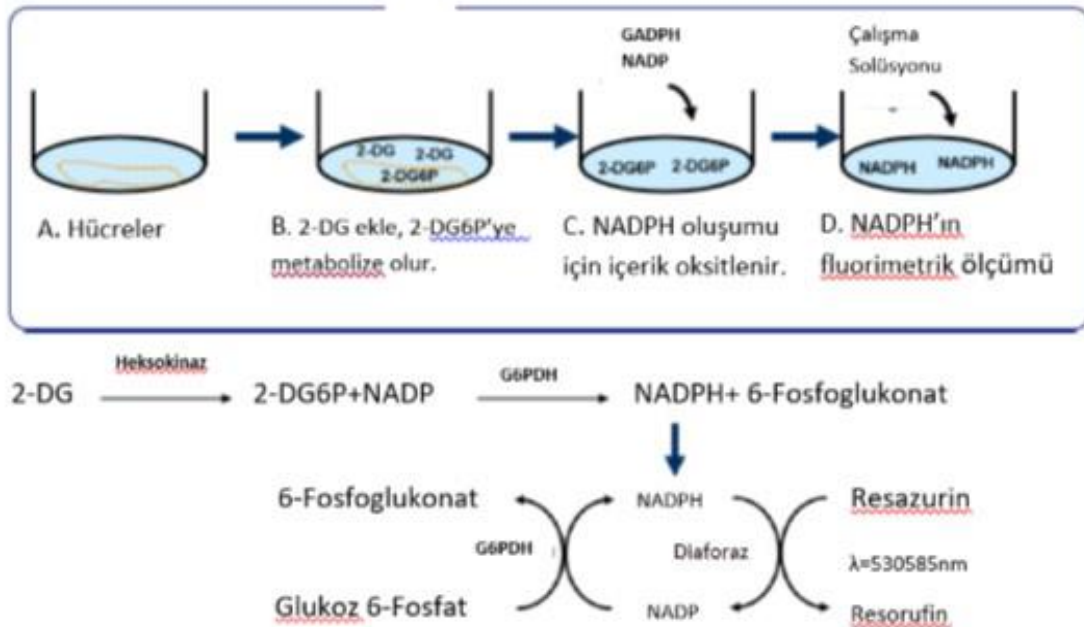
3.5. SİTOPLAZMİK KALSİYUM SEVİYESİNİN ÖLÇÜLMESİ

Kalsiyum (Ca⁺²), hücrelerde meydana gelen birçok fizyolojik süreçte ve sinyal iletiminde rol alan önemli bir ikincil habercidir. Bu çalışmada hücre içi Ca⁺² seviyesinin ölçümü için Fluoforte Calcium Assay Kit kullanıldı. Oda sıcaklığına gelen reaktifler vortekslenerek homejen hale getirildi. Reaktif A içeren tüpe 100 µL dimetil sülfoksit (DMSO) eklenip iyice karıştırılarak Reaktif A Stok Solüsyonu hazırlandı. Reaktif C’den 9 mL ve Reaktif B’den 1 mL alınıp karıştırılarak Test Tamponu hazırlandı. Hazırlanan Reaktif A Stok Solüsyonu’ndan 10 µL alınıp 10 mL hacmindeki Test Tamponu’na eklenerek iyice karıştırıldı ve Fluoforte Dye-

Loading Solüsyonu hazırlandı. Her kuyucuğa 100 µL boya çözeltisi eklenerek 96-kuyulu siyah plaka ışısız ortamda 37 °C’de 45 dakika inkübe edildi. Hücreler analize alınmadan hemen önce oda ısısında ve ışısız ortamda inkübasyon 15 dakika daha devam ettirildi ve fluoresans ışıma yoğunluğu Ex=490 nm/ Em= 525 nm dalga boylarında flourometrik mikropilaka okuyucuda (Biotek, FLX800) okundu. Fluoresans yoğunluk kontrol grubuna göre katlı artış olarak hesaplandı.

3.6. HÜCRE İÇİNE ALINAN GLUKOZ MİKTARININ ÖLÇÜLMESİ

Glukozun hücre içine alınma seviyelerinin ölçülmesi için EnzyFluo™ Glucose Uptake Assay Kit kullanıldı. 2- deoksiglukoz (2-DG), hücelere floresan işaretli glukoz alım testi için yaygın olarak kullanılan bir glukoz analogudur, glukoz taşıyıcıları tarafından alınıp endojen heksokinaz ile 2-deoksiglukoz 6-fosfat (2-DG6P)’a metabolize edilir. 2-DG6P, glikolizde bir sonraki adım için uygun bir substrat olmadığı için hücre içinde birikir. 2-DG6P’yi ekstrakte etmek için hüceler parçalanıp fazla NADP ve glukoz 6-fosfat dehidrojenaz (G6PDH) eklenerek NADPH üretilmesi sağlanır. Daha sonra NADPH bir G6PDH geri dönüşüm reaksiyonu kullanılarak ölçülür. Testin çalışma prensibi Şekil 3. 1:’de özetlenmiştir.



Şekil 3.1: Glukoz alım testinin çalışma prensibi.

Kitin kullanım talimatına göre hücrelerin glukoz alımını uyarabilmek için öncelikle hücrelerde besin yoksunluğu oluşturmak gerekmektedir. Bu amaçla hücrelere 40 dakika PBS uygulandıktan sonra her bir kuyucuğa 10 μL 2-DG substratı eklendi ve 20 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu işlemin ardından kuyucuklardaki medyumlar toplanarak atıldı. Hücreler soğuk PBS ile 3 defa yıkandıktan sonra üzerlerine 50 μL Lizis Tamponu (%1 Triton X-100 içeren NADP ekstraksiyon tamponu) eklendi ve 5 dakika orbital çalkalayıcıda çalkalandı. 96 kuyulu mikroparka, kuru blok ısıtıcıda 80 $^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dakika tutuldu. Hücrelerin üzerine 50 μL NADPH ekstraksiyon tamponu ve 50 μL distile su eklendi. Hücrelerin olduğu plaka dondurucuda -20 $^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dakika bekletildikten sonra oda ısısına alınıp 10 dakika bekletildi. Standartların hazırlanması için önce 5 μL 5 mM 2-DG6P'ye 4995 μL distile su eklenerek 5 μM 2-DG6P ön karışımı hazırlandı. Bu karışımın sulandırılmasıyla elde edilen diğer standartların hazırlanışı **Tablo 3. 8:**'de belirtilmiştir.

Tablo 3.8: 2-DG6P (μM) standartların hazırlanışı.

Ön karışım+dH ₂ O	2-DG6F (μM)
100 μL + 0 μL	5.0
60 μL + 40 μL	3.0
30 μL + 70 μL	1.5
0 μL +100 μL	0

Standartlardan 50 μL alınarak yeni bir 96 kuyulu plakaya koyuldu. Birinci Çalışma Solüsyonu (WR1)'nin hazırlanması için 10 μL Test Tamponu + 1 μL G6PDH Enzimi + 1 μL NADP karıştırıldı. Her kuyuya 10 μL WR1 eklenerek 37 $^{\circ}\text{C}$ 'de 60 dakika inkübe edildi. Bu işlemin ardından tüm kuyulara 50 μL NADPH ekstraksiyon tamponu eklenerek 80 $^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika inkübe edildi. Tüm kuyulara 50 μL NADP ekstraksiyon tamponu eklenerek plaka -20 $^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dakika boyunca soğutuldu. Örneklerden ve standartlardan 50 μL alınarak siyah 96-kuyulu plakaya aktarıldı. Bu işlemin ardından 45 μL Test Tamponu + 1 μL Enzim A + 1 μL Enzim B, 10 μL G6P Reaktif + 5 μL Prob karıştırılarak ikinci Çalışma Solüsyonu (WR2) hazırlandı. WR2 solüsyonundan 50 μL alınarak kuyulara eklendi. $\lambda_{\text{ex/em}} = 530/585$ nm dalga boyunda 0. dakika (F_0) ve 20. dakika (F_{20})'da floresans yoğunluk ölçüldü. Hesaplama işleminde öncelikle standart ve örnekler için ΔF ($\Delta F = F_{20} - F_0$) hesaplandı. Standartların ΔF 'leri kullanılarak standart eğri çizildi ve eğim belirlendi.

Örneklerdeki 2-DG6P konsantrasyonu $[2\text{-DG6P}] = [(\Delta F_{\text{örnek}} - \Delta F_{\text{Blank}}) / \text{Eğim}] \times \text{sulandırma faktörü } (\mu\text{M})$ formülü kullanılarak bulundu.

3.7. HÜCRE LİZATLARININ ELDESİ VE HEDEF PROTEİNLERİN MİKTAR TAYİNİ

Bu çalışma kapsamında membran, sitoplazmik, nüklear ve mitokondriyal olmak üzere hücrelerin dört farklı fraksiyonu izole edildi.

3.7.1. Lizis, Membran ve Sitoplazmik Fraksiyonlarının İzolasyonu

Membran proteinlerini elde etmek için Mem-PER Plus Membrane Protein Extraction Kit kullanıldı. Kitin kullanım talimatına göre kültür kaplarındaki hücreler soğuk PBS ile yıkandıktan sonra medyum ortamında bulunan hücreler, kazıyıcı ile tutundukları yüzeyden kaldırılarak falkon tüplerine toplandı. Örnekler $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de $300 \times g$ 'de 5 dakika santrüflenerek oluşan süpernatant atıldı. Peletlerin üstüne 3 mL Hücre Yıkama Solüsyonu eklenip pipetajlanarak yıkandı ve $300 \times g$ 'de $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dakika boyunca santrüflü edildi. Oluşan süpernatant atıldı. 1.5 mL Hücre Yıkama Solüsyonu peletlerin üstüne eklenerek pipetajlandı ve örnekler 2 mL hacimli santrüflü tüplerine aktarıldı. Tüpler $300 \times g$ 'de $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dakika boyunca santrüflü edildi ve oluşan süpernatant atıldı. İçlerinde proteaz (1:200) ve fosfataz (1:100) inhibitörleri bulunan Permeabilizasyon ve Çözme Tamponları hazırlandı. Peletlerin üzerine peletin hacmi kadar Permeabilizasyon Tamponu eklenerek pipetaj yapıldı ve buzda 10 dakika boyunca orbital karıştırıcıda karıştırılarak inkübe edildikten sonra $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de $16.000 \times g$ 'de 15 dakika boyunca santrüflü edildi. Oluşan süpernatant sitozolik proteinleri içerdiğinden bu aşamada oluşan süpernatantlar yeni tüplere aktarılarak sonradan çalışılmak üzere $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Peletlerin üstüne peletin hacmi kadar Çözme Tamponu eklenerek pipetajlandı. Tüpler buzun içinde orbital karıştırıcıda 30 dakika boyunca inkübe edilerek $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de $16.000 \times g$ 'de 15 dakika boyunca santrüflü edildi. Bu aşamada oluşan süpernatantlar çözünmüş membran ve membran ile ilişkili proteinleri içerdiği için süpernatantlar yeni tüplere aktarılarak sonradan çalışılmak üzere $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

3.7.2. Lizis, Sitoplazmik ve Nüklear Fraksiyonların İzolasyonu

Nüklear ve sitoplazmik fraksiyonların eldesi için Nuclear Extraction Kit kullanıldı. Kitin kullanım talimatına göre kısaca, kültür kaplarındaki hücreler soğuk PBS ile yıkandıktan sonra

kazıyıcı ile tutundukları yüzeyden kaldırılarak falkon tüplere toplandı. Örnekler santrüfuj cihazında +4 °C'de 1000 x g'de 5 dakika santrüfuj edildi ve oluşan süpernatantlar atıldı. Dibe çöken peletlerin üstüne yıkama amacı ile yaklaşık 1 mL soğuk PBS eklenerek pipetajlandı. Örnekler santrüfuj cihazında +4 °C'de 1000 x g'de 5 dakika boyunca santrüfuj edilerek süpernatantlar atıldı. Peletlerin üstüne yaklaşık 1 mL soğuk PBS eklenip pipetajlanarak temiz ve yeterli büyüklükteki santrüfuj tüplerine aktarıldı. Örnekler santrüfuj cihazında +4 °C'de 250 x g'de 5 dakika boyunca santrüfuj edildi ve süpernatantlar atıldı. Peletlerin üzerine 0.5 mM DTT ve 1:1000 oranında sulandırılmış proteaz ve fosfataz inhibitör karışımı içeren soğuk Sitoplazmik Lizis Tamponu peletin hacmi kadar eklenip tüpler hafif bir şekilde çalkalanarak buz üzerinde 15 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. Örnekler +4 °C'de 250 x g'de 5 dakika boyunca santrüfuj edilerek oluşan süpernatant atıldı. Pelet kadar Sitoplazmik Lizis Tamponu eklenerek karıştırıldı. Bu aşamadan sonra lizis işlemi daha iyi gerçekleştirmek amacı ile 27G iğneli enjektörler kullanıldı. Hücre süspansiyonları 8.000 x g'de +4°C 20 dakika boyunca santrüfuj edildi ve oluşan süpernatant sitoplazmik fraksiyonları içerdiğinden sonradan kullanılmak üzere mikrosantrüfuj tüplerine aktarılarak -20 °C'de saklandı. Tüplerde bulunan peletlerin üstüne 0.5 mM DTT ve 1:1000 oranında sulandırılmış proteaz ve fosfataz inhibitör karışımı içeren soğuk Nükleer Eksraksiyon Tamponu peletin hacmi kadar eklendi ve 27G iğneli enjektörler ile muamele edildi. Örnekler buzda orbital çalkalayıcının üstünde düşük hızda 45 dakika boyunca çalkalandıktan sonra 16.000 x g'de +4 °C'de 5 dakika boyunca santrüfuj edildi. Nükleer fraksiyonları içeren süpernatantlar mikrosantrüfuj tüplerine aktarılarak -20 °C'de saklandı.

3.7.3. Lizis, Sitoplazmik ve Mitokondriyal Fraksiyonların İzolasyonu

Bu çalışmada mitokondri izolasyonu Kültür Hücreleri için Mitokondri İzolasyon Kiti'nin önerdiği Douce homojenizasyon protokolü kullanılarak yapıldı. Öncelikle Reaktif A ve Reaktif C'ye proteaz inhibitörleri eklendi. Dounce Homojenizatörü (Active Motif) buzda bekletildi. 2×10^7 hücre 2.0 mL hacimli mikrosantrüfuj tüpüne koyularak yaklaşık 850 x g'de 2 dakika santrüfuj edildi. Oluşan süpernatant dikkatlice atıldı ve peletin üzerine 800 µL Mitokondri İzolasyon Reaktif A eklenerek orta hızda 5 saniye vortekslendikten sonra mikro santrüfuj tüpleri 2 dakika buzda inkübe edildi. Hücreler Dounce Homojenizatörün içine alındı ve buzun üzerinde, her örnek için yaklaşık 500 vuruş yapılarak hücreler parçalandı. Lizatin üzerine 800 µL Mitokondri İzolasyon Reaktif C eklendi. Tüpler birkaç kez ters çevrilip karıştırıldıktan

sonra +4 °C'de 700 x g'de 10 dakika santrüfüjlendi. Oluşan süpernatant 2.0 mL'lik santrüfüj tüpüne alınarak +4 °C'de 12.000 x g 'de 15 dakika santrüfüjlendi. Lizozomal ve peroksizomal kontaminantlardan kurtulup daha saf bir mitokondri fraksiyonu izole etmek için 3000 x g'de 15 dakika santrüfüjleme işlemi yapıldı. Sitoplazmik fraksiyon içeren süpernatant yeni bir mikrosantrüfüj tüpüne alındı. İzole edilmiş mitokondriyi içeren peletin üzerine 500 µL Mitokondri İzolasyon Reaktifi C eklendi ve 12.000 x g'de 5 dakika boyunca santrüfüjlenerek oluşan süpernatant atıldı. Elde edilen mitokondriyal fraksiyonları içeren mikrosantrüfüj tüpleri -20 °C derin dondurucuya kaldırıldı.

3.7.4. Bradford Yöntemi ile Protein Miktar Tayini

Bradford yöntemi, özellikle arjinin gibi bazik olan amino asitler ile bazı aromatik amino asitlere bağlanma eğiliminde olduğu gösterilen Coomasie Parlak Mavisi G-250 boyasının farklı protein yoğunluklara sahip olan çözeltilerde protein yoğunluğuyla orantılı olarak farklı şiddette mavi renk ortaya koyması ve ortaya çıkan mavi ışığın şiddetinden yararlanılarak 595 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon değerlerinin elde edilmesi ilkesine dayanır.

Bradford ayırıcının hazırlanması için 12,5 mL %95 saflıkta etil alkolün içine Coomassie Parlak Mavisi G-250 boyasından 25 mg koyulup çözüldükten sonra karışıma 25 mL fosforik asit (%85; H₃PO₄) eklendi. Solüsyon filtre kağıdı ile süzülerek ayıraç kullanıma hazır hale getirildi.

945 µL distile su ve 55 µL 1,46 mg/mL sığır serum albümin (BSA)'den karıştırılarak 80 µg/mL'lik standart oluşturuldu. 80 µg/mL'lik standarttan seri dilüsyon yapılarak sırasıyla 40, 20, 10 ve 8 µg/mL standartlar hazırlandı. 1:100 oranında sulandırılmış örneklerden ve standartlardan 160 µL alınarak 96 kuyulu plakalara aktarıldı. Kuyulardaki örneklerin üzerine 40 µL Bradford boyasından eklenip pipetajlandı ve 5 dakika oda ısısında inkübe edilerek 595 nm dalga boyunda absorbanslar alındı. Standartların absorbanslarından yararlanılarak grafik çizildi ve çizilen bu grafik kullanılarak örneklerdeki protein miktarları hesaplandı.

3.8. SODYUM DODESİL SÜLFAT POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ (SDS-PAGE)

3.8.1. Örneklerin Hazırlanması

50 µg protein içeren örnekler %5 beta merkaptotanol içeren laemmlı solüsyonu ile karıştırılarak vortekslandı. Bu işlemin ardından mikrosantrüfuj tüpleri kuru blok ısıtıcıda 100 °C’de 5 dakika ısıtılarak proteinler denatüre edildi.

3.8.2. SDS-PAGE Jellerin ve Tamponların Hazırlanması

SDS-PAGE jelleri hedef proteinlerin moleküler ağırlıklarına uygun olarak farklı yoğunluklarda hazırlandı. Trizma bazından 60 gr, Glisin’den 144 gr ve SDS’ten 10 gr alınarak 1 litre distile su içinde karıştırılıp pH: 8.3’e ayarlanarak 10X stok yürütme tamponu hazırlandı. 10X Stok tampon distile su ile sulandırılarak yürütme tamponu hazırlandı. Jellerin içeriği **Tablo 3.9:**’da belirtilmiştir.

Tablo 3.9: SDS-PAGE jellerinin hazırlanması.

Malzemeler	%3'lük Üst Jel	%7.5'lik Alt Jel	%10'lik Alt Jel	%12'lik Alt Jel	%15'lik Alt Jel	%18'lik Alt Jel
Distile Su	3,262 mL	5,425 mL	4,81 mL	4,309 mL	3,545mL	2,81 mL
Akrilamid/Bis Akri- lamid (%40-37,5:1 veya 29:1)	412,5 µL	1,875 mL	2,49 mL	2, 997 mL	3,74 mL	4,49 mL
Tris HCl pH: 8.8	-	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
Tris HCl pH: 6.8	980 µL	-	-	-	-	-
SDS %10	50 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
APS	50 µL	66 µL	66 µL	66 µL	66 µL	66 µL
Temed	7 µL	8 µL	8 µL	8 µL	8 µL	8 µL
Not: 29:1 Akrilamid/Bis Akrilamid MW:20< kDa proteinler için; 37,5:1 Akrilamid/Bis Akrilamid MW:>20 kDa proteinler için kullanıldı.						

3.8.3. Elektroforez ve Proteinlerin Membrana Aktarılması

Yürütme tamponu ile dolu olan tankın içine yerleştirilen jellerdeki kuyulara örnekleri aynı hacimde yükledikten sonra tank kapatılarak güç kaynağına bağlandı. Elektroforez işeminde örnekler üç aşamada ve her aşaması +4 °C'de olacak şekilde yürütüldü. Birinci aşamadaki yürütme 70 volt (V)'ta 30 dakika; ikinci aşamada 100 V'de 45 dakika; üçüncü aşama 120V'de yürütmenin sonuna kadar gerçekleştirildi. Proteinlerin jellerden membranlara aktarımı ıslak aktarım yöntemiyle yapıldı. Islak aktarım için %20 Metanol içeren yürütme tamponu kullanıldı.

20 kDa'dan küçük proteinler için 0.22 µm; daha büyük proteinler için ise 0.45 µm por çapına sahip PVDF membranlar kullanıldı. Aktarım işlemi +4 °C'de 720 dakika boyunca 80 mA akımda gerçekleştirildi.

Aktarım etkinliği Ponceau S işaretlemesi ile kontrol edildi. Negatif yüklü kırmızı bir boya olan ve Asit Kırmızısı 112 olarak da bilinen Ponceau S, pozitif yüklü amino gruplarına ve polar olmayan protein bölgelerine bağlanarak membranlara aktarılan proteinlerin gözle görülebilir hale gelmesine ve böylece proteinlerin membranlara aktarılıp aktarılmadığı hakkında bilgi sahibi olmamıza olanak sağlar. Aktarım işleminden sonra birkaç kez ultra saf su ile yıkanan membranların üzerine membranı kapatacak kadar Ponceau S dökülerek boyanın proteinlere bağlanması beklendi. Membranlar birkaç defa ultra saf su ve 0,001M sodyum hidroksit (NaOH) ile yıkanarak immünolojik işaretlemeden önce boyanın membrandan uzaklaşması sağlandı.

3.8.4. Hedef Proteinlerin İşaretlenmesi

Hedef protein bantlarının bulunduğu PVDF (Millipore) membranlar alınarak birkaç defa ultra saf su ve sonrasında TBS ile yıkanarak falkon tüplere alındı. %5 yağsız süt tozu ve %10 Tween 20 içeren TBS (TBS-T)'de çözülerek hazırlanan bloklama solüsyonu tüplere eklenerek membranlar oda ısısında tüp döndürücüde 1 saat inkübe edildi. Hedef proteine özgün primer antikoru ve %50 bloklama solüsyonu içeren TBS-T tamponundan 5 mL falkonun içine konuldu ve 1 gece boyunca +4 °C'de membranlar tüp döndürücüde inkübe edildi. Membranlar oda ısısında 1 saat daha inkübe edildikten sonra TBS-T tamponu ile 3 kez yıkandı. Primer antikora özgün olarak bağlanan yaban turbu peroksidaz (HRP) işaretli ikincil antikolar %50 bloklama solüsyonu içeren TBS-T solüsyonuna uygun miktarlarda eklenip membranların içinde

bulunduğu falkonlara 5 mL konularak oda ısısında 1 saat inkübe edildi ve TBS-T tamponu ile 3 kez, TBS tamponu ile 2 kez yıkandı. Yıkama işlemlerinin ardından membranlara kemiluminesans görüntüleme için HRP'nin substratı olan Luminol solüsyonu uygulanarak jel görüntüleme cihazında (Kodak GL1500; Kodak Molecular Imaging Systems yazılımı) hedef protein bantları görüntüledi. Görüntüleme işleminden sonra özgün protein bantlarının yoğunlukları ölçüldü. Hedef protein bantlarının yoğunlukları sitoplazmik proteinler için beta aktin bantlarının yoğunluğuna; nüklear proteinler için TFIIB bantlarının yoğunluğuna; membran proteinleri için pan-kaderin bantlarının yoğunluğuna oranlanarak normalize edildi. Bu çalışmada kullanılan antikorlar ve uygulama koşulları **Tablo 3.10:**'da verilmiştir.

Tablo 3.10: Western Emdirimi yönteminde kullanılan antikorlar ve bu antikorların uygulama koşulları.

Antikor	Konak/Marka	Sulandırma Oranı
İnsülin	Tavşan/Santa Cruz	1:500
GLUT1	Tavşan/ St John's Laboratory	1:1000
Pan-kaderin	Keçi/Santa Cruz	1:500
UCP2	Tavşan/ CST	1:500
MDH2	Tavşan/CST	1:500
Sitrat Sentaz	Tavşan/CST	1:500
T1R2	Tavşan/Santa Cruz	1:500
T1R3	Tavşan/Santa Cruz	1:500
PLC β 2	Tavşan/St John's Laboratory	1:250
β -aktin	Tavşan/Boster	1:500
CAMKK2	Fare/Santa Cruz	1:500
LKB1	Fare/Santa Cruz	1:500
p-AMPK (Thr172)	Tavşan/Milipore	1:1000
p-Akt (Thr308)	Tavşan/CST	1:1000
p-Akt (Ser473)	Tavşan/CST	1:1000
Total Akt	Rabit/CST	1:1000
p-mTOR (Ser2448)	Fare/Santa Cruz	1:200
FOXO1 (FKHR)	Tavşan/Santa Cruz	1:500
TFIIB	Tavşan/ Santa Cruz	1:500
anti-tavşan	Keçi/invitrogen	1:5000
anti-fare	Keçi/Sigma	1:10000
anti-keçi	Sığır/Santa Cruz	1.5000

3.9. MİTOKONDRIYAL KÜTLE TESPİTİ

Mitokondriyal kütle tespiti floresans ışına yapabildi ve mitokondrileri işaretleyen MitoTracker Yeşili kullanılarak yapıldı. Hafif tiyol-reaktif klorometil kısmı içeren MitoTracker Yeşili pasif difüzyonla plazma zarı boyunca yayılır ve aktif mitokondride birikir. 50 µg liyofilize MitoTracker Yeşili 74.4 µL DMSO'da çözülerek 1 mM stok solüsyon hazırlandı. Bu stok solüsyon PBS ile 100 nM'ye sulandırıldı. Bu solüsyondan kuyulara eklenerek 15 dakika 37 °C'de inkübasyon yapıldı. Floresans yoğunluk eksitasyon dalga boyu 490 nm ve emisyon dalga boyu 516 nm'ye ayarlanan spektrofotometre cihazında (Biotek,) ölçüldü. Ayrıca örnekler Nikon ECLIPSE Tİ-U floresans mikroskopta X10 oküler, X20 objektif sistemi ve NIS-Elements BR 3.1 programı ile görüntülenerek fotoğraflandı.

3.10. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Deneyle 3 kez tekrarlanarak elde edilen sonuçlar ortalama±SEM olarak hesaplandı. One-way ANOVA testini takiben çoklu karşılaştırmalar Tukey post hoc testi uygulanarak Graph-Pad Prism 5 programı ile yapıldı ve p<0,05 olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. PANKREATİK BETA HÜCRE FARKLILAŞMASI İLE İLGİLİ BULGULAR

Tam medyum (FM), glukoz (25 mM; G), aspartam (100 µg/mL; A), aspartam+glukoz (A+G), metformin (1 mM; M), glukoz+metformin (G+M), aspartam+metformin (A+M), aspartam+glukoz+metformin (A+G+M)'den oluşan sekiz deney şartı 10 gün boyunca PAK-PH'lere uygulandı. Deney süresinin sonunda akım sitometri yöntemi kullanılarak beta hücrelerinin özgün belirteci olan insülini üreten hücrelerin oranı belirlendi. Elde edilen sonuçlar glukoz hariç uygulanan diğer tüm şartların beta hücre farklılaşmasını anlamlı olarak uyardığını, fakat bu uyarılar ile birlikte metformin uygulanmasının belirgin olarak daha fazla farklılaşmaya neden olduğunu gösterdi. Belirlenen insülin pozitif hücre oranları (%) sırasıyla; FM:0.01±0.01, M:57.26±3.82, G:26.49±0.49, G+M:55.94±2.77, A:34.01±0.01, A+M:43.84±7.24, A+G:30.39±0.38, A+G+M:63.00±2.76'dır (**Şekil 4.1.A:**).

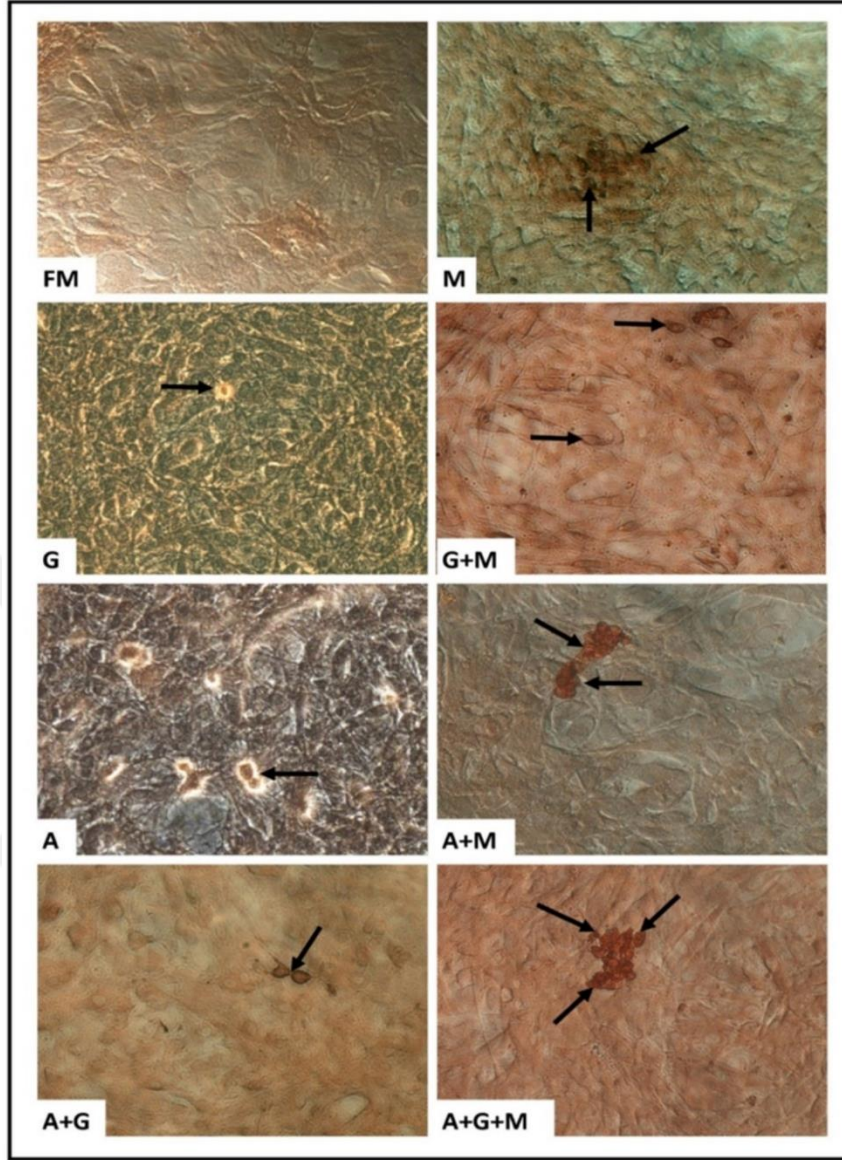
Metformin'in hücre içine glukoz alımını artıran bir molekül olması ve kök hücrelere glukozun GLUT1 aracılığı ile alınması bilgilerinden yola çıkarak GLUT1'in beta hücre farklılaşmasındaki muhtemel görevi özgün bir GLUT1 inhibitörü olan WZB117 uygulamasıyla araştırıldı. Sonuç olarak aspartam+metformin ve aspartam+glukoz+metformin ile uyarılan beta hücre farklılaşmasının GLUT1'in özgün inhibitörü olan WZB117 varlığında baskılandığı tespit edildi. Söz konusu baskılanma diğer gruplarda gözlenmedi. WZB117 varlığında belirlenen insülin pozitif hücre oranları (%) sırasıyla; FM:7.70±3.58, M:46.29±2.32, G:18.08±4.59, G+M:50.29±4.76, A:35.31±3.93, A+M:9.70±2.88, A+G:31.77±4.18, A+G+M:14.77±4.27'dir (**Şekil4.1.A:**).

Gen ekspresyonu düzeyinde beta hücre farklılaşma seviyesinin tespit edilebilmesi amacıyla ara progenitör hücre belirteci *NGN3*, erken farklılaşma faktörü *NKX2.2* ve *PDX1*, ileri farklılaşma faktörleri *NKX6.1*, *PAX4*, *PDX1*, *INS2* ve *GLUT2* genlerinin mRNA düzeyleri RT-PCR tekniğiyle gösterildi. Tam medyum uygulanan kontrol grubu ile glukoz uygulanan grupta *NGN3* ve *PAX4* genlerinin yok denecek kadar az; *PDX1*, *NKX6.1* ve *GLUT2* genlerinin yüksek seviyelerde ifade edilirken, *INS2* geninin eksprese edilmediği belirlendi. Glukoz uygulanan grupta erken farklılaşma faktörü *NKX2.2*'nin kontrol gruptan daha yüksek seviyede eksprese edilmesi bu gruptaki hücrelerin farklılaşma sürecinin erken seviyesinde olduğunu, kontrol grubundaki hücrelerin ise ara progenitör olduğunu göstermektedir. Metformin

uygulanan grupta *NGN3* ve *NKX2.2* genlerinin yok denecek kadar az ifade edilirken, diğer genlerin yüksek seviyede eksprese edildiğinin belirlenmesi bu gruptaki hücrelerin ileri seviyede farklılaşmış beta hücreleri olduğunu göstermektedir. Glukoz+metformin uygulanan grupta *NGN3* az olmakla birlikte diğer gruplardan daha yüksek seviyede eksprese edildiği; *PAX4* geninin yok denecek kadar az; *NKX2.2*, *NKX6.1* ve *PDX1* genlerinin düşük; *INS2* ve *GLUT2* genlerinin ise yüksek seviyelerde ifade edildiğinin belirlenmesi ileri seviyede beta hücre farklılaşmasına işaret etmektedir. Aspartam ve aspartam+glukoz uygulanan gruptaki gen ekspresyon profili glukoz+metformin uygulanan gruba benzemekle birlikte *NGN3* ekspresyonunun daha düşük olması bu gruplardaki ara progenitör hücre sayılarının glukoz+metformin grubundan daha az olduğunu düşündürmektedir. Aspartam+metformin ve aspartam+glukoz+metformin gruplarında *INS2* ve *GLUT2* gibi ileri farklılaşma faktörlerinin yanı sıra *NKX2.2* ekspresyonunun da yüksek olması bu gruplarda hem ileri hem de erken farklılaşma aşamasında bulunan beta hücrelerinin sayıca fazla olduğuna işaret etmektedir. (**Şekil 4.1.B:**).

İnsülin üreten hücreler immünohistokimyasal olarak işaretlendi. İnsülin pozitif hücrelerin metformin uygulanan gruplarda yuvarlak ve PAK-PH'lere oranla çok daha küçük bir morfolojiye sahip oldukları, ayrıca glukoz+metformin grubu dışında adacık benzeri kümeleşme gösterdikleri gözlemlendi (**Şekil 4.1.C:**)

(C)



Şekil 4.1: Beta hücre farklılaşması ile ilgili bulgular. (A) Akım sitometri ile ölçülen insülin⁺ hücre oranlarını gösteren histogram plotları (üst panel) ve ilgili sütun grafiği (alt panel). Sütun grafiğinde beyaz sütunlar WZB117 uygulanmayan, siyah sütunlar ise WZB117 uygulanan grupların sonuçlarını göstermektedir. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ FM'ye göre; # $p < 0.05$ G'ye göre; ^ω $p < 0.01$ G+M'ye göre; ^Υ $p < 0.01$ A+M'ye göre; ^σ $p < 0.05$, ^{σσ} $p < 0.001$ FM+WZB117'ye göre ve ^{θθθ} $p < 0.001$ A+G+M'ye göre. (B) Beta hücre farklılaşmasının temel düzenleyici genlerinin ekspresyonunu gösteren RT-PCR ürünleri. (C) İmmünohistokimyasal olarak işaretlenen insülin üreten hücreler (→), X200. FM:Tam medyum, M:Metformin, G:Glukoz, G+M:Glukoz+Metformin, A:Aspartam, A+M: Aspartam+Metformin, A+G: Aspartam+Glukoz, A+G+M: Aspartam+Glukoz+Metformin.

4.2.METABOLİZMA İLE İLGİLİ BULGULAR

Hücre içine glukoz alımı glikoliz metabolizması için sınırlayıcı etkiye sahiptir. Bu sebeple metabolizma ile ilgili çalışmalara hücre içine alınan glukoz değerlerindeki değişimler ölçülerek başlandı. Ölçümler sonucunda metformin uygulanan bütün gruplarda hücre içine glukoz alımının belirgin olarak arttığı belirlendi. Hücre içine glukoz alımının tespit edilen miktarları ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein/20 dk) sırasıyla; FM:13.42 \pm 1.26, M:28.53 \pm 7.44, G:9.75 \pm 0.21, G+M:35.91 \pm 0.05, A:17.25 \pm 1.06, A+M:36.71 \pm 2.92, A+G:20.55 \pm 3.53, A+G+M:31.95 \pm 4.62'dir (**Şekil 4.2.A:**).

Kök hücrelerde glukoz alımında fonksiyonel olan GLUT1 seviyeleri membran fraksiyonu örneklerinde western emdirimi yöntemiyle gösterildi. Sonuçta metformin uygulanan bütün gruplarda, hücre içine glukoz alımı değişimlerine paralel olarak, GLUT1 seviyelerinde belirgin bir artış olduğu tespit edildi. Ayrıca, A+G grubundaki GLUT1 seviyesindeki artışa rağmen glukoz alımı seviyelerinde değişiklik olmadığı dikkat çekmektedir. Bu durum A+G grubunda GLUT1'in seviyesinde artış olmasına karşın aktivasyonunda bir değişikliğin meydana gelmediğini düşündürmektedir. Tespit edilen GLUT1 seviyeleri (AU) sırasıyla; FM:0.55 \pm 0.05, M:2.23 \pm 0.13, G:1.23 \pm 0.39, G+M:3.25 \pm 0.14, A: 0.59 \pm 0.15, A+M:1.7 \pm 0.05, A+G:1.77 \pm 0.36, A+G+M:2.59 \pm 0.2'dir (**Şekil 4.2.B:**).

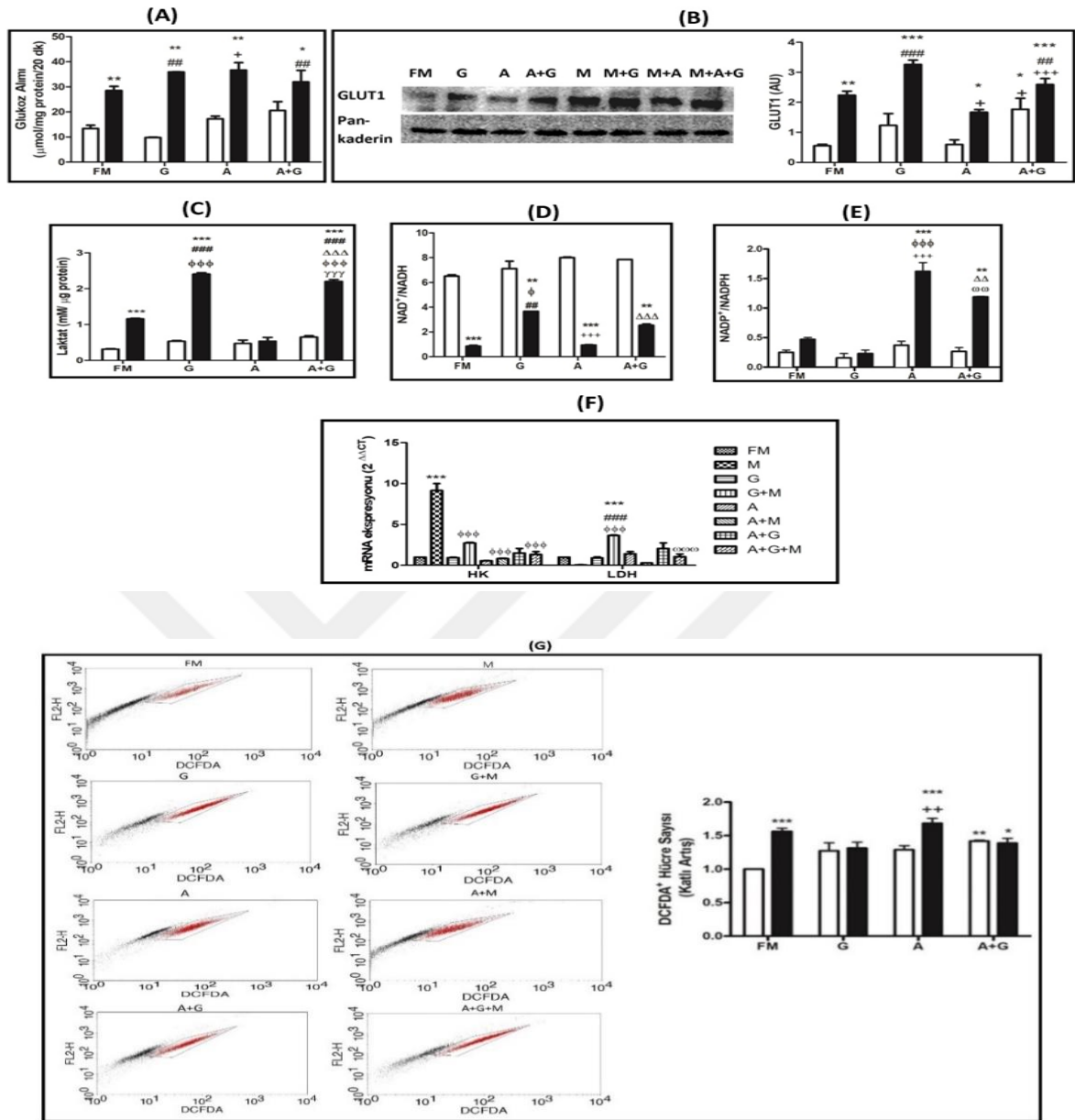
Anaerobik glikolizin son ürünü olarak ortaya çıkan laktat seviyeleri deney süresinin sonunda toplanan medyumalarda kolorimetrik yöntemle ölçüldü. Hücre içine glukoz alımı ve GLUT1 seviyelerindeki değişimlere paralel olarak M, G+M ve A+G+M gruplarında medyuma salınan laktat seviyelerinde belirgin bir artış tespit edildi. A+M grubunda medyuma salınan laktat seviyesinde bir değişiklik olmadığı belirlendi. Bu bulgu A+M grubunda glikolizin baskın metabolik yolak olmadığını düşündürmektedir. Tespit edilen laktat seviyeleri (mM/ μg protein) sırasıyla; FM:0.31 \pm 0.01, M:1.15 \pm 0.02, G:0.53 \pm 0.02, G+M:2.40 \pm 0.04, A:0.47 \pm 0.09, A+M:0.53 \pm 0.10, A+G:0.65 \pm 0.03, A+G+M:2.20 \pm 0.04'tür (**Şekil 4.2.C:**).

NAD⁺, sitozolde glikoliz ile ATP üretimini ve mitokondride oksidatif fosforilasyonu düzenler (Ying, 2008). Hücre metabolizmasının önemli bir belirleyicisi olan NAD⁺/NADH redoks çifti ile ilgili elde edilen bulgular hücre içi NAD⁺/NADH oranının metformin uygulanan bütün gruplarda laktat bulgularına ters olarak belirgin şekilde azaldığını göstermektedir. Bu sonuç metformin uygulanan gruplarda glikolitik ürünlerin önemli bir kısmının TCA çevrimine

yönlendirildiğini düşündürmektedir. Tespit edilen NAD^+/NADH oranları sırasıyla; FM:6.50±0.12, M:0.84±0.07, G:7.12±0.58, G+M:3.66±0.01, A:8.00±0.05, A+M:0.94±0.03, A+G:7.85±0.01, A+G+M:2.54±0.10'dur (**Şekil 4.2.D:**).

İndirgenen ve fosforile edilen yapı olan NADPH, yağ asitleri ve steroidlerin indirgeyici biyosentezinde ve antioksidan mekanizmada yer alırken, oksitlenmiş yapı olan NADP^+ , kalsiyum homeostazına katılır (Ying, 2008). $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ oranı ile ilgili elde edilen bulgular aspartam ve metformin'in birlikte uygulandığı gruplarda hücre içi $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ oranının belirgin olarak arttığını göstermektedir. Bu bulgu bu gruplarda anabolik yolların aktif olduğunu düşündürmektedir. Tespit edilen $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ oranları sırasıyla; FM:0.25±0.04, M:0.47±0.03, G:0.15±0.07, G+M:0.23±0.07, A:0.37±0.07, A+M:1.62±0.15, A+G:0.26±0.06, A+G+M:1.19±0.01'dir (**Şekil 4.2.E:**).

Glikolitik yolun önemli araçlarından biri olan *heksokinaz* gen ifadenmesi seviyesinde yalnızca metformin uygulanan grupta belirgin bir artış olduğu belirlendi. Tespit edilen *heksokinaz* mRNA seviyeleri sırasıyla; FM: 1.00±0.01, M: 9.14±0.85, G:0.94±0.04, G+M: 2.73±0.05 A: 0.56±0.02, A+M: 0.83±0.02, A+G: 1.50±0.56, A+G+M: 1.33±0.34'tür. G+M grubunda ise *laktat dehidrojenaz A* gen ifadenmesi seviyelerinin arttığı tespit edildi. Tespit edilen laktat dehidrojenaz A mRNA seviyeleri sırasıyla; FM: 1.00±0.01, M: 0.03±0.03, G:0.90±0.07, G+M: 3.65±0.02 A: 1.40±0.26, A+M: 0.29±0.01, A+G: 2.06±0.68, A+G+M: 1.06±0.31'dir (**Şekil 4.2.F:**). Oksidatif fosforilasyon sırasında üretilen ROS seviyelerinin glukoz, glukoz+metformin ve aspartam gruplarında değişmediğinin belirlenmesi bu gruplarda baskın metabolik yolağın oksidatif fosforilasyon olmadığını düşündürmektedir. Diğer gruplarda ise ROS seviyelerinin belirgin olarak arttığının belirlenmesi, bu gruplarda oksidatif fosforilasyonun ileri derecede gerçekleştiğini göstermektedir. Tespit edilen ROS seviyeleri sırasıyla; FM:1.00±0.01, M:1.56±0.04, G:1.27±0.11, G+M:1.31±0.08 A:1.28±0.06, A+M:1.68±0.07, A+G:1.41±0.01, A+G+M: 1.38±0.07'dir (**Şekil 4.2.G:**).



Şekil 4.2: Metabolizma ile ilgili bulgular. (A) Hücre içi glukoz alımı oranları ($\mu\text{mol/mg protein}/20 \text{ dk}$), (B) Membran fraksiyonunda GLUT1 ve yükleme kontrolü olarak kullanılan Pan-kaderin protein bantları (solda) ile bu bantların optik yoğunluk oranlarını gösteren GLUT1 seviyeleri (AU) (sağda), (C) Medyuma salınan laktat seviyeleri ($\text{mM}/\mu\text{g protein}$), (D) Hücre içi NAD⁺/NADH oranları, (E) Hücre içi NADP⁺/NADPH oranları, (F) Hekzokinaz ve Laktat dehidrojenaz A mRNA ekspresyon seviyeleri ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$), (G) ROS seviyesi DCFDA⁺ hücre sayısının ölçülmesi ile belirlenmiştir. Sol panelde akım sitometrik noktasal grafiği, sağ panelde ise ilgili grafik verilmiştir. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ FM'ye göre; ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ G'ye göre; + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$ A'ya göre; $\Delta\Delta p < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta p < 0.001$ A+G'ye göre; $\Phi p < 0.05$, $\Phi\Phi\Phi p < 0.001$ M'ye göre; $\omega\omega\omega p < 0.001$ G+M'ye göre; $\gamma\gamma\gamma p < 0.001$ A+M'ye göre. Beyaz kolonlar metformin uygulanmayan, siyah kolonlar ise metformin uygulanan grupları temsil etmektedir. FM: Tam medyum, G: Glukoz, A: Aspartam, A+G: Aspartam+Glukoz.

Tablo 4.1: Deney gruplarında meydana gelen metabolik değişimlerin özeti. Baskın metabolik yollar temel olarak laktat ve ROS üretim seviyelerine göre belirlenerek koyu yazılmıştır.

FM: Tam medyum, M:Metformin, G:Glukoz, G+M:Glukoz+Metformin, A:Aspartam, A+M:Aspartam+Metformin, A+G:Aspartam+Glukoz, A+G+M: Aspartam+Glukoz+Metformin.

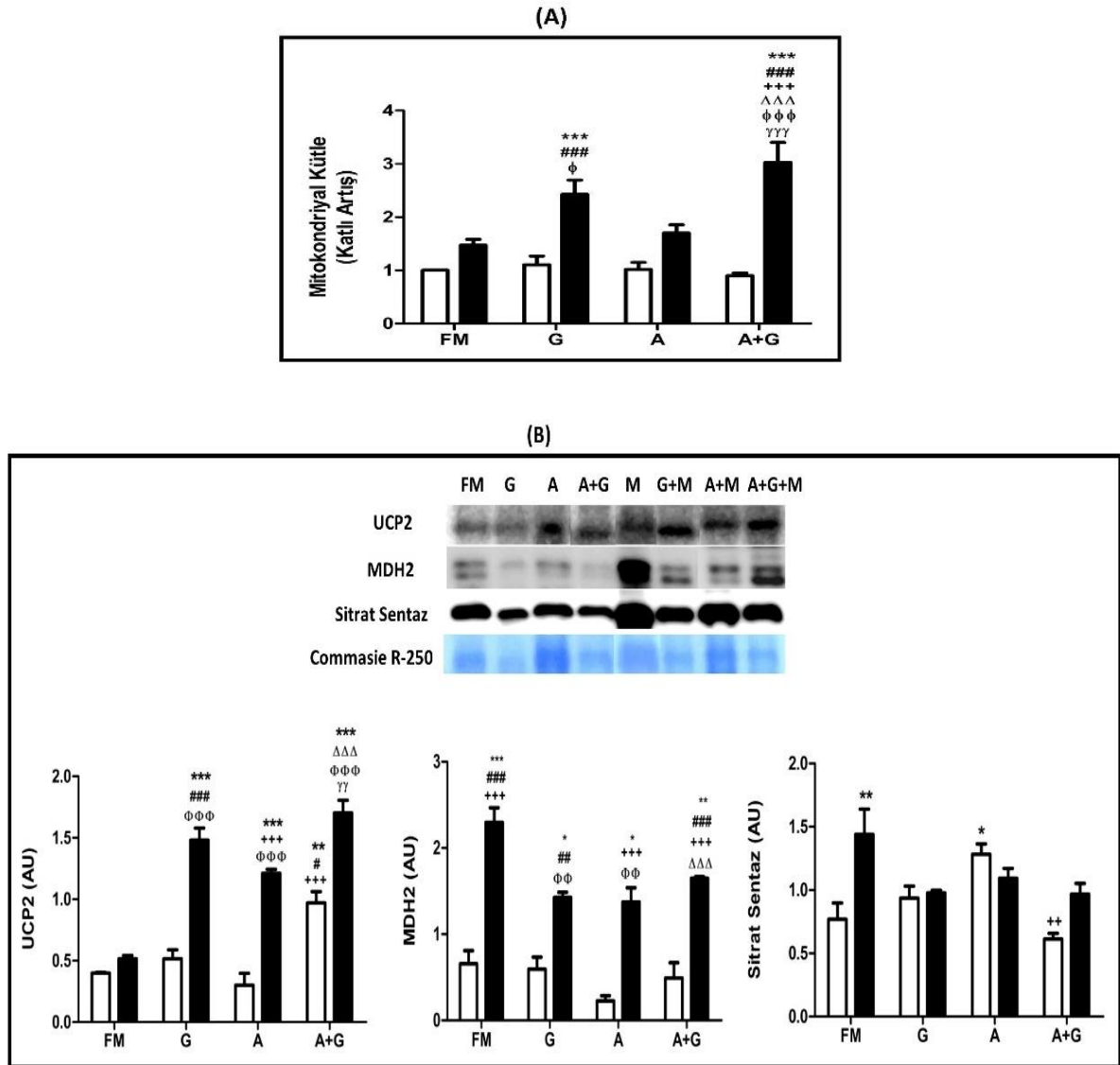
	FM	M	G	G+M	A	A+M	A+G	A+G+M
Glukoz Alımı	+	+++	+	+++	+	+++	+	+++
GLUT1	+	++	+	+++	+	++	++	++
Laktat	+	++	+	+++	+	+	+	+++
NAD⁺/NADH	+++	+	+++	++	+++	+	+++	++
NADP⁺/NADPH	+	+	+	+	+	+++	+	+++
ROS	+	+++	+	+	+	+++	+++	+++
SONUÇ	Glikoliz ve Oksidatif Fosforilasyon	Glikoliz ve Oksidatif Fosforilasyon	Glikoliz ve Oksidatif Fosforilasyon	Glikoliz ve Oksidatif Fosforilasyon	Glikoliz ve Oksidatif Fosforilasyon	Glikoliz ve Oksidatif Fosforilasyon	Glikoliz ve Oksidatif Fosforilasyon	Glikoliz ve Oksidatif Fosforilasyon

4.3. MİTOKONDRIYAL DEĞİŞİMLER İLE İLGİLİ BULGULAR

Metabolizmanın temel düzenleyicisi olan mitokondrilerdeki kütleli değişimler MitoTracker Green işaretlemesi ile tespit edildi ve elde edilen sonuçlar kontrol grubuna göre katlı artış olarak hesaplanıp değerlendirildi. Sonuç olarak, glukoz+metformin uygulanan grupta daha az, aspartam+glukoz+metformin uygulanan grupta ise daha fazla olmak üzere kontrol grubu olan FM'ye göre anlamlı bir artış; glukoz grubu ile kıyaslandığında yine aynı şekilde aspartam+glukoz+metformin grubunda ise daha fazla olmak üzere glukoz+metformin ve aspartam+glukoz+metformin gruplarında anlamlı bir artış olduğu tespit edildi. Aspartam, aspartam+glukoz, metformin ve aspartam+metformin grupları ile karşılaştırıldığında aspartam+glukoz+metformin grubunda anlamlı artışlar olduğu belirlendi. Tespit edilen mitokondriyal kütle oranları sırasıyla; FM:1.00±0.01, M:1.47±0.11, G:1.05±0.16, G+M:2.43±0.27, A:1.02±0.13, A+M:1.70±0.15, A+G:0.89±0.05, A+G+M:3.03±0.37'dir. (Şekil 4.3.A:).

Mitokondriyal kütle ile uyumlu artış göstermesi beklenen mitokondriyal protein içeriği UCP2, MDH2 ve sitrat sentaz seviyelerinin western emdirimi yöntemi ile gösterilmesi ile belirlendi.

Üç temel mitokondriyal protein arasından mitokondriyal kütle değişimi ile en paralel değişimi gösteren molekülün UCP2 olduğu dikkat çekmekteydi. UCP2 seviyelerinin metformin'in tek başına uygulandığı hücrelerde değişmediği buna karşın diğer metformin uygulanan gruplarda arttığı belirlendi. Tespit edilen UCP2 seviyeleri (AU) sırasıyla; FM:0.40±0.01, M:0.52±0.03, G:0.52±0.07, G+M:1.48±0.09, A:0.30±0.09, A+M:1.21±0.03, A+G:0.97±0.09, A+G+M:1.70±0.10. MDH2 seviyelerinin metformin uygulanan gruplarda uygulanmayanlara göre arttığı belirlendi. Tespit edilen MDH2 seviyeleri sırasıyla; FM:0.66±0.15, M:2.30±0.17, G:0.59±0.14, G+M:1.43±0.06, A:0.23±0.06, A+M:1.37±0.17, A+G:0.49±0.17, A+G+M:1.65±0.02'dur. Sitrat sentaz seviyelerinin tek başına metformin uygulanan grupta uygulanmayan gruba göre arttığı tespit edilirken, metformin uygulanan diğer gruplarda bir anlamlılık tespit edilemedi. Ayrıca tek başına aspartam uygulanan grupta kontrol grubuna göre artış tespit edilirken, aspartam+glukoz grubunda ise tek başına aspartam uygulanan gruba göre azalma belirlendi. Tespit edilen sitrat sentaz seviyeleri sırasıyla; FM:0.77±0.12, M:1.44±0.20, G:0.94±0.09, G+M:0.98±0.02, A:1.29±0.08, A+M:1.09±0.08, A+G:0.61±0.05, A+G+M:0.97±0.09'dur (**Şekil 4.3.B:**).



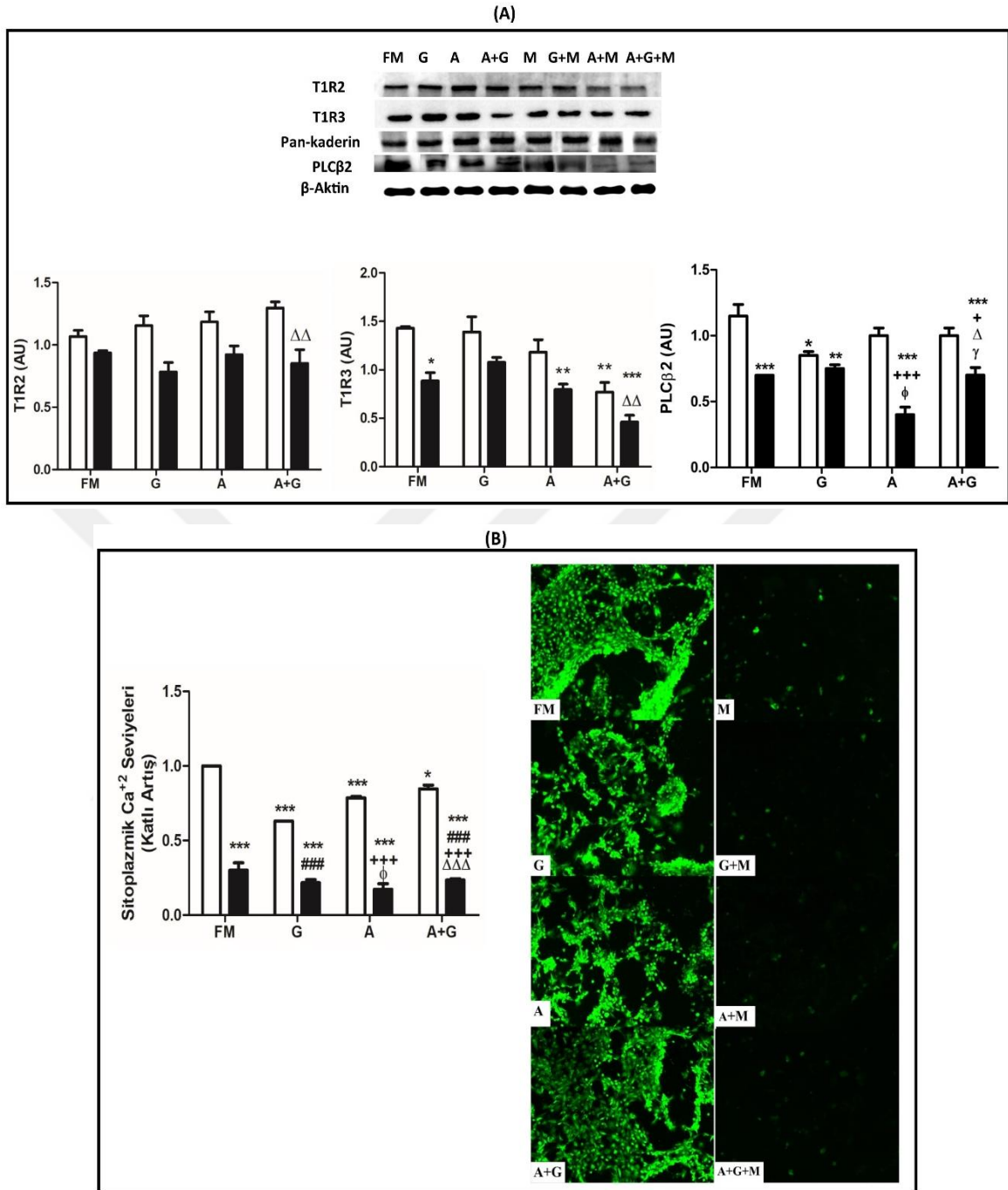
Şekil 4.3: PAK-PH'lerdeki mitokondriyal kütle değişimleri. (A) MitoTracker Green yoğunluğu ölçülerek elde edilen grafik. (B) UCP2, MDH2 ve sitrat sentaz seviyelerinde meydana gelen değişimler. Üst kısımda UCP2, MDH2, sitrat sentaz ve Commasie R-250 bantları, alt kısımda bu bantların optik yoğunluklarının Commasie R-250 yoğunluğuna normalizasyon değerleri (AU) ile oluşturulan grafik verilmiştir. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ FM'ye göre; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ G'ye göre; ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$ A'ya göre; $\Delta\Delta\Delta p < 0.001$ A+G'ye göre; $\phi p < 0.05$, $\phi\phi p < 0.01$, $\phi\phi\phi p < 0.001$ M'ye göre; $\gamma p < 0.01$, $\gamma\gamma\gamma p < 0.001$ A+M'ye göre. Beyaz renkte olan sütunlar metformin uygulanmayan grupları temsil ederken, siyah renkteki sütunlar metformin uygulanan grupları temsil etmektedir. FM: Tam medyum, G: Glukoz, A: Aspartam, A+G: Aspartam+Glukoz.

4.4. TATLI TAT SİNYALİ İLE İLGİLİ BULGULAR

Deney gruplarında T1R2 tatlı tat reseptörü alt ünitesinin seviyesinde kontrol gruba göre bir değişiklik olmadığı belirlendi. Membran fraksiyonunda belirlenen T1R2 seviyeleri sırasıyla; FM:1.06±0.04, M:0.93±0.01, G:1.15±0.07, G+M:0.78±0.07, A:1.18±0.08, A+M:0.92±0.07, A+G:1.29±0.04, A+G+M:0.85±0.11'dir. T1R3 alt ünitesinin seviyesinin aspartam+glukoz grubu ile glukoz+metformin grubu hariç diğer tüm metformin uygulanan gruplarda azaldığı tespit edildi. Bu bulgular adı geçen uyarıların T1R3 alt ünitelerinde azalma dolayısıyla tatlı tat sinyalinde bir baskılanmaya neden olabileceğini düşündürdü. Membran fraksiyonunda belirlenen T1R3 seviyeleri sırasıyla; FM:1.43±0.01, M:0.88±0.08, G:1.39±0.15, G+M:1.07±0.05, A:1.18±0.12, A+M:0.79±0.05, A+G:0.77±0.09, A+G+M:0.46±0.07'dir.

T1R2+T1R3 dimerizasyonu ile aktifleşerek fosfotidilinositol 4,5-bifosfat (PIP2)→inositol 1,4,5-trifosfat (IP3) değişimini uyaran PLCβ2 seviyeleri sitoplazmik fraksiyonda western emdirimi tekniğiyle gösterildi. Sonuç olarak en fazla A+M grubunda olmak üzere tüm metforminli gruplarda metforminsiz gruplara göre PLCβ2 seviyesinde azalma tespit edildi. PLCβ2 seviyeleri sırasıyla; FM:1.15±0.08, M:0.70±0.01, G:0.85±0.02, G+M:0.75±0.02, A:1.00±0.05, A+M:0.40±0.05, A+G:1.00±0.05, A+G+M:0.70±0.05 (Şekil 4.4.A:).

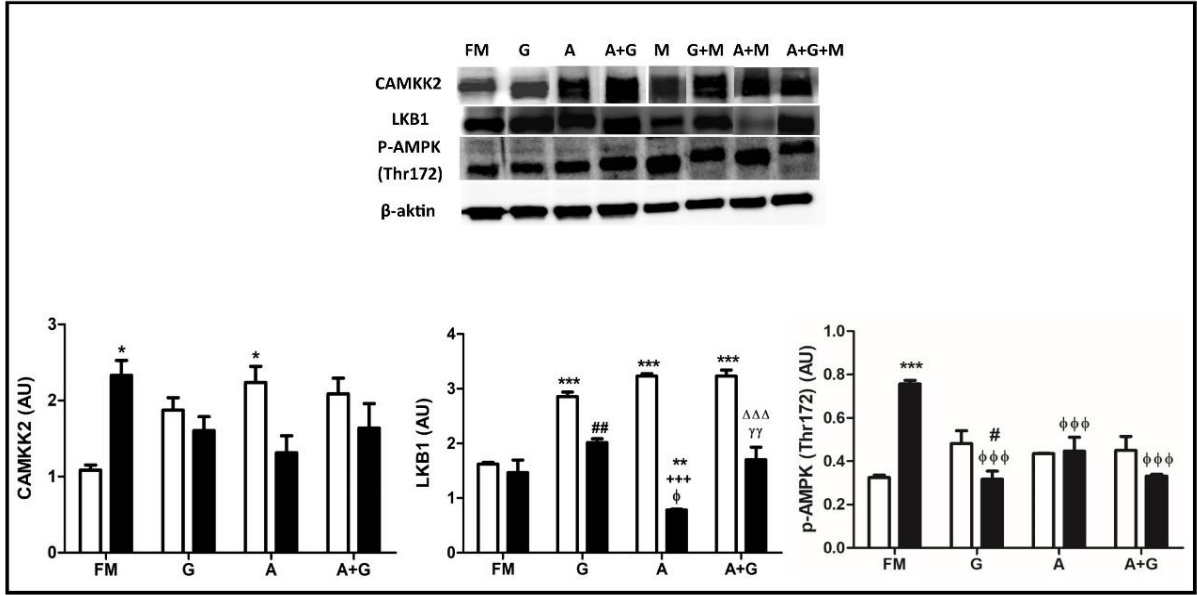
Sitoplazmik Ca²⁺ seviyelerinin kontrole göre tüm gruplarda azaldığı, ancak glukoz, aspartam ve aspartam+glukoz gruplarında metformin uygulanan gruplara göre daha yüksek olduğu belirlendi. Sitoplazmik Ca²⁺ seviyeleri sırasıyla; FM:1.00±0.01, M:0.30±0.04, G:0.63±0.01, G+M:0.21±0.02, A:0.78±0.01, A+M:0.17±0.03, A+G:0.84±0.03, A+G+M:0.23±0.01'dir (Şekil 4.4.B:).



Şekil 4.4: Tatlı tat sinyali ile ilgili bulgular. (A) T1R2, T1R3 ve pan-kaderin protein bantları ile T1R2 ve T1R3 bantlarının optik yoğunluklarının pan-kaderin yoğunluğuna normalizasyon değerleri (AU); PLCβ2 ile beta aktin bantları ve PLCβ2 bandının optik yoğunluğunun beta aktin yoğunluğuna normalizasyon değerleri (AU) ile oluşturulan grafikler. (B) Sitoplazmik Ca²⁺ seviyeleri fluorometrik ve mikroskopik yöntemle gösterilmiştir, x100. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 FM'ye göre; ###p<0.001 G'ye göre; †p<0.05, ††p<0.001 A'ya göre; Δp<0.05, ΔΔp<0.01, ΔΔΔp<0.001 A+G'ye göre; φp<0.05 M'ye göre ve γp<0.05 A+M'ye göre. Beyaz kolonlar metformin uygulanmayan, siyah kolonlar ise metformin uygulanan grupları temsil etmektedir. FM: Tam medyum, G: Glukoz, A: Aspartam, A+G: Aspartam+Glukoz.

4.5.MOLEKÜLER ENERJİ ALGILAYICILARI İLE İLGİLİ BULGULAR

Kalsiyuma bağımlı olarak AMPK'yı aktivelediği bilinen Kalsiyum/kalmodulin bağı protein kinaz kinaz 2 (CAMKK2) molekülünün seviyeleri ile ilgili yapılan ölçümlerde bu molekülün seviyesinde metformin ve aspartam gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artışın meydana geldiği gözlemlendi. Tespit edilen CAMKK2 seviyeleri sırasıyla; FM:1.05±0.05, M:2.33±0.19, G:1.87±0.16, G+M:1.60±0.18, A:2.23±0.21, A+M:1.31±0.22, A+G:2.08±0.20, A+G+M:1.63±0.32'dir. Metformin ve aspartam gruplarında CAMKK2 seviyelerinde meydana gelen yükselme kontrol grubuna göre nispeten azalan sitoplazmik Ca⁺² seviyelerinin CAMKK2 molekülünün uyarılması için yeterli olduğunu düşündürmektedir. AMPK'nın diğer bir aktivatörü olan LKB1'in glukoz, aspartam ve aspartam+glukoz gruplarında belirgin bir şekilde arttığı; buna karşın bu gruplara metformin uygulanmasının söz konusu artışı baskıladığı belirlendi. Baskılanma en fazla aspartam+metformin grubunda tespit edildi. LKB1 seviyeleri sırasıyla; FM:1.62±0.03, M:1.46±0.22, G:2.85±0.08, G+M:2.01±0.07, A:3.23±0.04, A+M:0.78±0.01, A+G:3.23±0.11, A+G+M:1.70±0.22'dir. p-AMPK(Thr172)'nin metformin grubunda belirgin olarak arttığı, glukoz+metformin grubunda ise glukoz grubuna kıyasla azaldığı belirlendi. Tespit edilen p-AMPK(Thr172) seviyeleri sırasıyla; FM:0.32±0.01, M:0.75±0.01, G:0.50±0.04, G+M:0.31±0.03, A:0.43±0.01, A+M:0.44±0.06, A+G:0.44±0.06, A+G+M:0.33±0.01'dir (Şekil 4.5).

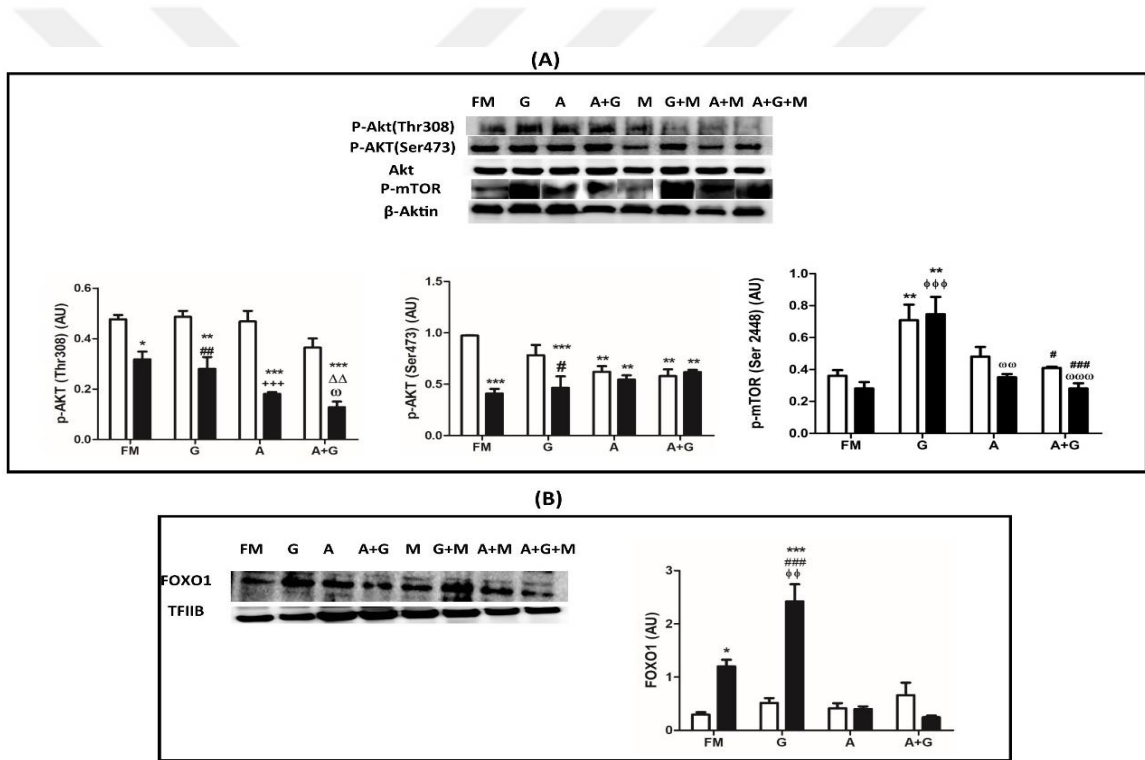


Şekil 4.5: Moleküler enerji algılayıcılarının seviyelerindeki değişimler. CAMKK2, LKB1, p-AMPK(Thr172) ve β -aktin bantları ile alta bu bantların optik yoğunluklarının beta Aktin yoğunluğuna normalizasyon değerleri (AU) ile oluşturulan grafikler verilmiştir * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ FM'ye göre; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ G'ye göre; +++ $p < 0.001$ A'ya göre; $\Delta\Delta\Delta p < 0.001$ A+G'ye göre, $\phi p < 0.05$, $\phi\phi p < 0.01$ M'ye göre ve $\gamma\gamma p < 0.01$ A+M'ye göre. Beyaz kolonlar metformin uygulanmayan, siyah kolonlar ise metformin uygulanan grupları temsil etmektedir. FM: Tam medyum, G: Glukoz, A: Aspartam, A+G: Aspartam+Glukoz.

AMPK tarafından negatif yönde düzenlenen Akt molekülünün Thr308 ve Ser473 fosforilasyonunda metformin uygulanan gruplarda azalma olduğu yani Akt'nin bu gruplarda inaktif hale geldiği, metformin uygulanmayan gruplarda ise Th308 fosforilasyonunun korunduğu yani Akt molekülünün bu gruplarda aktif olduğu belirlendi. Tespit edilen p-Akt(Thr308) seviyeleri sırasıyla; FM:0.47 \pm 0.01, M:0.31 \pm 0.03, G:0.48 \pm 0.02, G+M:0.28 \pm 0.08, A:0.46 \pm 0.04, A+M:0.18 \pm 0.01, A+G:0.36 \pm 0.03, A+G+M:0.12 \pm 0.02'dir. p-Akt(Ser473) seviyeleri ise sırasıyla; FM:0.96 \pm 0.01, M:0.40 \pm 0.04, G:0.75 \pm 0.06, G+M:0.46 \pm 0.11, A:0.62 \pm 0.05, A+M:0.54 \pm 0.04, A+G:0.56 \pm 0.03, A+G+M:0.61 \pm 0.01'dir (**Şekil 4.6.A**).

AMPK tarafından baskılandığı ve AKT tarafından aktifleştirildiği bilinen mTOR'un aktif formu olan p-mTOR(Ser2448) seviyeleri ile ilgili yapılan ölçümlerde glukoz ile glukoz+metformin gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artışın meydana geldiği belirlendi. Tespit edilen p-mTOR(Ser2448) seviyeleri sırasıyla; FM:0.36 \pm 0.03, M:0.28 \pm 0.03, G:0.70 \pm 0.09, G+M:0.74 \pm 0.10, A:0.48 \pm 0.06, A+M:0.35 \pm 0.01, A+G:0.41 \pm 0.01, A+G+M:0.28 \pm 0.03'dür (**Şekil 4.6.A**).

Akt molekülü tarafından negatif yönde düzenlenen FOXO1'in nükleer fraksiyonda metformin ve glukoz+metformin gruplarında belirgin şekilde bir artış gösterdiği belirlendi. Diğer taraftan, aspartam+metformin ve aspartam+glukoz+metformin gruplarında FOXO1 seviyelerinde istatistiksel olarak bir farklılığın olmadığı belirlendi. Elde edilen bu bulgunun p-Akt(Ser473) seviyelerindeki değişimler ile benzer olduğu dikkati çekmektedir. Akt inhibisyonunda Ser473 fosforilasyonunun asıl etken olduğu göz önünde bulundurulduğunda; aspartam ve aspartam+glukoz gruplarına metformin uygulanmasının FOXO1'i aktive etmemesi kabul edilebilir bir sonuçtur. Tespit edilen FOXO1 seviyeleri sırasıyla; FM:0.29±0.04, M:1.20±0.12, G:0.51±0.08, G+M:2.42±0.32, A:0.41±0.09, A+M:0.40±0.05, A+G:0.66±0.23, A+G+M:0.24±0.03'tür (Şekil 4.6.B:).



Şekil 4.6: (A) p-Akt(Thr308), p-Akt(Ser473), total Akt, p-mTOR (Ser 2448) ve β -aktin bantları ile p-Akt bantların optik yoğunluklarının total Akt yoğunluğuna normalizasyon değerleri ve p-mTOR (Ser 2448) bantların optik yoğunluklarının beta aktin yoğunluğuna normalizasyon değerleri (AU) ile oluşturulan grafikler. (B) FOXO1 ve TFIIB bantları ile bu bantların optik yoğunluklarının TFIIB yoğunluğuna normalizasyon değerleri (AU) ile oluşturulan grafik. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ FM'ye göre; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ G'ye göre; +++ $p < 0.001$ A'ya göre; $\Delta\Delta p < 0.01$ A+G'ye göre, $\phi\phi p < 0.01$, $\phi\phi\phi p < 0.001$ M'ye göre ve $\omega p < 0.05$, $\omega\omega p < 0.01$, $\omega\omega\omega p < 0.001$ G+M'ye göre. Beyaz kolonlar metformin uygulanmayan, siyah kolonlar ise metformin uygulanan grupları temsil etmektedir. FM: Tam medyum, G: Glukoz, A: Aspartam, A+G: Aspartam+Glukoz.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Keçisedefi otu olarak bilinen *Galega officinalis* adlı bitkiden elde edilen metformin'in yaygın kullanım alanı kan şekeri seviyesinin dengelenerek insülin direncinin kırılması ve hastalığa bağlı kilo alımının önlenmesidir. Metformin en popüler oral glukoz indirgeyici ilaçlardan birisidir ve yaygın olarak T2D tedavisinde başlangıç aşamasında tercih edilir. Hala bu ilacın hepatik glukoz üretimini baskılayıcı etkisinin dışında etki mekanizmasının tam olarak anlaşılamamış olması ilginçtir. Yüksek etkinliği, düşük maliyeti ve iyi güvenlik profili sıklıkla tercih edilmesinin sebepleri arasında gösterilmektedir. İlacın kan glukozunu indirgeyici etkisinden bağımsız olarak bazı lipidler ve inflamatuvar belirteçler üzerinde normalleştirici etkileri ile kardiyovasküler ve renal patolojilerde azalma sağlaması da metformin'in faydalı etkileri arasında gösterilmektedir (Sanchez-Rangel ve Inzucchi, 2017).

T2D'nin temel olarak beta hücreleri tarafından üretilen insülin seviyelerindeki ve/veya etki mekanizmasındaki değişimlerden kaynaklandığı düşünüldüğünde bu hastalığın erken safhalarında gelişen insülin direnci tedavisinde kullanılmakta olan metformin'in pankreatik etkilerinin ortaya konulmasının metformin'in hastalığın seyrini nasıl etkilediğinin anlaşılması açısından oldukça önemli olduğu açıktır. İnsülin direnci ile T2D gelişiminin ilk aşaması olarak bilinen kompenzasyon basamağının doğrudan ilişki olduğu göz önünde bulundurulduğunda, metformin'in bu safhada arttığı bilinen beta hücre kütlesi üzerindeki etkilerinin mercek altına alınması ilacın pankreatik etkilerinin gösterilmesi açısından önemlidir. Literatürde yoğunlukla metformin'in beta hücrelerinde glukoz ile uyarılan insülin sekresyonu üzerindeki etkilerinin araştırılmış olduğu dikkati çekmektedir. Lundquist ve diğerleri (2016) dişi farelerden izole ettikleri adacıklarda metformin'in yüksek konsantrasyonda glukoz (7mM) ile baskılanan insülin sekresyonunu adacık nitrik oksit (NO) sentaz-NO sisteminin yüksek aktivitesini baskılayarak artırdığını bildirmişlerdir. Sıçan pankreatik adacıklarında metformin'in yüksek konsantrasyonda serbest yağ asidi veya glukoz (16.7mM) ile baskılanan insülin sekresyonunu hücre içi glukoz ve yağ asidi metabolizmasını düzenleyerek artırdığı gösterilmiştir (Patane ve diğ., 2000). Orta seviyeli glukoz (6-8mM) varlığında ise metformin'in insülin sekresyonunu baskıladığı bildirilmiştir (Lamontagne ve diğ. 2009). Bu çalışmalardan anlaşıldığı üzere metformin'in insülin sekresyonunu artırıcı etkisi yüksek glukoz seviyelerine bağlıdır. Diğer taraftan, mevcut beta hücrelerinin fonksiyonunun devamlılığının sağlanması metformin'in kontrollü olarak T2D sürecini yavaşlattığını veya engellediğini göstermez. Bilindiği üzere

yüksek insülin üretimi de endoplazmik retikulum stresi aracılı apoptoz yoluyla beta hücre kaybına neden olabilmektedir (Fonseca ve diğ., 2011) ve kaybedilen beta hücrelerinin yerine yenileri konur (Manesso ve diğ., 2009). Bu bakış açısıyla metformin'in beta hücre fonksiyonunu destekleyici etkisi yeni beta hücrelerinin gelişimi dolayısıyla kütlesi artan pankreatik adacıkların varlığı ile karakterize edilen kompenzasyon fazını hızlandırıyor olabilir.

Beta hücre kompenzasyonu, glukoz homeostazını sağlayabilecek seviyede insülin ihtiyacını karşılamak üzere beta hücrelerinin geçirdiği adaptasyon sürecini tanımlar. Beta hücre kompenzasyonu genel anlamda yapısal değişikliklere neden olan hiperplazi, hipertrofi, artmış proliferasyon ve progenitör hücrelerden yeni beta hücrelerinin farklılaşması yoluyla oluşturulması süreçlerini kapsar. Bu yapısal uyarlamalar beta hücresi hiperfonksiyonunu sağlar ve sonuç olarak beta hücre kütlesinin artması nedeniyle normalden çok büyük pankreatik adacıklar ortaya çıkar (Comstock ve diğ., 2013; Cerf, 2015). Metformin'in yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde erken dönemde beta hücre proliferasyonunu azaltarak kompensatuvar beta hücre hiperplazisini baskıladığı, ancak ileri evrelerde metformin'in kompenzasyon üzerine bir etkisinin olmadığı ve bu etkinin metformin'in insülin direncini kırıcı etkisinden bağımsız olarak doğrudan beta hücrelerini etkilemesiyle ortaya çıktığı bildirilmiştir (Tajima ve diğ., 2017). Her ne kadar yüksek yağlı diyetle beslenen fare modelleri diyetle oluşan obezitede gözlenen beta hücre proliferasyonu ve kütle artışı araştırmaları için sıklıkla kullanılmakta ise de (Turner ve diğ., 2013; Tajima ve diğ., 2017), bu modelde insülin salınımının artmadığı ve beta hücre adaptasyonunun tam olarak sağlanamadığı belirtilmiştir (Hull ve diğ., 2005). İnsülin salınımını kanda yükselen glukoz seviyelerinin uyardığı, beta hücre kompenzasyonu temel anlamda kanda uzun süreli yüksek glukoz seviyelerine cevaben geliştiği ve sonuç olarak insülin direncinin ortaya çıktığı göz önünde bulundurulduğunda kompenzasyon modeli oluşturulması için yüksek yağlı diyetin yetersiz kalması şaşırtıcı değildir. Glukozun beta hücre kompenzasyonu ve insülin direnci gelişimindeki baskın etkisi birçok veri ile ortaya konmuştur (Weir ve Bonner-Weir, 2007).

Beta hücre kompenzasyonu araştırmalarındaki en önemli sorulardan birisi yetişkin pankreasında bu hücrelerin yenilenmesinin ne oranda gerçekleştiği ve bunun kaynağının hangi hücre olduğudur. Yeni hücreler oluşuyorsa bunlar kök/öncül hücrelerden mi kaynaklanmaktadır, yoksa mevcut hücrelerin bölünmesiyle mi ortaya çıkmaktadır? Literatürde birbiriyle çelişen bulgulara rastlanmaktadır. Gebelikte, obezitede ve kısmi pankreatektomiden

sonra beta hücrelerinin kendini yenilediği görülür. Bu bulgu pankreatik kök hücreleri kavramının doğmasına yol açmıştır (Bonner-Weir ve Sharma, 2002). Pankreatik kök hücrelerin var olduğunu ileri süren görüşler nakillerden sonra adacıkların işlev görmeyi sürdürmesinden de destek almaktadır. Beta hücrelerinin uzun süre yaşam sürmedikleri bilinir (Bonner-Weir ve diğ., 2000). Bu nedenle nakledilen adacıkların işlevlerini sürdürmesi, adacık içinde pankreatik kök hücrelerin veya en azından kendini yenileyebilen işlevsel beta hücrelerinin varlığıyla açıklanabilir (Can, 2014b).

Glukozun beta hücre proliferasyonunu uyardığını gösteren genetik, farmakolojik ve transplantasyon çalışmaları glukozun mitojenik bir hormon olarak önerilmesine yol açmıştır (Ferrer ve diğ., 2011). Bu yaklaşım kanda yükselen glukoz seviyelerine karşı insülin gereksiniminin nasıl algılandığı sorusuna yanıt olarak geliştirilmiştir. Klasik hormonların aksine glukozun doğrudan zar veya reseptörler aracılığıyla değil hücre içi metabolizma tarafından oluşturulan sinyallerle algılandığı ortaya konmuştur (Matschinsky ve diğ., 1993). Beta hücrelerinde glikoliz kan glukozu konsantrasyonu ile paraleldir. Özellikle, kanda artan glukoz, beta hücrelerinde glikolitik metabolizmayı güçlendirir ve hücre içi ATP/ADP oranını artırır, buna bağlı olarak ATP'ye duyarlı potasyum (KATP) kanallarının kapanması zarın depolarizasyonuna neden olur gerilime duyarlı kalsiyum kanallarının açılması ile artan hücre içi kalsiyum seviyesi insülin ekzositozuna neden olur. Tersine, azalan kan şekeri ve indirgenmiş beta hücre glikolitik metabolizması insülin salınımını baskılar (Brownlee, 2003). Porat ve diğerleri (2011) beta hücre glikolitik metabolizmasının sadece insülin salınımını başlatmak değil aynı zamanda adaptif bir proliferatif tepkiyi uyardığını ortaya koymuştur. Söz konusu çalışmada glukokinaz üretmeyen fareler oluşturulmuş ve bu farelerde beta hücre proliferasyonunun baskılandığı gösterilmiştir. Aynı şekilde, glukokinaz aktivatör bileşiklerin sağlıklı farelerde beta hücre proliferasyonunu indüklediği de belirlenmiştir. Ayrıca, genetik ve farmakolojik uygulamalar sonucunda glukozu bağımlı beta hücre proliferasyonu için KATP kanallarının kapatılması gerektiği ortaya konmuştur ki bu bulgular beta hücrelerinde insülin salınımı ile proliferasyon mekanizmalarının yakın ilişkisini açıkça ortaya koymaktadır.

Glukozun beta hücreleri üzerine etkileri iyi açıklanmış olmasına rağmen kompenzasyon aşamasına katkı verecek önemli bir grup hücre olan pankreatik kök/progenitor hücreler üzerindeki etkileri üzerine yapılmış çalışmalar kısıtlıdır. Ekibimizin önceki çalışmalarında yüksek konsantrasyonda glukozun pankreatik progenitor hücrelerin beta hücrelerine

farklılaşmasına neden olduğu ancak bu hücrelerin farklılaşmanın erken aşamalarında olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada yüksek konsantrasyonda glukoz uygulanan pankreatik progenitör hücrelerde nuklear c-myc seviyelerinde artış olduğunun belirlenmesi glukozun bu hücrelerde aynı zamanda proliferasyonu uyarabileceğini düşündürmektedir (Coskun ve diğ., 2018). Diğer bir çalışmamızda ise yüksek konsantrasyonda glukoz uygulanan progenitör hücrelerde proliferasyonun arttığı belirlenerek bu hipotez doğrulanmıştır (Erçin, 2017).

T2D hastalarında kan glukoz seviyelerinin normalizasyonu temel hedeftir ve yapay tatlandırıcılar bu bireyler için önerilen şeker alternatifleridir. Yapay tatlandırıcılar arasından özellikle aspartam'ın güvenliği uzun süredir tartışılmakta olmasına rağmen bu ürün hala birçok klinisyen tarafından diyeteye dahil edilmektedir. Aspartam şekerden 200 kat daha tatlıdır ve kan glukoz seviyeleri üzerindeki etkisinin göz ardı edilebilir seviyede olduğu düşünülerek T2D hastalarının karbohidrat alımını kontrol edebilmek için kullanılması önerilir (Choudhary, 2018). Bununla birlikte, araştırmalar aspartam alımının kilo kaybından ziyade kilo alma riski oluşturduğunu (Feijo ve diğ., 2013) ve kan şekeri seviyelerinin yükselmesine neden olabileceğini (Wilson ve Howes, 2008) göstermektedir. Çalışmalar aspartam'ın kortizol seviyelerini artırarak bir kimyasal stres oluşturduğu ve aşırı serbest radikal üretimi yolu ile sistemik oksidatif stresi uyarabileceğini (Iyyaswamy ve Rathinasamy, 2012), bağırsak mikrobiyal aktivitesini değiştirebileceğini (Palrnäs ve diğ., 2014) ve N-metil D-aspartat (NMDA) reseptörünü değiştirerek insülin direncine neden olabileceğini (Pan-Hou ve diğ., 1990) göstermektedir.

Mevcut çalışmada, glukoz ve/veya aspartam ve/veya metformin'in pankreatik progenitör hücrelerin beta hücrelerine farklılaşmasına yol açıp açmadığını tespit edebilmek amacıyla insülin üreten hücrelerin sayısı akım sitometri tekniği ile belirlendi. Sonuç olarak, aspartam'ın beta hücre farklılaşmasına neden olduğu, metformin'in tek başına veya glukoz veya aspartam ile birlikte pankreatik progenitör hücrelere uygulanmasının ise daha yüksek oranda beta hücre farklılaşmasını sağladığı belirlendi. Tek başına glukoz uygulanan grupta insülin⁺ hücre sayısında artış belirlenmekle birlikte bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ekibimizin önceki çalışmalarında yüksek konsantrasyonda glukozun pankreatik progenitör hücrelerin beta hücrelerine farklılaşmasına neden olduğu, ancak bu hücrelerin farklılaşmanın erken aşamalarında olduğu tespit edilmiştir (Coskun ve diğ., 2018; Erçin ve diğ., 2018). Ancak, bu çalışmalar arasında glukozun uygulanma süresi bakımından farklılıklar vardır. Erçin ve

diğerleri (2018), yüksek konsantrasyonda glukozu 24 saat süreyle pankreatik progenitör hücelere uyguladıktan sonra hüceleri bazal seviyede glukozda 30 gün kültüre ederken, Coskun ve diğerleri (2018) yüksek konsantrasyonda glukozu 20 gün boyunca pankreatik progenitör hücelere uygulamıştır. Mevcut çalışmada nispeten kısa süreli (10 gün) bir deney modeli oluşturulduğundan beta hücre farklılaşma sürecinin tam olarak gerçekleşmediği düşünülebilir. Gen ekspresyonu seviyesinde yaptığımız araştırmada tam medyum uygulanan kontrol grubu ile glukoz uygulanan grupta *NGN3* ve *PAX4* genlerinin yok denecek kadar az; *PDX1*, *NKX6.1* ve *GLUT2* genlerinin yüksek seviyelerde ifade edilirken, *INS2* geninin eksprese edilmediği belirlendi. Glukoz uygulanan grupta erken farklılaşma faktörü *NKX2.2*'nin kontrol gruptan daha yüksek seviyede eksprese edilmesi bu gruptaki hücelerin farklılaşma sürecinin erken seviyesinde olduğunu göstermektedir. Pankreatik progenitör hücelerin *GLUT2* eksprese ettiğinin gösterilmiş olması (Segev ve diğ., 2012) hem glukoz uygulanan grupta hem de kontrol grubunda çok sayıda pankreatik progenitör hücre olduğunu desteklemektedir.

Aspartam'ın beta hücre farklılaşmasını uyarıcı etkisi ilk defa mevcut çalışmada tespit edilmiştir. Gen ekspresyonu seviyesinde yaptığımız araştırmada aspartam ve aspartam+glukoz uygulanan gruplarda *NGN3* ekspresyonunun düşük olması bu gruplardaki ara progenitör hücre sayılarının az olduğunu, buna karşın *PAX4* geninin yok denecek kadar az; *NKX2.2*, *NKX6.1* ve *PDX1* genlerinin düşük; *INS2* ve *GLUT2* genlerinin ise yüksek seviyelerde ifade edildiğinin belirlenmesi ileri seviyede beta hücre farklılaşmasına işaret etmektedir. Aspartam'ın adiposit farklılaşmasını baskıladığı bildirilmiştir (Pandurangan ve diğ., 2014). Kilo alımını artırdığı bilinen aspartam'ın adiposit farklılaşmasını baskılaması ilginçtir. Söz konusu makalede araştırmacılar bu zıt bulguyu tartışmamış olsalar da çalışmanın *in vitro* ortamda gerçekleştirilmesi ve nispeten düşük ve kısa süreli aspartam uygulanması farklı bulgular elde edilmesine neden olmuş olabilir. MKH'lerin *in vitro* ortamda adipositlere farklılaşması sürecinin insülin ile uyarıldığı (Pfützner ve diğ., 2017) ve aspartam'ın tek başına insülin salınımını değıştirmediği (Malaisse ve diğ., 1998) göz önünde bulundurulduğunda aspartam'ın beta hücre farklılaşmasını uyarsa bile insülin salınımını etkilemediğinden adiposit farklılaşmasına neden olmaması mantıklı görünmektedir.

In vitro metformin uygulamasının *PDX1*⁺ progenitörlerin proliferasyonunu ve sayısını artırdığı, metformin tedavisi uygulanan hamile farelerin yavrularında pankreatik progenitör hücelerde ve beta hücre kütlelerinde artış ile sonuçlandığı gösterilmiştir (Gregg ve diğ., 2014). Ayrıca

metformin'in zebra balığına embriyogenez sırasında insülin üretimini artırmaksızın beta hücre sayısını artırdığının gösterilmesi metformin'in erken gelişim evresinde kompenzasyonu artırdığını düşündürmektedir (Wyett ve diğ., 2018). Çalışmamızda ilk defa erişkin pankreatik progenitor hücrelerde metformin'in beta hücre farklılaşmasını uyardığı belirlenmiştir. Gen ekspresyonu seviyesinde yaptığımız çalışmada metformin uygulanan grupta *NGN3* ve *NKX2.2* genlerinin yok denecek kadar az ifade edilirken, diğer genlerin yüksek seviyede eksprese edildiğinin belirlenmesi bu gruptaki hücrelerin ileri seviyede farklılaşmış beta hücreleri olduğunu göstermektedir. Bu bulgular erişkin dönemde metformin'in beta hücre farklılaşmasını uyardığını diğer bir deyişle kompenzasyonu desteklediğini düşündürmektedir. Metformin ile birlikte glukoz ve/veya aspartam verilen gruplarda da metformin uygulanan gruba benzer seviyelerde insülin⁺ hücre sayısında artış olduğu belirlenmekle birlikte metformin+aspartam grubunda insülin⁺ hücre sayısı nispeten daha düşüktü. Glukoz+metformin uygulanan grupta *NGN3* az olmakla birlikte diğer gruplardan daha yüksek seviyede eksprese edildiği; *PAX4* geninin yok denecek kadar az; *NKX2.2*, *NKX6.1* ve *PDX1* genlerinin düşük; *INS2* ve *GLUT2* genlerinin ise yüksek seviyelerde ifade edildiğinin belirlenmesi ileri seviyede beta hücre farklılaşmasına işaret etmektedir. Aspartam+metformin ve aspartam+glukoz+metformin gruplarında *INS2* ve *GLUT2* gibi ileri farklılaşma faktörlerinin yanı sıra *NKX2.2* ekspresyonunun da yüksek olması bu gruplarda hem ileri hem de erken farklılaşma aşamasında bulunan beta hücrelerinin sayıca fazla olduğuna düşündürmektedir.

Mevcut çalışmada metformin'in glukoz alımını artıran bir molekül olduğu (Natali ve Ferrannini, 2006) ve kök hücrelerde glukoz alımının GLUT1 aracılığı ile gerçekleştiği (Segev ve diğ., 2012) bilgilerinden yola çıkılarak, GLUT1'in beta hücre farklılaşmasındaki olası rolü özgün bir GLUT1 inhibitörü olan WZB117 uygulamasıyla araştırıldı. Sonuç olarak aspartam+metformin ve aspartam+glukoz+metformin ile indüklenen beta hücre farklılaşmasının GLUT1 inhibitörü varlığında baskılandığı, bu baskılanmanın diğer gruplarda meydana gelmediği tespit edildi. Bu bulgu aspartam ve metformin varlığında GLUT1'in beta hücre farklılaşma mekanizmasında önemli bir rol oynadığını düşündürmekte ise de ilişkili mekanizma henüz bilinmemektedir. Aspartam ve metformin ile uyarılıp GLUT1'i aktive eden ortak bir farklılaşma faktörünün bu mekanizmayı yönlendiriyor olması olasıdır.

Çalışmamızda, pankreatik progenitor hücrelerde GLUT1 ve glukoz alım seviyelerinin biri birine paralel değişim göstererek metformin uygulanan tüm gruplarda arttığı belirlendi.

Hücrelere alınan glukozun kök hücre meabolizmasını nasıl yönlendirdiğinin araştırabilmesi için glikoliz ve oksidatif fosforilasyon ile ilgili bazı moleküler ve metabolitlerin seviyelerindeki değişimler araştırıldı. Metformin ve aspartam+metformin gruplarında daha belirgin olmak üzere metformin uygulanan tüm gruplarda genel olarak $NAD^+/NADH$ oranlarında düşme gözlemlendi. Mitokondriyal gliserol 3-fosfat dehidrojenaz (G3PDH)'ın metformin tarafından inhibisyonun $NADH$ seviyesini yükselttiği ve laktat dehidrojenazın aktivasyonu yoluyla piruvattan laktat oluşmasını sağladığı bilinmektedir (An ve He, 2016). Bu bilgi, bulgumuzu desteklemektedir. Diğer taraftan, aspartam+metformin ve aspartam+glukoz+metformin gruplarında $NADP^+/NADPH$ bir artış belirlendi. Metformin, glukoz+metformin ve aspartam+glukoz+metformin gruplarında medyuma salınan laktat seviyelerindeki artış belirgindi. Metformin ile birlikte aspartam uygulanmasının laktat seviyelerini indirgemesi ve aspartamın bu baskılayıcı etkisinin glukoz ilavesi ile ortadan kaldırılması, aspartam'ın düşük enerjili bir besin olması nedeniyle metabolizmanın oksidatif fosforilasyona yönlendirildiğini düşündürdü. Glikolizin önemli araçlarından biri olan *hekzokinaz* gen ekspresyonu seviyesinde metformin grubunda belirgin bir artış gözlenirken, glukoz+metformin grubunda *laktat dehidrojenaz A* gen ekspresyon seviyelerinin arttığı belirlendi. Aspartam+glukoz+metformin grubunda hücrelerin glikolitik metabolizmayı kullandıkları belirlenmiş olsa da temel glikolitik enzimlerin ekspresyonunda bir değişimin olmaması bu enzimlerin aktivasyonu ile ilgili bir bilgi vermediğinden net bir yorum yapabilmek için enzimlerin aktivasyonlarının ölçülmesi gerekmektedir. Oksidatif fosforilasyonun bir ürünü olarak ROS seviyesi ölçüldüğünde aspartam+glukoz grubunda anlamlı bir artış olduğu, glukoz+metformin grubu hariç diğer tüm metformin uygulanan gruplarda da artış olduğu belirlendi. Sonuç olarak anlamlı bir farklılaşma belirlenemeyen glukoz grubu ile nispeten düşük oranda farklılaşma belirlenen aspartam gruplarının metabolik profilinin kontrol gruba yakın olduğu ve düşük oranda glikoliz ve oksidatif fosforilasyonu tercih ettikleri belirlendi. Glukoz+metformin grubunda baskın metabolik yolağın glikoliz olduğu; aspartam+glukoz ve aspartam+metformin gruplarında baskın metabolik yolağın oksidatif fosforilasyon olduğu; metformin, glukoz+metformin ve aspartam+glukoz+metformin gruplarında ise glikoliz ve oksidatif fosforilasyonun birlikte süregeldiği tespit edildi.

Hücrel enerji metabolizmasını yönlendiren temel faktörler besin maddeleridir. Glukozun enerji metabolizması için temel düzenleyici faktör olduğu iyi bilinmektedir. Glukoz glikolitik yolda metabolize edilerek oluşan piruvat krebs çevrimine yönlendirilebilir ve krebs çevrimi

sırasında oluşan bileşiklerdeki hidrojen atomlarının elektron taşıma sisteminden geçirilmesi sırasında oksijenle birleşerek su oluşturulur. Kök hücrelerde, glikoliz ile üretilen piruvatın çoğu laktat dehidrojenaz ile laktata çevrilir. Bu durum genel olarak düşük oksijen varlığında gerçekleşip anaerobik glikoliz etkisi olarak adlandırılır. Mevcut çalışmada standart kültür şartları kullanılmıştır, yani inkübatöre %5 CO₂, %95 hava gazı karışımı uygulanmıştır. Bu şartlar altında kültür medyumunda çözünen O₂ miktarının yaklaşık %20 olduğu ve bu değer normalde insan kanında çözünen O₂ miktarından (%10-13) daha yüksek olduğu bilinmektedir, bu durum *in vitro* ve *in vivo* çalışmaların bulgularında farklılıklara neden olabilmektedir (Sullivan ve diğ., 2006). Hücre kültüründe standart olarak kullanılan bikarbonat tamponlu kültür medyumu % 5 CO₂ varlığında medyumun pH'sını 7.4 civarında tutmak üzere tasarlandığından ortamın CO₂ oranını yükseltmek medyumun asiditesini artırabilmekte ve hücreler için olumsuz bir ortam gelişmesine neden olabilmektedir. Bu sebeple hücre kültürü çalışmalarında O₂ oranı *in vivo* ortama göre daha yüksektir. Mevcut çalışmada standart kültür medyumu ve kültür şartları kullanıldığından kontrol hücrelerde düşük seviyede glikoliz ile birlikte oksidatif fosforilasyonun da süregelmesi beklenen bir durumdur. Glukoz uygulamasının bu metabolik profili değiştirmemiş olması glukozun kök hücre karakterinin korunmasını desteklediğini düşündürmektedir. Nuschke ve diğerlerinin (2016) MKH'lerin glikolitik olması sebebiyle glukozun *in vitro* MKH modellerinin sınırlayıcı bir faktörü olduğunu, glukozun yetersiz seviyede bulunmasının MKH fonksiyonunu olumsuz etkilediğini göstermiş olması hipotezimizi desteklemektedir.

Aspartam vücutta sindirildiğinde aspartik asit, fenilalanin ve metanol'e dönüştürülür. Aspartik asit (ayrıca aspartat olarak da bilinir), tüketilen her proteinin içinde bulunan ve insan vücudundaki proteinlerin bileşimine katılan bir amino asittir. Aspartik asit, karbohidratların ve diğer aminoasitlerin metabolizmasına aracılık eder. İnsan vücudu, gerekli durumlarda diğer maddelerden aspartik asit elde edip enerji için yakabilir veya fazla bulunması durumunda onu yağa çevirebilir. Fenilalanin, tüm proteinlerde bulunan başka bir amino asittir. Aspartik asit'in aksine, insanlar diğer maddelerden fenilalanin üretmedikleri için her gün diyetle belli bir miktar fenilalanin alınmalıdır. Bu özelliğinden dolayı fenilalanin esansiyel bir amino asit olarak sınıflandırılır. İhtiyacın üzerinde fenilalanin tüketimi enerji üretimi için kullanılabilir veya daha fazla miktarlarda yağ olarak depolanabilir. Yani aspartik asit ve fenilalanin kalori sağlar, düşünüldüğünün aksine aspartam klorijenik bir tatlandırıcıdır. Genel olarak, aminoasitler, karbohidratlar gibi gram başına yaklaşık 4 kalori sağlar. Aspartam diyetle kalori verir, ancak

yaklaşık 200 kat şekerli tat uyarısı oluşturduğundan tatlandırma için çok az miktarlarda kullanılması yeterlidir, dolayısıyla şekere oranla çok daha düşük seviyede kalori alınmış olur. Metanol birçok meyve ve meyve suyunda, kısmen pektin gibi metil esterleri formunda bulunur. Sindirim sisteminde, bu esterlerin çoğu hidrolize edildiğinde metanol serbestleşir. Karaciğer belli miktarda metanolü formaldehit ve daha sonra formik aside dönüştürür ki bu metabolitler böbrekler tarafından kolayca atılır. Aspartam tüketimine bağlı olarak metanol zehirlenmesi gelişme olasılığı ancak kısa süre içinde tüketilecek çok yüksek miktarda aspartam ile gerçekleşebileceğinden çok da mümkün görünmemektedir (Rycerz and Jaworska-Adamu, 2013). Çalışmamızda aspartam uygulanan hücrelerin düşük seviyede glikoliz ve oksidatif fosforilasyon yaptığını ve hücre farklılaşması oranlarının buna paralel olduğunu belirledik. Bu bulgu düşük seviyede enerji kaynağı bulunan ortamda kök hücre fonksiyonlarının düşük seviyede sürdürülebildiğini düşündürmektedir. Diğer taraftan, aspartam ve glukoz veya metformin ve aspartam birlikte verildiğinde baskın metabolik yolağın oksidatif fosforilasyon olduğu, ancak hücre farklılaşmasının aspartam uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediğini tespit ettik. Literatürdeki genel bilgi farklılaşmış hücrelerin daha fazla oksidatif fosforilasyon yaptığı yönünde olsa da bu süreçte üretilen ROS'un kök hücre fonksiyonlarını baskılayabileceği unutulmamalıdır (Kobayashi ve Suda, 2012). Kök hücrelerin fonksiyonlarından birisi de farklı tipte hücreleri verebilmek olduğu düşünülürse yüksek seviyede ROS üretimi belirlediğimiz glukoz+aspartam ve aspartam+metformin gruplarında beta hücre farklılaşmasının aspartam grubuna göre anlamlı bir artış göstermemiş olması ROS'un hücre farklılaşmasını baskılayıcı etkisinden kaynaklanmış olabilir. Bu grupta total antioksidan kapasitesinin düşük olma ihtimali yüksek olmakla birlikte bu hipotezin doğrulanabilmesi için total antioksidan kapasite ölçülmelidir.

Çalışmamızda metformin, glukoz+metformin ve aspartam+glukoz+metformin gruplarında yüksek seviyede glikoliz ve oksidatif fosforilasyonun birlikte süregeldiği ve aynı zamanda hücre farklılaşmasının da belirgin olarak arttığı tespit edildi. Kök hücrelerin besin algılama yolları aracılığıyla oksidatif fosforilasyonu baskılayıp, glikolizi artırarak karakterlerini koruduğu bilinmektedir. Bu durumda, enerji kaynaklarının artması veya değişmesi kök hücrelerin karakterini etkileyerek farklılaşmasına neden olabilmektedir (Ochocki ve Simon, 2013). Farklılaşan hücrelerde süregelen mitokodriyal elektron taşıma sistemi ROS üretilmesine neden olur. Dolayısıyla yükselen ROS seviyeleri kök hücrelerin farklılaşmasıyla ilişkilendirilmektedir (Ryu ve diğ., 2015). Bu bilgilerden yola çıkarak metformin ve

aspartam+glukoz+metformin gruplarında hem pankreatik progenitör hücre popülasyonunun hem de beta hücre popülasyonunun arttığı düşünülebilir. Erişkin kök hücrelerin en iyi bilinen özelliklerinden birisi asimetrik hücre bölünmesi, yani farklılaştırıcı bir uyaran varlığında mitoz bölünme yoluyla oluşan iki hücreden birinin kök hücre olarak kalması diğersinin ise farklılaşmaya yönlendirilmesidir (Yamashita ve diğ., 2010). Bu bilgi hipotezimizi desteklemektedir. Glukoz+metformin grubunda laktat seviyesi artarken $NAD^+/NADH$ oranının azalması glikoliz sürecinde açığa çıkan NAD^+ 'ların bir kısmının krebs çevrimine yönlendirildiğini düşündürmekte ise de bu grupta ROS seviyelerinin değişmediği belirlenmiştir. Bu grupta total antioksidan kapasitenin artmış olması ihtimali yüksek olmakla birlikte bu hipotezin doğrulanabilmesi için total antioksidan kapasite ölçülmelidir.

İyi gelişmiş bir mitokondrinin olgunlaşmamış küresel bir mitokondriye göre daha verimli enerji yani ATP ürettiği düşünülmektedir. İyi gelişmiş bir mitokondri karmaşık krista yapısına sahip olduğundan, enerji üretimi için gereken proteinlerin yerleşebileceği daha geniş bir yüzey alanına sahiptir (Zick ve diğ., 2009). Kaynaşmış ve birbirine bağlı mitokondriyal yapıların enerji üretimi için esas olarak oksidatif fosforilasyonu kullanan hücrelerde bulunduğu gösterilmiştir (Rossignol ve diğ., 2004). Kaynaşık olmayan küresel mitokondri içeren hücrelerin esas olarak glikolitik metabolizma yoluyla enerji üretmeye eğilimli olduğu bilinmektedir (Collins ve diğ., 2002). Metabolik değişikliklere cevap olarak, mitokondriyal morfoloji, fisyon ve füzyon ile değişir. Mitokondriyal fisyon hücrelerin büyümesi ve bölünmesi sırasında yeterli miktarda mitokondrinin oluşturulması için gereklidir (Chang ve diğ., 2010). Mitokondriyal füzyon ise oksidatif fosforilasyon yapan hücrelerde daha sık ortaya çıkar (Rossignol ve diğ., 2004) ve hücre sağ kalımı için değil, normal gelişim için gereklidir (Chen ve Chan, 2010). Pluripotent kök hücre farklılaşması ve yeniden programlanması sırasında mitokondri ve metabolizmanın yeniden şekillenmesi söz konusudur. Pluripotent kök hücreler, elektronca az yoğun bir matris ile karakterize edilen perinükleer yerleşim gösteren, küresel az gelişmiş kristaya sahip olgunlaşmamış mitokondriler taşırlar. Pluripotent kök hücrelerde enerji üretimi temel olarak yüksek glikoliz yolu ile üretilir ve artan laktat üretimi oksidatif fosforilasyon aktivitesini sınırladığı için oksijen tüketimi ve ROS üretimi düşüktür. TCA döngüsüne substrat girişi sınırlıdır, glikolizin ara maddeleri pentoz fosfat yoluna girer ve hücrelerin kendini yenilemesini sürdürmek için gereken nükleotit sentezinde substrat olarak görev yapar. Farklılaşmış hücrelerde elektronca yoğun matris ve gelişmiş kristaya sahip gelişmiş bir mitokondriyal ağ sayesinde artan oksidatif fosforilasyon aktivitesi ile ATP üretimi

sağlanır. Sonuç olarak yüksek oksijen tüketimi, ROS üretimi ve düşük glikoliz yoluyla düşük laktat üretimi meydana gelir. Oksidatif fosforilasyonun inhibe edilmesi veya glikolizin uyarılması, indüklenmiş pluripotent hücrelere yeniden programlamayı desteklerken kök hücre farklılaşmasını engeller. Buna karşılık, mitokondriyal biyogenezin uyarılması hücre farklılaşmasını desteklerken, glikolizin baskılanması pluripotent hücrelere yeniden programlamayı bozar (Wanet ve diğ., 2015).

Mevcut çalışmada gruplar arasındaki mitokondriyal kütle farklılıkları mitokondrilerin MitoTracker Green işaretlenmesi yoluyla ölçüldü. Metformin uygulanan tüm gruplarda uygulanmayan gruplara göre mitokondriyal kütlede artış gözlenirse de bu artış yalnızca glukoz+metformin ve aspartam+glukoz+metformin gruplarında istatistiksel olarak anlamlıydı ve en belirgin artışın aspartam+glukoz+metformin grubunda meydana geldiği belirlendi. Yalnızca aspartam+glukoz+metformin grubunda ROS seviyelerindeki artış olarak mitokondriyal kütledeki artışın anlamlı paralellik gösteriyor olması bu grupta enerji üretiminin oksidatif fosforilasyon yoluyla gerçekleştiğini desteklemektedir. Glukoz+metformin grubundaki mitokondriyal kütle artışına karşın ROS üretiminin düşük seviyede olması anti-oksidan savunma sistemi aracılığıyla ROS'un indirgenmiş olma ihtimalini düşündürse de bu hipotezin doğrulanabilmesi için total antioksidan seviyelerinin ölçülmesi gerekmektedir. Diğer taraftan aspartam+glukoz, metformin ve aspartam+metformin gruplarında tespit edilen anlamlı ROS artışına karşın mitokondriyal kütlede anlamlı bir farklılığın tespit edilmemiş olması şaşırtıcı bir sonuçtur. Memeli hücrelerinde, mitokondriyal biyogenezin düzenlenmesi ile antioksidan sistemler arasındaki sıkı bağlantı iyi tanımlanmıştır. ROS aracılı mitokondriyal biyogenez artışı, mitokondriyal metabolizmanın artması nedeniyle hücrenin ROS üretiminden korunmasını sağlamak için yapılan düzenleyici bir mekanizma olarak ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte, bazı patolojilerde ve/veya mitokondriyal solunum zincirinin şiddetli disfonksiyonunda olduğu gibi aşırı oksidatif stres koşullarında, mitokondriyal biyogenezin azaldığı bildirilmiştir (Yoboue ve Devin, 2012). Bu bilgiler, glukoz+metformin ve aspartam+glukoz+metformin gruplarındaki nispeten düşük ROS seviyelerine karşın daha yüksek mitokondriyal kütle tespit edilmesinin düşük seviyelerde ROS'un bu gruplarda mitokondriyal biyogenezi uyarılabileceğini düşündürmektedir. Diğer taraftan, aspartam+glukoz, metformin ve aspartam+metformin gruplarında tespit edilen anlamlı ROS artışına karşın mitokondriyal kütlede anlamlı bir farklılığın tespit edilememiş olması ise aşırı ROS üretimine bağlı olarak mitokondriyal biyogenezin baskılandığını düşündürmektedir.

Çalışmamızda mitokondriyal kütlelerin yanı sıra gruplar arasındaki mitokondriyal protein seviyelerindeki değişimler de araştırıldı. UCP2'nin mitokondriyal kütle ile paralel değişim gösterdiği belirlendi. UCP2'nin mitokondriyal biyogenez, substrat kullanımı ve ROS eliminasyonunu düzenlediği bilinmektedir (Kukat ve diğ., 2014). Bu bilgi, yukarıda yer alan ROS ve mitokondriyal kütle tartışmasını desteklemektedir. MDH2 seviyeleri UCP2'den farklı olarak yalnız başına metformin uygulanan grupta da artış göstermiştir. Bu bulgu insülin⁺ hücre sayısındaki değişimler ile paralellik göstermektedir. MDH2, NAD⁺/NADH koenzim sisteminden yararlanarak malat ve oksaloasetatın birbirine dönüşmesini katalizler (Ban ve diğ., 2016). Dolayısıyla, krebs çevrimi ve ona bağlı olarak ilerleyen oksidatif fosforilasyonun önemli bir düzenleyicisidir. Metformin uygulanan tüm gruplarda NAD⁺/NADH oranının düşük iken MDH2 ve glukoz+metformin grubu hariç ROS seviyelerinin yüksek olması bu gruplarda oksidatif fosforilasyonun aktif olduğunu desteklemektedir. Glukoz+metformin grubunda düşük ROS seviyelerinin tespit edilmesi bu grupta antioksidan savunmanın aktif olduğunu düşündürmekte ise de bu hipotezin doğrulanması için total antioksidan kapasitenin ölçülmesi gerekmektedir. Sitrat sentaz mitokondride asetil Koenzim-A ve oksaloasetat'dan sitrat sentezini sağlar (Iacobazzi ve Infantino, 2014). Bu enzim sitrik asit döngüsünü hızlandırır (Wiegand ve Remington, 1986). Mevcut çalışmada yalnızca metformin uygulanan grupta sitrat sentaz seviyesinde artış belirlenmiştir. Suwa ve diğerlerinin (2006) metformin'in kas dokusunda AMPK fosforilasyonu aracılığıyla sitrat sentaz aktivitesini artırdığını rapor etmiş olmaları bulgumuzu desteklemektedir.

Mitokondriyal disfonksiyonun pankreas adacık gelişimi ve diyabet gelişimindeki rolü ile ilgili çalışmalar (Simmons, 2006) dikkat çekmekte ise de moleküler mekanizmalar hala iyi anlaşılmamıştır. UCP1'in bir proton taşıyıcısı olduğu ve kahverengi yağ dokusunda bir UCP olarak rol aldığı iyi bilmesine karşın, UCP2'nin mitokondriyal eşleşme aktivitesinin olmadığı veya çok az olduğu, bu proteinin daha çok bir metabolit taşıyıcısı olarak görev yaptığı gösterilmiştir (Vozza ve diğ., 2014). UCP2 dalak, akciğer, mide, pankreas ve yağ dokusunda ifade edilir (Pecqueur ve diğ., 2008; Robson-Doucette ve diğ., 2011). Birkaç çalışma UCP2'nin bir ROS baskılayıcısı olduğunu göstermektedir (Arsenijevic ve diğ., 2000; Pecqueur ve diğ., 2008). Ek olarak UCP2, kemirgen embriyonik fibroblastlarında (Pecqueur ve diğ., 2008) ve farklı kanser hücrelerinde (Esteves ve diğ., 2014) glikoliz ile oksidatif fosforilasyon arasındaki dengeyi düzenleyebilir. Son zamanlarda, insanlarda *UCP2* mutasyonlarının doğuştan var olan hiperinsülinizm ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (González-Barroso ve diğ., 2008). Farelerde,

UCP2 yokluğunun insülin sekresyonunun artmasına yol açtığı bildirilmiştir (Zhang ve diğ., 2001). UCP2'nin nakavt edilmesi endokrin hücre sayısında artışa neden olur ve bu fenotip yüksek yağlı diyetle güçlendirilebilir (Joseph ve diğ., 2002). Tüm bu bilgiler UCP2'nin pankreatik gelişimde önemli olduğunu göstermektedir. Son olarak Broche ve diğerleri (2018), UCP2 nakavt farelerde yaptıkları araştırmada fetüs pankreas boyutunda artış ile birlikte kontrol gruba göre daha fazla sayıda alfa ve beta hücrelerinin varlığını göstermişlerdir. Bu fenotipin PDX1⁺ progenitör hücrelerin artıstan kaynaklandığı sonucuna varmışlardır. Ayrıca UCP2 mutant fetüslerde nuklear faktör erythroid 2 ile ilişkili faktör 2 (NRF2)'nin nuklear translokasyonu ROS üretiminin artmış olduğunu düşündürmüştür. Ayrıca, ROS'un hedefi olan AKT'nin fosforilasyonun da gösterilmiş olmasıyla UCP2'nin ROS-AKT sinyal yolu aracılığıyla pankreas gelişimini kontrol ettiği iddia edilmiştir. Çalışmamızda, metformin uygulanan tüm gruplarda beta hücre farklılaşması tespit edilirken tek başına metformin uygulanan grup hariç diğer metformin uygulanan gruplarda UCP2 seviyesinin artmış olduğu belirlendi. Gen ekspresyonu seviyesinde yalnızca metformin verilen grupta diğer metformin verilen gruplardan daha fazla *PAX4* ve *PDX1*, daha düşük *NKX2.2* ifade edildiği belirlendi. Bu bulgu, yalnızca metformin uygulanan gruptaki hücrelerin ileri seviyede farklılaşmış hücreler olduğunu düşündürmektedir ve Broche ve diğerlerinin (2018) elde ettiği bulgular hipotezimizi desteklemektedir.

Aspartam, glukoz ve metformin ile uyarılan beta hücre farklılaşmasının moleküler mekanizmasını ortaya koyabilmek amacıyla glukoz ve aspartam'ın algılandığı tatlı tat reseptör alt ünitelerindeki değişimleri araştırdık. Tatlı tat reseptörünün T1R2 alt ünitesinde kontrol grubuna göre diğer gruplarda istatistiksel olarak bir değişiklik saptanmadı. T1R3 alt ünitesinin aspartam+glukoz grubunda azaldığı ve glukoz+metformin grubu hariç diğer metformin uygulanan gruplardaki azalmanın da anlamlı olduğu tespit edildi. Bu bulgular aspartam ile birlikte glukoz uygulanmasının T1R3 seviyelerini azaltarak tatlı tat sinyalinde bir azalmaya neden olabileceğini düşündürdü. Aspartam ve glukozun birlikte oluşturduğu güçlü tat uyarısının T1R3'ü baskılayarak bir nevi tatlı tat direnci oluşturması olasıdır. Metformin grubunda T1R3 seviyesinin düşük olması ve metformin ile birlikte glukoz uygulanmasının bu azalmayı engellemesi glukoz+metformin grubunda tatlı tat sinyalinin daha kuvvetli algılandığını düşündürdü. GLUT1 ve glukoz alımı seviyelerinin bu grupta yüksek olması bu hipotezi güçlendirmektedir. Literatüre bakıldığında metformin'in glukoz taşıyıcıları ve glukoz

alımını üzerine olan etkilerinin genel olarak ince barsak emici hücrelerinde araştırıldığı görüyoruz. Bir çalışmada izole sıçan jejunal hücrelerde metformin'in GLUT2, AMPK aktivasyonu ve glukoz alımı üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Sonuç olarak metformin'in glukoz varlığında sodyuma bağlı glukoz taşıyıcı-1 (SGLT1)'i azaltırken AMPK aktivasyonunu, GLUT2'yi ve glukoz alımını artırdığı gösterilmiştir (Sakar ve diğ., 2010). Metformin'in glukoz taşıyıcıları üzerine benzer etkilerini ince barsak hücrelerinde gösteren birçok çalışma mevcut olmasına rağmen moleküler mekanizma halen tam olarak anlaşılammıştır. Bir çalışmada ZDF sıçanlarda ileal T1R3 transkripsiyonu azalırken GLUT2'nin transkript seviyelerinin artmış olması bağırsakta tatlı tat algılama reseptör ekspresyonunun glukoz metabolizması ile ilişkili olduğunu düşündürmüştür (Feng ve diğ., 2017). Bu bulgu yüksek glukoz varlığında artan oksidatif fosforilasyona bağlı olarak yükselen ROS seviyelerinin T1R3 ekspresyonunu baskılama olasılığını düşündürmektedir. Ancak, literatürde bu hipotezi destekleyecek bir çalışmaya rastlanmamıştır. Mevcut çalışmada metformin+glukoz uygulanan grup haricinde tüm metformin uygulanan gruplarda ROS seviyelerinin artmış olmasına karşın T1R3 seviyelerinin azalmış olması bu hipotezimizi doğrulamaktadır. İlâveten GLUT1 ve glukoz alım seviyelerinin de T1R3 ile paralel değişim göstermesi metformin ile uyarılan metabolik değişiklikler sonucunda tatlı tat algılama yolağının düzenlendiğini açıkça göstermektedir.

Mevcut çalışmada tatlı tat sinyali aracılığıyla aktifleşmesi öngörülen PLC β 2'nin glukoz uygulanan grup ile metformin uygulanan tüm gruplarda azaldığı tespit edildi. Sitoplazmik Ca⁺² seviyelerinin PLC β 2 bulgularına benzer olarak kontrole göre tüm gruplarda azaldığı, ancak Ca⁺² seviyesinin glukoz, aspartam ve aspartam+glukoz gruplarında metformin uygulanan gruplara göre daha yüksek olduğu belirlendi. Kalsiyuma bağımlı olarak aktifleştiği ve AMPK'yı uyardığı bilinen CAMKK2 seviyeleri aspartam ve metformin uygulanan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterirken, tek başına metformin uygulanan grup hariç diğer metformin uygulanan gruplarda anlamlı bir değişiklik göstermediği belirlendi. Bu bulgular, aspartam ve metformin gruplarında PLC β 2 aracılığıyla endoplazmik retikulumdan salınan Ca⁺² seviyesinin sinyali ilerletecek kadar yeterli olduğunu düşündürmekte ise de CAMKK2 seviyelerindeki artış bu enzimin aktif olduğunu göstermez. Bu noktada CAMKK2 aktivasyonunun ölçülmesi tabloyu netleştirmek için gereklidir. Metformin uygulanan gruplarda PLC β 2 aracılığıyla endoplazmik retikulumdan salınan düşük miktardaki Ca⁺² 'ye hücre dışına atılıyor ya da diğer organellere taşınıyor olabilir. Loubiere ve diğerlerinin (2017), kanser hücrelerinde metformin'in ER stresini, ER'den Ca⁺² salınmasını ve daha sonra mitokondriye

Ca^{2+} alımını indüklediğini ve böylece mitokondriyal şişmeye yol açtığını göstermiş olmaları ER'den salınan Ca^{2+} 'nin mitokondriye geçtiği hipotezini güçlendirmekte ise de bu olasılık teyide muhtaçtır. Ca^{2+} mitokondriyal metabolizmanın merkezi bir düzenleyicisidir; TCA döngüsündeki birkaç enzimin aktivitesini düzenler ve hücrelerin enerji metabolizmasının kontrolüne katılır (Bhosale ve diğ., 2015). Kalsiyum seviyeleri kas kasılması, apoptoz veya hücre proliferasyonu gibi biyolojik süreçleri sağlamak için sıkı bir şekilde düzenlenir. ER kalsiyum depolayan ana hücre içi organelidir. IP3 (inositol 1,4,5-trisfosfat), IP3 reseptörüne (IP3R) bağlanır ve kalsiyumun ER'den salınmasını sağlar. Mitokondri, sitozolik kalsiyum tamponlayıcısı olarak hareket eder, mitokondriye kalsiyum alımı Mitokondriyal Kalsiyum Uniporter (MCU)'ı içeren elektrojenik bir yolla gerçekleşir (Kirichok ve diğ., 2004). Mitokondriyal kalsiyum seviyelerindeki artış, apoptozun indüksiyonunda önemli rol oynayan mitokondriyal permeabilite geçiş porlarının (mPTP) açılmasına neden olur. Loubiere ve diğerleri (2017), ilginç olarak kanser hücrelerinde metformin'in mitokondriyal membran porlarının açılmasını önlediğini ve mitokondriyal biyogenezi indüklediğini göstererek metforminin zayıf bir pro-apoptotik etkiye sahip olduğunu öne sürmüşlerdir. Bu olasılığın değerlendirilebilmesi için mitokondriyal kalsiyum seviyelerinin ölçülmesigereklidir. Diğer bir olasılık ise metformin uygulanan gruplarda ER'den kalsiyum salınmasının PLC β 2/IP3 inhibisyonu nedeni ile baskılanarak ER stresinin engellenmesidir. Metformin'in ER stresini indirgeyici etkisi birçok çalışmada gösterilmiştir (Kim ve diğ., 2010; Simon-Szabó ve diğ., 2014). İnsan adacıklarının fosfolipaz C - inositol 1,4,5-trifosfat - Ca^{2+} (PLC-IP3-kalsiyum) aracılı yolun inhibe edilmesi yoluyla, hipergliseminin neden olduğu ER stresinden korunduğu ve böylece beta hücre fonksiyonunun geliştiğinin gösterilmiş olması da bu olasılığı kuvvetlendirmektedir (Madec ve diğ., 2013). Bu olasılığın değerlendirilmesi için ER stresi biyobelirleçleri glukoz ile düzenlenen protein (GRP) 78 ve C/-EBP homolog protein (CHOP) seviyelerinin ölçülmesi gereklidir.

Çalışmamızda tespit edilen Ca^{2+} seviyelerindeki azalma ile beta hücre farklılaşma oranları arasındaki ters ilişki dikkat çekicidir. 2010 yılında Resende ve arkadaşları hem farklılaşmamış hücrelerde hem de nöral progenitör hücrelerde hücre döngüsü ilerlemesi sırasında G1/S geçişinde Ca^{2+} seviyelerinin arttığını göstermiş olması çalışmamızda yüksek seviyede belirlediğimiz Ca^{2+} 'nin kök hücre karakterini destekleyici etkisini açıklamaktadır. Resende ve diğerleri (2010), IP(3)R tarafından yaratılan kalsiyum akışının, hem farklılaşmamış hücrelerde hem de nöral progenitör hücrelerde siklin seviyelerinin düzenlenmesinden ötürü hücre döngüsü

ilerlemesi ve proliferasyonunda rol oynayabileceği fikrini öne sürmüşlerdir. Sun ve diğerlerinin (2007) kemik farklılaşması ile kalsiyum seviyelerinin hızlı bir şekilde farklılaşmış insan osteoblastlarında gözlenen bir seviyeye düştüğünü göstermiş olmaları bulgularımızı desteklemektedir. Kalsiyum osilasyonları, insan MKH farklılaşması sırasında iki yönlü bir sinyal olarak hizmet vermektedir. Değişmiş bir kalsiyum osilasyon paterni, insan MKH farklılaşması için bir gösterge olabilirken, aynı zamanda insan MKH farklılaşmasının yönlendirilmesinde de rol oynar (Sun ve diğ., 2007).

Kalsiyum aracılı hücrel bilgi akışı, geniş bir sinyal yolu ağının koordineli aktivitesini gerektirir. CaMKK2, Ca²⁺/kalmodulin'e bağımlı bir proteindir ve CaMKI ve CaMKIV'in yanı sıra AMPK'yı da aktive eder (Hurley ve diğ., 2005). AMPK, alternatif olarak tümör baskılayıcı kinaz LKB1 tarafından da Thr172 kalıntısında fosforilasyon yolu ile aktive edilir. AMP seviyesinin artması enerji açığı temsil eder ki LKB1'in aracılık ettiği AMPK allosterik aktivasyonunu ve net Thr172 fosforilasyonunu teşvik eder. Yani LKB1-AMPK yolu bir enerji sensörü olarak hareket eder (Fogarty ve diğ., 2016). Mevcut projede CAMKK2 seviyelerinin aspartam veya metformin uygulanan hücrelerde belirgin bir artış gösterirken; LKB1'in glukoz, aspartam ve aspartam+glukoz grubunda belirgin olarak arttığı, buna karşın glukoz+metformin, metformin+aspartam ve aspartam+glukoz+metformin gruplarında anlamlı olarak azaldığı; p-AMPK(Thr172)'nin ise metformin grubunda belirgin olarak artış gösterdiği, glukoz+metformin grubunda ise glukoz grubuna göre azaldığı belirlendi. İlginç olarak hem CAMKK2 hem de LKB1 uyarınının yüksek olduğu aspartam+glukoz grubunda p-AMPK(Thr172) seviyelerinde bir değişiklik belirlenmemiştir. Bilindiği üzere AMPK'nın ana uyarıcısı AMP seviyelerinin yükselmesidir, ATP ve/veya ADP seviyelerinin yüksek olması durumunda diğer AMPK aktivatörleri işlevlerini yeteri kadar gösteremeyebilirler. Hücrel ATP'yi tüketen tedaviler, LKB1-negatif tümörlerde AMPK'yi etkin bir şekilde aktive etmez, çünkü CAMKK2'nin bazal aktivitesi, AMPK(Thr172)'nin fosforilasyon durumunu etkilemek için yetersiz kalmaktadır, ancak ATP'nin tükenmesi nedeniyle AMP'deki artış, AMPK aktivasyonunu belirgin bir düzeye ulaştırabilir. Bununla birlikte, bu tedaviler hücre içi Ca²⁺'yi yükselten koşullar altında CAMKK2 aracılığıyla AMPK aktivasyonuna neden olabilir. AMPK'nın Thr172 bakiyesindeki fosforilasyon/defosforilasyon dengesi AMPK'ya AMP veya ADP/ATP bağlanması ile düzenlenmektedir (Kim ve diğ., 2016). Sonuç olarak çalışmamızda yalnızca metformin uygulanan grupta AMPK'nın aktifleşmesi CAMKK2 aracılığıyla, glukoz+metformin grubunda glukozu göre azalması ise LKB1 aracılığıyla meydana geliyor

olabilir. Ancak, metformin'in enerji azalmasına neden olarak AMP seviyelerinin artmasına ve dolaylı olarak AMPK aktivasyonuna neden olduğu bilgisi göz önünde bulundurularak hücre içi AMP seviyelerinin ölçülmesi ile tablo netleştirilebilir.

AMPK'nın yanı sıra AKT, metabolik strese yanıt veren diğer bir moleküldür. AMPK, metabolizmayı yeniden canlandıran, redoks dengesini koruyan ve enerji algılayan bir faktör iken, AKT besin maddelerinin bol miktarda bulunduğu ortamlarda enerji üretimini yaygınlaştırmaktadır, ancak AKT'nin metabolik stres altında oynadığı rol tartışmalıdır. Son çalışmalar, AMPK ve AKT'nin metabolik stres altında antagonistik role sahip olduklarını göstermektedir. Metabolik stres kaynaklı ROS sinyali metabolik yeniden programlama ve redoks homeostazi mekanizmalarının merkezindedir. AMPK antioksidan üretimini, hücre içine glukoz alınmasını ve glikolizi artırır. mTOR ve FOXO, AMPK'nin iki ana efektörüdür. AMPK, protein sentezi inhibisyonunu ve otofaji aktivasyonunu indükleyen mTOR aktivitesini inhibe eder. AMPK ayrıca geliştirilmiş antioksidan üretim ve glukoz metabolizması yoluyla redoks dengesini korumak için FOXO aktivitesini de desteklemektedir. Diğer taraftan AKT, mTOR ve FOXO aktivitesini düzenlemek için antagonistik etki gösterir. AKT, glukoz metabolizmasını ve protein sentezini artırmak için artan ROS üretimine yol açan mTOR sinyalini uyarır, aynı zamanda FOXO aktivitesini inhibe eder ve ROS toksisitesine duyarlılığı sağlar. AMPK ve AKT fosforilasyonlarının karşılıklı olarak birbirini negatif yönde etkilediği bilinmektedir. Aktif AKT, AMPK'yı Ser-485/491 kalıntılarından fosforile ederek Thr-172 aktif alanının LKB1 veya CaMMK'ye erişmesini önler. AMPK ise insülin reseptör substratı 1 (IRS1) fosforilasyonu aracılığıyla AKT sinyallemesini inhibe eder (Zhao ve diğ., 2017). Mevcut projede metformin uygulanan gruplarda AKT'nin Thr308 ve Ser473 bakiyelerinin fosforilasyonunda azalma olduğu yani AKT'nin bu gruplarda inaktifleştiği, metformin uygulanmayan gruplarda ise AKT Th308 ve S473 fosforilasyonunun korunduğu yani AKT'nin bu gruplarda aktif olduğu belirlendi. Metformin'in AKT aktivasyonunu baskılayıcı etkisinin doğrudan AMPK aracılı fosforilasyon ile ilgili olduğu meme kanseri hücrelerinde gösterilmiştir (Zakikhani ve diğ., 2010). İlginç olan mevcut projede yalnızca metformin uygulanan grupta AMPK aktif iken, diğer metformin uygulanan gruplarda da AKT inhibisyonunun gözleniyor olmasıdır. Bu bulgu, metformin ile uyarılan AKT inhibisyonunun AMPK'dan bağımsız olarak da gerçekleşebildiğinin bir göstergesidir. Bu noktada fosfataz ve tensin homoloğu (PTEN) gibi ana AKT düzenleyicilerinin seviyelerindeki değişimleri araştırmak gerekmektedir. Luo ve

diğerlerinin (2017) metformin'in endotel hücre hattında PTEN seviyelerini artırdığını göstermiş olmaları hipotezimizi desteklese de bu olasılık teyide muhtaçtır.

Mevcut çalışmada, AMPK tarafından baskılandığı ve AKT tarafından aktiveleştirildiği bilinen mTOR'un aktif formu p-mTOR(Ser2448) seviyeleri ile ilgili yapılan ölçümlerde glukoz ile glukoz+metformin gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artışın meydana geldiği belirlendi. Glukoz uygulanan hücrelerde aktif AMPK seviyelerinin değişmemesine karşın aktif AKT seviyelerindeki artış mTOR aktivasyonunu açıklamaktadır. Ancak, glukoz+metformin grubunda aktif AMPK seviyelerinin değişmemesi ve aktif AKT seviyelerindeki azalmaya karşın artan mTOR aktivasyonu başka bir molekül aracılığıyla gerçekleşmiş olabilir. Bu noktada, metformin'in AKT'yi inhibe edici etkisinin yanı sıra, yüksek seviyede bulunan glukozun mTOR'u uyarıcı etkisinin (Leontieva ve diğ., 2014) devreye girmesi olasıdır. Ayrıca mTORC1, transkripsiyon faktörü hipoksi ile indüklenebilir faktör (HIF1) aracılığı ile glukoz alımı ve glikolizi uyarır (Düvel ve diğ., 2010). Mevcut çalışmada mTOR aktivitesinin arttığı belirlenen glukoz+metformin grubunda glukoz alımı ve glikolizin artmış olması bu bilgi ile uyumlu bir sonuçtur. Diğer taraftan, glukoz uygulanan grupta mTOR aktivitesindeki artış glukoz alımı ve glikolizi etkilememiştir. Fare MKH'lerinde yüksek glukoz seviyelerinin hipoksi ile indüklenen HIF1 alfa'nın ekspresyonunu zayıflattığı bildirilmiştir (Ishizuka ve diğ., 2011). Bu bilgi yalnızca glukoz uygulanan hücrelerde HIF1 alfa'nın baskılanması sonucunda glukoz alımı ve glikolizin değişmemiş olabileceğini düşündürse de net bir sonuca ulaşabilmek için HIF1 alfa seviyelerinin ölçülmesi gerekmektedir. mTORC1, beta hücre büyümesini ve çoğalmasını uyarmasından dolayı, beta hücre kütlelerinin pozitif bir düzenleyicisi olarak kabul edilmiştir. *In vivo* mTOR fonksiyon kaybı çalışmaları, özellikle beta hücrelerinde veya pankreas endokrin progenitor hücrelerinde mTOR nakavt farelerde incelenmiştir (Elghazi ve diğ., 2017). Bu fareler azalmış beta hücre kütleleri, kusurlu postnatal adacık gelişimi, hipoinsülinemi ve glukoz intoleransı sergiler (Blandino-Rosano ve diğ., 2017; Sinagoga ve diğ., 2017). Bu gözlemler, mTOR'un adacık gelişimi ve fonksiyonu ve dolayısıyla glukoz homeostazı için kritik olduğunu göstermektedir. Mevcut çalışmada, mTOR aktivasyonunun yalnızca glukoz ve glukoz+metformin gruplarında tespit edilmesine karşın, glukoz grubunda beta hücre farklılaşmasının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ve gen ekspresyon profilinin kontrol grubuna çok yakın olduğu belirlenmiştir. Dahası diğer gruplarda beta hücre farklılaşması tespit edilmiş olmasına rağmen mTOR aktivasyonunda artış belirlenmemiştir.

Elde edilen bu sonuç deney modellerinin farklılığından kaynaklanmış olabilir. *In vivo* ortamda bulunan birçok faktörün sonucu değiştirebileceği açıktır.

AKT doğrudan fosforilasyon yoluyla FOXO transkripsiyon faktörlerinin hedef genlerinin ekspresyonunu uyarmasını engeller (Hay, 2011). Çalışmamızda FOXO1'in nuklear fraksiyonda metformin ve glukoz+metformin gruplarında belirgin bir artış gösterdiği belirlendi. Metformin uygulanan tüm gruplarda AKT inaktif iken yalnızca metformin ve glukoz+metformin gruplarında FOXO1'in nukleusa geçişi metformin ile birlikte aspartam uygulanan gruplarda FOXO1 fosforilasyonunu sağlayan farklı moleküllerin fonksiyonel olduğunu düşündürmektedir. ROS ve benzeri diğer stres kaynaklı uyarılar fosforilasyon ve asetilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlar aracılığıyla FOXO aktivitesini çeşitli seviyelerde değiştirebilir (Klotz ve diğ., 2015). FOXO'ların ERK katalizli fosforilasyonu sitoplazmik translokasyona ve Mdm2-bağımlı proteazomal degradasyona neden olabilir (Yang ve diğ., 2008). FOXO1'in nakavt edilmesi, fare pankreatik prekürsör hücrelerinden türetilmiş beta hücrelerinin sayısını artırmıştır (Talchai ve Accili, 2015). Dahası FOXO1 inhibisyonu, *in vitro* insan fetal pankreas öncü hücrelerinden üretilen hücrelerde beta hücre belirteçlerinin ekspresyonunu artırmıştır (Jiang ve diğ., 2017). Ek olarak, fare pankreatik öncü hücrelerinde FOXO1'in aşırı ekspresyonu, *in vivo* pankreas hipoplazisine yol açmıştır (Kitamura ve diğ., 2019). Bu bilgilere dayanarak, FOXO1'in pankreatik progenitor hücrelerin beta hücrelerine farklılaştırılmasında negatif bir düzenleyici olduğu düşünülebilir. Ancak, metformin ve glukoz+metformin gruplarında FOXO1 seviyelerindeki artış ile birlikte beta hücre farklılaşmasında da artış gözlenmesi bu bilgiler ile ters düşmektedir. Zhang ve diğerleri (2016), FOXO1'in beta hücre kompenzasyonunu beta hücre kütlelerini artırarak, glukoz algılanmasını geliştirerek ve antioksidan savunmayı artırarak desteklediğini göstermişlerdir. Bu noktada metformin ve glukoz+metformin gruplarında FOXO1'in PAK-PH'lerden farklılaşan yeni beta hücrelerinde metabolik strese karşı savunmayı desteklediği düşünülebilir. Bu hipotezin doğrulanabilmesi için total antioksidan kapasitenin ölçülmesi gereklidir.

Sonuç olarak PAK-PH'lerde;

- Aspartam ve aspartam+glukoz uygulanmasının istatistiksel olarak anlamlı oranlarda beta hücre farklılaşmasına neden olduğu, metformin'in tek başına veya diğer uyarımlarla birlikte uygulanmasının ise daha yüksek oranda beta hücre farklılaşmasını sağladığı tespit edilmiştir.
- GLUT1 inhibisyonunun aspartam+metformin ve aspartam+glukoz+metformin gruplarında beta hücre farklılaşmasını baskıladığının tespit edilmiş olması aspartam ve metformin varlığında GLUT1'in beta hücre farklılaşmasında önemli bir rol oynadığını göstermektedir.
- Beta hücre farklılaşması sırasında anaerobik glikolizden oksidatif fosforilasyona geçiş şeklinde gerçekleşen bir metabolik yeniden programlanma söz konusudur. Özellikle glukoz, aspartam ve aspartam+glukoz gruplarında kontrol grubuna daha yakın bir metabolik profilin gözlenmesi ile bu gruplarda farklılaşan hücrelerin yanı sıra PAK-PH'lerin sayıca fazla olabileceğini düşündürmektedir.
- Metformin uygulanan tüm gruplarda uygulanmayan gruplara göre mitokondriyal kütlede artış gözlenirse de bu artış yalnızca glukoz+metformin ve aspartam+glukoz+metformin gruplarında istatistiksel olarak anlamlıdır, en belirgin artışın aspartam+glukoz+metformin grubunda meydana geldiği ve UCP2'nin mitokondriyal kütle ile paralel değişim gösterdiği belirlenmiştir.
- Glukoz sinyali T1R2/T1R3 ile algılanmaktadır, ancak sitoplazmik Ca^{+2} seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla azalması bu grupta tat algılama yolağının baskılandığını düşündürmektedir. Bu grupta AKT aktivitesindeki korunma ve mTOR aktivitesindeki artış glukoz alımı ve glikolizi etkilememiştir. Yalnızca glukoz uygulanan hücrelerde HIF1 alfa'nın baskılanması sonucunda glukoz alımı ve glikolizin değişmemiş olması mümkün görünse de net bir sonuca ulaşabilmek için HIF1 alfa seviyelerinin ölçülmesi gerekmektedir.
- Aspartam+glukoz+metformin grubu hariç T1R2 alt ünitesinin seviyelerinin korunuyor olması sinyalin baskın olarak bu alt ünite aracılığıyla algılandığını düşündürmektedir.

- Aspartam grubunda sitoplazmik Ca^{+2} seviyeleri kontrol grubuna kıyasla düşük olsa da Ca^{+2} ile aktive olan CAMKK2'nin belirgin olarak artmış olması sitoplazmada tatlı tat sinyalini iletmeye yetecek kadar Ca^{+2} 'nin bulunduğunu düşündürmektedir. Bu grupta PLC β 2 seviyesinin korunması da tatlı tat sinyalinin tamamen baskılanmadığının diğer bir göstergesidir. Aspartam uygulanan hücrelerde LKB1 ve CAMKK2 seviyelerindeki artışa rağmen p-AMPK(Thr172) seviyelerinde artış gözlenmemiş olması AMPK'nın birincil uyararı olan AMP seviyelerinde azalma olabileceğini düşündürmekte ise de bu hipotez teyide muhtaçtır.
- Aspartam+glukoz grubunda LKB1 seviyelerinde belirgin bir artış gözlenirken p-AMPK(Thr172) seviyelerinin değişmemiş olması LKB1'in aktivasyonuna rağmen AMPK'yı baskılayan araçların varlığına işaret etmektedir ki en olası baskılayıcı ATP ve/veya ADP seviyelerindeki artışa karşın AMP seviyelerinin azalmasıdır. Bu grupta glukoz grubuna benzer olarak AKT ve glikoliz enzimlerinin ekspresyonundaki korunma dikkat çekmektedir.
- Metformin uygulanan gruplarda en belirgin değişiklik sitoplazmik Ca^{+2} seviyelerinin belirgin olarak azalmasıdır. Bu gruplarda Ca^{+2} 'nin endoplazmik retikulumdan salınıp salınmadığı, salınıyorsa mitokondriye veya hücre dışına geçme olasılığı araştırılmalıdır.
- Metformin grubunda CAMKK2 aracılığı ile artan AMPK aktivasyonu dikkati çekmektedir.
- Metformin ve glukoz+metformin gruplarında FOXO1 seviyelerindeki artış antioksidan savunmaya işaret etmektedir.
- Glukoz+metformin grubunda laktat seviyesi artarken $NAD^+/NADH$ oranının azalması glikoliz sürecinde açığa çıkan NAD^+ 'ların bir kısmının krebs çevrimine yönlendirildiğini düşündürmekte ise de bu grupta ROS seviyelerinin değişmediği belirlenmiştir. Bu grupta total antioksidan kapasitenin artmış olması ihtimali yüksektir. Bu hipotezin doğrulanması için total antioksidan kapasite ölçülmelidir.
- Glukoz+metformin grubunda aktif AMPK seviyelerinin değişmemesi ve aktif AKT seviyelerindeki azalmaya karşın artan mTOR aktivasyonunun yüksek seviyede bulunan glukoz aracılığıyla meydana gelmesi olasıdır.

- Yalnızca metformin uygulanan grupta AMPK aktif iken, diğer metformin uygulanan gruplar da dahil olmak üzere tüm metformin uygulanan gruplarda AKT inhibisyonunun gözleniyor olması metformin ile uyarılan AKT inhibisyonunun AMPK'dan bağımsız olarak da gerçekleşebildiğinin bir göstergesidir. PTEN gibi ana AKT düzenleyicilerinin seviyelerindeki değişimler ölçülerek ilgili mekanizma araştırılabilir.



KAYNAKLAR

- Aguayo-Mazzucato, C., Koh, A., El Khattabi, I., Li, W.C., Toschi, E., Jermendy, A., Juhl, K., Mao, K., Weir, G.C., Sharma, A. and Bonner-Weir, S., 2011, Mafa expression enhances glucose-responsive insulin secretion in neonatal rat beta cells, *Diabetologia*, 54(3),583-593.
- Ahlgren, U., Jonsson, J., Jonsson, L., Simu, K. and Edlund, H., 1998, β -Cell-specific inactivation of the mouse *Ipf1/PDX1* gene results in loss of the β -cell phenotype and maturity onset diabetes, *Genes & Development*, 12(12), 1763-1768.
- American Diabetes Association, 2004, Screening for type 2 diabetes, *Diabetes Care*, 27(suppl 1), s11-s14.
- American Diabetes Association. 2019, 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2019, *Diabetes Care*, 42(Suppl 1), S13.
- An, H. and He, L., 2016, Current understanding of metformin effect on the control of hyperglycemia in diabetes, *The Journal of Endocrinology*, 228(3), R97.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F. and Schreier, P.H., 1981, Sequence and organization of the human mitochondrial genome, *Nature*, 290(5806), 457.
- Arsenijevic, D., Onuma, H., Pecqueur, C., Raimbault, S., Manning, B.S., Miroux, B., Couplan, E., Alves-Guerra, M.C., Gubern, M., Surwit, R. and Bouillaud, F., 2000, Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production, *Nature Genetics*, 26(4), 435.
- Artner, I., Hang, Y., Mazur, M., Yamamoto, T., Guo, M., Lindner, J., Magnuson, M.A. and Stein, R., 2010, MafA and MafB regulate genes critical to β -cells in a unique temporal manner, *Diabetes*, 59(10), 2530-2539.
- Atkinson, M.A., Eisenbarth, G.S. and Michels, A.W., 2014, Type 1 diabetes, *The Lancet*, 383(9911), 69-82.
- Atlas, D., 2015, International diabetes federation, *IDF Diabetes Atlas, 7th edn. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation.*
- Attardi, G., 1985, Animal mitochondrial DNA: an extreme example of genetic economy. In *International Review of Cytology* (Vol. 93, 93-145), Academic Press.
- Ban, H.S., Xu, X., Jang, K., Kim, I., Kim, B.K., Lee, K. and Won, M., 2016, A novel malate dehydrogenase 2 inhibitor suppresses hypoxia-inducible factor-1 by regulating mitochondrial respiration, *PloS One*, 11(9), e0162568.
- Banko, M.R., Allen, J.J., Schaffer, B.E., Wilker, E.W., Tsou, P., White, J.L., Villén, J., Wang, B., Kim, S.R., Sakamoto, K. and Gygi, S.P., 2011, Chemical genetic screen for

- AMPK α 2 substrates uncovers a network of proteins involved in mitosis, *Molecular Cell*, 44(6), 878-892.
- Bastard, J.P., Maachi, M., Lagathu, C., Kim, M.J., Caron, M., Vidal, H., Capeau, J. and Feve, B., 2006, Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance, *European Cytokine Network*, 17(1), 4-12.
- Bellamy, L., Casas, J.P., Hingorani, A.D. and Williams, D., 2009, Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis, *The Lancet*, 373(9677), 1773-1779.
- Benitez, C.M., Goodyer, W.R. and Kim, S.K., 2012, Deconstructing pancreas developmental biology, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(6), a012401.
- Bhosale, G., Sharpe, J.A., Sundier, S.Y. and Duchon, M.R., 2015, Calcium signaling as a mediator of cell energy demand and a trigger to cell death, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1350(1), 107-116.
- Blandino-Rosano, M., Barbaresso, R., Jimenez-Palomares, M., Bozadjieva, N., Werneck-de-Castro, J.P., Hatanaka, M., Mirmira, R.G., Sonenberg, N., Liu, M., Rüegg, M.A. and Hall, M.N., 2017, Loss of mTORC1 signalling impairs β -cell homeostasis and insulin processing, *Nature Communications*, 8, 16014.
- Bonner-Weir, S., Taneja, M., Weir, G.C., Tatarkiewicz, K., Song, K.H., Sharma, A. and O'Neil, J.J., 2000, In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(14), 7999-8004.
- Bonner-Weir, S. and Sharma, A., 2002, Pancreatic stem cells, *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 197(4), 519-526.
- Boschero, A.C., Bordin, S., Sener, A. and Malaisse, W.J., 1990, D-glucose and L-leucine metabolism in neonatal and adult cultured rat pancreatic islets, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 73(1), 63-71.
- Boyer, R., 2004, *Metabolism and energy*, Concepts in biochemistry, 3rd ed., USA, ISBN: 13:978-0-471-66179-5.
- Broche, B., Fradj, S.B., Aguilar, E., Sancerni, T., Bénard, M., Makaci, F., Berthault, C., Scharfmann, R., Alves-Guerra, M.C. and Duvillié, B., 2018, Mitochondrial protein UCP2 controls pancreas development, *Diabetes*, 67(1), 78-84.
- Brownlee, M. 2003, A radical explanation for glucose-induced β cell dysfunction, *The Journal of Clinical Investigation*, 112(12), 1788-1790.
- Buck, M.D., 2016, O' Sullivan, D., Klein Geltink, RI, Curtis, JD, Chang, C. H., Sanin, DE, Qiu, J., Kretz, O., Braas, D., van der Windt, GJ et al, 63-76.
- Can, A., 2014a, *Kök hücre biyolojisi*, Kök Hücre- biyolojisi, türleri ve tedavide kullanımları, In: Can, A. (ed.), Bölüm 1, Akademisyen Tıp Kitabevleri, Ankara, Türkiye, ISBN: 978-605-4649-43-3, 39-47.

- Can, A., 2014b, *Kök hücrelerin yetişkin vücudundaki dağılımı ve tedavideki yerleri*, Kök Hücre-biyolojisi, türleri ve tedavide kullanımları, In: Can, A. (ed.), Bölüm 3, Akademisyen Tıp Kitabevleri, Ankara, Türkiye, ISBN: 978-605-4649-43-3, 333-361.
- Catalano, P.M., Tyzbir, E.D., Wolfe, R.R., Calles, J.O.R.G.E., Roman, N.M., Amini, S.B. and Sims, E.A., 1993, Carbohydrate metabolism during pregnancy in control subjects and women with gestational diabetes, *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 264(1), E60-E67.
- Cerf, M. E. 2015, High fat programming of beta cell compensation, exhaustion, death and dysfunction, *Pediatric Diabetes*, 16(2), 71-78.
- Chang, C. R. and Blackstone, C. 2010, Dynamic regulation of mitochondrial fission through modification of the dynamin-related protein Drp1, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1201(1), 34-39.
- Chen, C., Liu, Y., Liu, R., Ikenoue, T., Guan, K.L., Liu, Y. and Zheng, P., 2008, TSC–mTOR maintains quiescence and function of hematopoietic stem cells by repressing mitochondrial biogenesis and reactive oxygen species, *Journal of Experimental Medicine*, 205(10), 2397-2408.
- Chen, H. and Chan, D.C., 2010, Physiological functions of mitochondrial fusion, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1201(1), 21-25.
- Choudhary, A.K., 2018, Aspartame: should individuals with Type II Diabetes be taking it?, *Current Diabetes Reviews*, 14(4), 350-362.
- Collins, T. J., Berridge, M. J., Lipp, P. And Bootman, M. D. 2002, Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells, *The EMBO Journal*, 21(7), 1616-1627.
- Collombat, P., Hecksher-Sørensen, J., Krull, J., Berger, J., Riedel, D., Herrera, P.L., Serup, P. and Mansouri, A., 2007, Embryonic endocrine pancreas and mature β cells acquire α and PP cell phenotypes upon Arx misexpression, *The Journal of Clinical Investigation*, 117(4), 961-970.
- Comstock, S.M., Pound, L.D., Bishop, J.M., Takahashi, D.L., Kostuba, A.M., Smith, M.S. and Grove, K.L., 2013, High-fat diet consumption during pregnancy and the early post-natal period leads to decreased α cell plasticity in the nonhuman primate, *Molecular Metabolism*, 2(1), 10-22.
- Coskun, E., Ercin, M. and Gezginci-Oktayoglu, S., 2018, The Role of Epigenetic Regulation and Pluripotency-Related MicroRNAs in Differentiation of Pancreatic Stem Cells to Beta Cells, *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(1), 455-467.
- Cufi, S., Corominas-Faja, B., Vazquez-Martin, A., Oliveras-Ferraros, C., Dorca, J., Bosch-Barrera, J., Martin-Castillo, B. and Menendez, J.A., 2012, Metformin-induced preferential killing of breast cancer initiating CD44+ CD24-/low cells is sufficient to overcome primary resistance to trastuzumab in HER2+ human breast cancer xenografts, *Oncotarget*, 3(4), 395.

- Danial, N.N. and Korsmeyer, S.J., 2004, Cell death: critical control points, *Cell*, 116(2), 205-219.
- Dasgupta, B. and Milbrandt, J., 2009, AMP-activated protein kinase phosphorylates retinoblastoma protein to control mammalian brain development, *Developmental Cell*, 16(2), 256-270.
- De la Hunty, A., Gibson, S. and Ashwell, M., 2006, A review of the effectiveness of aspartame in helping with weight control, *Nutrition Bulletin*, 31(2), 115-128.
- de Matos Feijó, F., Ballard, C.R., Foletto, K.C., Batista, B.A.M., Neves, A.M., Ribeiro, M.F.M. and Bertoluci, M.C., 2013, Saccharin and aspartame, compared with sucrose, induce greater weight gain in adult Wistar rats, at similar total caloric intake levels, *Appetite*, 60, 203-207.
- DeFronzo, R.A., 2009, From the triumvirate to the ominous octet": a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus, *Clinical Diabetology*, 10(3), 101-128.
- DeFronzo, R.A., Ferrannini, E., Alberti, K.G.M.M., Zimmet, P. and Alberti, G. eds., 2015, *International Textbook of Diabetes Mellitus, 2 Volume Set* (Vol. 1). John Wiley & Sons.
- Diano, S. and Horvath, T.L., 2012, Mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2) in glucose and lipid metabolism, *Trends in Molecular Medicine*, 18(1), 52-58.
- Duvillié, B., Attali, M., Bounacer, A., Ravassard, P., Basmaciogullari, A. and Scharfmann, R., 2006, The mesenchyme controls the timing of pancreatic β -cell differentiation, *Diabetes*, 55(3), 582-589.
- Düvel, K., Yecies, J.L., Menon, S., Raman, P., Lipovsky, A.I., Souza, A.L., Triantafellow, E., Ma, Q., Gorski, R., Cleaver, S. and Vander Heiden, M.G., 2010, Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1, *Molecular Cell*, 39(2), 171-183.
- Easley IV, C.A., Ben-Yehudah, A., Redinger, C.J., Oliver, S.L., Varum, S.T., Eisinger, V.M., Carlisle, D.L., Donovan, P.J. and Schatten, G.P., 2010, mTOR-mediated activation of p70 S6K induces differentiation of pluripotent human embryonic stem cells, *Cellular Reprogramming (Formerly "Cloning and Stem Cells")*, 12(3), 263-273.
- Eberhardt, M., Salmon, P., Von Mach, M.A., Hengstler, J.G., Brulport, M., Linscheid, P., Seboek, D., Oberholzer, J., Barbero, A., Martin, I. and Müller, B., 2006, Multipotential nestin and Isl-1 positive mesenchymal stem cells isolated from human pancreatic islets, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 345(3), 1167-1176.
- Elghazi, L., Blandino-Rosano, M., Alejandro, E., Cras-Méneur, C. and Bernal-Mizrachi, E., 2017. Role of nutrients and mTOR signaling in the regulation of pancreatic progenitors development, *Molecular Metabolism*, 6(6), 560-573.

- Ercin, M., 2017, *The in vitro investigation of molecular mechanism of pancreatic β -cell differentiation in the development of insulin resistance*, Thesis (M.Sc.), Istanbul University.
- Ercin, M., Sancar-Bas, S., Bolkent, S. and Gezginci-Oktayoglu, S., 2018, Tub and β -catenin play a key role in insulin and leptin resistance-induced pancreatic beta-cell differentiation, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1865(12), 1934-1944.
- Eсни, F., Ghosh, B., Biankin, A.V., Lin, J.W., Albert, M.A., Yu, X., MacDonald, R.J., Civin, C.I., Real, F.X., Pack, M.A. and Ball, D.W., 2004, Notch inhibits Ptf1 function and acinar cell differentiation in developing mouse and zebrafish pancreas, *Development*, 131(17), 4213-4224.
- Esteves, P., Pecqueur, C., Ransy, C., Esnous, C., Lenoir, V., Bouillaud, F., Bulteau, A.L., Lombes, A., Prip-Buus, C., Ricquier, D. and Alves-Guerra, M.C., 2014, Mitochondrial retrograde signaling mediated by UCP2 inhibits cancer cell proliferation and tumorigenesis, *Cancer Research*, 74(14), 3971-3982.
- Federation, I.D., 2013, IDF diabetes atlas, *Brussels: International Diabetes Federation*.
- Feng, R., Qian, C., Liu, Q., Jin, Y., Liu, L., Li, S., Liao, Y., Zhou, H., Liu, W., Rayner, C.K. and Ma, J., 2017, Expression of sweet taste receptor and gut hormone secretion in modelled type 2 diabetes, *General and Comparative Endocrinology*, 252, 142-149.
- Fernstrom, J.D., Munger, S.D., Sclafani, A., de Araujo, I.E., Roberts, A. and Molinary, S., 2012, Mechanisms for sweetness, *The Journal of Nutrition*, 142(6), 1134S-1141S.
- Ferrer, J. 2011, Glucose as a mitogenic hormone, *Cell Metabolism*, 13(4), 357-358.
- Fogarty, S., Ross, F.A., Ciruelos, D.V., Gray, A., Gowans, G.J. and Hardie, D.G., 2016, AMPK causes cell cycle arrest in LKB1-deficient cells via activation of CAMKK2, *Molecular Cancer Research*, 14(8), 683-695.
- Folmes, C.D., Nelson, T.J., Martinez-Fernandez, A., Arrell, D.K., Lindor, J.Z., Dzeja, P.P., Ikeda, Y., Perez-Terzic, C. and Terzic, A., 2011, Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency-dependent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming, *Cell Metabolism*, 14(2), 264-271.
- Fonseca, S.G., Gromada, J. and Urano, F., 2011, Endoplasmic reticulum stress and pancreatic β -cell death, *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 22(7), 266-274.
- Freinkel, N., Lewis, N.J., Johnson, R., Swenne, I., Bone, A. and Hellerström, C., 1984, Differential effects of age versus glycemic stimulation on the maturation of insulin stimulus-secretion coupling during culture of fetal rat islets, *Diabetes*, 33(11), 1028-1038.
- Gardner, C., Wylie-Rosett, J., Gidding, S.S., Steffen, L.M., Johnson, R.K., Reader, D. and Lichtenstein, A.H., 2012, Nonnutritive sweeteners: current use and health perspectives:

a scientific statement from the American Heart Association and the American Diabetes Association, *Circulation*, 126(4), 509-519.

Gascón, S., Murenu, E., Masserdotti, G., Ortega, F., Russo, G.L., Petrik, D., Deshpande, A., Heinrich, C., Karow, M., Robertson, S.P. and Schroeder, T., 2016, Identification and successful negotiation of a metabolic checkpoint in direct neuronal reprogramming, *Cell Stem Cell*, 18(3), 396-409.

Gezginci-Oktayoglu, S., Karatug, A. and Bolkent, S., 2012, The relation among NGF, EGF and insulin is important for triggering pancreatic β cell apoptosis, *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 28(8), 654-662.

Gezginci-Oktayoglu, S., Karatug, A. and Bolkent, S., 2015, Nerve growth factor neutralization suppresses β -cell proliferation through activin A and betacellulin, *Pancreas*, 44(2), 243-249.

Gezginci-Oktayoglu, S., Onay-Ucar, E., Sancar-Bas, S., Karatug-Kacar, A., Arda, E.S. and Bolkent, S., 2018, Involvement of dying beta cell originated messenger molecules in differentiation of pancreatic mesenchymal stem cells under glucotoxic and glucolipotoxic conditions, *Journal of Cellular Physiology*, 233(5), 4235-4244.

Githens, S. 1988, The pancreatic duct cell: proliferative capabilities, specific characteristics, metaplasia, isolation, and culture, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 7(4), 486-506.

Goertz, M. J., Wu, Z., Gallardo, T. D., Hamra, F. K., & Castrillon, D. H. 2011, Foxo1 is required in mouse spermatogonial stem cells for their maintenance and the initiation of spermatogenesis, *The Journal of Clinical Investigation*, 121(9), 3456-3466.

González-Barroso, M.M., Giurgea, I., Bouillaud, F., Anedda, A., Bellanné-Chantelot, C., Hubert, L., De Keyzer, Y., De Lonlay, P. and Ricquier, D., 2008, Mutations in UCP2 in congenital hyperinsulinism reveal a role for regulation of insulin secretion, *PLoS One*, 3(12), e3850.

Gosmain, Y., Marthinet, E., Cheyssac, C., Guérardel, A., Mamin, A., Katz, L.S., Bouzakri, K. and Philippe, J., 2010, Pax6 controls the expression of critical genes involved in pancreatic α cell differentiation and function, *Journal of Biological Chemistry*, 285(43), 33381-33393.

Goward, C.R. and Nicholls, D.J., 1994, Malate dehydrogenase: a model for structure, evolution, and catalysis, *Protein Science*, 3(10), 1883-1888.

Greer, E.L. and Brunet, A., 2005, FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression, *Oncogene*, 24(50), 7410.

Gregg, B., Elghazi, L., Alejandro, E.U., Smith, M.R., Blandino-Rosano, M., El-Gabri, D., Cras-Méneur, C. and Bernal-Mizrachi, E., 2014, Exposure of mouse embryonic pancreas to metformin enhances the number of pancreatic progenitors, *Diabetologia*, 57(12), 2566-2575.

- Gu, G., Brown, J.R. and Melton, D.A., 2003, Direct lineage tracing reveals the ontogeny of pancreatic cell fates during mouse embryogenesis, *Mechanisms of Development*, 120(1),35-43.
- Gu, C., Stein, G.H., Pan, N., Goebbels, S., Hörnberg, H., Nave, K.A., Herrera, P., White, P., Kaestner, K.H., Sussel, L. and Lee, J.E., 2010, Pancreatic β cells require NeuroD to achieve and maintain functional maturity, *Cell Metabolism*, 11(4), 298-310.
- Hald, J., Sprinkel, A.E., Ray, M., Serup, P., Wright, C. and Madsen, O.D., 2008, Generation and characterization of Ptf1a antiserum and localization of Ptf1a in relation to NKX6. 1 and PDX1 during the earliest stages of mouse pancreas development, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 56(6), 587-595.
- Harrison, D.E., Strong, R., Sharp, Z.D., Nelson, J.F., Astle, C.M., Flurkey, K., Nadon, N.L., Wilkinson, J.E., Frenkel, K., Carter, C.S. and Pahor, M., 2009, Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice, *Nature*, 460(7253), 392.
- Harvey, A.J., Rathjen, J. and Gardner, D.K., 2016, Metaboloepigenetic regulation of pluripotent stem cells, *Stem Cells International*, 2016.
- Haumaitre, C., Lenoir, O. and Scharfmann, R., 2008, Histone deacetylase inhibitors modify pancreatic cell fate determination and amplify endocrine progenitors, *Molecular and Cellular Biology*, 28(20), 6373-6383.
- Hay, N., 2011, Interplay between FOXO, TOR, and Akt, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813(11), 1965-1970.
- Hesselson, D., Anderson, R.M. and Stainier, D.Y., 2011, Suppression of Ptf1a activity induces acinar-to-endocrine conversion, *Current Biology*, 21(8), 712-717.
- Hole, R.L., Pian-Smith, M.C. and Sharp, G.W., 1988, Development of the biphasic response to glucose in fetal and neonatal rat pancreas, *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 254(2), E167-E174.
- Horenstein, R.B. and Shuldiner, A.R., 2004, Genetics of diabetes, *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 5(1), 25-36.
- <http://www.nhvweb.net/nhhs/science/wking/files/2011/09/cell-resp-2.pdf>
- <https://byjus.com/biology/glycolysis/>
- <https://images.app.goo.gl/4qsZyFrFh5cNAsRd8>
- <https://www.memorangapp.com/flashcards/21141/Biochemistry+Pentose+Phosphate+Pathway/>
- Hull, R.L., Kodama, K., Utschneider, K.M., Carr, D.B., Prigeon, R.L. and Kahn, S.E., 2005, Dietary-fat-induced obesity in mice results in beta cell hyperplasia but not increased insulin release: evidence for specificity of impaired beta cell adaptation, *Diabetologia*, 48(7), 1350-1358.

- Hurley, R.L., Anderson, K.A., Franzone, J.M., Kemp, B.E., Means, A.R. and Witters, L.A., 2005, The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases, *Journal of Biological Chemistry*, 280(32), 29060-29066.
- Iacobazzi, V. and Infantino, V., 2014, Citrate—new functions for an old metabolite, *Biological Chemistry*, 395(4), 387-399.
- International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Consensus Panel, 2010, International association of diabetes and pregnancy study groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy, *Diabetes Care*, 33(3), 676-682.
- Inzucchi, S.E., Bergenstal, R.M., Buse, J.B., Diamant, M., Ferrannini, E., Nauck, M., Peters, A.L., Tsapas, A., Wender, R. and Matthews, D.R., 2012, Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach: position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD), *Diabetes Care*, 35(6), 1364-1379.
- Ishizuka, T., Hinata, T. and Watanabe, Y., 2011, Superoxide induced by a high-glucose concentration attenuates production of angiogenic growth factors in hypoxic mouse mesenchymal stem cells, *Journal of Endocrinology*, 208(2), 147.
- Iyyaswamy, A. and Rathinasamy, S., 2012, Effect of chronic exposure to aspartame on oxidative stress in brain discrete regions of albino rats, *Journal of Biosciences*, 37(4), pp.679-688.
- Jaacks, L.M., Siegel, K.R., Gujral, U.P. and Narayan, K.V., 2016, Type 2 diabetes: a 21st century epidemic, *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 30(3), 331-343.
- Jiang, Z., Tian, J., Zhang, W., Yan, H., Liu, L., Huang, Z., Lou, J. and Ma, X., 2017, Forkhead protein FoxO1 acts as a repressor to inhibit cell differentiation in human fetal pancreatic progenitor cells, *Journal of Diabetes Research*, 2017.
- Johansson, K.A., Dursun, U., Jordan, N., Gu, G., Beermann, F., Gradwohl, G. and Grapin-Botton, A., 2007, Temporal control of neurogenin3 activity in pancreas progenitors reveals competence windows for the generation of different endocrine cell types, *Developmental Cell*, 12(3), 457-465.
- Joseph, J.W., Koshkin, V., Zhang, C.Y., Wang, J., Lowell, B.B., Chan, C.B. and Wheeler, M.B., 2002, Uncoupling protein 2 knockout mice have enhanced insulin secretory capacity after a high-fat diet, *Diabetes*, 51(11), 3211-3219.
- Kahn, B.B., Alquier, T., Carling, D. and Hardie, D.G., 2005, AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism, *Cell Metabolism*, 1(1), 15-25.
- Kalaitzidis, D., Sykes, S.M., Wang, Z., Punt, N., Tang, Y., Ragu, C., Sinha, A.U., Lane, S.W., Souza, A.L., Clish, C.B. and Anastasiou, D., 2012, mTOR complex 1 plays critical roles in hematopoiesis and Pten-loss-evoked leukemogenesis, *Cell Stem Cell*, 11(3), 429-439.

- Kapahi, P., Chen, D., Rogers, A.N., Katewa, S.D., Li, P.W.L., Thomas, E.L. and Kockel, L., 2010, With TOR, less is more: a key role for the conserved nutrient-sensing TOR pathway in aging, *Cell Metabolism*, 11(6), 453-465.
- Karaoz, E., Ayhan, S., Gacar, G., Aksoy, A., Duruksu, G., Okçu, A., Demircan, P.Ç., Sariboyaci, A.E., Kaymaz, F. and Kasap, M., 2010, Isolation and characterization of stem cells from pancreatic islet: pluripotency, differentiation potential and ultrastructural characteristics, *Cytotherapy*, 12(3), 288-302.
- Kenyon, C.J., 2010, The genetics of ageing, *Nature*, 464(7288), 504.
- Khacho, M., Clark, A., Svoboda, D.S., Azzi, J., MacLaurin, J.G., Meghaizel, C., Sesaki, H., Lagace, D.C., Germain, M., Harper, M.E. and Park, D.S., 2016, Mitochondrial dynamics impacts stem cell identity and fate decisions by regulating a nuclear transcriptional program, *Cell Stem Cell*, 19(2), 232-247.
- Kim, D.S., Jeong, S.K., Kim, H.R., Kim, D.S., Chae, S.W. and Chae, H.J., 2010, Metformin regulates palmitate-induced apoptosis and ER stress response in HepG2 liver cells, *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 32(2), 251-257.
- Kim, J., Yang, G., Kim, Y., Kim, J. and Ha, J., 2016, AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities, *Experimental & Molecular Medicine*, 48(4), e224.
- Kippin, T.E., Martens, D.J. and van der Kooy, D., 2005, p21 loss compromises the relative quiescence of forebrain stem cell proliferation leading to exhaustion of their proliferation capacity, *Genes & Development*, 19(6), 756-767.
- Kirichok, Y., Krapivinsky, G. and Clapham, D.E., 2004, The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel, *Nature*, 427(6972), 360.
- Kitamura, T., Kitamura, Y.I., Kobayashi, M., Kikuchi, O., Sasaki, T., DePinho, R.A. and Accili, D., 2009, Regulation of pancreatic juxtaductal endocrine cell formation by FoxO1, *Molecular and Cellular Biology*, 29(16), 4417-4430.
- Klotz, L.O., Sánchez-Ramos, C., Prieto-Arroyo, I., Urbánek, P., Steinbrenner, H. and Monsalve, M., 2015, Redox regulation of FoxO transcription factors, *Redox Biology*, 6, 51-72.
- Kobayashi, C.I. and Suda, T., 2012, Regulation of reactive oxygen species in stem cells and cancer stem cells, *Journal of Cellular Physiology*, 227(2), 421-430.
- Kojima, I., Nakagawa, Y., Ohtsu, Y., Medina, A. and Nagasawa, M., 2014, Sweet taste-sensing receptors expressed in pancreatic β -cells: sweet molecules act as biased agonists, *Endocrinology and Metabolism*, 29(1), 12-19.
- Kopp, J.L., Dubois, C.L., Schaffer, A.E., Hao, E., Shih, H.P., Seymour, P.A., Ma, J. and Sander, M., 2011, Sox9+ ductal cells are multipotent progenitors throughout development but do not produce new endocrine cells in the normal or injured adult pancreas, *Development*, 138(4), 653-665.

- Kukat, A., Dogan, S.A., Edgar, D., Mourier, A., Jacoby, C., Maiti, P., Mauer, J., Becker, C., Senft, K., Wibom, R. and Kudin, A.P., 2014, Loss of UCP2 attenuates mitochondrial dysfunction without altering ROS production and uncoupling activity, *PLoS Genetics*, *10*(6), e1004385.
- Labrou, N.E. and Clonis, Y.D., 1997, Simultaneous purification of L-malate dehydrogenase and L-lactate dehydrogenase from bovine heart by biomimetic-dye affinity chromatography, *Bioprocess Engineering*, *16*(3), 157-161.
- Lamontagne, J., Pepin, É., Peyot, M.L., Joly, É., Ruderman, N.B., Poitout, V., Madiraju, S.M., Nolan, C.J. and Prentki, M., 2009, Pioglitazone acutely reduces insulin secretion and causes metabolic deceleration of the pancreatic β -cell at submaximal glucose concentrations, *Endocrinology*, *150*(8), 3465-3474.
- Lee, C.S., Sund, N.J., Behr, R., Herrera, P.L. and Kaestner, K.H., 2005, Foxa2 is required for the differentiation of pancreatic α -cells, *Developmental Biology*, *278*(2), 484-495.
- Lee, S.C., Robson-Doucette, C.A. and Wheeler, M.B., 2009, Uncoupling protein 2 regulates reactive oxygen species formation in islets and influences susceptibility to diabetogenic action of streptozotocin, *Journal of Endocrinology*, *203*(1), 33.
- Leontieva, O.V., Demidenko, Z.N. and Blagosklonny, M.V., 2014, Rapamycin reverses insulin resistance (IR) in high-glucose medium without causing IR in normoglycemic medium, *Cell Death & Disease*, *5*(5), e1214.
- Li, Y., Xu, S., Mihaylova, M.M., Zheng, B., Hou, X., Jiang, B., Park, O., Luo, Z., Lefai, E., Shyy, J.Y.J. and Gao, B., 2011, AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice, *Cell Metabolism*, *13*(4), 376-388.
- Lima, A.L., Illing, T., Schliemann, S. and Elsner, P., 2017, Cutaneous manifestations of diabetes mellitus: a review, *American Journal of Clinical Dermatology*, *18*(4), 541-553.
- Lindemann, B., 2001, Receptors and transduction in taste, *Nature*, *413*(6852), 219.
- Loubiere, C., Clavel, S., Gilleron, J., Harisseh, R., Fauconnier, J., Ben-Sahra, I., Kaminski, L., Laurent, K., Herkenne, S., Lacas-Gervais, S. and Ambrosetti, D., 2017, The energy disruptor metformin targets mitochondrial integrity via modification of calcium flux in cancer cells, *Scientific Reports*, *7*(1), 5040.
- Lundquist, I., Al-Amily, I.M., Abaraviciene, S.M. and Salehi, A., 2016, Metformin ameliorates dysfunctional traits of glibenclamide- and glucose-induced insulin secretion by suppression of imposed overactivity of the islet nitric oxide synthase-NO system, *PloS One*, *11*(11), e0165668.
- Luo, M., Tan, X., Mu, L., Luo, Y., Li, R., Deng, X., Chen, N., Ren, M., Li, Y., Wang, L. and Wu, J., 2017, MiRNA-21 mediates the antiangiogenic activity of metformin through

- targeting PTEN and SMAD7 expression and PI3K/AKT pathway, *Scientific Reports*, 7, 43427.
- Madec, A.M., Cassel, R., Dubois, S., Ducreux, S., Vial, G., Chauvin, M.A., Mesnier, A., Chikh, K., Bosco, D., Rieusset, J. and Van Coppenolle, F., 2013, Losartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, protects human islets from glucotoxicity through the phospholipase C pathway, *The FASEB Journal*, 27(12), 5122-5130.
- Magenheim, J., Ilovich, O., Lazarus, A., Klochender, A., Ziv, O., Werman, R., Hija, A., Cleaver, O., Mishani, E., Keshet, E. and Dor, Y., 2011, Blood vessels restrain pancreas branching, differentiation and growth, *Development*, 138(21), 4743-4752.
- Malaisse, W.J., Vanonderbergen, A., Louchami, K., Jijakli, H. and Malaisse-Lagae, F., 1998, Effects of artificial sweeteners on insulin release and cationic fluxes in rat pancreatic islets, *Cellular Signalling*, 10(10), 727-733.
- Manesso, E., Toffolo, G.M., Saisho, Y., Butler, A.E., Matveyenko, A.V., Cobelli, C. and Butler, P.C., 2009, Dynamics of beta cell turnover: evidence for beta cell turnover and regeneration from sources of beta cells other than beta cell replication in the HIP rat, *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 297(2), E323-E330.
- Manganelli, G., Fico, A., Masullo, U., Pizzolongo, F., Cimmino, A. and Filosa, S., 2012, Modulation of the pentose phosphate pathway induces endodermal differentiation in embryonic stem cells, *PLoS One*, 7(1), e29321.
- Marchetti, P., Bugliani, M., De Tata, V., Suleiman, M. and Marselli, L., 2017, Pancreatic beta cell identity in humans and the role of type 2 diabetes, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 5, 55.
- Mathieu, J. and Ruohola-Baker, H., 2017, Metabolic remodeling during the loss and acquisition of pluripotency, *Development*, 144(4), 541-551.
- Matschinsky, F., Liang, Y., Kesavan, P., Wang, L.I.Q.U.N., Froguel, P., Velho, G., Cohen, D., Permutt, M.A., Tanizawa, Y. and Jetton, T.L., 1993, Glucokinase as pancreatic beta cell glucose sensor and diabetes gene, *The Journal of Clinical Investigation*, 92(5), 2092-2098.
- Mihaylova, M.M. and Shaw, R.J., 2011, The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism, *Nature Cell Biology*, 13(9), 1016.
- Mitsutomi, K., Masaki, T., Shimasaki, T., Gotoh, K., Chiba, S., Kakuma, T. and Shibata, H., 2014, Effects of a nonnutritive sweetener on body adiposity and energy metabolism in mice with diet-induced obesity, *Metabolism*, 63(1), 69-78.
- Miyamoto, K., Araki, K.Y., Naka, K., Arai, F., Takubo, K., Yamazaki, S., Matsuoka, S., Miyamoto, T., Ito, K., Ohmura, M. and Chen, C., 2007, Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool, *Cell Stem Cell*, 1(1), 101-112.

- Miyamoto, Y., Maitra, A., Ghosh, B., Zechner, U., Argani, P., Iacobuzio-Donahue, C.A., Sriuranpong, V., Iso, T., Meszoely, I.M., Wolfe, M.S. and Hruban, R.H., 2003, Notch mediates TGF α -induced changes in epithelial differentiation during pancreatic tumorigenesis, *Cancer Cell*, 3(6), 565-576.
- Miyatsuka, T., Kosaka, Y., Kim, H. and German, M.S., 2011, Neurogenin3 inhibits proliferation in endocrine progenitors by inducing Cdkn1a, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(1), 185-190.
- Morshead, C.M., Reynolds, B.A., Craig, C.G., McBurney, M.W., Staines, W.A., Morassutti, D., Weiss, S. and van der Kooy, D., 1994, Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells, *Neuron*, 13(5), 1071-1082.
- Murakami, M., Ichisaka, T., Maeda, M., Oshiro, N., Hara, K., Edenhofer, F., Kiyama, H., Yonezawa, K. and Yamanaka, S., 2004, mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells, *Molecular and Cellular Biology*, 24(15), 6710-6718.
- Nakada, D., Saunders, T.L. and Morrison, S.J., 2010, Lkb1 regulates cell cycle and energy metabolism in haematopoietic stem cells, *Nature*, 468(7324), 653.
- Natali, A. and Ferrannini, E., 2006, Effects of metformin and thiazolidinediones on suppression of hepatic glucose production and stimulation of glucose uptake in type 2 diabetes: a systematic review, *Diabetologia*, 49(3), 434-441.
- Nettleton, J.A., Lutsey, P.L., Wang, Y., Lima, J.A., Michos, E.D. and Jacobs, D.R., 2009, Diet soda intake and risk of incident metabolic syndrome and type 2 diabetes in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA), *Diabetes Care*, 32(4), 688-694.
- Noguchi, H., Kaneto, H., Weir, G.C. and Bonner-Weir, S., 2003, PDX-1 protein containing its own antenapedia-like protein transduction domain can transduce pancreatic duct and islet cells, *Diabetes*, 52(7), 1732-1737.
- Nuschke, A., Rodrigues, M., Wells, A.W., Sylakowski, K. and Wells, A., 2016, Mesenchymal stem cells/multipotent stromal cells (MKHs) are glycolytic and thus glucose is a limiting factor of in vitro models of MKH starvation, *Stem Cell Research & Therapy*, 7(1), 179.
- Ochocki, J.D. and Simon, M.C., 2013, Nutrient-sensing pathways and metabolic regulation in stem cells, *J Cell Biol*, 203(1), 23-33.
- Orford, K.W. and Scadden, D.T., 2008, Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation, *Nature Reviews Genetics*, 9(2), 115.
- Ouyang, J., Parakhia, R.A. and Ochs, R.S., 2011, Metformin activates AMP kinase through inhibition of AMP deaminase, *Journal of Biological Chemistry*, 286(1), 1-11.
- Paik, J.H., Ding, Z., Narurkar, R., Ramkissoon, S., Muller, F., Kamoun, W.S., Chae, S.S., Zheng, H., Ying, H., Mahoney, J. and Hiller, D., 2009, FoxOs cooperatively regulate

- diverse pathways governing neural stem cell homeostasis, *Cell Stem Cell*, 5(5), 540-553.
- Palmnäs, M.S., Cowan, T.E., Bomhof, M.R., Su, J., Reimer, R.A., Vogel, H.J., Hittel, D.S. and Shearer, J., 2014, Low-dose aspartame consumption differentially affects gut microbiota-host metabolic interactions in the diet-induced obese rat, *PloS One*, 9(10), e109841.
- Pandurangan, M., Park, J. and Kim, E., 2014, Aspartame downregulates 3T3-L1 differentiation, *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 50(9), 851-857.
- Pan-Hou, H., Suda, Y., Ohe, Y., Sumi, M. and Yoshioka, M., 1990, Effect of aspartame on N-methyl-D-aspartate-sensitive L-[3H] GLUTamate binding sites in rat brain synaptic membranes, *Brain Research*, 520(1-2), 351-353.
- Patanè, G., Piro, S., Rabuazzo, A.M., Anello, M., Vigneri, R. and Purrello, F., 2000., Metformin restores insulin secretion altered by chronic exposure to free fatty acids or high glucose: a direct metformin effect on pancreatic beta-cells, *Diabetes*, 49(5), 735-740.
- Pawlikowska, L., Hu, D., Huntsman, S., Sung, A., Chu, C., Chen, J., Joyner, A.H., Schork, N.J., Hsueh, W.C., Reiner, A.P. and Psaty, B.M., 2009, Association of common genetic variation in the insulin/IGF1 signaling pathway with human longevity, *Aging Cell*, 8(4), 460-472.
- Pecqueur, C., Alves-Guerra, M.C., Gelly, C., Lévi-Meyrueis, C., Couplan, E., Collins, S., Ricquier, D., Bouillaud, F. and Miroux, B., 2001, Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation, *Journal of Biological Chemistry*, 276(12), 8705-8712.
- Pecqueur, C., Bui, T., Gelly, C., Hauchard, J., Barbot, C., Bouillaud, F., Ricquier, D., Miroux, B. and Thompson, C.B., 2008, Uncoupling protein-2 controls proliferation by promoting fatty acid oxidation and limiting glycolysis-derived pyruvate utilization, *The FASEB Journal*, 22(1), 9-18.
- Pfützner, A., Schipper, D., Pansky, A., Kleinfeld, C., Roitzheim, B. and Tobiasch, E., 2017, Mesenchymal Stem Cell Differentiation into Adipocytes Is Equally Induced by Insulin and Proinsulin In Vitro, *International Journal of Stem Cells*, 10(2), 154.
- Pictet, R.L., Clark, W.R., Williams, R.H. and Rutter, W.J., 1972, An ultrastructural analysis of the developing embryonic pancreas, *Developmental Biology*, 29(4), 436-467.
- Porat, S., Weinberg-Corem, N., Tornovsky-Babaey, S., Schyr-Ben-Haroush, R., Hija, A., Stolovich-Rain, M., Dadon, D., Granot, Z., Ben-Hur, V., White, P. and Girard, C.A., 2011, Control of pancreatic β cell regeneration by glucose metabolism, *Cell metabolism*, 13(4), 440-449.
- Prigione, A., Fauler, B., Lurz, R., Lehrach, H. and Adjaye, J., 2010, The senescence-related mitochondrial/oxidative stress pathway is repressed in human induced pluripotent stem cells, *Stem Cells*, 28(4), 721-733.

- Puri, S. and Hebrok, M., 2010, Cellular plasticity within the pancreas—lessons learned from development, *Developmental Cell*, 18(3), 342-356.
- Rafalski, V.A., Mancini, E. and Brunet, A., 2012, Energy metabolism and energy-sensing pathways in mammalian embryonic and adult stem cell fate, *Journal of Cell Science*, 125(23), 5597-5608.
- Renault, V.M., Rafalski, V.A., Morgan, A.A., Salih, D.A., Brett, J.O., Webb, A.E., Villeda, S.A., Thekkat, P.U., Guillerey, C., Denko, N.C. and Palmer, T.D., 2009, FoxO3 regulates neural stem cell homeostasis, *Cell Stem Cell*, 5(5), 527-539.
- Resende, R.R., Adhikari, A., Da Costa, J.L., Lorencon, E., Ladeira, M.S., Guatimosim, S., Kihara, A.H. and Ladeira, L.O., 2010, Influence of spontaneous calcium events on cell-cycle progression in embryonal carcinoma and adult stem cells, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1803(2), 246-260.
- Robson-Doucette, C.A., Sultan, S., Allister, E.M., Wikstrom, J.D., Koshkin, V., Bhattacharjee, A., Prentice, K.J., Sereda, S.B., Shirihai, O.S. and Wheeler, M.B., 2011, β -cell uncoupling protein 2 regulates reactive oxygen species production, which influences both insulin and glucagon secretion, *Diabetes*, 60(11), 2710-2719.
- Rossignol, R., Gilkerson, R., Aggeler, R., Yamagata, K., Remington, S.J. and Capaldi, R.A., 2004, Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells, *Cancer Research*, 64(3), 985-993.
- Rozzo, A., Meneghel-Rozzo, T., Delakorda, S.L., Yang, S.B. and Rupnik, M., 2009, Exocytosis of insulin: in vivo maturation of mouse endocrine pancreas, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1152(1), 53-62.
- Rukstalis, J.M. and Habener, J.F., 2009, Neurogenin3: a master regulator of pancreatic islet differentiation and regeneration, *Islets*, 1(3), 177-184.
- Rycerz, K. and Jaworska-Adamu, J.E., 2013. Effects of aspartame metabolites on astrocytes and neurons. *Folia Neuropathol*, 51(1), 10-7.
- Ryu, J.M., Lee, H.J., Jung, Y.H., Lee, K.H., Kim, D.I., Kim, J.Y., Ko, S.H. and Choi, G.E., 2015, Regulation of stem cell fate by ROS-mediated alteration of metabolism, *International Journal of Stem Cells*, 8(1), 24.
- Sadaf, N., Ahsan, J., Ahmad, S. and Haque, R., 2015, Mitochondria: A key player in stem cell fate, *Cell Biology*, 1-2.
- Sakar, Y., Meddah, B., Faouzi, M.Y.A., Cherrach, Y., Bado, A. and Ducroc, R., 2010, Metformin-induced regulation of the intestinal D-glucose transporters, *Journal of Physiology and Pharmacology*, 61(3), 301.
- Salih, D.A. and Brunet, A., 2008, FoxO transcription factors in the maintenance of cellular homeostasis during aging, *Current Opinion in Cell Biology*, 20(2), 126-136.

- Sampath, P., Pritchard, D.K., Pabon, L., Reinecke, H., Schwartz, S.M., Morris, D.R. and Murry, C.E., 2008, A hierarchical network controls protein translation during murine embryonic stem cell self-renewal and differentiation, *Cell Stem Cell*, 2(5), 448-460.
- Sanchez-Rangel, E. and Inzucchi, S.E., 2017, Metformin: clinical use in type 2 diabetes, *Diabetologia*, 60(9), 1586-1593.
- Sawadsopanon, T., Meksawan, K. and Chanvorachote, P., 2017, Aspartame inhibits migration of human intestinal epithelial cells, *Journal of Food Biochemistry*, 41(3), e12341.
- Schaffer, A.E., Freude, K.K., Nelson, S.B. and Sander, M., 2010, NKX6 transcription factors and Ptf1a function as antagonistic lineage determinants in multipotent pancreatic progenitors, *Developmental Cell*, 18(6), 1022-1029.
- Schieke, S.M., Ma, M., Cao, L., McCoy, J.P., Liu, C., Hensel, N.F., Barrett, A.J., Boehm, M. and Finkel, T., 2008, Mitochondrial metabolism modulates differentiation and teratoma formation capacity in mouse embryonic stem cells, *Journal of Biological Chemistry*, 283(42), 28506-28512.
- Segev, H., Fishman, B., Schulman, R. and Itskovitz-Eldor, J., 2012, The expression of the class 1 glucose transporter isoforms in human embryonic stem cells, and the potential use of GLUT2 as a marker for pancreatic progenitor enrichment, *Stem Cells and Development*, 21(10), 1653-1661.
- Seita, J. and Weissman, I.L., 2010, Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 2(6), 640-653.
- Sena, L.A. and Chandel, N.S., 2012. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Molecular Cell*, 48(2), pp.158-167.
- Seymour, P.A. and Sander, M., 2011, Historical perspective: beginnings of the β -cell: current perspectives in β -cell development, *Diabetes*, 60(2), 364-376.
- Sharma, A., Rani, R., 2017, Do we really need to differentiate mesenchymal stem cells into insulin-producing cells for attenuation of the autoimmune responses in type 1 diabetes: immunoprophylactic effects of precursors to insulin-producing cells, *Stem Cell Research and Therapy*, 8(1):167.
- Shaw, R.J., Bardeesy, N., Manning, B.D., Lopez, L., Kosmatka, M., DePinho, R.A. and Cantley, L.C., 2004, The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling, *Cancer Cell*, 6(1), 91-99.
- Shih, H.P., Kopp, J.L., Sandhu, M., Dubois, C.L., Seymour, P.A., Grapin-Botton, A. and Sander, M., 2012, A Notch-dependent molecular circuitry initiates pancreatic endocrine and ductal cell differentiation, *Development*, 139(14), 2488-2499.
- Sieber, M.H., Thomsen, M.B. and Spradling, A.C., 2016, Electron transport chain remodeling by GSK3 during oogenesis connects nutrient state to reproduction, *Cell*, 164(3), 420-432.

- Simmons, R.A., 2006, Developmental origins of diabetes: the role of oxidative stress, *Free Radical Biology and Medicine*, 40(6), 917-922.
- Simon, B.R., Parlee, S.D., Learman, B.S., Mori, H., Scheller, E.L., Cawthorn, W.P., Ning, X., Gallagher, K., Tyrberg, B., Assadi-Porter, F.M. and Evans, C.R., 2013, Artificial sweeteners stimulate adipogenesis and suppress lipolysis independently of sweet taste receptors, *Journal of Biological Chemistry*, 288(45), 32475-32489.
- Simon-Szabó, L., Kokas, M., Mandl, J., Kéri, G. and Csala, M., 2014, Metformin attenuates palmitate-induced endoplasmic reticulum stress, serine phosphorylation of IRS-1 and apoptosis in rat insulinoma cells, *PLoS One*, 9(6), e97868.
- Simsek, T., Kocabas, F., Zheng, J., DeBerardinis, R.J., Mahmoud, A.I., Olson, E.N., Schneider, J.W., Zhang, C.C. and Sadek, H.A., 2010, The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche, *Cell Stem Cell*, 7(3), 380-390.
- Sinagoga, K.L., Stone, W.J., Schiesser, J.V., Schweitzer, J.I., Sampson, L., Zheng, Y. and Wells, J.M., 2017, Distinct roles for the mTOR pathway in postnatal morphogenesis, maturation and function of pancreatic islets, *Development*, 144(13), 2402-2414.
- Smith, A.G., 2001, Embryo-derived stem cells: of mice and men, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17(1), 435-462.
- Sosa-Pineda, B., Chowdhury, K., Torres, M., Oliver, G. and Gruss, P., 1997, The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing β cells in the mammalian pancreas, *Nature*, 386(6623), 399.
- Stefan, Y., Orci, L., Malaisse-Lagae, F., Perrelet, A., Patel, Y. and Unger, R.H., 1982, Quantitation of endocrine cell content in the pancreas of nondiabetic and diabetic humans, *Diabetes*, 31(8), 694-700.
- Suez, J., Korem, T., Zeevi, D., Zilberman-Schapira, G., Thaiss, C.A., Maza, O., Israeli, D., Zmora, N., Gilad, S., Weinberger, A. and Kuperman, Y., 2014, Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota, *Nature*, 514(7521), 181.
- Sullivan, M., Galea, P. and Latif, S., 2006, What is the appropriate oxygen tension for in vitro culture?, *Molecular Human Reproduction*, 12(11), 653-653.
- Sun, S., Liu, Y., Lipsky, S. and Cho, M., 2007, Physical manipulation of calcium oscillations facilitates osteodifferentiation of human mesenchymal stem cells, *The FASEB Journal*, 21(7), 1472-1480.
- Suwa, M., Egashira, T., Nakano, H., Sasaki, H. and Kumagai, S., 2006, Metformin increases the PGC-1 α protein and oxidative enzyme activities possibly via AMPK phosphorylation in skeletal muscle in vivo, *Journal of Applied Physiology*, 101(6), 1685-1692.
- Tajima, K., Shirakawa, J., Okuyama, T., Kyohara, M., Yamazaki, S., Togashi, Y. and Terauchi, Y., 2017, Effects of metformin on compensatory pancreatic β -cell hyperplasia in mice

- fed a high-fat diet, *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 313(3), E367-E380.
- Takubo, K., Goda, N., Yamada, W., Iriuchishima, H., Ikeda, E., Kubota, Y., Shima, H., Johnson, R.S., Hirao, A., Suematsu, M. and Suda, T., 2010, Regulation of the HIF-1 α level is essential for hematopoietic stem cells, *Cell Stem Cell*, 7(3), 391-402.
- Talchai, S.C. and Accili, D., 2015, Legacy effect of Foxo1 in pancreatic endocrine progenitors on adult β -cell mass and function, *Diabetes*, 64(8), 2868-2879.
- Tothova, Z., Kollipara, R., Huntly, B.J., Lee, B.H., Castrillon, D.H., Cullen, D.E., McDowell, E.P., Lazo-Kallanian, S., Williams, I.R., Sears, C. and Armstrong, S.A., 2007, FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress, *Cell*, 128(2), 325-339.
- Turner, N., Kowalski, G.M., Leslie, S.J., Risis, S., Yang, C., Lee-Young, R.S., Babb, J.R., Meikle, P.J., Lancaster, G.I., Henstridge, D.C. and White, P.J., 2013, Distinct patterns of tissue-specific lipid accumulation during the induction of insulin resistance in mice by high-fat feeding, *Diabetologia*, 56(7), 1638-1648.
- van der Meulen, T. and Huising, M.O., 2014, Maturation of stem cell-derived beta-cells guided by the expression of urocortin 3, *The Review of Diabetic Studies: RDS*, 11(1), 115.
- Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C. and Thompson, C.B., 2009, Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation, *Science*, 324(5930), 1029-1033.
- Varum, S., Rodrigues, A.S., Moura, M.B., Momcilovic, O., Easley IV, C.A., Ramalho-Santos, J., Van Houten, B. and Schatten, G., 2011, Energy metabolism in human pluripotent stem cells and their differentiated counterparts, *PloS One*, 6(6), e20914.
- Vilchez, D., Boyer, L., Morantte, I., Lutz, M., Merkwirth, C., Joyce, D., Spencer, B., Page, L., Masliah, E., Berggren, W.T. and Gage, F.H., 2012, Increased proteasome activity in human embryonic stem cells is regulated by PSMD11, *Nature*, 489(7415), 304.
- Villasenor, A., Chong, D.C., Henkemeyer, M. and Cleaver, O., 2010, Epithelial dynamics of pancreatic branching morphogenesis, *Development*, 137(24), 4295-4305.
- Vozza, A., Parisi, G., De Leonardis, F., Lasorsa, F.M., Castegna, A., Amorese, D., Marmo, R., Calcagnile, V.M., Palmieri, L., Ricquier, D. and Paradies, E., 2014, UCP2 transports C4 metabolites out of mitochondria, regulating glucose and GLUTamine oxidation, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(3), 960-965.
- Wanet, A., Arnould, T., Najimi, M. and Renard, P., 2015, Connecting mitochondria, metabolism, and stem cell fate, *Stem Cells and Development*, 24(17), 1957-1971.
- Wang, H., Brun, T., Kataoka, K., Sharma, A.J. and Wollheim, C.B., 2007, MAFA controls genes implicated in insulin biosynthesis and secretion, *Diabetologia*, 50(2), 348-358.

- Wang, S., Yan, J., Anderson, D.A., Xu, Y., Kanal, M.C., Cao, Z., Wright, C.V. and Gu, G., 2010, Neurog3 gene dosage regulates allocation of endocrine and exocrine cell fates in the developing mouse pancreas, *Developmental Biology*, 339(1), 26-37.
- Weir, G.C. and Bonner-Weir, S., 2007, A dominant role for glucose in β cell compensation of insulin resistance, *The Journal of Clinical Investigation*, 117(1), 81-83.
- Weissman, I.L., Anderson, D.J. and Gage, F., 2001, Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17(1), 387-403.
- Wiegand, G. and Remington, S.J., 1986, Citrate synthase: structure, control, and mechanism, *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, 15(1), 97-117.
- Willcox, B.J., Donlon, T.A., He, Q., Chen, R., Grove, J.S., Yano, K., Masaki, K.H., Willcox, D.C., Rodriguez, B. and Curb, J.D., 2008, FOXO3A genotype is strongly associated with human longevity, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(37), 13987-13992.
- Wilson, F. and Howes, K.E., 2008, Blood glucose changes following the ingestion of sucrose- and aspartame-sweetened beverages, *Appetite*, 2(51), 410.
- Wyett, G., Gibert, Y., Ellis, M., Castillo, H.A., Kaslin, J. and Aston-Mourney, K., 2018, Metformin, beta-cell development, and novel processes following beta-cell ablation in zebrafish, *Endocrine*, 59(2), 419-425.
- Yamashita, Y.M., Yuan, H., Cheng, J. and Hunt, A.J., 2010, Polarity in stem cell division: asymmetric stem cell division in tissue homeostasis, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(1), a001313.
- Yang, J.Y., Zong, C.S., Xia, W., Yamaguchi, H., Ding, Q., Xie, X., Lang, J.Y., Lai, C.C., Chang, C.J., Huang, W.C. and Huang, H., 2008, ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation, *Nature Cell Biology*, 10(2), 138.
- Yatoh, S., Dodge, R., Akashi, T., Omer, A., Sharma, A., Weir, G.C. and Bonner-Weir, S., 2007, Differentiation of affinity-purified human pancreatic duct cells to β -cells, *Diabetes*, 56(7), 1802-1809.
- Ying, W., 2008, NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences, *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(2), 179-206.
- Yoboue, E.D. and Devin, A., 2012, Reactive oxygen species-mediated control of mitochondrial biogenesis, *International Journal of Cell Biology*, 2012.
- Zakikhani, M., Blouin, M.J., Piura, E. and Pollak, M.N., 2010, Metformin and rapamycin have distinct effects on the AKT pathway and proliferation in breast cancer cells, *Breast Cancer Research and Treatment*, 123(1), 271-279.

- Zaret, K.S. and Grompe, M., 2008, Generation and regeneration of cells of the liver and pancreas, *Science*, 322(5907), 1490-1494.
- Zhang, C.Y., Baffy, G., Perret, P., Krauss, S., Peroni, O., Grujic, D., Hagen, T., Vidal-Puig, A.J., Boss, O., Kim, Y.B. and Zheng, X.X., 2001, Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, β cell dysfunction, and type 2 diabetes, *Cell*, 105(6), 745-755.
- Zhang, C., Moriguchi, T., Kajihara, M., Esaki, R., Harada, A., Shimohata, H., Oishi, H., Hamada, M., Morito, N., Hasegawa, K. and Kudo, T., 2005, MafA is a key regulator of glucose-stimulated insulin secretion, *Molecular and Cellular Biology*, 25(12), 4969-4976.
- Zhang, J., Khvorostov, I., Hong, J.S., Oktay, Y., Vergnes, L., Nuebel, E., Wahjudi, P.N., Setoguchi, K., Wang, G., Do, A. and Jung, H.J., 2011a, UCP2 regulates energy metabolism and differentiation potential of human pluripotent stem cells, *The EMBO Journal*, 30(24), 4860-4873.
- Zhang, X., Yalcin, S., Lee, D.F., Yeh, T.Y.J., Lee, S.M., Su, J., Mungamuri, S.K., Rimmelé, P., Kennedy, M., Sellers, R. and Landthaler, M., 2011b, FOXO1 is an essential regulator of pluripotency in human embryonic stem cells, *Nature Cell Biology*, 13(9), 1092.
- Zhang, T., Kim, D.H., Xiao, X., Lee, S., Gong, Z., Muzumdar, R., Calabuig-Navarro, V., Yamauchi, J., Harashima, H., Wang, R. and Bottino, R., 2016, FoxO1 plays an important role in regulating β -cell compensation for insulin resistance in male mice, *Endocrinology*, 157(3), 1055-1070.
- Zhao, Y., Hu, X., Liu, Y., Dong, S., Wen, Z., He, W., Zhang, S., Huang, Q. and Shi, M., 2017, ROS signaling under metabolic stress: cross-talk between AMPK and AKT pathway, *Molecular Cancer*, 16(1), 79.
- Zhou, J., Su, P., Wang, L., Chen, J., Zimmermann, M., Genbacev, O., Afonja, O., Horne, M.C., Tanaka, T., Duan, E. and Fisher, S.J., 2009, mTOR supports long-term self-renewal and suppresses mesoderm and endoderm activities of human embryonic stem cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(19), 7840-7845.
- Zhou, B., Bentham, J., Di Cesare, M., Bixby, H., Danaei, G., Cowan, M.J., Paciorek, C.J., Singh, G., Hajifathalian, K., Bennett, J.E. and Taddei, C., 2017, Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015: a pooled analysis of 1479 population-based measurement studies with 19·1 million participants, *The Lancet*, 389(10064), 37-55.
- Zick, M., Rabl, R. and Reichert, A.S., 2009, Cristae formation—linking ultrastructure and function of mitochondria, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1793(1), 5-19.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Ertan Çelik
Doğum Yeri	Tunceli
Doğum Tarihi	19.07.1991
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	05372349626
E-Posta Adresi	ertancelik1919@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	2014

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji
Programı	Moleküler Biyoloji

Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Anabilim Dalı Adı
Programı	Program Adı

Makale ve Bildiriler	