



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



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**INS-1 BETA HÜCRELERİNDE SERBEST YAĞ ASİDİYLE
OLUŞAN APOPTOZDA GLP-1 ANALOĞUNUN
BİYOLOJİK ROLÜ**

Eda OYAR YILMAZ

Biyoloji Anabilim Dalı

Zooloji Programı

Danışman

Prof. Dr. Şehnaz BOLKENT

Nisan, 2015

İSTANBUL

Bu çalışma 10/04/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Zooloji programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:

İmza

Danışmanın Adı Soyadı: Prof. Dr. Şehnaz BOLKENT
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

İmza

Jüri Adı: Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

İmza

Jüri Adı: Prof. Dr. Nuriye AKEV
İstanbul Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi

İmza

Jüri Adı: Prof. Dr. Mehtap KUTLU
Anadolu Üniversitesi
Fen Fakültesi

İmza

Jüri Adı: Doç. Dr. Selda GEZGİNCİ
OKTAYOĞLU
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliđinin 37786 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca deneyimini, bilgi birikimini ve imkanlarını paylaşıp, bana her türlü konuda destek olan ve bu çalışmanın ortaya çıkarılmasında büyük emeği geçen değerli danışman hocam Prof. Dr. Şehnaz BOLKENT'e yardımları, güler yüzü ve içtenliği için sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarımın her aşamasında değerli fikir ve deneyimlerinden yararlandığım, akademik duruşu ve güler yüzüyle her zaman çalışma isteği veren değerli hocam Doç. Dr. Selda GEZGİNCİ OKTAYOĞLU' na teşekkürlerimi sunarım.

Deney çalışmalarımda kullandığım INS-1 sıçan pankreatik beta hücre soyunu hediye ederek nezaket gösteren sayın Prof. Dr. Michele SOLIMENA'ya çok teşekkür ederim. Sabırlı davranışlarıyla yardımlarını benden esirgemeyen Araş. Gör. Dr. Serap SANCAR BAŞ'a ve Araş. Gör. Dr. Ayşe KARATUĞ'a sonsuz teşekkür ederim.

Lisansa başladığım yıldan itibaren desteklerini benden hiç esirgemeyen ve her zaman yanımda olan başta Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Şef Yardımcısı Uzm. Dr. Elvin DİNÇ olmak üzere tüm mikrobiyoloji çalışanlarına sonsuz teşekkür ederim. Sevgisi, samimiyeti ve bilimsel bilgi birimiyle her zaman yanımda olan ve sürekli beni motive eden biricik can dostum Uzman Biyolog Güliz AYKOL'a, çalışmalarım sırasında her an yanımda olup, destekleriyle beni motive eden ve yardımcı olan değerli çalışma arkadaşlarım Uzman Biyolog Özgecan KAYALAR, Biyolog Merve ERÇİN, Biyolog Neziha BEŞİKTEPE ve Biyolog Ediz ÇOŞKUN'a çok teşekkür ederim.

Tezimin hazırlanması ve basılması sürecinde en az benim kadar çalışan, bu uzun ve engembeli yolda attığım her adımda yanımda olan hayat arkadaşım, canım eşim Mustafa YILMAZ'a çok teşekkür ederim. Hayatımın her aşamasında maddi ve manevi yardımcı olan, anlayış ve sabırla günlere gelmemde büyük emeği geçen, her zaman amaçlarım doğrultusunda beni yönlendiren ve varlıklarından güç aldığım canım babam Faruk OYAR ve canım annem Ayşe OYAR'a çok teşekkür ederim.

Nisan, 2015

Eda OYAR YILMAZ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ	vii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	viii
ÖZET.....	x
SUMMARY	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	5
2.1. TİP 2 DİYABET (T2D).....	5
2.2. LİPOTOKSİSİTE	6
2.2.1. Palmitik Asit.....	7
2.3. TİP 2 DİYABET İLE İLİŞKİLİ TERAPÖTİK UYGULAMALAR.....	8
2.4. İNSÜLİNOMA	9
2.5. PANKREATİK BETA HÜCRE SOYLARI	9
2.5.1. INS-1 Sıçan Beta Hücre Soyusu	10
2.6. HÜCRE ÖLÜMÜ	10
2.6.1. Apoptoz	11
2.6.1.1. Apoptozun Moleküler Mekanizması	11
2.6.2. Otofaji.....	14
2.6.2.1. Otofajinin Moleküler Mekanizması	15
2.6.3. Nekroz	17
2.7. GLUKAGON-BENZERİ PEPTİT 1 (GLP-1).....	18
2.7.1. Glukagon-Benzeri Peptid'in Beta Hücresine Etkisi	21
2.7.2. Kuraglutid.....	22
3. MALZEME VE YÖNTEM	23
3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ.....	23
3.2.KULLANILAN YAĞ ASİDİ VE PEPTİDİN ÇÖZÜNMESİ VE SULANDIRILMASI.....	24

3.2.1. Palmitik Asitin Çözülmesi ve Sulandırılması	24
3.2.2. Kuraglutid'in Çözünmesi ve Sulandırılması	24
3.3. BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER	24
3.3.1. Palmitik Asit ve Kuraglutid'in Etkin Doz ve Sürelerinin Belirlenmesi	24
3.3.1.1. Palmitik Asit İçin Doz ve Süre Belirleme Deneyleri	24
3.3.1.2. Kuraglutid İçin Doz ve Süre Belirleme Deneyleri	25
3.3.2. MTT Testi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi	25
3.3.2.1. MTT Çözeltilisinin Hazırlanması	26
3.3.2.2. Hücrelerin MTT ile Muamele Edilmesi	26
3.3.3. Laktat Dehidrogenaz Salınımının Ölçülmesi	26
3.3.4. ROS Ölçümü	27
3.4. MOLEKÜLER YÖNTEMLER	28
3.4.1. Lizat Elde Edilmesi	28
3.4.2. Bradford Protein Miktar Tayini	28
3.4.3. Western Emdirimi	29
3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	29
4. BULGULAR	30
4.1. PALMİTİK ASİTE AİT HÜCRE CANLILIK TESTİ BULGULARI	30
4.2. PALMİTİK ASİT İLE OLUŞTURULAN TOKSİSİTEDE HÜCRE ÖLÜM TİPİNİN BELİRLENMESİ	31
4.2.1. INS-1 Hücrelerinde Palmitik Asit Uygulaması Otofajiyi Uyarır	31
4.2.2. INS-1 Hücrelerinde Palmitik Asit Uygulaması Apoptozu Uyarır	32
4.2.3. INS-1 Hücrelerinde Palmitik Asit Uygulaması Nekrozu Uyarır	33
4.3. INS-1 BETA HÜCRELERİNDE PALMİTİK ASİT UYGULAMASI REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİNİN ÜRETİMİNE NEDEN OLUR	34
4.4. KURAGLUTİD'E AİT HÜCRE CANLILIK TESTİ BULGULARI	35
4.5. KURAGLUTİD VE PALMİTİK ASİT'İN BİRLİKTE UYGULANDIĞI DURUMA AİT HÜCRE CANLILIK TESTİ BULGULARI	36
4.5.1. Kuraglutid'in INS-1 Beta Hücre Ölümleri Üzerinde Koruyucu ve İyileştirici Etkisi	36
4.5.1.1. Kuraglutid'in Otofaji Üzerinde Koruyucu ve İyileştirici Etkisi	38
4.5.1.2. Kuraglutid'in Apoptoz Üzerinde Koruyucu ve İyileştirici Etkisi	39
4.5.1.3. Kuraglutid'in Nekroz Üzerinde Koruyucu ve İyileştirici Etkisi	40
4.6. KURAGLUTİD'İN LİPOTOKSİK ŞARTLARDA INS-1 BETA HÜCRELERİNDE REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİNİN ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİSİ	41

5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	43
KAYNAKLAR	53
ÖZGEÇMİŞ.....	66

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Tip 2 Diyabetde beta hücre fonksiyon kaybının patogenezi (Kang ve diğ, 2012)	6
Şekil 2.2: Palmitik asitin kimyasal yapısı (https://bioswchem.wordpress.com).....	8
Şekil 2.3: Hücre dışı sinyallerle tetiklenen, hücre ölüm reseptörleri aracılığıyla etkisini meydana getiren hücre dışı ve mitokondri aracılığıyla gerçekleşen hücre içi apoptotik yolak gösterilmektedir (http://pt851.wikidot.com/stroke-cell-bio).....	12
Şekil 2.4: Otofagozom oluşumu ve görevli otofajiyle ilişkili proteinler (http://www.mdpi.com/20794991/4/3/548/htm).....	16
Şekil 2.5: 160 amino asitli öncü bir protein olan proglukagon'nun dokuya spesifik posttranslasyonu (Janssen ve diğ., 2013).....	19
Şekil 2.6: Beta hücre yaşamı ve proliferasyonunda GLP-1' in etkisi (Dalle ve diğ., 2013).....	22
Şekil 4.1: INS-1 hücrelerine verilen farklı dozlarda palmitik asitin % hücre canlılığı üzerine etkisi (* p<0,05; ** p<0,001; ***p<0,0001).....	30
Şekil 4.2: INS-1 hücrelerinde palmitik asit ile uyarılan hücre içinde LC3 proteinmiktarlarının tayini (* p<0,05; ** p<0,001; *** p<0,0001).....	31
Şekil 4.3: INS-1 hücrelerinde hücre içinde p 53, sitokrom-c ve aktif kaspaz-3 miktarının tayini (A.U. : Arbitrary Unit) (* p<0,05).....	32
Şekil 4.4: Palmitik asitin INS-1 beta hücrelerinde laktat dehidrogenaz salınımı üzerine etkisi. (* p<0,05; ** p<0,001).....	34
Şekil 4.5: Palmitik asitin INS-1 beta hücrelerinde reaktif oksijen türleri üzerine etkisi (** p<0,001; *** p<0,0001).....	35
Şekil 4.6: Kuraglutid'in INS-1 beta hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkisi (*p<0.05).....	36
Şekil 4.7: Kuraglutidin INS-1 beta hücrelerinde hücre canlılığı üzerinde koruyucu ve iyileştirici etkisi (* p<0,05; *** p<0,0001).....	37
Şekil 4.8: INS-1 beta hücrelerinde palmitik asit ile meydana gelen otofajide kuraglutid'in koruyucu ve iyileştirici etkisi (***p<0,0001).....	38
Şekil 4.9: INS-1 beta hücrelerinde palmitik asit ile meydana gelen apoptozda kuraglutidin koruyucu ve iyileştirici etkisi (* p<0,05; ** p<0,001; *** p<0,0001).....	39

Şekil 4.10: Kuraglutid'in INS-1 beta hücrelerinde laktat dehidrogenaz enziminin salınımı üzerinde iyileştiri ve koruyucu etkisi (** $p < 0,0001$).....**40**

Şekil 4.11: Kuraglutid'in, farklı dozlarda palmitik asit uygulanan INS-1 beta hücrelerindeki ROS üzerinde koruyucu ve iyileştirici etkisi (** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$).....**41**

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 2.1: GLP-1, GLP-2 ve Glukagon amino asit sekuensleri dizileri arasındaki benzerlikler (Janssen, 2013).....	19
Tablo 2.2: GLP-1 analogları (John ve diğ.,2008).....	20
Tablo 3.1: Western emdirimi yönteminde kullanılan primer antikorlar, bu antikorlar için kullanılan seyreltme oranları ve süreleri.....	30

SİMGE VE KISALTIMA LİSTESİ

Kısaltmalar	Açıklama
Apaf-1	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
Atg	: Otofaji ilişkili protein
ATP	: Adenozin trifosfat
BSA	: Sığır serum albumin
CREB	: cAMP yanıt element bağlayıcı protein
H₂DCFDA	: 2'7'-diklorodihidrofluoresin diasetat
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DPP-IV	: Dipeptidil peptidaz 4
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
ELİSA	: Enzim bağlı immünemici tekniği
ER	: Endoplazmik retikulum
ERK	: Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz
FADD	: Fas ile ilişkili ölüm bölgesi
FBS	: Fötal sığır serumu
GLP-1	: Glukagon-benzeri peptit 1
GLP-2	: Glukagon-benzeri peptit 2
GLUT-2	: Glukoz taşıyıcısı 2
HCL	: Hidroklorik asit
IAPP	: Ada amiloid polipeptit
IDF	: Uluslararası diyabet fedarasyonu
IGF	: İnsülin benzeri büyüme faktörü
INT	: İdotetrazolyum klorür
IRS	: İnsülin reseptör substrat
JNK	: N-Terminal kinaz
LDH	: Laktat dehidrogenaz
MTT	: Metil-tiazol tetrazoliyumbromid
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NFAT	: Aktive T hücrelerinin nüklear faktörü
PA	: Palmitik asit
PARP	: Poliadenozin riboz polimeraz
PAS	: Otofaji oluşum merkezi
PBS	: Fosfatlı tamponlu tuz çözeltisi
PE	: Fosfatetanolamin
PI3F	: Fosfatidilinositol 3 fosfat
PKA	: Protein kinaz a
RIP1	: Ribozom inaktive edici protein 1
ROS	: Reaktif oksijen türleri
Rpm	: Dakikadaki dönüş sayısı

RPMI 1640	: Roswell park memorial institue
T1D	: Tip 1 diyabet
T2D	: Tip 2 diyabet
TCFL-2	: T hücre faktörü benzeri-2
TNF	: Tümör nekroz faktör
TRAF-2	: Tümör nekroz faktör ilişkili faktör 2
WHO	: Dünya sağlık örgütü
LC3	: Mikrotübül ilişkili protein-hafif zincir

ÖZET

YÜKSEK LİSANS

INS-1 BETA HÜCRELERİNDE SERBEST YAĞ ASİDİYLE OLUŞAN APOPTOZDA GLP-1 ANALOĞUNUN BİYOLOJİK ROLÜ

Eda OYAR YILMAZ

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Şehnaz BOLKENT

Tip 2 diyabet (T2D) hiperglisemi, pankreatik beta hücrelerinden insülin salınımında bozukluk, insülin direnci ve dislipidemi ile ilişkili olan metabolik bir hastalıktır. Beta hücrelerinin fazla miktarda serbest yağ asidine maruz kalmaları sonucu, T2D ile ilişkili olarak beta hücre fonksiyon kaybı ve hücre kitlesinde azalma meydana geldiği bilinmektedir. Beta hücre fonksiyonuna önemli etkileri olan, GLP-1 ve analoglarının T2D’te terapötik etkiye sahip oldukları uzun yıllardır bilinmektedir. Bu çalışma, INS-1 beta hücrelerinde palmitik asit ile otofaji, apoptoz ve nekroz gibi üç farklı ölüm tipini uyarmak, bu hücre ölümleriyle reaktif oksijen türleri arasındaki ilişkiyi ortaya koymak ve yine bu hücre ölümleri üzerinde yeni bir GLP-1 analogu olan kuraglutid’in olası koruyucu ve iyileştirici etkisini ortaya koymak amacıyla tasarlanmıştır.

Bu çalışmada, INS-1 beta hücrelerine farklı dozlarda palmitik asit uygulamasının uyardığı otofajiyi göstermek için LC3 II, apoptozu göstermek için p53, sitokrom-c ve aktif kaspaz-3 protein miktarlarına western blot yöntemiyle bakıldı. Diğer bir ölüm tipi olan nekrozu göstermek için ise, LDH salınımı ELISA kit yardımıyla ölçüldü. ROS seviyeleri DCFHDA kullanılarak florometrik yöntemle ölçüldü. Ayrıca kuraglutid’in hücre ölümü üzerindeki koruyucu ve iyileştirici etkilerini göstermek için hücre ölüm belirteçleri değerlendirildi.

INS-1 beta hücrelerine geniş bir doz aralığında palmitik asitin farklı dozlarının uygulanması sonucu, hücrelerde otofaji, apoptoz ve nekroz olmak üzere üç farklı ölüm tipinin de uyarıldığı görüldü. Kuraglutid’in otofaji ve apoptoz üzerinde hem koruyucu hem de iyileştirici etkisi olduğu, ancak nekroz üzerinde sadece 3 mM palmitik asit verilen grupta iyileştirici etkisi olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, kuraglutid’in

lipotoksik şartlarda antiotofajik, antiapoptotik ve antinekrotik özelliklere sahip yeni bir GLP-1 analogu olduğunu ve bundan dolayı da preT2D ve T2D’de terapötik bir ajan olarak kullanılabileceğini söyleyebiliriz.

Nisan 2015, 79 Sayfa.

Anahtar kelimeler: Hücre ölümü, INS-1, kuraglutid, palmitik asit, tip 2 diyabet.

SUMMARY

M. Sc. THESIS

BIOLOGICAL ROLE OF A GLP-1 ANALOGUE ON FREE FATTY ACID-INDUCED APOPTOSIS IN INS-1 BETA CELLS

Eda OYAR YILMAZ

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Sehnaz BOLKENT

Type 2 diabetes (T2D) is a metabolic disorder associated with hyperglycemia, defect of insulin secretion from pancreatic beta cells, resistance to insulin, and dyslipidemia. Beta cell dysfunction and mass reduction associated with T2D occur in beta cells exposed to excess free fatty acids. The therapeutic effect of GLP-1 and analogue which have important influences on the functions of beta cells is known for many years. This study was designed to induce three different cell death types namely autophagy, apoptosis, and necrosis by palmitic acid in INS-1 beta cells; to reveal the relationship between ROS and cell death, and to show probable protective and curative effects of curaglutide, which is a new GLP-1 analogue.

In this study, protein amounts were determined, such as LC3 II for autophagy, and cytochrome-c, active caspase-3 and p53 for apoptosis by western blot analysis in INS-1 beta cells treated by palmitic acid in different doses. LDH release was measured by using the ELISA kit for necrosis, which is another cell death type. ROS levels were measured DCFHDA using with fluoremetric method. In addition, the markers of cell death was evaluated to show the preventive and curative effects of curaglutide on cell death.

Three different cell death types such as autophagy, apoptosis, and necrosis were induced by different doses of palmitic acid in a wide dose range in INS-1 beta cells. It was determined that curaglutide has both preventive and therapeutic effects on autophagy and apoptosis, but it was found that the group administered with 3 mM palmitic acid was only found to have a therapeutic effect on necrosis. As a result, we could say that

curaglutide is a new GLP- 1 analogue that has antiautophagic, antiapoptotic, and antinecrotic properties and also that it can be used as a therapeutic agent in the lipotoxic conditions in preT2D and T2D.

Nisan 2015, 79 Pages.

Keywords: Cell death, curaglutide, INS-1, palmitic acid, type 2 diabetes.

1. GİRİŞ

Diyabet toplumda sıklığı gittikçe artan önemli bir metabolik hastalıktır (Xu ve diğ., 1999; Kritikos ve diğ., 2014). Bu hastalığın tip 1 ve tip 2 diyabet olmak üzere iki formu vardır. Tip 1 diyabette (T1D) insülin çok az üretilir ve/veya hiç üretilmezken, tip 2 diyabet (T2D)'te ise insülin üretilir, ancak hedef hücreler tarafından etkin kullanılamaz. Diyabet hastalarının çoğu tip 2 diyabettir. Dünya sağlık örgütünün (WHO) yaptığı istatistiklere göre, dünya çapında her yıl diyabet olan birey sayısı artarken, 3 milyon insan da diyabetten hayatını kaybetmektedir (Alexey ve diğ., 2007). Primer olarak insülin direnci, daha sonra beta hücre fonksiyon kaybı ve hepatik glukoz metabolizmasının bozulması gibi patofizyolojik olaylar metabolik bir hastalık olan T2D gelişimine neden olur (Scheen ve diğ., 1996; Aronoff ve diğ., 2004). Bu metabolik bozukluk mikro- ve makrovasküler komplikasyonlara yol açan kronik hiperglisemi ve dislipidemi ile sonuçlanır (Stratton ve diğ., 2000).

Plazma serbest yağ asidi miktarının artması insülin direnci patofizyolojisinde önemli bir role sahiptir (Shulman, 2000). Aynı zamanda artan serbest yağ asidi miktarı kaspaz 3 aktivasyonuna, DNA fragmantasyonuna ve sitokrom-c salınmasına yol açarak beta hücre apoptozuna neden olur (Choi ve diğ., 2011). Tip 2 diyabet gelişiminde beta hücre fonksiyon kaybının ilk fazında glukoz tolerans azalır, ikinci fazda ise insülin sekresyonu azalır (Del Prato ve diğ., 2001). Ayrıca T2D'li bireylerde beta hücre kitlesinin azaldığı gözlenir. Beta hücre kitlesinin azalması, proliferasyonun azalmasından ziyade apoptozun artması ile ilişkilidir (Butler ve diğ., 2003). Bundan dolayı araştırmalarda fonksiyonel beta hücre kitlesinin korunmasına ağırlık verilmiştir ve T2D'in gelecekteki tedavisi için hedef beta-hücrelerini hem apoptotik ölümden hem de fonksiyon bozukluğundan korumak olmalıdır (Dalle ve diğ., 2013). Tip 2 diyabetin tedavisi için ilaç geliştirme çalışmaları beta hücrelerinde GLP-1'in etkisini arttırmaya yönelik olmalıdır.

Apoptotik hücre ölümü istenmeyen, zararlı ya da enfekte olmuş hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlayan bir çeşit hücre intihar mekanizması olup, doku homeostazının

devam ettirilmesinde önemli bir rol oynar (Kerr ve diğ., 1972). Apoptoza özgü başlıca morfolojik kriterler hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, membran tomurcuklanması, DNA fragmantasyonu ve son olarak DNA fragmantlarının apoptotik cisimcikler içinde paketlenmesidir (Wyllie ve diğ., 1980). Apoptoz düzenleyici mekanizmada meydana gelen herhangi bir bozulma nörodejeneratif hastalıklar, diyabet ve onkogeneze gibi çeşitli patolojik durumlara neden olur. Hücreler arası sinyal yollarıyla aktif hale gelen apoptotik hücre ölümü fizyolojik, kimyasal ve biyolojik faktörler ile tetiklenebilir (Lee ve diğ., 2007). Tip 2 diyabet alanında yapılan araştırmaların önemli bir kısmı lipotoksik şartlarda meydana gelen beta hücre apoptozu üzerine yoğunlaşmıştır. Beta hücrelerinde meydana gelen apoptoz insülin salınımında bozulma meydana getirir. Bundan dolayı diyabetli hastalarda insülin üretimini artırarak glukoz toleransını iyileştirmek, bu hastalığın tedavi edilebilmesi için yapılan klinik araştırmaların temelini oluşturmaktadır.

Pankreatik beta hücrelerinden insülin salınmasını uyaran ve barsak hormonları olarak bilinen inkretin hormonlarının uygulanması umut vaat eden araştırmalardır (Mentlein, 2005). Glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1), insülin salınımını arttıran güçlü bir glukoinkretin hormondur ve diyabetin tedavisinde önemli bir potansiyel ilaç olarak düşünülmektedir (Ahren, 2005). Bununla birlikte, GLP-1 bağırsakta bulunan L-hücreleri tarafından salındıktan sonra birkaç dakika içinde dipeptidil peptidaz IV (DPP-IV) olarak bilinen bir enzim tarafından hızla proteolitik olarak parçalandığından, oldukça kısa bir plazma yarı ömrüne sahiptir ve bu nedenle bu hormonun klinikte kullanımı oldukça kısıtlıdır (Meurer ve diğ., 1999; Holst, 2004a).

Diyabetin GLP-1 aracılığı ile tedavi edilebilmesi amacıyla yapılan çalışmalar çeşitli DPP-IV inhibitörleri ve GLP-1 analogları üzerinde yoğunlaşmış ve GLP-1'in meydana getirdiği birçok biyolojik olayı gerçekleştirebilen yeni analoglar geliştirilmiştir (Holst, 2004b). Bunlardan kuraglutid, DPP-IV'e karşı daha dirençli olduğundan daha uzun ömürlü olup, diğer analoglar gibi GLP-1 reseptörüne bağlanarak beta hücrelerinde siklik adenosin mono fosfat oluşumunu tetiklemek suretiyle insülin salınımını arttırdığı düşünülen, 28 amino asitli bir peptittir (Greig ve diğ., 1999).

GLP-1'in güçlü insülinotropik etkisi diyabet tedavisinde oldukça önemlidir. Ancak, bu molekülün hızla parçalanması enjeksiyon için elverişsiz bir durum oluşturmaktadır.

GLP-1 tek doz intravenöz veya subkutan enjeksiyon ile ekzojen olarak uygulandığında yarı ömrünün oldukça kısa olduğu belirlenmiştir (Visboll ve diğ., 2003). Bununla birlikte, yapılan çalışmalarda insülin pompası kullanılarak gerçekleştirilen uzun süreli (6 hafta) subkutan uygulama ile bu hormonun etkinliğinin arttığı da gösterilmiştir. GLP-1'in pankreatik adalar üzerine olan etkilerinin yanı sıra, hipotalamus ve beyin sapı, gastrointestinal kanal ve karaciğeri etkileyerek glukoz homeostazını sağladığı da bilinmektedir. GLP-1 ve reseptörlerinin hipotalamus ve beyin sapında bulunduğu saptanmasını (Alvarez ve diğ., 1996) takiben sıçan ve insanlarda yapılan farklı çalışmalar ile GLP-1 reseptör aktivasyonunun normal veya anormal glukoz metabolizması durumunda iştah kapatıcı bir etki yaptığı ortaya konmuştur (Larsen ve diğ., 2001a; 2001b).

GLP-1'in glukoz homeostazı üzerine olan en belirgin etkisi pankreatik adalardan insülin ve glukagon salınımı üzerinden gerçekleşse de GLP-1'in hepatik glukoz alımı ve üretimini doğrudan düzenlediğini gösteren bulgular da mevcuttur (Dardevet ve diğ., 2004).

Yapılan birçok çalışmada serbest yağ asidi olan palmitik asiti muamelesinin INS-1 sıçan beta hücrelerinde lipotoksisiteye yol açıp, apoptoza neden olduğu gösterilmiştir. Ancak yapılan kapsamlı literatür taramasına göre, kuraglutid'in bu lipotoksik şartlardaki etkisi hiç araştırılmamıştır.

Yukarıdaki literatür bilgileri ışığında, bu çalışmanın amaçları ve çıktıları aşağıda özetlenmiştir.

Amaçlar:

1. Palmitik asit ile lipotoksik şartlarda, INS-1 sıçan pankreatik beta hücre soyunda oluşması muhtemel olan otofaji, apoptoz ve nekroz gibi hücre ölüm tiplerini doza bağlı olarak belirlemek.
2. Lipotoksik şartlarda, bu hücre soyunda yeni bir GLP-1 analogu olan kuraglutid'in hücre ölümü üzerinde etkili olup olmadığını ortaya koymak.
3. Lipotoksik koşullarda beta hücrelerinde meydana gelen ROS (reaktif oksijen türleri) seviyelerinin ölçümüyle oksidatif stres varlığını belirlemek.
4. Mevcut kullanılan GLP-1 analoglarına ilaveten tip 2 diyabet tedavisinde daha yaygın etkiye sahip yeni bir GLP-1 analogu önermek.

Çıktılar:

İn vitro şartlarda palmitik asit ile oluşturulan lipotoksisite durumunda, yapısal ve biyokimyasal özellikleri bakımından insanlarda gözlemlenen T2D hastalığı ile büyük benzerlik gösteren, lipotoksik koşullarda, INS-1 sıçan pankreatik beta hücre soyunda; kuraglutid uygulamasının bu hastalığın tedavisinde terapötik bir ajan olarak etkili olup olmadığı aydınlatılmaya çalışılmıştır. Ayrıca, kuraglutid'in bu hücre soyunda koruyucu bir ajan olarak etkin olup olmadığı da belirlenmiştir. Çalışmamız ile, tip 2 diyabet (T2D)'li bireylerde tedavi amaçlı kullanılacak yeni bir terapötik ajan önerilmektedir.

2. GENEL KISIMLAR

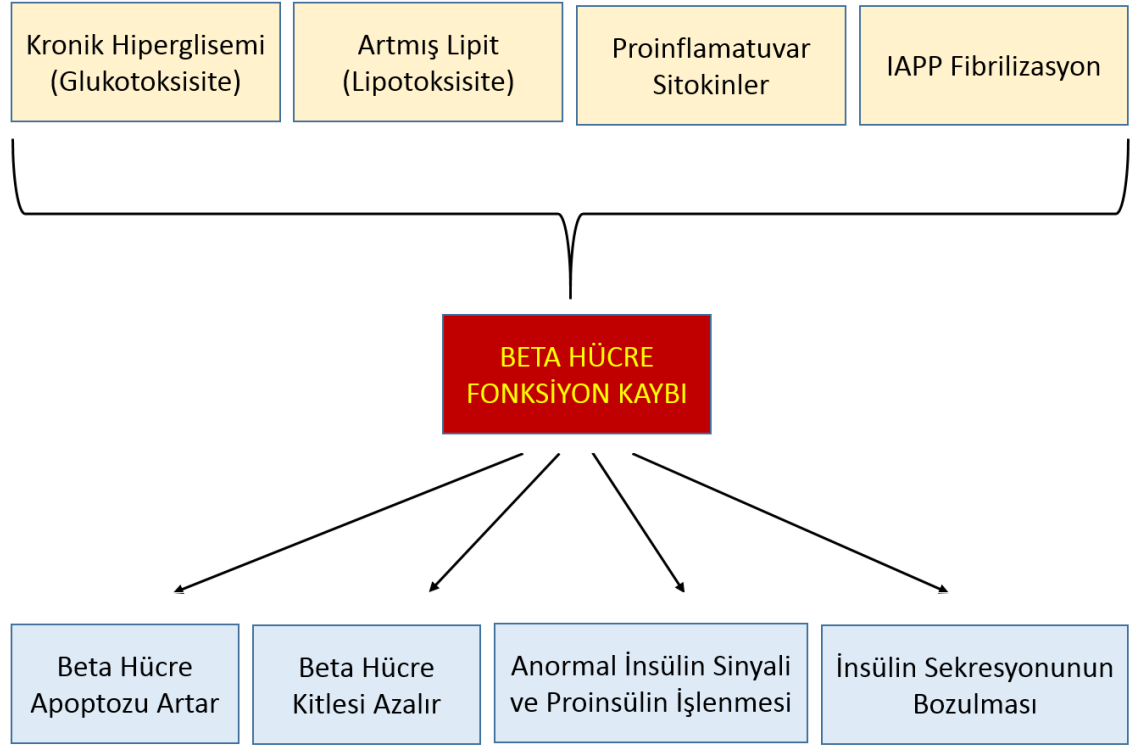
2.1. TİP 2 DİYABET (T2D)

Tip 2 diyabet (T2D) enfeksiyon, kalp krizi, serebral vasküler hastalıklar, böbrek yetmezliği, körlük, kol ve bacakta kangren gibi ciddi sağlık problemleri ile ilişkili yaygın bir hastalık olup, pankreatik beta hücrelerinden insülin sekresyon bozukluğu, insülin direnci, hiperglisemi ve dislipidemi ile ilişkilidir (Peng ve diğ., 2011). Serbest yağ asiti miktarının artmasına bağlı olarak oluşan lipotoksisite beta hücre fonksiyon bozukluğuna ve apoptoza neden olur. Tip 2 diyabetin iki önemli özelliği vardır. Bunlardan biri, insülin reseptörleri veya post insülin reseptör bozukluklarının neden olduğu insülin aktivasyonuna karşı hücrelerde direnç oluşması iken, diğeri beta hücrelerinde insülin salımında ve insülin yapımında bir bozukluk olmasıdır. Her ikisi de genetik olarak kontrol edilen faktörler olup, bunlardan hangisinin primer ağırlıkta rol oynadığı henüz açık değildir. İnsülin direnci, dolaşımdaki serbest yağ asit konsantrasyonunun artmasına ve adipoz doku dışındaki (ektopik) dokularda yağ birikmesine yol açar. Bazı genler insülin direncine ve diyabete yol açabilirken (Lyssenko ve diğ., 2008), yapılan epidemiyolojik çalışmalara göre fiziksel aktivitenin azalması ve kalori alımının artmasına bağlı olarak gelişen obezitede insanlarda insülin direncine ve T2D'e neden olmaktadır (James ve diğ., 2008). Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF)'na göre, 2011 yılında dünyada 336 milyon T2D'li insan vardır ve bu sayı her yıl yaklaşık 4.6 milyon artmaktadır. Tip 2 diyabet üç stratejiyi takiben gelişir:

- Bazı bireyler çevresel faktörler ve/veya genetik yatkınlıktan dolayı insülin direnci gelişimine daha eğilimlidir.
- Periferik dokularda insülin etkisinin eksikliğini gidermek amacıyla, pankreatik beta hücreleri insülin üretimini ve salınımını artırır ve sonuç olarak beta hücre kitlesi artar.
- İnsülin ihtiyacının artması sonucu beta hücreleri yeterli insülin salgılayamaz ve sonuç olarak glukoz toleransı bozulur. Bu aşamada hem açlık hem de yemek sonrası kan glukoz seviyeleri önemli miktarda artar ve sonunda T2D tetiklenir.

- Hem insülin direnci hem de beta hücre fonksiyon bozukluğu T2D' in gelişiminde önemli unsurlardır (Kahn, 2003).

Hiperglisemi (glukotoksisite), hiperlipidemi (lipotoksisite), ada amiloid polipeptit veya amilin (IAPP) ve proinflamatuvar sitokinler gibi çeşitli mekanizmalar beta hücre fonksiyon bozukluğu sonucunda T2D'e neden olur (Kang ve diğ., 2012) (Şekil2.1).



Şekil 2.1: Tip 2 diyabette beta hücre fonksiyon kaybının patogenezi (Kang ve diğ., 2012)

2.2. LİPOTOKSİSİTE

Adipositler lipid damlacıklarında trigliserit formundaki yağ asitlerinin fazlasını depolama kapasitesine sahipken, adipoz olmayan dokuların lipid depolama kapasitesi sınırlıdır. Karaciğer, kas, kalp ve pankreatik ada gibi adipoz olmayan dokularda lipid birikiminin artması yani "Lipotoksisite" hücresel bozukluk ve/veya hücre ölümü ile ilişkilidir. Pankreatik beta hücrelerinde lipid birikimi insülin sekresyon bozukluğuna yol açar, aynı zamanda hem apoptotik hücre ölümüne hem de diyabetin patogeneziye katkıda bulunabilir. Adipoz olmayan hücrelerde lipotoksisiteden korunma ve lipotoksisitenin düzenlenmesi ile ilgili hücresel mekanizmayı çözmek ve hastalıklara

karşı terapötik ajanlar geliştirmek hedeflenebilir. Doymuş ve doymamış yağ asitleri farklı derecelerde lipotoksisiteye yol açar. Kardiyomiyositlerde (de Vries ve diğ., 1997), pankreatik beta hücrelerinde (Cnop ve diğ., 2001, Maedler ve diğ., 2001), meme kanseri hücre soylarında (Hardy ve diğ., 2000) ve hematopoiyetik prekürsor hücre soyları ile yapılan çalışmalarda daha çok doymuş yağ asitlerin birikmesi sonucu lipotoksisitenin oluştuğu görülmüştür. Doymuş yağ asitleri hücre ölümünü başlatırken, doymamış yağ asitleri ise lipotoksisiteden korur, ancak kesin etkin mekanizması halen bilinmemektedir (Hardy ve diğ., 2000; Cnop diğ., 2001; Maedler ve diğ., 2001).

Hücre kültürü çalışmalarına göre, uzun zincirli yağ asitleri apoptoz aracılı hücre ölümünü başlatır. Bu lipoapoptoz C4-C14 arasındaki karbon uzunluğuna sahip yağ asitlerinden ziyade, palmitat (C16:0) ve stearat (C18:0) gibi uzun karbonlu yağ asitleri ile oluşur (Paumen ve diğ., 1997; Cnop ve diğ., 2001). Uzun zincirli yağ asitleri ve onların türevleri, membran sentezi dahil çeşitli hücresel süreçler, beta-oksidasyon yoluyla enerji üretimi, hücreler arası sinyal iletimi ve protein modifikasyonu için gereklidir. Ancak yağ asitlerinin alınması ve birikimi her zaman için arzu edilen bir olay değildir.

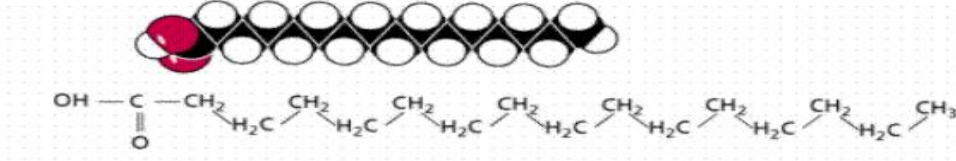
Yapılan birçok çalışmada, uzun zincirli doymuş yağ asitlerinin yüksek konsantrasyonunun hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve hücre ölümüne yol açtığı gösterilmiştir. Hücrelere fazla miktarda palmitik asit uygulandığında, mitokondriden sitokrom c salınmasına, fosfatidilserin translokasyonuna, kaspaz 3 aktivasyonuna (Sparagna ve diğ., 2000) ve DNA fragmantasyonuna (Paumen ve diğ., 1997) yol açar. Aynı zamanda palmitik asit uygulaması Bcl-2 gibi anti-apoptotik faktörleri baskılayabilir (Shimabukuro ve diğ., 1998).

2.2.1. Palmitik Asit

Suda az çözünen apolar özellikte, uzun hidrokarbon zincirli karboksilik asitlere “yağ asitleri” denir. Ancak karboksilik asit grubu polardır ve bu hidrofilik kısım sayesinde kısa zincirli yağ asitleri az da olsa suda çözünür. Tüm organizmalarda yağların ve membran lipidlerinin yapı taşları olarak bulunan yağ asitleri vücutta serbest (esterleşmemiş) veya triaçilgliserol (%90’dan fazlası) gibi daha karmaşık moleküller (yağ asiti esterleri) olarak bulunurlar. Bir yağ asidi, terminal karboksil grubu bulunan bir hidrokarbon zincirden oluşur. Serbest yağ asitlerinde zincir uzunluğu arttıkça

hidrofobik kısım daha baskın hale gelip, suda çözünürlüğü azalır ve bu nedenle albumine bağlı olarak taşınmak zorundadır.

Yağ asitleri yapılarında çift zincir bulunup bulundurmamalarına göre “doymuş yağ asitleri” ve “doymamış yağ asitleri” olarak adlandırılırlar. Hayvan ve bitkilerde bulunan, kimyasal formülü $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$ olan 16 karbonlu (C16:0) en yaygın doymuş yağ asiti palmitik asittir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Palmitik asitin kimyasal yapısı (<https://bioswchem.wordpress.com>).

2.3. TİP 2 DİYABET İLE İLİŞKİLİ TERAPÖTİK UYGULAMALAR

Tip 2 diyabet tedavisinde öncelikle yaşam tarzı değişiklikleri yapılması gerekmektedir. Önerilen yaşam tarzı değişiklikleri, tıbbi beslenme (diyet), fiziksel aktivitenin artması, alkol ve sigaradan uzak durulmasıdır. Bu önerilere rağmen metabolik kontrol sağlanamayan hallerde, genellikle oral antidiyabetik ilaçlar tercih edilir (Kayaalp, 2005). Günümüzde kullanılan, terapötik önemi olan oral antidiyabetik bileşikler, çeşitli mekanizmalar ile glukoz düzeyini düşürmektedir (Scheen, 2007). Oral antidiyabetik ilaçlar etki mekanizmasına göre şöyle sınıflandırılır:

- İnsülin salgılatıcı ilaçlar (sekretagoglar): Sülfonilüreler, meglitinidler vd.
- İnsüline duyarlılığı arttıran ilaçlar (insülin direncini azaltmaya yönelik): Biguanidler (metformin), Tiyazolidindion türevleri vd.
- Glukoz emilimini yavaşlatan ilaçlar: Alfa glikozidaz inhibitörleri vd.
- Yeni geliştirilen antidiyabetik ilaçlar ve tip 2 diyabet tedavisinde kullanılmaya aday diğer bileşikler
 - i. İnsülin direncini azaltan ilaçlar: Tiyazolidindion türevleri vd.
 - ii. Serbest yağ asidi metabolizmasını değiştiren ilaçlar
 - Non-esterifiye yağ asitleri salınımını inhibe eden bileşikler: İnsülin vd.

- Yağ asidi oksidasyon inhibitörleri: Klomoksir vd. (Mohrbacher ve diğ., 1987)
- iii. İnsülin sekresyonunu uyaran ilaçlar
- Alfa-2 adrenerjik reseptör antagonistleri: Midaglizol vd. (Mohrbacher ve diğ., 1987; Dow ve Kreutter, 1995)
 - Glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1= glukagon benzeri peptid analogu Exenatide vd. (Eng ve diğ., 1992)
 - Dipeptidil peptidaz 4 (DPP-IV) inhibitörleri: Sitagliptin, Vildagliptin, Meglitinidler vd. (Raz ve diğ., 2006; Rosenstock ve diğ., 2007)
 - Yeni sülfonilüre grubu ilaçlar: Glimepirid vd. (Pfützner ve diğ., 2007).
- iv. Yemek sonrası glukoz artışının önlenmesinde kullanılan ilaçlar
- v. Kilo kaybı sağlanmasında kullanılan ilaçlar

2.4. İNSÜLİNOMA

İnsülinoma pankreasta bulunan fonksiyonel (insülin üretmelerinden dolayı) nöroendokrin tümörlerin nadir görülen bir tipidir. Beta hücreleri, kan glukozu arttığı zaman insülin salgılar ve kan glukoz değeri normal seviyeye ulaştığı zaman insülin salgılanması durur. İnsülinoma oluştuğunda glukoz tarafından insülin salgısı düzenlenemez hal halır ve tümörler insülin sekresyonunu sürdürerek, kan glukozunun normal değerlerinin altına düşmesine yol açar (hipoglisemi) (<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/000387.htm>).

2.5. PANKREATİK BETA HÜCRE SOYLARI

Pankreatik beta hücre soyları primer beta hücre fizyolojisinden biraz farklılık gösteriyor olsalar da primer adacıkların sınırlı kullanımının üstesinden gelebilmek, beta hücre fonksiyonu ve fonksiyon kaybının moleküler mekanizmasını anlamak için sıklıkla kullanılırlar.

İnsülinoma kökenli hücrelerin sınırsız büyüme gibi avantajları olsa da normal beta hücreleriyle karşılaştırıldıklarında glukozla uyarılmış insülin sekresyonunda farklılık gösterirler. Pankreatik beta hücre soylarının bazıları normal beta hücrelerinde glukozla uyarılan insülin salgısının %30'undan daha fazla insülin salgırlar. Ancak, yalnızca birkaç hücre fizyolojik aralıkta glukoz konsantrasyonuna normal yanıt verir (Efrat, 2004).

HIT-T15 hücreleri glukoz konsantrasyonlarındaki küçük bir değişiklikte bile insülin salgılamakta, β HC-9, MIN6, INS-1 ve Blox5 hücreleri (insülinoma beta hücre soyları) ise normal glukoz konsantrasyonunda insülin salgılanmasını devam ettirirler. Çalışmalarda sıklıkla radyasyon veya virus ile uyarılan insülinoma tümör hücre soyları kullanılır.

Yaptığımız literatür taramalarına göre, lipotoksik şartlarda daha çok INS-1 sıçan pankreatik beta hücre soyu ile çalışılmış olmasından dolayı bu çalışmada INS-1 sıçan pankreatik beta hücre soyu seçilmiştir.

2.5.1. INS-1 Sıçan Beta Hücre Soyu

İnsülinoma hücre soyu glukozu yanıt (glukokinaz ve GLUT2 ekspresyonu ile ilgili) ve yüksek insülin içeriği gibi pankreatik beta hücrelerinin önemli karakteristik özelliklerini gösterir (Asfari ve diğ., 1992). INS-1 hücreleri X-ışını radyasyonu ile uyarılan sıçan insülinoma dokusundan izole edilmiştir. Bu hücreler hem proinsülin I hem de proinsülin II sentezlerler. INS-1 sıçan pankreatik beta hücre soyunun insülin içeriği doğal hücrelerindeki kadar sadece %20'sidir. Bunun nedeni ise kültür medyumunda toksik, irrite edici, proteinleri geri dönüşümsüz olarak denatüre eden merkaptetanole ihtiyaç duymalarıdır. Bu bileşen olmadan hücreler çoğalamaz ve birçok önemli fonksiyonel özelliklerini kaybederler.

2.6. HÜCRE ÖLÜMÜ

Hücre ölümü gelişimin bütün evrelerinde, viral ve bakteriyel enfeksiyonlarda, dejeneratif hastalıklarda, hücresel strese cevapta, inflamasyon ve yaralanmada önemli rol oynamaktadır. Apoptoz, otofaji, nekroz, senesens ve mitotik katastrof olmak üzere beş çeşit hücre ölümü vardır.

Tip 2 diyabet insülin direncinin gelişimiyle tanımlanan ve beta hücrelerinde fonksiyon kaybıyla sonuçlanan kompleks bir hastalıktır. Reaktif oksijen türlerinin üretimi, metabolik yollardaki aksaklıklar, hücre içi kalsiyum miktarının artması ve endoplazmik retikulum stresinin aktivasyonu gibi çeşitli mekanizmalar beta hücrelerinin fonksiyonunu (insülin gen ekspresyonunu azaltır, insülin sekresyonunu bozar) olumsuz etkileyerek apoptotik ölüme yol açar (Chang-Chen ve diğ., 2008).

2.6.1. Apoptoz

Çok hücreli organizmalarda gelişimin yanı sıra, homeostazın sağlanmasında, enfekte olmuş, hasar görmüş veya transforme olmuş hücrelerin uzaklaştırılmasında hücre intihar programının aktivasyonu ile gerçekleşen önemli bir mekanizmadır. Programlı hücre ölümü (apoptoz) hasar görmüş ve istenilmeyen hücrelerin morfolojik karakteristik özelliklerine bakılarak ortaya çıkan bir terimdir. Bu morfolojik özellikler hücre büzülmesi, kromatin kondensasyonu ve plazma membranının bozulması şeklindedir. Bu morfolojik değişiklikler “kaspaz” adı verilen sistein aspartat proteazlar ile gerçekleştirilmekte ve nuklear DNA ile proteinler bu proteazlar tarafından kesilmektedir. Bu işlem sonucunda oluşan apoptotik cisimler komşu hücreler tarafından inflamatuvar cevap olmaksızın, fagositoz ile ortadan kaldırılmaktadır. Apoptotik ölüme meydana gelen aksaklıklar kanser, nörodejeneratif ve otoimmün hastalıklarla ilişkilendirilmektedir. Apoptotik hücre ölümünün tetiklenip tetiklenmemesi hasarın boyutuna ve hücrenin tipine bağlıdır (Ellis ve diğ., 1991).

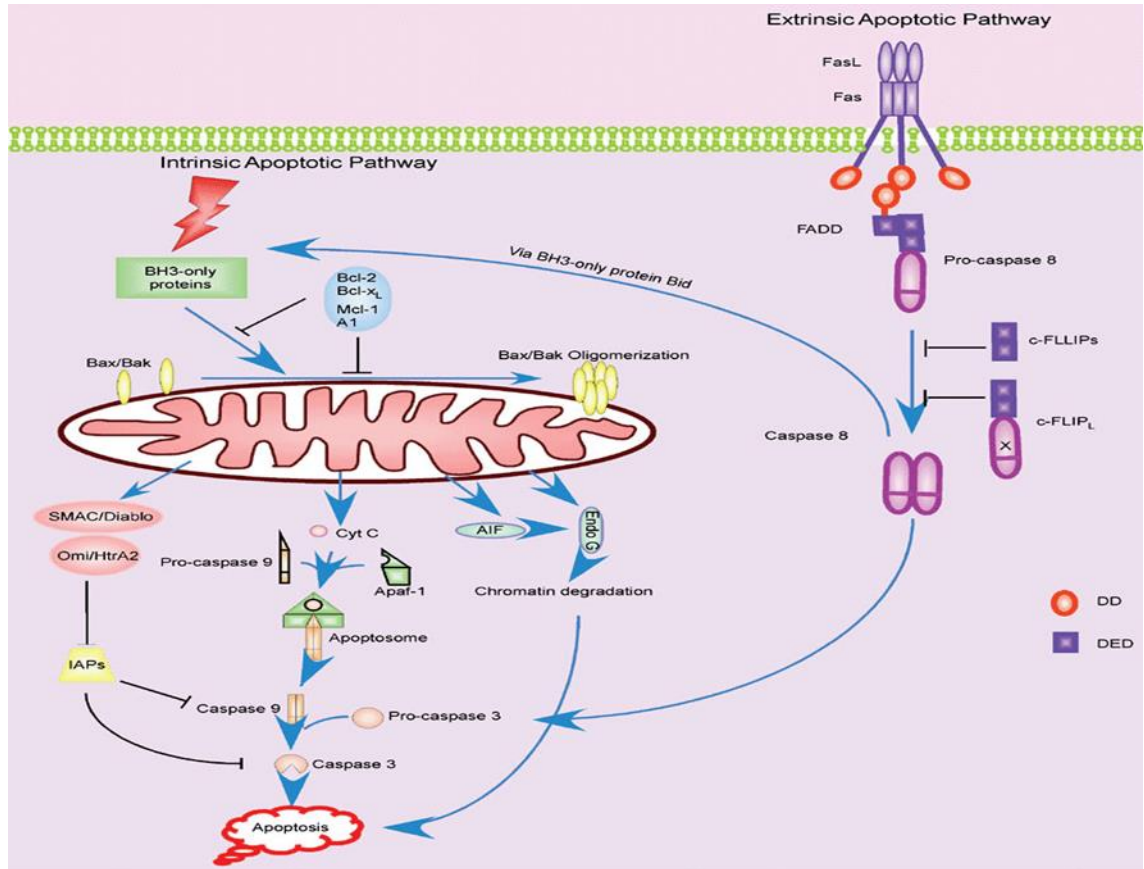
2.6.1.1. Apoptozun Moleküler Mekanizması

Memelilerde apoptotik hücre yolağı, hücre dışı yolak (TNF reseptör ailesinin alt grubu olan ölüm reseptörleri) ve hücre içi yolak (Bcl-2 ailesi üyeleri tarafından kontrol edilen) olmak üzere iki farklı mekanizma ile düzenlenir. (Marsden ve Strasser, 2003). Başlatma modlarındaki farklılığa rağmen, her iki yolak da kaspaz ailesi üyesi olan proteolitik enzimlerin aktivasyonuna yol açtığından, birbiri ile kesişmektedir.

Hücre dışı yolakta (reseptör aracılı yolak) ölüm, ölüm reseptörleri olan TNF reseptör süper ailesinin belli üyelerinin (Fas, TNFR1, ölüm reseptörü DR1, DR3 ve DR5) teşviki ile başlar (Krammer, 2000). Fas, trimerik Fas ligandına bağlanarak sitozolik bir protein olan FADD'ı (Fas ilişkili ölüm kısmı) aktive eder. Bu aktivasyon, Fas reseptörünün hücre içinde kalan ölüm kısmı ile FADD'ın C ucu ölüm kısmı arasındaki homotipik etkileşim aracılığı ile olur (Boldin ve diğ., 1995; Chinnaiyan ve diğ., 1995). Aktive olan FADD, reseptör aracılığıyla tetiklenen yolakta, apoptotik sinyal akışını başlatan kaspaz 8'i uyarır (Krammer, 2000). Kaspaz 8 ve FADD ölüm reseptörleri ile tetiklenen yolakta rol oynayan temel moleküllerdir (Yeh ve diğ., 1998; Zhang ve Bieker, 1998) (Şekil 2.3).

Hücre içi yolak oksijen yetersizliği, büyüme faktörü eksikliği ve sitotoksik ajanlar gibi hücresel strese neden olan çeşitli faktörler tarafından tetiklenebilir. Bu yolağın

merkezinde, hücre içi kaspaz 9'u aktive eden apoptozom oluşumu yatar. Sonlandırıcı bir sinyal ya da hücre içi bir değişiklik mitokondriden sitozole sitokrom c salınmasına neden olur. Sitokrom-c, dATP varlığında Apaf-1'i uyararak prokaspaz'ın aktivasyonunu sağlar. Mitokondriyal yolda kaspaz akışını başlatan enzim olarak bilinen kaspaz-9'un aktifleşmesi ise, icracı kaspazları uyarır ve böylece apoptotik ölüm gerçekleştirilmiş olur (Şekil 2.3)



Şekil 2.3: Hücre dışı sinyallerle tetiklenen, hücre ölüm reseptörleri aracılığıyla etkisini meydana getiren hücre dışı ve mitokondri aracılığıyla gerçekleşen hücre içi apoptotik yolak gösterilmektedir (<http://pt851.wikidot.com/stroke-cell-bio>).

Ölüm reseptörü ile tetiklenen yolak doğrudan kaspaz aktivasyonuna neden olmasına karşın, hücre içi ya da stres tetikli apoptoz yolağında kaspaz aktivasyonu pro ya da antiapoptotik proteinlerin (Bcl-2 ailesini kapsayan) oluşturduğu ağ kompleksinden oluşur (Martin ve Elkon, 2004).

Memelilerde hücrenin çeşitli yerlerine yerleşmiş, farklı işlevlere sahip, Bcl-2 ailesine ait en az 20 üye bilinmektedir. Ailenin kurucu üyesi olan BCL-2, ilk olarak B-hücre

lenfomalarında keşfedilmiştir (McDonnell ve diğ., 1989). Bu aileye ait tüm üyeler çeşitli pro ya antiapoptotik proteinlerle etkileşime girmelerine izin veren bir ya da daha fazla Bcl-2 homolojisi (BH) gösteren kısımlarına sahip, yapı ve işlevleri bakımından birbiriyle etkileşim halinde olan 3 gruba ayrılır.

Birinci grup Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 ve A1'i içerir ve bu proteinler hücreleri büyüme faktör eksikliği, radyasyon (UV ve gamma) ve kemoterapi gibi ölüm tetikleyicilere karşı korur. Bu gruba ait proteinler mitokondri dış zarının geçirgenliğini azaltarak, sitokrom-c gibi mitokondriyal proteinlerin sitozole geçmesine mani olur ve hücrenin apoptoza gitmesini engeller. Bax, Bak ve Bok proteinlerini içeren ikinci Bcl-2 grubu, yapısal olarak Bcl-2'ye benzerlik gösterir (Bcl-2 gibi 3 BH kısmı içerir) ve apoptozu teşvik eder.

İkinci gruba ait proteinler, apoptozu teşvik etme işlevlerini, mitokondri ya da diğer membranların geçirgenliğini değiştirip, proapoptotik araçların salınmasını sağlayarak başarır. Son grup olan BH3 proteinleri proapoptotik proteinler olup Bid, Bad, Bik, Bim, Bmf, Hrk Noxa ve Puma üyelerine sahiptir ve Bcl-2 ailesinin koruyucu etkilerine zıt etkiler meydana getirir. Bazı BH3 proteinleri apoptozda hücreler için koruyucu görevi üstlenirken, diğerleri doğrudan apoptozu aktive etmede görev almaktadır (Danial ve diğ., 2003). BH3 üyeleri çeşitli organellerde nöbetçi gibi hareket edip, ölüm ya da sağkalım sinyallerine uyum sağlar ve Bax/Bak tetikli apoptozu kolaylaştırmaktadır. Pro ve anti apoptotik proteinler arasındaki denge ya da etkileşimler hücrenin yaşayıp yaşamayacağını belirlemeye yardım etmektedir (Gross, 1999).

Senkronize şekilde apoptoza gitmesi için tetiklenen hücrelerin sitozolik ekstraktlarında yapılan çok sayıdaki çalışma, apoptozun neden olduğu biyokimyasal ve morfolojik değişikliklerin hücrenin plazma zarı, sitoplazması ve nukleusu gibi tüm unsurlarını etkilediğini ortaya koymuştur (Lazebnik ve diğ., 1993). Nukleusta gözlenen başlıca değişiklikler apoptotik hücre ölümünün en belirgin özellikleri olan kromatin yoğunlaşması, DNA'nın endonükleazlar aracılığıyla yaklaşık 180-200 baz çiftlik parçalara ayrılması ve yoğunlaşmış kromatinin nukleus zarına doğru göç etmesidir. Apoptotik hücrelerde sitoplazma büzüşmüş ve eozinofilik bir görünüm almıştır. Bu hücrelerin sitoplazmik organellerinde aşırı bir hasar gözlemlenmemesine karşın, normal fizyolojik koşullardaki morfolojilerinde de olmadığı saptanmıştır. İç zarda pH kaybı,

matriksin ozmotik olarak şişmesi, dış zarın bozulması ve zarlar arasındaki bölgeden proapoptotik proteinlerin salınması, apoptotik hücrelerin mitokondrilere ait başlıca değişikliklerdir (Saraste ve Pulkki, 2000).

Apoptotik hücrelerde gözlenen en belirgin biyokimyasal değişiklik, hızla RNA ve protein sentezinin azalmasıdır (Cohen, 1993). Normal fizyolojik şartlar altında hücre zarının iç ve dış zarındaki fosfolipitler asimetrik dağılmışlardır. Ancak normal şartlarda hücre zarının iç kısmında lokalize olmuş fosfotidilserinin hücre dış zar yüzeyindeki proteinlere bağlanması ile bu asimetri bozulur ve apoptotik hücre, komşu hücrelerin makrofajları tarafından tanınır hale gelir. Fosfotidil reseptörleri taşıyan komşu makrofajlar apoptotik hücreleri içine alırlar ve bu yolla dokuyu apoptotik cisimlerden temizlemiş olurlar. Sürecin başından sonuna kadar, hücre zarı parçalanmayıp, hücre içi bileşenler dışarı sızmadığı için inflamasyon oluşmaz (Fiers ve diğ., 1999).

2.6.2. Otofaji

Otofaji embriyonik gelişim, homeostaz ve hastalıklarda önemli bir katabolik süreçtir. Otofaji, hücre içi makromoleküllerin ve organellerin bir kesecik içine alınarak lizozomlara yönlendirilmesi ve lizozomla birleşerek burada parçalanmasına yol açan bir mekanizmadır. Hücre içerisinde uzun ömürlü ve kısa ömürlü proteinlerin parçalanma mekanizmaları değişmektedir; örneğin kısa ömürlü proteinler ubiquitin ile işaretlenerek parçalanırken, uzun ömürlü proteinler ve organeller lizozomlar tarafından otofaji mekanizması ile parçalanırlar, oluşan yapı taşları tekrar kullanılmak üzere hücre metabolizmasına katılır. Otofaji, kelime anlamı olarak kendi kendini (*auto*) yeme (*phagy*) anlamına gelir ve hücrenin açlıkla karşılaştığı fizyolojik koşullarda, besin elde etmek için hücre içindeki yapıları nasıl parçalandığını ifade etmek amacı ile kullanılmıştır. Yapılan ilk çalışmalarda otofajinin, besin yokluğunda hücre içi moleküllerin geri dönüşümünü sağlayarak hücrenin stres ortamına uyumuna yardım ettiği, böylelikle hücre homeostazının korunmasında etkili bir yol olduğu gösterilmiştir (Ohsumi, 2001). Son yapılan çalışmalara göre ise otofajinin metabolizmanın düzenlenmesi, morfogenez, hücre farklılaşması, yaşlanma, hücre ölümü ve bağışıklık sisteminin bir parçası olarak hücre içi patojenlerin yıkımında da etkili bir rol oynadığı ortaya koyulmuştur (Shintani ve diğ., 2004; Mizushima ve diğ., 2008). Ayrıca araştırmalar otofaji anormalliklerinin kanser, enfeksiyon hastalıkları ve nörodejeneratif

hastalıklar gibi önemli sağlık sorunlarının da nedenleri arasında yer aldığını göstermektedir (Yang ve diğ., 2010).

Çift membranla sarılı organellerin sitoplazma içinde parçalanması olan makrotofaji, membran invajinasyonu ile sitoplazmanın lizozom içine taşınması olan mikrotofaji, spesifik moleküllerin lizozom içine alınması olan şaperon bağımlı otofaji ve kanonikal olmayan-alternatif (Atg5/7 bağımsız) makrotofaji olmak üzere değişik formlarda meydana gelebilir (Klionsky ve diğ. 2010).

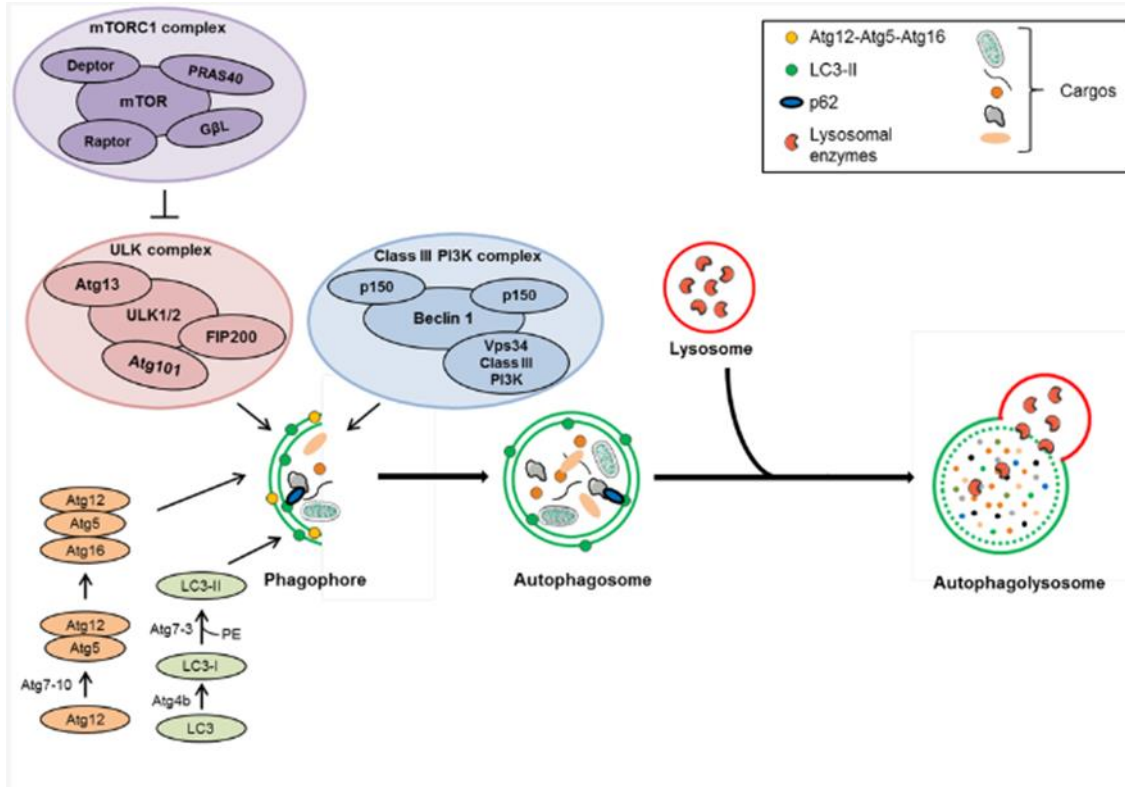
2.6.2.1. Otofajinin Moleküler Mekanizması

Otofaji mekanizmalarında rol oynayan proteinlerin çoğu ilk olarak mayada yapılan çalışmalar sonucunda bulunmuş ve “otofaji ile bağlantılı proteinler” ya da kısaca “Atg proteinleri” olarak adlandırılmışlardır. Ayrıca memelilerdeki karşılıkları da bilinmektedir. Bu proteinler otofajik keseciklerin oluşumunda rol oynayan çeşitli protein kompleksleridir. Yani otofaji ile ilgili proteinlerin çoğu, otofajik zarların oluşumunda ve bunların uzayarak kesecik haline gelmesinde görev yapmaktadırlar (Yorimitsu ve diğ., 2005; Holz ve diğ., 2010).

Otofaji ile bağlantılı proteinlerden ilk basamakta görev yapan Atg6 (memelilerdeki beclin-1) proteindir. Atg 6 sınıf III fosfoinositol 3 fosfat (PI3F) kinaz Vsp34'ün aktivitesini düzenlemektedir. Fosfoinositol 3 fosfat kinaz kesecik oluşumunda rol oynayan proteinleri ve protein gruplarını kendisine bağlayarak otofaji oluşum merkezine yönlendirmektedir. Bu şekilde otofagozom membranının çekirdeği oluşturulmuş olur. Membran uzaması ve kesecik halini alması ise iki ubikitin benzeri sistem tarafından kontrol edilir. Bunlar Atg12-Atg5 ve Atg8-fosfatidiletanolamin konjugasyon sistemidir.

Bu mekanizmalarda konjugasyona yardımcı ubikitin sisteminde E1 ve E2 gibi enzimler bulunur. Atg12-Atg5 konjugasyon yolağında Atg5, Atg12'ye E1 benzeri enzim, Atg7 ve E2 benzeri enzim ise Atg10 yardımı ile kovalent olarak bağlanır. Ardından Atg12'ye bağlanan Atg5, Atg16 ile birleşerek büyük bir protein kompleksi oluşturur ve izolasyon membranının dış yüzeyine bağlanır. İkinci ubikitin benzeri sistemde ise Atg8 (memelilerde MAP-LC3 ya da kısaca LC3) proteininin, bir fosfatidiletanolamin (FE) yağ molekülüne kovalent olarak bağlanması söz konusudur. Atg12-Atg5-Atg16

kompleksi, Atg8/LC3'ün FE'ye bağlanması için gereklidir. LC3'ün FE'ye bağlanması ile çözülebilir formda bulunan sitoplazmik LC3-1, otofagozom ile ilişkili membrana bağlı form LC3-2'e dönüşmektedir. Fosfatidiletanolamin molekülü, LC3'ün sondan 6. amino asiti olan glisine bağlanmaktadır. Glisin de LC3'ün C-ucundaki beş amino asitin Atg4 proteaz tarafından kesilmesi ile ortaya çıkar. Atg8/LC3'ün FE'ye bağlanması, otofaji oluşum merkezi olan preotozomal yapıya zar taşınması ve burada zar uzaması için gerekli bir olaydır. LC3-etanolaminin oluşması sonucunda Atg 4 proteaz, E1 benzeri enzim Atg 7 ve E2 benzeri enzim Atg3 tarafından aktive edilir. Atg4 de kesecik oluşumu sonrasında görevi tamamlanan LC3 proteinlerini yağdan kopararak yeniden kullanılmasını sağlar. Otofagozom daha sonra geç endozom veya lizozomla birleşerek taşıdığı kargo lizozomal enzimler ile yıkıma uğrar. Kargonun yıkımı ile (proteinler, organeller vb.) ortaya çıkan yapıtaşları (örn. amino asitler, yağ asitleri, vb.) tekrar kullanılmak üzere hücreye kazandırılmış olur (Ferraro ve diğ., 2007; Xie ve diğ., 2007; Holz ve diğ., 2010) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: Otofagozom oluşumu ve görevli otofajiyle ilişkili proteinler (<http://www.mdpi.com/2079-4991/4/3/548/htm>).

Otofaji mekanizmasında Beklin 1 ve MAP-LC3 (mikrotubul ile ilişkili protein 1 hafif zincir 3) gibi sıkıca korunmuş genler rol oynamaktadır. Sentez sonrasında LC3 proteolitik reaksiyonlar sonrasında sitoplazmik lokalizasyonda bulunan LC3-1'e dönüşmektedir. Otofaji boyunca LC3-1 fosfatidiletanolamin ile konjuge olarak LC3-2'yi oluşturmaktadır. LC3-2 otofagozomun iç ve dış membranlarıyla ilişkiye girerek otofagozom oluşumuna katılmaktadır. LC3-2'nin artmış seviyeleri hücrelerde otofagozom oluşumu ile uyumludur. Bu nedenle LC3-2 sık olarak geç dönem otofaji işaretleyicisi olarak kullanılırken, izolasyon membranlarının otofaji oluşum merkezi (Preotofagozomal yapı, PAS)'de toplanması aşamasında kontrol mekanizması olarak görev alan beklin-1 ise erken dönem otofaji işaretleyicisi olarak kullanılmaktadır (Martinet ve diğ., 2006).

2.6.3. Nekroz

Morfolojik olarak sitoplazmanın vakuolleşmesi, hücre membran bütünlüğünün kaybı ve organellerin şişmesi olarak ayırt edilmektedir. *İn vitro* çalışmalar hücrelerde enerji kaybı, homeostatik iyon pompalarının fonksiyon kaybı ve membran lipitlerindeki hasar sonucu bu morfolojik değişikliklerin geliştiğini göstermektedir. Hücresel içeriğin mikroçevreye yayılması inflamasyonun başlamasına yol açar. Genel olarak, kaspaz aktivasyonu ve DNA fragmentasyonu gibi apoptotik olayların nekrozda gözlenmediği kabul edilmiş olsa da (Proskuryakov ve diğ., 2003), son yıllarda artan bilgiler nekrozda programlı olayların gözlemlenebileceğini göstermiştir. TNF- α ve Fas ligandının ölüm reseptörlerine bağlanması kinaz RIP-1 (reseptör interacting protein-1) adı verilen bir proteinin aktifleşmesine yol açmakta ve bu protein mitokondriyi hedef alan fazla miktarda reaktif oksijen türlerinin üretilmesini uyarmaktadır (Holler ve diğ., 2000).

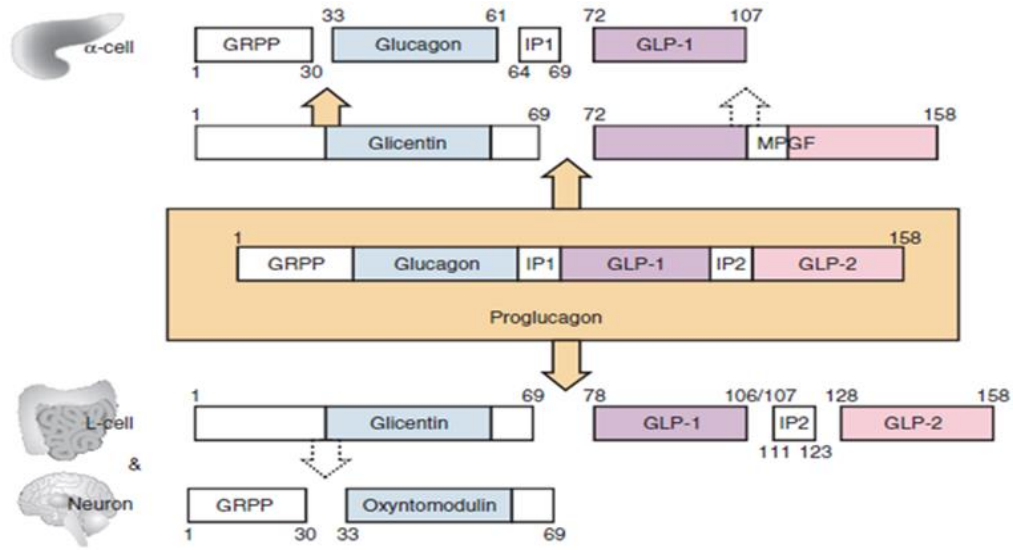
Apoptotik hücre ölümü enerjiye ihtiyaç duyarken, nekroz ATP'den bağımsız hücre ölümüdür. Bu nedenle hücre içi ATP'nin konsantrasyonu hücrenin hangi yolla öleceğini belirleyen temel bir faktördür. Yeterli enerji yokluğunda apoptotik hücre ölümü nekroza dönüşebilir. Bu noktada DNA hasarının onarımı ile ilgili bir protein olan PARP hücrenin kaderini belirler. PARP, kaspazlar tarafından yıkıma uğrarsa inaktif hale geçer, ATP havuzu boşaltılamaz ve hücre apoptoza gider. Eğer PARP aktifleşirse, ATP'yi oluşturacak ADP havuzu, ADP ribozun tüketilmesi ile azalır ve hücre nekrotik yol ile ölür. DNA'yı alkilleyici ajanlar ile PARP aktivasyonu sonucu ATP'nin yanı sıra

glikoliz için gerekli bir kofaktör olan NAD⁺ azalır. Oluşan biyoenerjetik kriz ile hücre içi kalsiyum konsantrasyonu artar ve sitozolik proteaz kalpainler aktifleşir (Ha ve Syender, 1999; Zong ve diğ., 2004). Aktif kalpainler, lizozom zarını permeabilize eder ve katepsinler sitozole salınır. Ayrıca sitozolde artan kalsiyum ve reaktif oksijen türleri fosfolipaz A2'yi aktifleştirir. Proteoliz ve lipid peroksidasyonu sonucu hücre membran permeabilitesi artarak, nekrotik hücre ölümü gerçekleşir (Amaravadi ve Thompson, 2007).

NAD⁺ tüketimi ve enerji azalmasının yanı sıra PARP'ın TNF reseptöründen bağımsız olarak RIP1 ve TNF reseptör ilişkili faktör 2'yi (TRAF2) aktive ettiği ve c-Jun N-terminal kinaz 1 (JNK1)-bağımlı olarak nekrozu düzenlediği de bildirilmiştir (Xu ve diğ., 2006).

2.7. GLUKAGON-BENZERİ PEPTİT 1 (GLP-1)

Oral yolla glukoz verildiğinde insülin sekresyonunun artmasına neden olan faktörlere “inkretin” denir. İnkretin etki gösteren GLP-1 ve GLP-2 olmak üzere iki çeşit nöroendokrin hormon vardır. Bu hormonlar proglukagon mRNA'sının dokuya spesifik posttranslasyon aracılığı ile translasyonu olan ve biyolojik aktiviteleri oldukça farklı iki moleküldür (Şekil 2.5). İnkretinler, DPP-IV yıkımından korunmuş olarak portal vende birikebilir ve hiperglisemi durumunda glukozla uyarılmış insülin sekresyonunu arttırmak amacıyla pankreatik arter aracılığı ile beta hücrelerine ulaşarak sistemik kan dolaşımına dahil olurlar (Hjollund ve diğ., 2011).



Şekil 2.5: 160 aminoasitli öncü bir protein olan proglukagon'un dokuya spesifik posttranslasyonu (Janssen ve diğ., 2013).

Glukagon-benzeri peptit-1 (GLP-1) güçlü insülinotropik etkiye sahip olan 31 amino asitli nöroendokrin bir hormondur. Ayrıca glukagon ve GLP-2'de bulunan birçok amino asit dizisi korunmuş haldedir (Tablo 2.1).

Tablo 2.1: GLP-1, GLP-2 ve Glukagon amino asit dizileri arasındaki benzerlikler (Janssen, 2013).

Glukagon	HSQGTFTSDYSKYLD SRRAQDFVQ WLMNT
GLP-1	HAEGTFTSDVSSYLEGQA AKE FIAWL VKGRG
GLP-2	HADGSF SDEMNT ILDNLA ARDFIN WLI QTITD

GLP-1, endokrin pankreasın alfa hücrelerinde, bağırsağın enteroendokrin L hücrelerinde ve merkezi sinir sisteminde, beyin kökünde ve hipotalamusta eksprese edilmesine rağmen (Drucker ve Asa, 1988; Drucker ve Brubager, 1989; Baggio ve Drucker, 2004), sadece besin sindirimini takiben intestinal L hücrelerinden salınır. GLP-1R olarak adlandırılan G protein ile ilişkili reseptöre bağlanarak etkisini gösterir (Holst ve diğ., 1994; Estall ve Drucker, 2006). GLP-1 glukoz bağımlı insülin sekresyonunu uarması (Rouille ve diğ., 1997; Ugleholdt ve diğ., 2004), glukagon sekresyonunun inhibisyonu (Lim ve Brubaker, 2006; Wideman ve diğ., 2006) ve ek olarak hem insanlarda (Orskov

ve diğ., 1986) hem de hayvanlarda (Brubaker, 2006) yemek sonrası kan glukozunu düzenleyici biyolojik aktiviteye sahiptir.

GLP-1' in tip 2 diyabetli bireylerde (Herrmann ve diğ., 1995; Cummings ve diğ., 2007) anti-diyabetojenik etkisi bulunduğundan itibaren hem GLP-1 hem de GLP-1 ile ilişkili peptitler bu hastalığın tedavisi için umut verici olmuştur. Ancak GLP-1'in plazma yarı ömrü kısa olmasından dolayı, tip 2 diyabetli hastaların tedavisinde kullanımı sınırlıdır. GLP-1 proteolitik bir enzim olan dipeptidil peptidaz IV (DPP-IV) tarafından, N-terminalinin histidin ve alanin amino asitlerinden kesilmesi ile hızlıca yıkılır. GLP-1'in plazmadaki yarı ömrü ortalama 12-30 dakika arasındadır (Rocca ve Brubaker, 1999; Reimann ve Gribble, 2002). *In vivo*'da DPP-IV'ün biyolojik aktivitesine karşı dayanıklı olabilecek GLP-1'in yapısal aktivitesiyle ilişkili peptit analogları geliştirilmeye çalışılmıştır (Deacon ve diğ., 1995; Anini ve Brubaker, 2003) (Tablo 2.2.). Bunlardan Ac-GLP-1- (7-34)- amid kuraglutiddir.

Tablo 2.2: GLP-1 analogları (John ve diğ., 2008).

PEPTİD	SEKUENS	MOLEKÜL AĞIRLIĞI [Da]
GLP-1-(7-34)-amid	HAEGTFTSDVSSLEGQAAKEFIAWLVK-CONH ₂	3084,4
GLP-1- (9-34)-amid	EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFLAWLVK-CONH ₂	2876,2
Ac-GLP-1- (7-34)- amid	Ac- HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVK-CONH ₂	3126,4
GLP-1- (7-36)-amid	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR-CONH ₂	3297,7
GLP-1- (9-36)-amid	EGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR-CONH ₂	3089,4
GLP-1- (11-36)-amid	TFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR-CONH ₂	2903,3

GLP-1 analogları da inkretine benzer etki gösterir. Bu etkilerden bazıları aşağıda verilmiştir:

- Glukoza bağımlı insülin uyarılması
- Yemek sonrası insülin salınımı uyarılmasının artması
- Hipoglisemi ve hiperglisemide glukoz sekresyonunun düzenlenmesi

- Proinsülin sekresyonunun artması
- Pankreatik beta hücre kütesinin artması
- Beta hücrelerinde kanal epitelindeki kök hücrelerin farklılaşmasının uyarılması
- Beta hücre apoptozunun inhibisyonu
- Kilo kaybının, doygunluğun uyarılması ve iştahın baskılanması (Nielsen ve diğ., 2004; Drucker ve Nauck, 2006; Thong ve diğ., 2011).

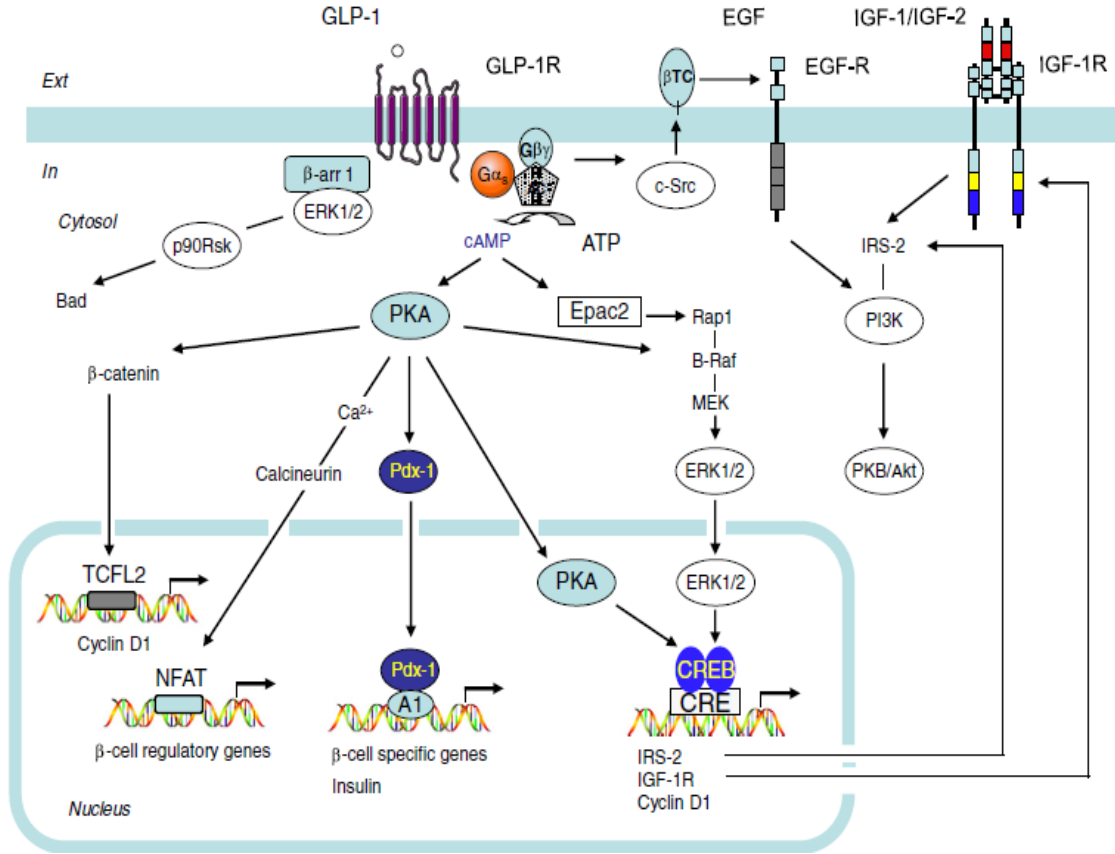
2.7.1. Glukagon-Benzeri Peptid'in Beta Hüresine Etkisi

İnsülinotropik etkisinin yanı sıra, GLP-1 optimal β -hücre glukoz duyarlılığının devam ettirilmesini sağlar. GLP-1 insülin depolarını doldurur ve PKA-bağımlı ve bağımsız sinyal yolaklarının aktivasyonu aracılığıyla insülin gen ve transkripsiyonunu artırarak β -hücre ölümünü engeller.

cAMP/PKA yolağı ile ortaya çıkan Ca^{2+} akımı aktive olmuş T hücrelerin Ca^{2+} /kalsinörin/nuklear faktörünün (NFAT) aktivasyonuna yol açar. NFAT ise insülin gen transkripsiyonunda cAMP/PKA yolağının aracısı olmasının yanı sıra, β -hücre büyümesi ve fonksiyonunun da önemli bir anahtarıdır (Lawrence ve diğ., 2002; Heit ve diğ., 2006). Çünkü GLP-1 glukokinaz ve GLUT 2 taşıyıcılarının ekspresyonunu da uyarır ve β -hücrelerinin glukozu olan duyarlılığını devam ettirir (Holz ve diğ., 1993; Ding ve diğ., 2011). GLP-1 ayrıca β -hücre kitlesinin homeostazının sağlanmasında ve β -hücre proliferasyonunu uyararak apoptoza karşı korunmasında da önemli bir rol oynar (Doyle ve Egan, 2007). GLP-1'in hücre yaşamı ve proliferasyonuna etkisi Şekil 2.6'da gösterilmiştir.

Hem normal hem de diyabetik hayvanların uzun süre GLP-1 ile muamele edilmesi β -hücre proliferasyonunu ve neogenezini uyarır ve beta hücre apoptozunu azaltır. GLP-1 β -hücrelerinde PKA, PI3-kinaz ve ERK1/2 gibi çok sayıda sinyal kinazları aktive eder (Doyle ve Egan, 2007). Örneğin, PKA aktivasyonu insülin gen transkripsiyon faktörü Pdx-1'in nuklear translokasyonunu artırarak β -hücre aktivasyonunu düzenler. GLP-1R sinyali ayrıca PKA aracılığıyla β -katenin/T-hücre faktörü- benzeri 2 (TCFL-2)-bağımlı Wnt sinyal yolağının (insülin gen ekspresyonunda ve siklin D1 regülasyonu ile β -hücre proliferasyonunu sağlar) aktivasyonuna yol açar (Liu ve Habener, 2008; Loder, 2008). İlginç şekilde TCFL-2 polimorfizmi ile T2D riski arasındaki bağlantıyı gösteren genetik çalışmalar mevcuttur (Lyssenko ve diğ., 2007). Nukleusta PKA, β -hücre yaşamı ve

proliferasyonunda anahtar transkripsiyon faktörü olan CREB' i aktive eder. GLP-1 CREB-aracılı insülin reseptör substrat-2 (IRS-2) ekspresyonu ile β -hücre proliferasyonunu uyararak CREB-aracılı Siklin D1 ekspresyonuna (Kim ve diğ., 2008) ve PI 3-kinaz/Akt/PKB sinyal yolağının (Jhala, 2003) aktivasyonuna yol açar.



Şekil 2.6: Beta hücre yaşamı ve proliferasyonunda GLP-1' in etkisi (Dalle ve diğ., 2013).

2.7.2. Kuraglutid

N-terminali bloklanmış ve C-terminali kesilmiş, böylelikle DPP-IV tarafından yıkıma direnç gösteren 28 amino asitli yeni bir GLP-1 analogudur. Kuraglutid ilk kez RIN-m5F hücrelerde insülin salınım kapasitesine ve cAMP üretimine bakılarak yeni bir analog olarak tanımlanmıştır (John ve diğ., 2008). Bu yeni analog daha sonra izole sıçan kalbinde reperfüzyon hasarında yapılan bir çalışma ile kardiyoprotektif etki gösterdiği ve bu etkisini GLP-1 reseptör aracılığı ile gösterdiği kanıtlanmıştır (Salling ve diğ., 2012). Diğer bir çalışmada ise bu analogun *in vitro* sistemde primer motor nöron hücrelerde nöroprotektif etkisi ortaya konulmuştur (Sun ve diğ., 2013).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ

Çalışmalarımızda kullanılan sıçan kökenli INS-1 beta hücre soyu, Almanya, Dresden Paul Langerhans Enstitü’de görev yapan Prof. Dr. Michele Solimena tarafından hediye edilmiştir. 22. pasajda gelen INS-1 beta hücreleri haftada bir kez rutin pasajları yapılmak suretiyle, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü Laboratuvarında çoğaltıldı. Hücreler, ısı ile inaktive edilmiş % 20 fetal sığır serumu (FBS, Sigma-F7524) ve antibiyotikler (100 unite/ml penisilin G100, 100 µg/ml streptomisin, Gibco-15240-122), %1 sodyum pirüvat (Sigma-S8636), 10 mM hepes (Sigma- H4034) ve 50 µM 2- merkapto-etanol (Biorad-161-0710) içeren, RPMI 1640 (Gibco-31800-014) medyumunda 37 °C’de, % 5 CO₂ ve % 95 hava içeren nemli inkübatörde, 1 atmosfer basınç altında büyütüldü. Steril kültür kaplarında üretilen hücreler, kültür kabı yüzeyinin % 60-80’ini kapladıklarında, deney için kullanıldı.

Hücreler uzun süre depo edilmeleri amacıyla %10 dimetil sülfoksit (DMSO) ve %90 fetal sığır serumu (FBS) içeren dondurma medyumunda donduruldu. Bu işlem için çoğalan hücreler %0,25’lik tripsin-EDTA (Sigma-T4174) ile kaldırılıp, Thoma lamında toplam hücre sayısı hesaplandı. Daha sonra hücreler 1500 rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek toplandı. Hücre peleti dondurma medyumunda, yaklaşık 1-1,5 milyon hücre/ml yoğunlukta olacak şekilde süspanse edildi ve kriyotüplere aktarıldı. Kriyotüpler bir gece -86 °C’de bekletildikten sonra ertesi gün uzun süre saklamak amacıyla -152 °C’ye kaldırıldı.

Dondurulmuş hücreler açılması gerektiği zaman, kriyotüpler mümkün olduğunca hızlı bir şekilde 37 °C’ye getirildi ve hücre süspansiyonu içinde 5 ml medyum bulunan santrifüj tüpüne aktarıldı ve hücreler 1500 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen hücre peleti, DMSO’yu iyi bir şekilde uzaklaştırmak için 5 ml medyum içinde tekrar yıkandı ve santrifüj edildi. Bu ikinci hücre peleti az miktar medyumda süspanse edilerek 25 cm²’lik flasklara aktarıldı.

3.2. KULLANILAN YAĞ ASİDİ VE PEPTİDİN ÇÖZÜNMESİ VE SULANDIRILMASI

3.2.1. Palmitik Asitin Çözülmesi ve Sulandırılması

10,26 mg palmitik asit (Sigma) 500 µl metanol'de 60 °C'lik su banyosunda çalkalanarak bir gece çözülmeye bırakıldı. Daha sonra % 0,5 sığır serum albumin (BSA) içeren, RPMI 1640 ile 10 ml'ye tamamlanarak süzüldü. Kullanılacak konsantrasyonlara göre sulandırıldı.

3.2.2. Kuraglutid'in Çözülmesi ve Sulandırılması

Peptid en az % 95 saflıkta liyofilize halde İnvitrogen firmasından temin edildi ve kullanım şartnamesine uygun olacak şekilde çözüldü. 5,4 mg peptidi çözmek için öncelikle 400 µl asetonitril ilave edilip iyice vortekslendi ve üzerine 400 µl ultra saf su ilave edilerek çözülmesi sağlandı. Daha sonra 9200 µl PBS (pH7.4) bulunan santrifüj tüpüne vortekste sürekli çalkalanarak ilave edildi. Elde edilen peptid solüsyonu alikotlanarak, -86 °C' ye kaldırıldı. Kullanılacağı vakit uygun konsantrasyonlarda hazırlandıktan sonra 0.22 µm por çaplı membran filtreden geçirilerek hücrelere uygulandı.

3.3. BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER

3.3.1. Palmitik Asit ve Kuraglutid'in Etkin Doz ve Sürelerinin Belirlenmesi

3.3.1.1. Palmitik Asit İçin Doz ve Süre Belirleme Deneyleri

Deneylerde kullanılacak hücreler, kültür kaplarınıın % 60-80 oranında kapladıklarında, tripsin kullanılarak yapışıkları kültür kabı yüzeyinden kaldırıldı. Mikroskop altında kalktıkları gözlenen hücrelere tripsinin etkisini engellemek amacıyla, tripsinle eşit miktarda medyum konuldu ve hücre süspansiyonu santrifüj tüpünde toplanarak 1500 rpm'de, 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı, tübün dibinde kalan hücrelerin üzerine medyum eklendi ve tek hücre süspansiyonu oluşturmak amacıyla pipetaj yapıldı. Hemositometre kullanılarak toplam hücre sayısı hesaplandı. 96 kuyucuklu kültür kaplarınının her birine hücre sayısı hesaplanmış, % 100 canlı tek hücre süspansiyonundan alınmış 50.000 INS-1 beta hücresi ekildi. Ekilen hücreler kültür kabınının yüzeyine yapışması ve çoğalması için 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyon sonunda hücreler, literatüre uygun olarak seçilmiş dozlar olan 0.25 mM,

0.5 mM, 0.75 mM, 1 mM, 1.25 mM, 1.5 mM, 1.75 mM, 2 mM, 2.5 mM, 2.75 mM, 3 mM, 3.25 mM, 3.5 mM, 3.75 mM, 4 mM, 4.25 mM, 4.5 mM, 4.75 mM, 5 mM palmitik asit ile muamele edildi. Deneylerde kontrol grubu da dahil, her doz için en az 10 kuyucuk kullanıldı ve her konsantrasyon için 24 saatlik deney grupları oluşturuldu.

3.3.1.2. Kuraglutid İçin Doz ve Süre Belirleme Deneyleri

Çoğalan hücreler tripsinle kaldırıldıktan sonra 200 µl' de 50.000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuğa ekim yapıldı. Ekilen hücrelerin çoğalması için 37°C'de 24 saat inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyon sonunda hücreler literatüre uygun olarak seçilmiş dozlar olan 1 nM, 10 nM, 100 nM kuraglutid ile muamele edildi. Deney ve kontrol grupları dahil, her doz için en az 10 kuyucuk kullanıldı ve her konsantrasyon için 24 saatlik deney grupları oluşturuldu.

Kuraglutid'in koruyucu etkisi için; öncelikle hücelere 24 saat süreyle 10 nM kuraglutid uygulanıp daha sonra farklı dozlarda 24 saat süreyle palmitik asit ile birlikte tekrar aynı dozda kuraglutid uygulandı. Kuraglutid'in iyileştirici etkisi içinse, farklı dozlarda 24 saat süreyle palmitik asit ile hasar oluşturup daha sonra 24 saat süreyle 10 nM kuraglutid uygulandı.

3.3.2. MTT Testi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi

MTT ([3-(4, 5-dimetil tiyazol-2-il)-2, 5 difenil tetrazolyum bromid]) testi doğrudan olmayan yolla, hücre büyümesi ve/veya hücre ölümünü değerlendirmeyi amaçlayan ve hücre kültürü esasına dayanan bir ilaç duyarlılığı testidir (Mcgahon ve diğ., 1995). Sıkça kullanılan bu test, diğer test yöntemlerinden hızlı, hassas, tekrarlanabilir ve uygulama kolaylığı gibi avantajlara sahip olması bakımından ayrılır. Bu yöntemin temelinde, canlı hücrelerde MTT boyasının tetrazolyum halkasının mitokondri tarafından parçalanması yatar. Bu reaksiyon mitokondriyal enzim süksinat dehidrogenaz tarafından katalizlenir. MTT hücelere aktif olarak absorbe olur ve mitokondride gerçekleşen reaksiyonla mavi-mor renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenir. Hücrelerin MTT indirgeme özellikleri hücre canlılığının ölçütü olarak kabul edilir ve MTT analizi sonunda elde edilen, boya yoğunluğu ile canlı hücre sayısı doğru orantılıdır. Canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanırken, ölmüş ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır.

MTT ile inkübe edilen canlı hücrelerin oluşturduğu formazan kristalleri çözünür hale getirildikten sonra, reaksiyon ürünü kolorimetrik olarak okunur.

3.3.2.1. MTT Çözeltisinin Hazırlanması

50 mg MTT maddesi (Applichem A2231 0001) tartıldı, RPMI 1640 medyum ile 10 ml'ye tamamlanarak vorteks aracılığıyla, çözünmemiş boya partiküllerinin kalmamasına özen gösterilerek çözündürüldü ve 0.22 µl'lik filtreden geçirilerek steril edildi. Her defasında taze olarak hazırlanıp kullanıldı.

3.3.2.2. Hücrelerin MTT ile Muamele Edilmesi

Deneylede toksik ya da koruyucu ajan ile muamele edilmemiş hücreler kontrol grubu olarak kullanıldı. Doksan altı kuyucuklu kültür plaklarına ekilip, yağ asidi ve peptidin belirlenen doz ve süreleri ile muamele edilen hücelere, hedeflenen inkübasyon süresinin sonunda, 20 µl/kuyucuk hacimde MTT çözeltisi eklendi. MTT çözeltisi eklendikten sonra, kültür plakları aliminyum folyo ile sarılarak % 5 CO₂'li nemli hava hava içeren 37 °C 'lik etüvde 2 saat süreyle tutuldu. Hedeflenen bekleme süresinin sonunda, faz kontrast mikroskobu kullanılarak canlı hücelerde mor renkte formazan kristallerinin oluştuğu, buna karşın ölü hücelerin boyanmadığı saptandı. Formazan kristallerini çözünür hale getirmek için, boya içeren çözelti kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve her kuyucuğa 75µl izopropanol eklendi (Mcgahon ve diğ., 1995). İzopropanol eklenmesini takiben, çözündüğü gözlenen formazan kristallerini içeren kültür plağı, orbital çalkalayıcı üzerine konularak 250 rpm'de, 2 dakika çalkalandı. Çalkalama işlemi son bulduktan sonra, kültür plağı ELISA plak okuyucusuna konularak absorbans değerleri 570-630 nm dalga boyunda okutuldu. Kontrol ve deney gruplarında canlılık oranı absorbans değerleri karşılaştırılarak incelendi.

3.3.3. Laktat Dehidrogenaz Salınımının Ölçülmesi

Laktat dehidrogenaz (LDH) salınım testi ölmüş ya da plazma membranı hasar görmüş hücelerden salınan sitoplazmik enzim olan laktat dehidrogenaz aktivitesinin ölçülmesine dayanmaktadır (Lobner, 2000) ve hücrel sitotoksitenin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Palmitik asidin sıçan pankreatik INS-1 hücre soyu üzerine sitotoksik etkisi hasarlı hücelerden salınan LDH aktivitesinin ölçülmesi ile belirlenmiştir ve bu amaçla Sitotoksite Saptama Kiti, LDH (Roche Molecular Diagnostics) kullanılmıştır.

LDH testinde, palmitik asidin uygulandığı deneysel grupların yanı sıra hücrelerden spontan LDH salınımı için negatif kontrol grubu ve maximum LDH salınımı için pozitif kontrol grubu çalışıldı. Palmitik asit 0.5, 0.75 ve 1 mM dozlarda hücre canlılığını azalttığı için, bu dozlar ve en yüksek dozun kontrol grubu çalışılmıştır. Hücreler 75 cm² flaskta çoğaltıldıktan sonra tripsin-EDTA ile kaldırıldı ve santrifüj edildi. 100 µl'de 50000 hücre olacak şekilde hücreler medyuma süspanse edildi ve 100 µl hücre süspansiyonu 96 kuyucuklu pleytlere aktarıldı. Kontrol grupları ve deney grupları için 10'ar kuyucuk çalışıldı ve deney 3 kez tekrarlandı. 24 saat inkübasyon sonrası kontrol grupları PBS ile yıkanıp, sodyum pirüvatsız ve beta-merkaptetanolsuz medyum ile tazelendi. Deney gruplarının medyumunu ise içinde palmitik asidin farklı konsantrasyonlarını içeren medyum ile değiştirildi. Hücreler palmitik asit ile 24 saat inkübe edildikten sonra hücrelerden salınan LDH aktivitesi, üretici firmanın talimatları doğrultusunda saptandı. Pozitif kontrol grubuna ait kuyucuklara 5 µl lizis solüsyonu (% 2' lik Triton-X-100) eklendi ve pleyt 15 dakika 37°C'de inkübe edildi. LDH aktivitesini ölçmek için, içinde katalizör (Diaforaz/NAD⁺ karışımı) ve boya çözeltisini (İdotetrazolyum klorür (INT) ve sodyum laktat) içeren taze hazırlanan reaksiyon karışımından 100 µl her kuyucuğa ilave edildi. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyon sonrası, her kuyucuğa 50 µl durdurma solüsyonu (1N HCl) eklenmesi ile reaksiyon durduruldu. Pleytler 10 saniye orbital çalkalayıcıda çalkalandı ve spektrofotometrik absorbans 490 nm test dalga boyu ve 690 nm referans dalga boyunda ölçüldü. Sonuçlar “% sitotoksosite” olarak belirlendi. Kontrol ve deney gruplarından negatif kontrolün ortalama absorbans değerleri çıkarıldı ve pozitif kontrol grubu % 100 sitotoksik olduğu kabul edilerek, kontrol ve deney grupları pozitif kontrol grubuna göre kıyaslanarak sitotoksiteleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı :

$$\% 100 \text{ Sitotoksosite} = \frac{(\text{Deney veya Kontrol Değeri}) - (\text{Negatif Kontrol})}{(\text{Pozitif Kontrol}) - (\text{Negatif Kontrol})} \times 100$$

3.3.4. ROS Seviyelerinin Ölçümü

2',7'-diklorodihidrofluoresin diasetat (H₂DCFDA) hücrelerde ROS için indikatör olarak kullanılan fluoressinin kimyasal olarak indirgenmiş formudur. Bu bileşik oksidanlar ya da serbest radikallerle okside olduğunda floresan diklorofluoresin (DCF) oluşacaktır.

INS-1 beta hücreleri 100 µl'de 50000 hücre olacak şekilde siyah kaplı 96 kuyucuklu pleytlere ekim yapıldı. Hücreler çoğaldıktan sonra deney grubu (sadece palmitik asit verilen grup) ve palmitik asite karşı hem koruyucu ve hem de iyileştirici olarak kuraglutid verilen gruplar deney süresi sonrasında kaldırıldı ve her kuyucuk PBS ile yıkandı. Daha sonra her kuyucuğa 100 µl PBS ilave edildi. Bunun üzerine 10 mM DCFDA ilave edilerek deney başlangıcı 0. saat olarak kabul edilmiştir ve 0. saat dahil olmak üzere 3 saat boyunca ölçüm alınmıştır. 3. saatteki absorbans değerleri, kontrol grubu değerleri %100 kabul edilerek her gruba ait değerler hesaplanmıştır.

3.4. MOLEKÜLER YÖNTEMLER

3.4.1. Lizat Elde Edilmesi

75 cm²'lik flaskta bulunan INS-1 sıçan beta hücrelerine tripsin uygulandı ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrası oluşan peletin yoğunluğuna göre PBS ile pipetaj yapıp iyice yıkanması sağlanarak 2 ml'lik ependorfa alınarak +4°C'de 1500 rpm' de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırılarak peletin yoğunluğuna göre lizis tamponu (İnvitrogen) eklendi ve dikkatlice pipetaj yapıldı. Buz üzerinde her 10 dakika bir vorteksenerek 30 dakika bekletildi. Daha sonra 5 kez 10 sn ultrasonikasyon ve 10 sn buzda bekletilerek hücrelerin iyice lizis olması sağlandı ve +4 °C'de 13000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Oluşan süpernatant 0,2 ml'lik ependorf tüplere alınarak -86 °C'ye kaldırıldı. Bu işlemler tüm kontrol ve deney grupları için 3'er kez yapıldı.

3.4.2. Bradford Yöntemi ile Protein Miktar Tayini

Protein içeriğinin belirlenmesi için Bradford yöntemi kullanılmıştır (Bradford, 1976). Ana stok olarak konsantrasyonu 1,46 mg/ml olan BSA (sığır serum albumin) kullanılarak önce standart eğri oluşturulmuştur. Bu eğri şu şekilde hazırlanmıştır: 80 µg/ml, 40 µg/ml, 20 µg/ml, 10 µg/ml BSA'nın üzerine Bradford çözeltisi eklenerek, 595 nm dalga boyunda absorbansları ölçülmüş, elde edilen lizatlar 1/100 olacak şekilde sulandırılmış, aynı dalga boylarında absorbansları belirlenmiştir. Standartların absorbans/konsantrasyon grafiği elde edildikten sonra, absorbans değerleri bilinen örneklerin konsantrasyonları belirlenmiştir.

3.4.3. Western Emdirimi

Elektroforez ile jelde ayrımı yapılan protein bantları ıslak aktarım ile jelden nitroselüloz membrana aktarıldı. Membran aktarım işlemi sonrasında Ponceau S boyama solusyonu kullanılarak 15 dakika transfer etkinliği kontrol edildi.

Proteinlerin aktarıldığı membran, yağsız süt tozu ile hazırlanan bloklama solüsyonuyla 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Membranlar, bloklama işlemi sonrası uygun sulandırma oranıyla hazırlanan primer antikorlarıyla (Tablo 3.5) bir gece +4°C’de inkübe edildiler. Bu işlem sonrasında yıkanan membranlar, peroksidaz işaretli keçi anti-tavşan sekonder IgG’leri ile (Santa Cruz, CA, USA, sc-2004) ile 1 saat süreyle oda sıcaklığında muamele edildi. Sekonder antikor ile muamele işlemi sonrası membranlar, tekrar yıkama solüsyonu ile yıkanarak saf su ile çalkalandılar. Sonrasında Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz, CA, USA, sc-2048) kemilüminans substratı kullanılarak kemilüminesans yöntemi ile antikorlara spesifik protein bantları KodakGL1500 jel görüntüleme sistemi ile görüntülendi. “Kodak Molecular Imaging Systems” yazılımı ile densitometrik analizleri yapıldı. Densitometrik analizleri yapılan protein örneklerine ait bant yoğunlukları, β -aktin proteininin yoğunluğuna normalize edilerek gruplar arasında istatistiksel analizleri yapıldı.

Tablo 3.1: Western emdirimi yönteminde kullanılan primer antikorlar, bu antikorlar için kullanılan seyreltme oranları ve süreleri.

Primer Antikorlar	Seyreltme Oranı	İnkübasyon Süresi ve Koşul
Tavşan anti-p53	1:1000	Tüm Gece, +4 °C
Tavşan anti-sitokrom-c	1:1000	Tüm Gece, +4 °C
Tavşan anti-kaspaz-3	1:1000	Tüm Gece, +4 °C
Tavşan anti-LC3	1:1000	Tüm Gece, +4 °C
Fare anti- β -aktin	1:500	Tüm Gece, +4 °C

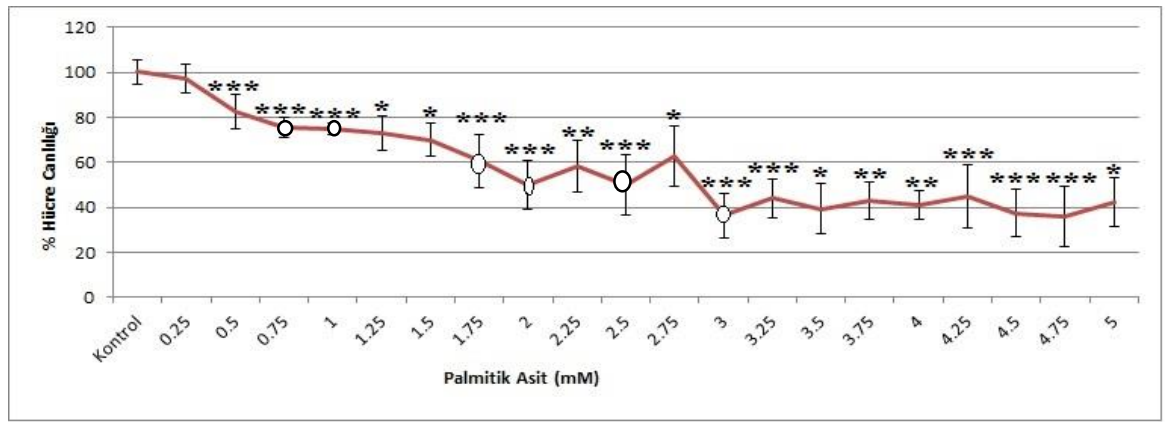
3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Elde edilen sonuçlar GraphPad Prism 5 bilgisayar programı kullanılarak değerlendirildi. İkili karşılaştırmalar Student t testi, çoklu karşılaştırmalar ise ANOVA varyans analiz testi ve nonparametrik Tukey testi ile karşılaştırıldı. Elde edilen sonuçlar \pm S.E.M olarak verildi.

4. BULGULAR

4.1. PALMİTİK ASİTE AİT HÜCRE CANLILIK TESTİ BULGULARI

INS-1 hücrelerine farklı dozlarda palmitik asit uygulanmıştır. Geniş aralıkta mM konsantrasyonda verilen palmitik asitin hücre canlılığı üzerindeki etkisi MTT tekniği ile belirlenerek Şekil 4.1' de gösterilmiştir.



Şekil 4.1: INS-1 hücrelerine verilen farklı dozlarda palmitik asitin % hücre canlılığı üzerine etkisi (* p<0,05; ** p<0,001; *** p<0,0001).

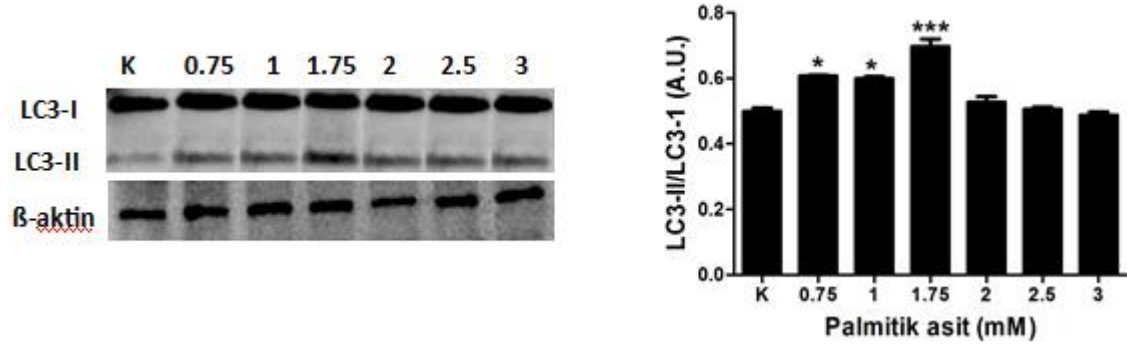
Hücre canlılığı değerleri (%) kontrol grubunda %100±5.20; 0.25 mM palmitik asit verilen grupta %92±2.40; 0.5 mM palmitik asit verilen grupta %81.5±7.60; 0.75 mM palmitik asit verilen grupta %75.63±4.37; 1 mM palmitik asit verilen grupta %74.80±2.35; 1.25 mM palmitik asit verilen grupta %72.7±7.7; 1.5 mM palmitik asit verilen grupta %69.9±7.40; 1.75 mM palmitik asit verilen grupta %60.6±11.60; 2 mM palmitik asit verilen grupta %50.1±11; 2.25 mM palmitik asit verilen grupta %58.4±11.5; 2.5 mM palmitik asit verilen grupta %49.9±3; 2.75 mM palmitik asit verilen grupta %62.9±4.3; 3 mM palmitik asit verilen grupta %36.5±3.3; 3.25 mM palmitik asit verilen grupta %44.14±8.7; 3.5 mM palmitik asit verilen grupta %39.4±11.40; 3.75 mM palmitik asit verilen grupta %42.9±8.2; 4 mM palmitik asit verilen grupta %41.04±6.6; 4.25 mM palmitik asit verilen grupta %44.94±11.8; 4.5 mM palmitik asit verilen grupta %37.3±10.5; 4.75 mM palmitik asit verilen grupta %35.7±3.7; 5 mM palmitik asit verilen grupta %42.14±4.4 olarak bulunmuştur. Kontrol

grubuna göre tüm dozlarda oluşan hücre canlılığındaki bu azalma istatistiksel olarak anlamlı düzeyde meydana gelmiştir (Şekil 4.1). Yapılan tekrarlı deney sonuçlarına göre 0.25 mM palmitik asit uygulaması hücrelerin canlı kalmasını, 2 mM palmitik asit uygulaması %50 oranında hücre ölümünü sağlarken, 3 mM palmitik asit uygulamasından sonra ise hücre ölümü %50'nin altına düşmüştür. Bundan dolayı palmitik asit ile meydana gelen toksisitede hücre ölüm tipini belirlemek amacıyla, hücre canlılığının belirgin bir şekilde azaldığı 0.75, 1, 1.75, 2, 2.5 ve 3 mM dozlarda araştırılmaya devam edilmesine karar verilmiştir.

4.2. PALMİTİK ASİT İLE OLUŞTURULAN TOKSİSİTEDE HÜCRE ÖLÜM TİPİNİN BELİRLENMESİ

4.2.1. INS-1 Hücrelerinde Palmitik Asit Uygulaması Otofajiyi Uyarır

Otofajik dozun belirlenebilmesi için 0.75, 1, 1.75, 2, 2.5 ve 3 mM palmitik asit uygulanan hücrelerden lizat elde edilerek, western emdirme yöntemi ile otofajik belirteç olan LC3-II protein miktarları hesaplanmıştır. Hem western blot bantları hem de bu bantların analizi sonucu yapılan hesaplama ile elde edilen grafik Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



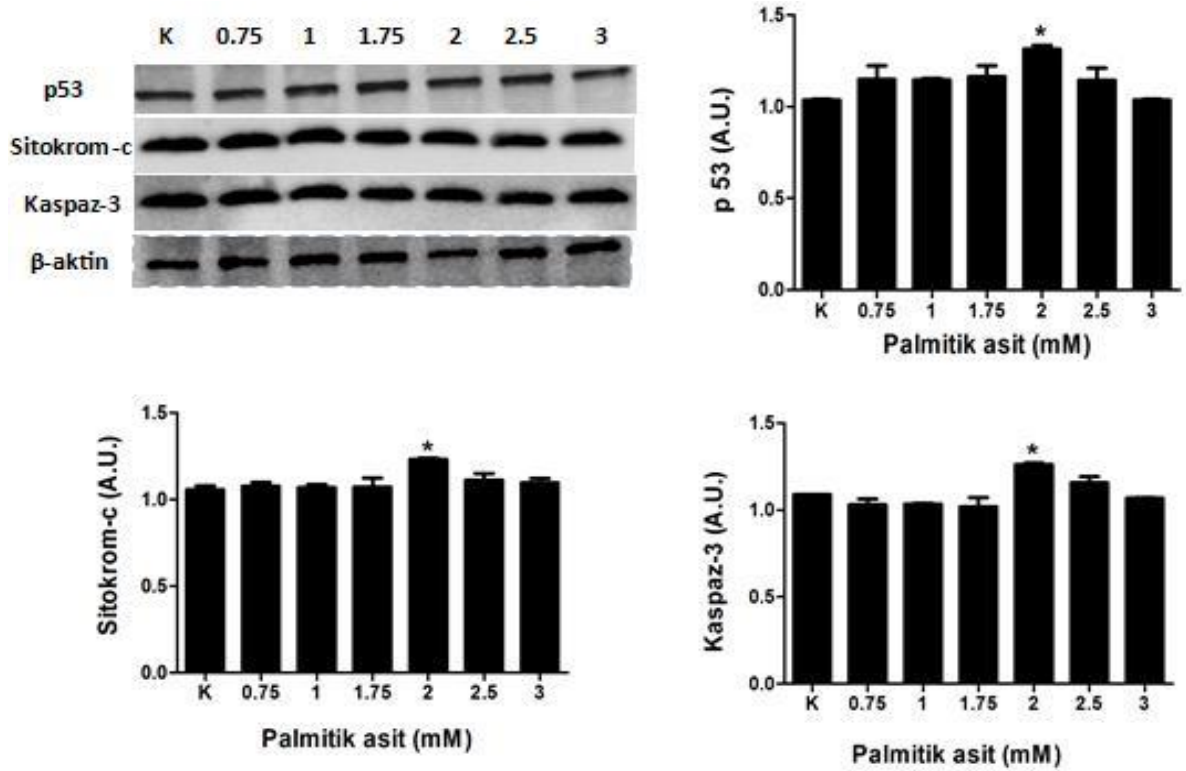
Şekil 4.2: INS-1 hücrelerinde palmitik asit ile uyarılan hücre için LC3 protein miktarının tayini (* p<0,05; *** p<0,001).

Sonuçlara göre INS-1 hücrelerinde LC3-II miktarları kontrol grup için 0.50 ± 0.01 ; 0.75 mM palmitik asit verilen grup için 0.60 ± 0.00 ; 1 mM palmitik asit verilen grup için 0.60 ± 0.00 ; 1.75 mM palmitik asit verilen grup için 0.70 ± 0.03 ; 2 mM palmitik asit verilen grup için 0.52 ± 0.02 ; 2.5 mM palmitik asit verilen grup için 0.50 ± 0.00 ; 3 mM palmitik asit verilen grup için 0.49 ± 0.01 olarak bulunmuştur. Gruplar birbiri arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilmiştir (Şekil 4.2). İkili

karşılaştırılmalar sonucunda da LC-3 II miktarı 0.75, 1, 1.75 mM palmitik asit verilen dozlarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artış göstermiştir ($p<0,05$; $p<0,001$). İstatiksel anlamda en fazla artış 1.75 mM palmitik asit verilen grupta olduğu için, bu doz INS-1 beta hücrelerinde otofajiyi uyaran doz olarak belirlenmiştir.

4.2.2. INS-1 Hücrelerinde Palmitik Asit Uygulaması Apoptozu Uyarır

Apoptoz dozunun belirlenebilmesi için 0.75, 1, 1.75, 2, 2.5 ve 3 mM dozlarda palmitik asit verilen hücrelerden lizat elde edilerek, western emdirme yöntemi ile p 53, sitokrom-c ve aktif kaspaz-3 protein miktarları hesaplanmıştır. Hem western blot bantları hem de bu bantların analizi sonucu yapılan hesaplama ile elde edilen grafik Şekil 4.3'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3: INS-1 hücrelerinde hücre içinde p 53, sitokrom-c ve aktif kaspaz-3 miktarının tayini (A.U. : Arbitrary Unit) (* $p<0,05$).

Sonuçlara göre INS-1 hücrelerinde p 53 miktarları kontrol grubu için 1.04 ± 0.00 ; 0.75 mM palmitik asit verilen grup için 1.1 ± 0.00 ; 1 mM palmitik asit verilen grup için 1.14 ± 0.00 ; 1.75 mM palmitik asit verilen grup için 1.16 ± 0.05 ; 2 mM palmitik asit verilen grup için 1.3 ± 0.02 ; 2.5 mM palmitik asit verilen grup için 1.14 ± 0.06 ; 3 mM

palmitik asit verilen grup için 1.03 ± 0.00 olarak bulunmuştur. Gruplar birbiri ile karşılaştırıldığında 2 ve 3 mM dozlar arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilmiştir ($p < 0,05$). İkili karşılaştırmalar sonucunda da p 53 miktarı 2 mM palmitik asit verilen dozlarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artış göstermiştir ($p < 0,05$).

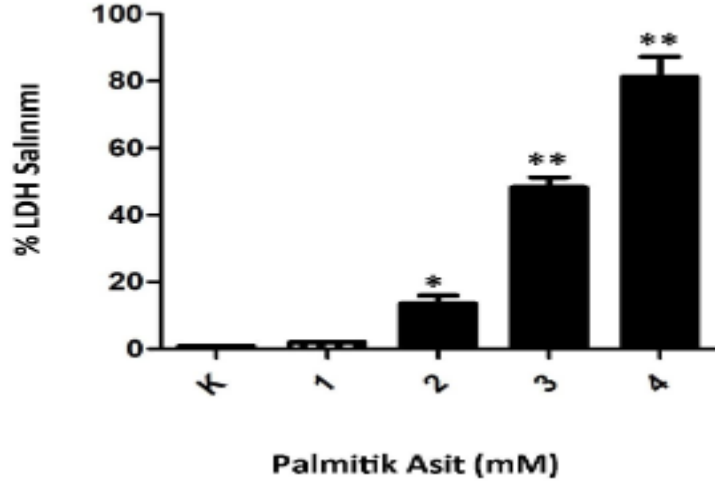
Sonuçlara göre INS-1 hücrelerinde sitokrom-c miktarları kontrol grubu için 1.05 ± 0.02 ; 0.75 mM palmitik asit verilen grup için 1.07 ± 0.02 ; 1 mM palmitik asit verilen grup için 1.06 ± 0.01 ; 1.75 mM palmitik asit verilen grup için 1.07 ± 0.05 ; 2 mM palmitik asit verilen grup için 1.23 ± 0.00 ; 2.5 mM palmitik asit verilen grup için 1.11 ± 0.04 ; 3 mM palmitik asit verilen grup için 1.09 ± 0.02 olarak bulunmuştur. Gruplar birbiri ile karşılaştırıldığında 1.75 ve 2 mM dozlar arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilmiştir ($p < 0,05$). İkili karşılaştırmalar sonucunda da sitokrom-c miktarı 2 mM palmitik asit verilen dozlarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artış göstermiştir ($p < 0,05$).

Sonuçlara göre INS-1 hücrelerinde aktif kaspaz-3 miktarları kontrol grubu için 1.08 ± 0.00 ; 0.75 mM palmitik asit verilen grup için 1.03 ± 0.03 ; 1 mM palmitik asit verilen grup için 1.03 ± 0.00 ; 1.75 mM palmitik asit verilen grup için 1.02 ± 0.05 ; 2 mM palmitik asit verilen grup için 1.26 ± 0.00 ; 2.5 mM palmitik asit verilen grup için 1.15 ± 0.03 ; 3 mM palmitik asit verilen grup için 1.06 ± 0.00 olarak bulunmuştur. Gruplar birbiri ile karşılaştırıldığında 1.75 ve 2 mM dozlar arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilmiştir ($p < 0,05$). İkili karşılaştırmalar sonucunda da aktif kaspaz-3 miktarı 2 mM palmitik asit verilen dozlarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artış göstermiştir ($p < 0,05$).

p 53, sitokrom-c ve aktif kaspaz-3 apoptotik protein miktarları birbirleriyle uyumlu olarak 2 mM dozda yüksek çıkmıştır ve bu doz palmitik asitin INS-1 beta hücrelerinde apoptozu uyardığı doz olarak kabul edilmiştir.

4.2.3. INS-1 Hücrelerinde Palmitik Asit Uygulaması Nekrozu Uyarır

Laktat dehidrogenaz salınımı farklı dozlarda palmitik asit uygulanan INS-1 hücrelerinde sitotoksosite kiti kullanılarak ölçülmüş ve sonuçlar Şekil 4.4'de gösterilmiştir.

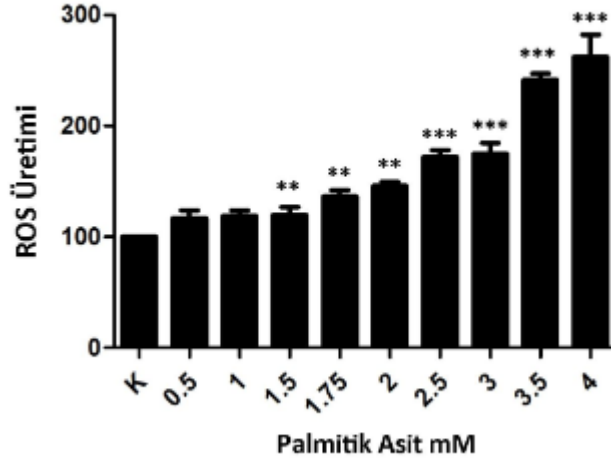


Şekil 4.4: Palmitik asitin INS-1 beta hücrelerinde laktat dehidrogenaz salınımı üzerine etkisi (*p<0,05; ** p<0,001).

Sonuçlara göre INS-1 hücrelerinde sitotoksosite yüzde değerleri kontrol grubu için %0±0; 1 mM palmitik asit verilen grup için %1±0; 2 mM palmitik asit verilen grup için %13.5±2.4; 3 Mm palmitik asit verilen grup için %48.2±2, 4 mM palmitik asit verilen grup için %81.3±5.9 olarak bulunmuştur. Gruplar birbiri ile karşılaştırıldığında dozlar arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilmiştir (p<0,05; p<0,001). İkili karşılaştırmalar sonucunda da LDH miktarı 3 ve 4 mM dozda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artış göstermiştir (p<0,001). 4 mM dozda palmitik asit hücreler için çok fazla toksik etki oluşturduğundan nekrotik doz olarak 3 ve 4 mM seçilmiştir.

4.3. INS-1 BETA HÜCRELERİNDE PALMİTİK ASİT UYGULAMASI REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİNİN ÜRETİMİNE NEDEN OLUR

Reaktif oksijen türleri (ROS) için indikatör olarak kullanılan fluoressinin kimyasal olarak indirgenmesi sonucu oluşan H₂DCFDA farklı dozlarda palmitik asit uygulanan INS-1 beta hücrelerine verilerek ROS ölçümü yapılmış ve sonuçlar Şekil 4.5'de gösterilmiştir.

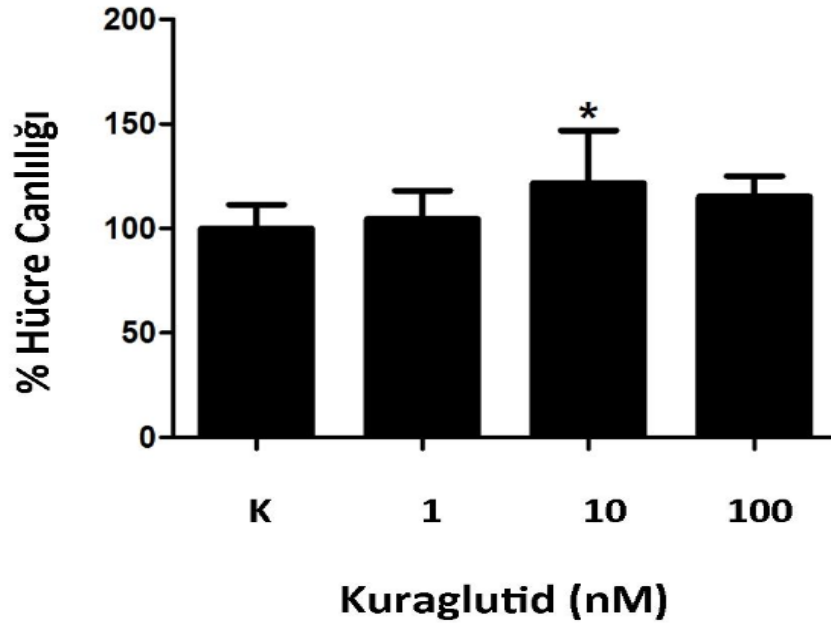


Şekil 4.5: Palmitik asitin INS-1 beta hücrelerinde reaktif oksijen türleri üzerine etkisi (** p<0,001; *** p<0,0001).

Sonuçlara göre INS-1 beta hücrelerinde ROS'un yüzde ölçümü kontrol grubunda %100±7.02; 0.5 mM palmitik asit verilen grupta %116±6.01; 1 mM palmitik asit verilen grupta %117±2.5; 1.5 mM palmitik asit verilen grupta %119.7±7.0; 1.75 mM palmitik asit verilen grupta %136.5±5.6; 2 mM palmitik asit verilen grupta %145.8±3.8; 2.5 mM palmitik asit verilen grupta %172.1±6.1; 3 mM palmitik asit verilen grupta %174.8±9.9; 3.5 mM palmitik asit verilen grupta %241.6±5.5; 4 mM palmitik asit verilen grupta %262.2±9.9 olarak bulunmuştur. İkili karşılaştırmalar sonucunda 1.5, 1.75, 2, 2.5, 3, 3.5 ve 4 mM palmitik asit verilen gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artış meydana gelmiştir (p<0,001; p<0,0001).

4.4. KURAGLUTİD'E AİT HÜCRE CANLILIK TESTİ BULGULARI

Kuraglutid'in, INS-1 sıçan pankreatik beta hücre soyu canlılığı üzerine etkisini görebilmek için farklı konsantrasyonlarda (1, 10 ve 100 nM) 24 saat inkübe edilmiştir. Farklı dozlarda nM cinsinden verilen kuraglutid'in hücre canlılığı üzerindeki etkisi Şekil 4.6'te verilmiştir.



Şekil 4.6: Kuraglutid'in INS-1 beta hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkisi (* p<0.05).

Sonuçlara göre % hücre canlılığı değerleri kontrol grubunda 100 ± 3.3 ; 1 nM verilen grupta 104.50 ± 3.70 ; 10 nM verilen grupta 121.80 ± 7.30 ; 100 nM verilen grupta 115.20 ± 3.30 olarak bulunmuştur. Gruplar birbiri ile karşılaştırıldığında dozlar arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilmiştir ($p < 0,05$). İkili karşılaştırmalar sonucunda da hücre canlılığı 10 nM dozda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artış göstermiştir ($p < 0,05$).

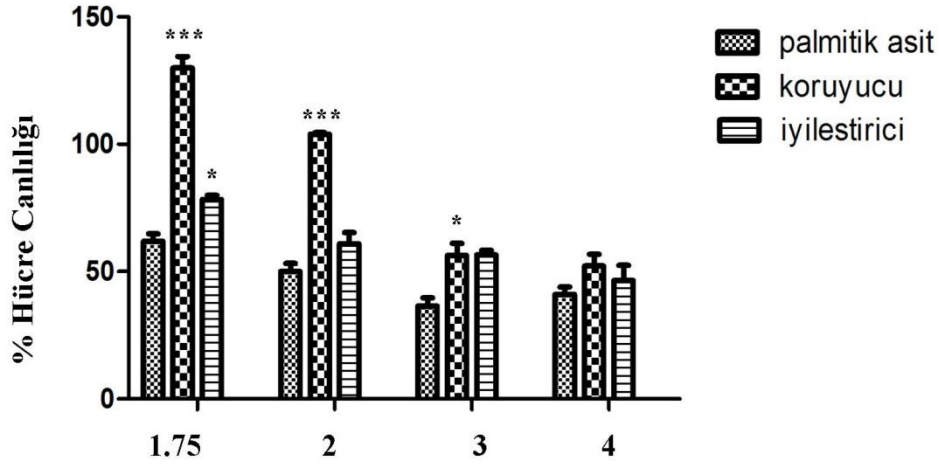
4.5. KURAGLUTİD VE PALMİTİK ASİT'İN BİRLİKTE UYGULANDIĞI DURUMA AİT HÜCRE CANLILIK TESTİ BULGULARI

INS-1 sıçan pankreatik beta hücre soyunda ilk olarak palmitik asitin meydana getirmiş olduğu sitotoksositeye karşı kuraglutid'in hem iyileştirici hem de koruyucu etkisine bakılmıştır.

4.5.1. Kuraglutid'in INS-1 Beta Hücre Ölümleri Üzerinde Koruyucu ve İyileştirici Etkisi

INS-1 beta hücrelerinde otofajik, apoptotik ve nekrotik olarak seçilen 1.75, 2, 3 ve 4 mM palmitik asit dozları uygulanmadan önce kuraglutid'in bu hücre ölümleri üzerindeki koruyucu etkisini görebilmek için, hücreler önce 10 nM kuraglutid ile 24 saat muamele edilmiştir. Daha sonra kuraglutid ortamdan uzaklaştırılıp, son hacim 5 ml

olacak şekilde palmitik asit ile birlikte 10 nM kuraglutid verilip 24 saat beklenmiştir. Sonra kuraglutid'in iyileştirici etkisini görmek için 1.75, 2, 3 ve 4 mM palmitik asit 24 saat uygulandıktan sonra 10 nM kuraglutid ile hücreler 24 saat muamele edilmiştir. Kuraglutid'in hücre ölümleri üzerindeki hem koruyucu hem de iyileştirici etkisi Şekil 4.7'da gösterilmiştir.



Şekil 4.7: Kuraglutid'in INS-1 beta hücrelerinde hücre canlılığı üzerinde koruyucu ve iyileştirici etkisi (* p<0,05; *** p<0,0001).

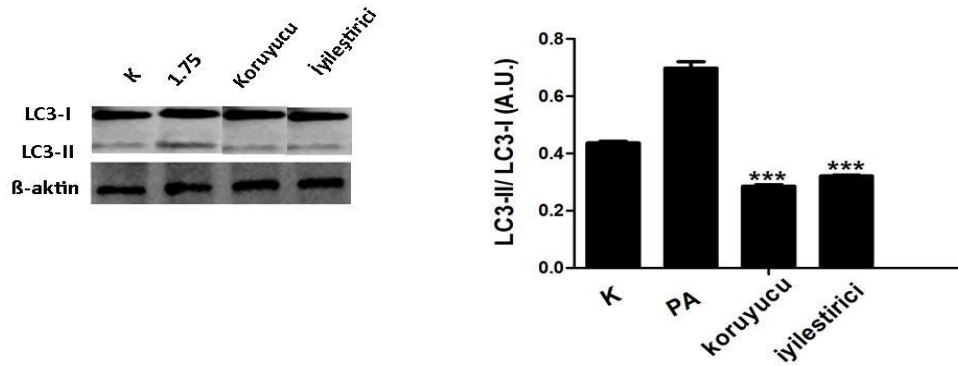
Sonuçlara göre % hücre canlılığı değerleri 1.75 mM (otofajik doz) palmitik asit verilen grupta 60.6 ± 11.6 , otofajik doza karşı koruyucu olarak 10 nM kuraglutid verilen grupta 129.9 ± 4.6 , otofajik doza iyileştirici olarak 10 nM kuraglutid verilen grupta 78.3 ± 1.6 ; 2 mM (apoptotik doz) palmitik asit verilen grupta 50.1 ± 11 , apoptotik doza koruyucu olarak 10 nM kuraglutid verilen grupta 103.9 ± 0.6 , apoptotik doza iyileştirici olarak 10 nM kuraglutid verilen grupta 60.9 ± 4.3 ; 3 mM (nekrotik doz) palmitik asit verilen grupta 36.50 ± 3.3 , nekrotik doza koruyucu olarak 10 nM kuraglutid verilen grupta 56.4 ± 4.7 , nekrotik doza iyileştirici olarak 10 nM kuraglutid verilen grupta 56.5 ± 1.7 ; 4 mM (nekrotik doz) palmitik asit verilen grupta 41.04 ± 6.6 , 4 mM palmitik doza koruyucu olarak 10 nM kuraglutid verilen grup 52.2 ± 4.6 , 4 mM palmitik doza iyileştirici olarak 10 nM kuraglutid verilen grup 46.6 ± 5.8 olarak bulunmuştur. Gruplar birbiri ile karşılaştırıldığında dozlar arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilmiştir ($p < 0,05$; $p < 0,0001$).

10 nM kuraglutid'in koruyucu etkisi 1.75, 2, 3 ve 4 mM' da göstermiş olup bunlardan 1.75, 2 ve 3 mM'da koruyucu etkisi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde meydana gelmiştir ($p<0,05$; $p<0,0001$).

10 nM kuraglutid'in iyileştirici etkisini görmek için öncelikle 1.75, 2, 3 ve 4 mM dozlarda palmitik asit ile 24 saat süreyle muamele edilmiştir. Daha sonra ortamdan palmitik asit uzaklaştırılıp 10 nM kuraglutid ile 24 saat muamele edilmiştir. Kuraglutid'in 1.75, 2, 3 ve 4 mM dozda iyileştirici etki göstermesine rağmen, iyileştirici etki bunlardan sadece 1.75 mM dozda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde meydana gelmiştir ($p<0,05$).

4.5.1.1. Kuraglutid'in Otofaji Üzeinde Koruyucu ve İyileştirici Etkisi

INS-1 beta hücrelerinde 1.75 mM palmitik asit ile uyarılan otofajide kuraglutid'in etkisini incelemek amacıyla hücre içinde LC3 protein miktarına western blot yöntemiyle bakılmıştır. Hem western blot bantları hem de bu bantların analizi sonucu yapılan hesaplama ile elde edilen grafik Şekil 4.8'de gösterilmiştir.

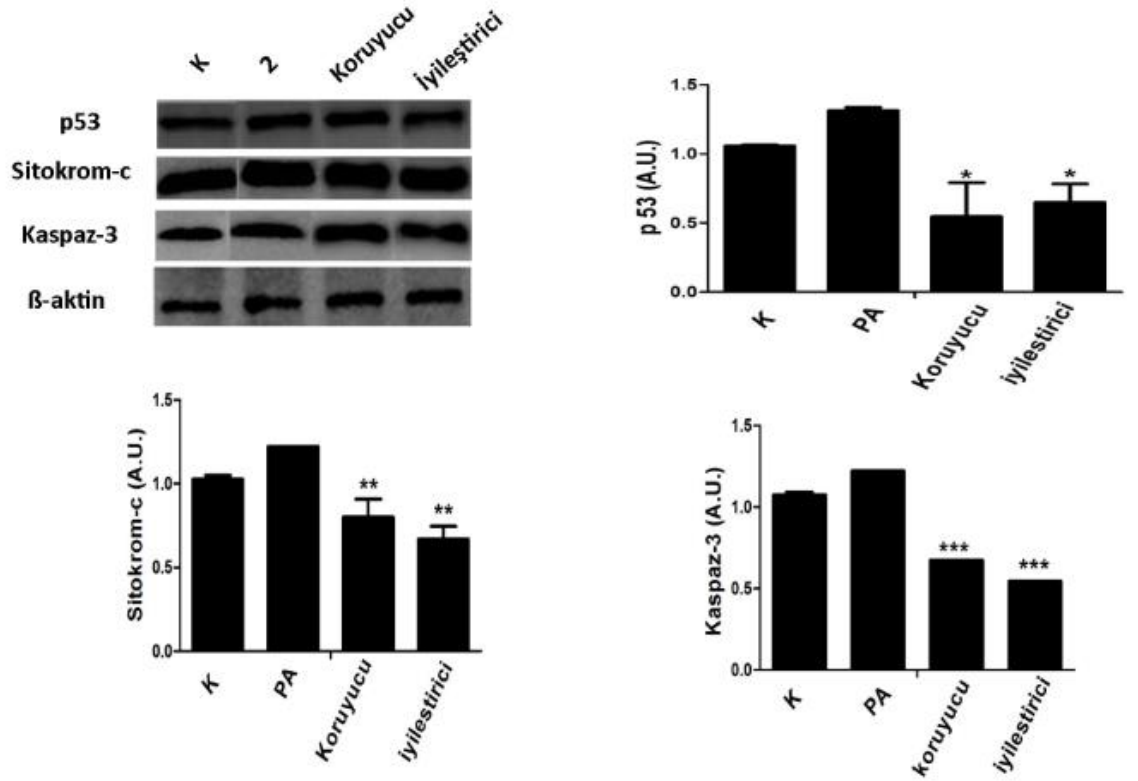


Şekil 4.8: INS-1 beta hücrelerinde palmitik asit ile meydana gelen otofajide kuraglutid'in koruyucu ve iyileştirici etkisi (***) $p<0,001$).

Sonuçlara göre hücre içinde LC3-II miktarı, kontrol grubunda 0.44 ± 0.00 ; 1.75 mM (otofajik dozda) doz palmitik asit verilen grup 0.70 ± 0.01 ; otofajik dozda koruyucu olarak kuraglutid'in verilen grup 0.29 ± 0.00 ; otofajik dozda iyileştirici olarak kuraglutid verilen grup 0.32 ± 0.00 olarak bulunmuştur. İkili karşılaştırmalar sonucunda otofajide 10 nM kuraglutid'in koruyucu ve iyileştirici etki meydana getirdiği tespit edilmiş ve bu etkiler istatistiksel olarak anlamlı düzeyde meydana gelmiştir ($p<0,001$).

4.5.1.2. Kuraglutid'in Apoptoz Üzerinde Koruyucu ve İyileştirici Etkisi

INS-1 beta hücrelerinde 2 mM palmitik asit ile uyarılan apoptozda kuraglutid'in etkisini incelemek amacıyla hücre içinde p53, sitokrom-c ve aktif kaspaz-3 gibi protein miktarlarına western blot yöntemiyle bakılmıştır. Hem western blot bantları hem de bu bantların analizi sonucu yapılan hesaplama ile elde edilen grafik Şekil 4.9'de gösterilmiştir.



Şekil 4.9: INS-1 beta hücrelerinde palmitik asit ile meydana gelen apoptozda kuraglutid'in koruyucu ve iyileştirici etkisi (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

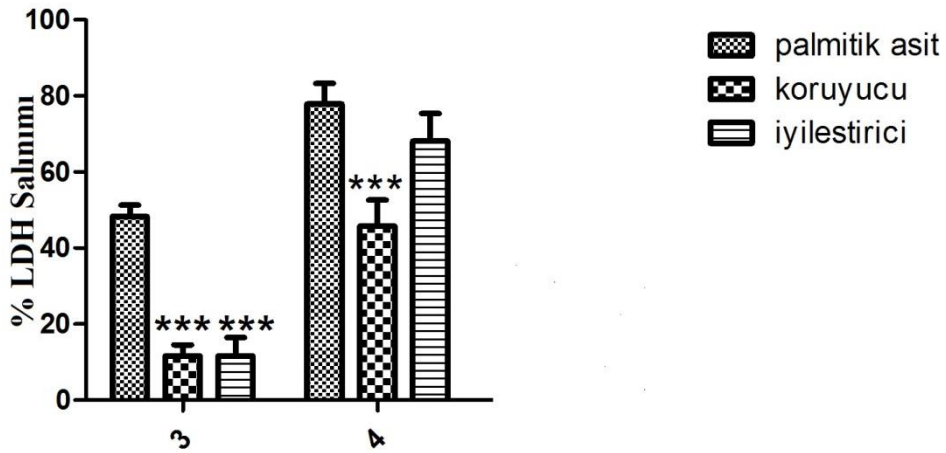
Sonuçlara göre hücre içinde p53 miktarı kontrol grubunda 1.06 ± 0.00 ; 2 mM (apoptotik doz) palmitik asit verilen grupta 1.31 ± 0.02 ; apoptotik doza koruyucu olarak 10 nM kuraglutid'in verildiği grup 0.54 ± 0.24 ; apoptotik dozda iyileştirici olarak 10 nM kuraglutid'in verildiği grup 0.65 ± 0.13 olarak bulunmuştur. İkili karşılaştırma sonuçlarına göre, p53 protein miktarının koruyucu ve iyileştirici gruplarda, palmitik asit verilen gruba göre azaldığı tespit edildi ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı düzeyde meydana gelmiştir ($p < 0,05$).

Sitokrom-c miktarı kontrol grubunda 1.02 ± 0.02 ; 2 mM (apoptotik doz) palmitik asit verilen grup 1.22 ± 0.00 ; apoptotik doza koruyucu olarak 10 nM kuraglutid'in verildiği grup 0.80 ± 0.10 ; apoptotik doza iyileştirici olarak 10 nM kuraglutid'in verildiği grup 0.67 ± 0.07 olarak bulunmuştur. İkili karşılaştırma sonuçlarına göre, sitokrom-c protein miktarının koruyucu ve iyileştirici gruplarda, palmitik asit verilen gruba göre azaldığı tespit edildi ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı düzeyde meydana gelmiştir ($p < 0,01$).

Aktif kaspaz-3 miktarı kontrol grubunda 1.07 ± 0.01 ; 2 mM (apoptotik doz) palmitik asit verilen grup 1.22 ± 0.00 ; apoptotik doza koruyucu olarak 10 nM kuraglutid'in verildiği grup 0.67 ± 0.00 ; apoptotik doza iyileştirici olarak 10 nM kuraglutid'in verildiği grup 0.54 ± 0.00 olarak bulunmuştur. İkili karşılaştırma sonuçlarına göre, aktif kaspaz-3 protein miktarının koruyucu ve iyileştirici gruplarda, palmitik asit verilen gruba göre azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,001$).

4.5.1.3. Kuraglutid'in Nekroz Üzerinde Koruyucu ve İyileştirici Etkisi

10 nM kuraglutid, INS-1 beta hücrelerinde 3 ve 4 mM dozlarda LDH salınımı değerlendirilerek nekroz üzerinde koruyucu ve iyileştirici etkisi şekil 4.10'da verilmiştir.



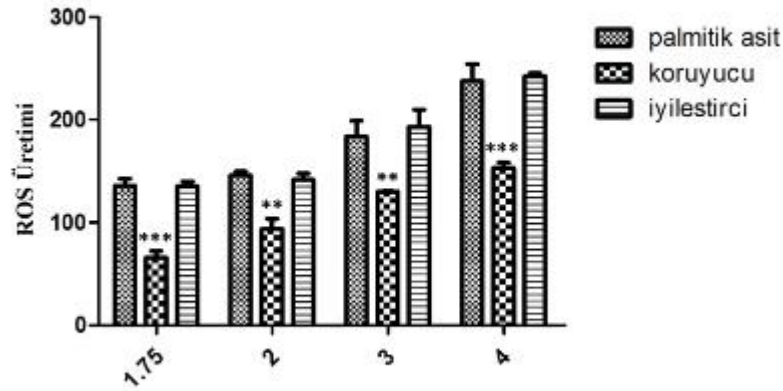
Şekil 4.10: Kuraglutid'in INS-1 beta hücrelerinde palmitik asit ile uyarılan laktat dehidrogenaz salınımı üzerinde iyileştirici ve koruyucu etkisi (***) $p < 0,001$).

Sonuçlara göre INS-1 beta hücrelerinde % sitotoksosite değerleri 3 mM dozda (nekrotik doz) palmitik asit verilen grupta 48.2 ± 2 , nekrotik doza koruyucu olarak 10 nM

kuraglutid verilen grupta 11.6 ± 2.9 , nekrotik doza iyileştirici olarak 10 nM kuraglutid verilen grupta 11.6 ± 4.8 ; 4 mM doz palmitik asit verilen grupta 81.3 ± 5.9 , 4 mM palmitik asite koruyucu olarak 10 nM kuraglutid verilen grupta 45.8 ± 6.8 , 4 mM palmitik asite iyileştirici olarak 10 nM kuraglutid verilen grupta 68.2 ± 7.2 , olarak bulunmuştur. Kontrol ile karşılaştırıldığında her iki dozda da koruyucu etki bakımından istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmiştir ($p < 0,001$). Oysa 4 mM palmitik asit verilen grupta kuraglutid sadece koruyucu etki meydana getirmiştir. İkili karşılaştırmalar sonucunda kuraglutid'in nekrotik dozda hem iyileştirici hem de koruyucu etki meydana getirdiği tespit edilmiş ve bu etkiler istatistiksel olarak anlamlı düzeyde meydana gelmiştir ($p < 0,0001$).

4.6. KURAGLUTİD'İN LİPOTOKSİK ŞARTLARDA INS-1 BETA HÜCRELERİNDE REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİNİN ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİSİ

Farklı dozlarda palmitik asit uygulanan INS-1 beta hücrelerine 10 nM kuraglutid'in koruyucu ve iyileştirici olarak verilmesiyle ROS ölçümü yapılmış ve sonuçlar Şekil 4.11'de gösterilmiştir.



Şekil 4.11: Kuraglutid'in, farklı dozlarda palmitik asit uygulanan INS-1 beta hücrelerindeki ROS üzerinde koruyucu ve iyileştirici etkisi (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Sonuçlara göre lipotoksik şartlarda INS-1 beta hücrelerinde ROS'un yüzde ölçümü 1.75 mM palmitik asit verilen grupta 136.5 ± 5.6 , otofajik (1.75 mM) doza koruyucu olarak 10 nM kuraglutid verilen grupta 65.8 ± 6.2 , otofajik (1.75 mM) doza iyileştirici

olarak 10 nM kuraglutid verilen grupta 135.3 ± 4.5 ; 2 mM palmitik asit verilen grupta 145.8 ± 3.8 , apoptotik (2 mM) doza koruyucu olarak 10 nM kuraglutid verilen grupta 93.9 ± 9.7 , apoptotik (2 mM) doza iyileştirici olarak 10 nM kuraglutid verilen grupta 141.6 ± 6.1 ; 3 mM palmitik asit verilen grupta 174.8 ± 9.9 , nekrotik (3 mM) doza koruyucu olarak 10 nM kuraglutid verilen grupta 130 ± 0.4 , nekrotik (3 mM) doza iyileştirici olarak 10 nM kuraglutid verilen grupta 193 ± 4.4 ; 4 mM palmitik asit verilen grupta 262.2 ± 9.9 , nekrotik (4 mM) doza koruyucu olarak 10 nM kuraglutid verilen grupta 153 ± 5.0 , nekrotik (4 mM) doza iyileştirici olarak 10 nM kuraglutid verilen grupta 242 ± 2.7 olarak bulunmuştur. İkili karşılaştırmalara göre 1.75, 2, 3 ve 4 mM palmitik asit verilen hücrelerde kuraglutid'in istatistiksel anlamda koruyucu etki meydana getirdiği tespit edilmiştir ($p < 0,01$; $p < 0,001$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hastalığın oluşum sürecinin ve tedavisinin belirlenmesi, süreçte rol oynayan moleküllerin etki mekanizmalarının aydınlatılması ile mümkündür. Bu amaçla, yeni terapötik ajanlar ya da ilaçların etkileri çeşitli hastalıklar ile ilgili *in vivo* hayvan modellerinde veya *in vitro* şartlarda denenerek test edilmektedir. Bu çalışmalar sonucunda hastalıkların meydana gelmesinde temel rol oynayan pek çok sinyal yolağı ve ilişkili moleküller ortaya konmaktadır.

Tüm dünyadaki diyabet vakalarının %90'ından fazlasını Tip 2 diyabet (T2D) oluşturur (Stumvoll ve diğ., 2005). 2000 yılında yapılan değerlendirmelere göre, dünyada 171 milyon T2D'den etkilenmiş birey vardır ve bu sayının 2030 yılında 366 milyonu bulacağı tahmin edilmektedir (Sala ve diğ., 2011). 20 yılı aşkın süredir yapılan araştırmalar pankreatik beta hücre hasarına neden olan özgün mekanizmalar üzerine odaklanmıştır. Hem beta hücre canlılığının azalması hem de fonksiyon kaybı diyabet gelişiminde önemlidir (Yang ve diğ., 2012). Tip 2 diyabet tedavisi için diyet, fiziksel aktivite ve kilo kaybının yanı sıra optimal glisemik kontrolün sağlanması ve oluşabilecek komplikasyonları önlemek amacıyla, insülin eksikliğini veya insülin direncini hedef alan antidiyabetik ilaçlar gereklidir.

Tip 2 diyabetin gelişimini ve moleküler mekanizmasını aydınlatmaya yönelik olarak dünya genelinde büyük çapta araştırmalar yapılmakta ve bu araştırmalar için genetik olarak obez/diyabetik olan ve/veya diyetle uyarılan obezite/diyabete yatkın deneysel hayvan modelleri *in vivo* ve MIN-6, INS-1, RINm5F, HIT gibi insülinoma beta hücreleri *in vitro* olarak kullanılmaktadır. Deney hayvanları kullanımını en aza indirmek ve etik problemlerden dolayı öncelikli olarak tercihimiz beta hücre soylarından yana olmuştur. Bu düşünce ile yola çıkarak yaptığımız literatür taramaları ışığında, *in vitro* ortamda lipotoksisite çalışmalarının beta hücre soyları arasında daha çok INS-1 sıçan pankreatik hücreleri ile yapılmasından dolayı tercihimiz bu hücreler olmuştur.

Birçok organizmanın enerji metabolizmasındaki iki önemli molekül olan glukoz ve yağ asitlerinin fazla tüketilmeleri diyabet ve obezite gibi metabolik hastalıkların meydana gelmesine neden olur (Yang ve diğ., 2012). Organlarda yağ birikimi dokuya özgü hasar meydana gelmesine neden olarak, metabolizmayla ilişkili birçok hastalığa zemin hazırlayabilir. Beta hücrelerinde palmitik asit gibi doymuş yağ asiti miktarının artması fonksiyon kaybına ve apoptoza neden olur (Peng ve diğ., 2011). Serbest yağ asidi, yağ asidi bağlayıcı proteine (UCP-2) bağlanarak beta hücre sitozolüne taşınır. LC-CoA (Serbest yağ asidinin aktif formu, uzun zincirli Co-A ürünleri) CPT-1 (Karnitin Palmitoil Transferaz) aracılığı ile mitokondriye taşınarak Krebs siklusuna katılır ve beta oksidasyonunu gerçekleştirir. Serbest yağ asidi tamamen okside olursa, beta hücresi için toksik etki oluşturmaz. Çalışmamızda, *in vitro* koşullarda palmitik asit ile lipotoksisite oluşturarak INS-1 beta hücrelerinde, hücre ölüm tipini belirlemeyi ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) bu hücre ölüm tipleri ile ilişkisini ortaya koymayı hedefledik. Ayrıca kuraglutid'in lipotoksik şartlarda INS-1 beta hücreleri üzerindeki muhtemel koruyucu ve iyileştirici etkisini ortaya koymayı da amaçladık.

Palmitik asitin beta hücreleri (Maedler ve diğ., 2001), kardiyomiyositler (de Vries ve diğ., 1997; Hickson-Bick ve diğ., 2000), mikrovasküler endotelial hücreler (Yamagishi ve diğ., 2002) ve insan meme kanser hücre (Hardy ve diğ., 2000) soyları dahil birçok hücre soyunda farklı doz ve sürelerde farklı hücre ölüm tiplerini meydana getirdiği gösterilmiştir. INS-1 beta hücrelerine 0.5 mM palmitik asit ile birlikte 30 mM glukozun 24 saat verilmesi sonucunda hücre canlılığının azaldığı (Miao ve diğ., 2013), ayrıca MIN-6 beta hücrelerinin 0.4 mM palmitik asit ile 24 saat muamele edilmesinden sonra hücre canlılığının azaldığı da (Jiang ve diğ., 2014) gösterilmiştir. Çalışmamızda INS-1 beta hücrelerine 0.25 mM palmitik asit uygulanmasından itibaren 24 saatte hücre canlılığında azalma meydana geldiği gözlenmiştir. Palmitik asit düşük doz uygulamalarında hücrelerin enerji gereksiniminde kullanıldığından, 0.25 mM'lık dozda hücre canlılığında etkin bir azalma olmadığını düşünüyoruz. Palmitik asitin hücrelere taşınabilmesi için taşıyıcı proteine ihtiyaç duyulduğu göz önüne alınarak, çözücü olarak kullandığımız medyuma sıgır serum albumin ilave edildi (Martinez ve diğ., 2008) ve doz taramalarına devam edildi. 0.5-2 mM doz aralığında palmitik asit uygulaması sonucu hücre canlılığının tedricen azaldığı, 2-3 mM doz aralığında palmitik asit uygulamasında ise hücre canlılığında birbirini takip eden belirgin artış ve azalışların meydana geldiği

dikkati çekmiştir. Ancak 3-5 mM doz aralığında palmitik asit uygulandığında ise bu artış ve azalışların daha minimal düzeyde olduğu gözlenmiştir. Yaptığımız literatür taramalarına göre, palmitik asitin geniş doz aralıklarında hücre canlılığındaki etkisine bakılmadığını tespit ettik. Çalışmamızda hücre canlılığının belirlenmesi sonucunda 4 mM palmitik asit ile oluşan hücre toksitesinin ancak bu dozda doygunluğa ulaştığını söyleyebiliriz.

GLP-1, β hücrelerinde insülin kodlayan gen transkripsiyonunu (INS) sağlayan, glukozla uyarılan insülin sekresyonunu arttıran, pankreatik progenitör hücrelerin farklılaşmasını düzenleyen, ayrıca hücreleri apoptozdan koruyan, besin alımını takiben L- hücrelerinden salınan peptit tabiatlı bir hormondur. Bu özelliklerinden dolayı diyabetin tedavisi için klinikte kullanımı oldukça önemlidir (Yusta ve diğ., 2006; Lee ve diğ., 2014). Çeşitli çalışmalar, GLP-1 ve agonistlerinin β hücrelerinin büyümesini ve farklılaşmasını uyardığını, ayrıca β hücre çoğalması ve apoptozu arasındaki dengeyi sağladığını da ileri sürmektedir (Xu ve diğ., 1999; Tourrel ve diğ., 2001).

1980'lerin ortasında, GLP-1'in biyolojik aktivitesiyle ilgili yapılan çalışmalarda, ilk olarak GLP-1 (1-37 ve 1-36 amid)'in N-ucundan uzatılmış, ancak bu uzun molekülün biyolojik aktivitesinin sınırlı olduğu görülmüştür. 1987'de, birbirinden bağımsız 3 farklı araştırmacı tarafından, GLP-1 molekülünün ilk 6 amino asitinin kaldırılması sonucu biyolojik aktivitesinin arttığı görülmüştür (<http://www.glucagon.com/glp1.html>). Daha sonra molekül modifiye edilerek çeşitli analoglar geliştirilmiş ve plazma yarı ömrünün uzatılması sağlanmaya çalışılmıştır. Ancak uzun ömürlü GLP-1 analoglarının (liraglutid, albiglutid, dulaglutid vb.) geliştirilmesiyle bu molekülün terapötik etkinliği artırılmıştır. Lipotoksik koşullarda, birçok GLP-1 analogunun etkisi araştırılmıştır (Cunha ve diğ., 2009; Yang, 2012). Ancak kuraglutid'in bu alanda etkilerinin hiç araştırılmamış olması bu çalışmanın özgünlüğünü ortaya koyan birincil tercih nedeni olmuştur.

Protein yıkımında iki önemli mekanizma vardır; bunlardan biri kısa ömürlü proteinleri parçalayan "ubikitin proteazom sistemi", diğeri uzun ömürlü proteinleri ve hücresele bileşenleri parçalayan "otofaji"dır. Otofaji ve ubikitin proteazom sistemi birbiriyle bağlantılıdır. Otofaji aktive olduğu zaman ubikitin proteazom sistemi inaktive olur (Fujitani ve diğ., 2009). INS-1 beta hücreleri yüksek glukoz ve belirli dozda serbest

yağ asitine maruz kaldığında, ubikitinlenmiş protein agregatları artar. Bu agregatların uzaklaştırılması otofaji ile düzenlenir. Yapılan bazı çalışmalarda, INS-1 beta hücrelerinin otofaji inhibitörü olan 3-metiladenin ile muamele edilmesi sonucunda, hücre canlılığının azaldığı görülmüştür. Bundan dolayı, INS-1 beta hücrelerinin normal fonksiyonlarını devam ettirebilmeleri ve yaşamlarını sürdürebilmeleri için düşük düzeyde otofaji gereklidir. Bizim çalışmamızda da gözlemlendiği gibi, otofaji indüklendiğinde otofagozom belirteci olan LC3-II protein miktarı artar.

Yapılan çalışmalarda, INS-1 beta hücrelerinde 24 saat 0.5 mM palmitik asit uygulamasına karşın, SK-N-SH sinir, C2C12 kas ve HepG2 karaciğer hücrelerine 24 saat 1mM palmitik asit uygulamasının otofajiyi uyardığı gösterilmiştir (Komiya ve diğ., 2010). Bundan yola çıkarak, palmitik asit ile meydana gelen hücre canlılığındaki bu azalmanın otofajiden kaynaklanıp kaynaklanmadığını anlamak için, çalışmamızda 0.75, 1, 1.75, 2, 2.5 ve 3 mM palmitik asit uygulanan hücrelerden elde edilen lizatlarda, LC3 I'in LC3 II' ye dönüşüm miktarına bakıldı ve en fazla 1.75 mM'lık dozda artış olduğu görülerek, bu dozun lipotoksik şartlarda bu hücreler için otofajik doz olduğu kabul edildi.

Aktif kaspaz-3 birçok apoptotik süreçte rol oynayan efektör bir protein olup, apoptotik hücrelerde gerçekleşen DNA fragmentasyonu ve morfolojik değişikliklerden sorumludur (Porter ve Janicke, 1999). Sağlıklı hücrelerde sitokrom-c mitokondri membranları arasında bulunan ancak sitotoksik ilaçlar, gelişme faktörü eksikliği, reaktif oksijen türleri ve DNA hasarı gibi değişik hücre stresleri ile sitoplazmaya salınan önemli bir proteindir. Sitokrom-c sitoplazmaya salındığında apoptozom kompleksi oluşumuna neden olarak kaspaz kaskadını başlatır ve artık bu hücre için geri dönüşümsüz bir durumdur (Kumar, 2005). Apoptozu düzenleyen protein ve tümör baskılayıcı gen olarak bilinen p53, hücre siklusunun düzenlenmesi, öncelikle DNA hasar tamiri ve hasarın onarılamaması durumunda programlanmış hücre ölümünü gerçekleştirir. DNA hasarı tamir edilemediğinde Bax, Noxa ve Puma'yı aktifleyerek, Bcl-2 ve Bcl-xL'yi baskılayarak hücreyi apoptoza yönlendirir. Bazı araştırmacılar p53 ölüm sinyalinin kaspaz aktivasyonuna yol açabileceğini savunur, ancak p53 ile kaspaz aktivasyon mekanizması tam olarak bilinmemektedir (Hardy ve diğ., 2000). Palmitik asit ile uyarılan apoptozla ilgili yapılan birçok çalışma olmasına rağmen ilginçtir ki,

palmitik asitin hücrelerde hangi mekanizmayla apoptoza yol açtığı hala bilinmemektedir ve bu konu üzerinde çalışmalar yoğunlukla devam etmektedir (Mu ve diğ., 2013).

Palmitik ve stearik asit gibi doymuş yağ asitleri beta hücrelerinde sitokrom-c salınımına, kaspaz-3 aktivasyonuna ve DNA fragmantlarının oluşumuna neden olur. INS-1 beta hücreleri 15 saat süreyle 0.4 ve 0.6 mM palmitik asit ile muamele edildiğinde DNA fragmantlarının görülmesiyle apoptoz oluştuğu gösterilmiştir (Choi ve diğ., 2011).

Çalışmamızda bu bilgilerin ışığında, palmitik asit ile uyarılan hücre canlılığındaki azalmanın apoptotik hücre ölümü ile ilişkili olup olmadığını araştırmak için, hücre canlılığı bulguları incelenmiş ve belirgin düşüş olan dozların 0.75, 1, 1.75, 2, 2.5 ve 3 mM olduğu tespit edilmiştir. Belirlenen dozlarda palmitik asitin uygulandığı hücre lizatlarında p53, sitokrom-c, kaspaz-3 seviyeleri western blot yöntemiyle ölçülmüştür. Sonuç olarak, 2 mM palmitik asitin apoptotik proteinleri en fazla uyardığı belirlenmiştir. 2.5 ve 3 mM dozda apoptotik protein miktarlarının düşmeye başlaması bize hücrelerin nekroza geçiyor olabileceğini düşündürdü.

Laktat dehidrogenaz (LDH) bütün hücrelerde bulunan sitozolik bir enzim olup, laktat ve pirüvatın birbirine dönüşmesini katalizler. Sitozolik LDH kaybı ve onun kültür medyumuna geçmesi, hücre membranının hasarından dolayı, nekrotik hücre ölümünün bir indikatörüdür (Fotakis ve Timbrell, 2006). Çalışmamızda palmitik asit ile uyarılan hücre canlılığındaki azalmanın nekrozla ilişkili olup olmadığını araştırmak için LDH aktivitesi ölçülmüştür. Palmitik asit ile inkübasyon sonrası INS-1 beta hücre soyunda doza bağlı olarak LDH salınımı artmıştır. Bu sonuç palmitik asidin membran hasarına yol açtığını göstermektedir.

Reaktif oksijen türleri (ROS) bazı metabolik yollarda, çeşitli kinazlar ve transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu başlatmada, sinyal iletim yollarında ikincil habercil olarak önemli rol oynarlar (Jacquier-Sarlin ve Polla, 1996). ROS birçok biyolojik fonksiyon ve hastalıkla ilişkilidir ve hücre ortamına göre ya hücre yaşamını ya da hücre ölümünü teşvik eder (Gibson, 2010). Ayrıca ROS otofajinin, apoptozun ve nekrozun meydana gelmesinde aracı rol oynar. Düşük seviyede oksidatif stres otofaji ve apoptoza neden olurken, daha yüksek seviyede oksidatif stres nekroza neden olur

(Lennon ve diğ.,1991, Dypkut ve diğ.,1994, Karna ve diğ., 2010). Palmitik asit gibi serbest yağ asitleri, antioksidatif enzim aktivitesini azaltarak ROS üretimini tetikler (Azevedo-Martins ve Curi, 2008). Çalışmamızda artan dozlarda palmitik asitin ROS üretimini arttırdığı gözlenmiş ve otofajik dozda daha az, apoptotik dozda biraz daha fazla ve nekrotik dozda ise ROS üretiminin en fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu bilgilere göre ROS'un artması hücre ölümü arasındaki geçişleri tetikleyebilir.

Tüm bu sonuçlar bize palmitik asitin düşük dozlarda INS-1 hücrelerinde enerji gereksiniminde kullanıldığını, hücre canlılığını koruduğunu ve hatta çoğaldığını; daha yüksek dozlarda ise toksik etkiye sahip olup hücre canlılığında azalmaya neden olduğunu gösterdi. Bu mekanizmayla ilgili olarak, hücrede biriken palmitik asitin ilk olarak endoplazmik retikulum stresini uyurabileceği ve böylece otofajinin devreye girdiğini düşünüyoruz. Doz arttıkça hücrenin bu toksisiteye adapte olamadığını ve canlılığının gittikçe azaldığı bu noktada da devreye apoptozun girdiğini düşünmekteyiz. Yüksek palmitik asit uygulamalarında ise canlılığın daha da azaldığı ve başka bir ölüm tipi olan nekrozun baskın olmaya başladığı dikkati çekmektedir.

GLP-1 besin alımını takiben bağırsak L- hücrelerinden sekrete olur, ancak T2D'li bireylerde sekresyonu azalmıştır. GLP-1 ve analogları glukoz düşürücü özelliğinden dolayı, T2D için terapötik etkiye sahiptirler. Hem *in vivo* hayvan deneyleri hem de *in vitro* koşullarda beta hücreleriyle yapılan birçok çalışmada, GLP-1'in insülin sekresyonunu uyardığı, beta hücre apoptozunu azalttığı, hücre büyümesi ve yaşamını düzenlediği gösterilmesine rağmen, bu etkileri nasıl sağladığının moleküler mekanizması kesin olarak açıklanamamıştır. Yapılan bir çalışmada, GLP-1'in 10 nM dozda 24 saatte hücre canlılığını arttırdığını (Han ve diğ., 2012) ve bir diğer çalışmada ise GLP-1 analogu olan liraglutid'in 24 saatte 10 nM dozda INS-1 beta hücrelerinin canlılığını arttırdığı gösterilmiştir (Chen ve diğ., 2013). RINm5F insülinoma hücrelerinde yapılan bir çalışmaya göre ise GLP-1 ve analogu olan liraglutid'in 100 nM dozda 24 saatte hücre canlılığını arttırdığını tespit etmişlerdir (Bregenholt ve diğ., 2005).

Bu bilgilerin ışığında, çalışmamızda, seçmiş olduğumuz GLP-1 analogu liraglutid'in 1, 10 ve 100 nM dozlarda 24 saatde INS-1 beta hücrelerinde hücre canlılığı üzerindeki

etkisine bakıldı ve sonuç olarak 10 nM dozda hücre canlılığının daha fazla arttığı tespit edilerek, ileri çalışmalara 10 nM doz ile devam edildi.

Artan kan glukoz seviyelerine cevaben gelişen yüksek kan insülin seviyeleri T2D'in ana bulgusu olan insülin direncinin önemli bir belirteçidir. Diyabetin gelişme basamaklarından ilki olan, en uzun süren ve klinikte "prediyabet" olarak da bilinen "kompensasyon aşaması" hastalığın erken tespiti ve kesin tedavisi için önemlidir. Diyabet komplikasyonlarının gelişmesi bu hastalığın tanısının koyulmasından çok önce (1-12yıl) (<http://diabetes.niddk.nih.gov/dm/pubs/insulinresistance/prediabetes>) başlamaktadır. Bundan dolayı, prediyabet döneminde alınacak önlemler ile T2D gelişim riskini azaltmak mümkündür. Günümüzde, hem yaşam biçiminin hem de farmakolojik ajanların diyabet başlangıcını önleyebileceği ya da geciktirebileceği düşünülmektedir. Yapılan araştırmalarda, T2D tedavisi için günümüzde ilk tercih edilen ilaç olan metformin'in prediyabetik hastalarda üç yıl kullanım sonrasında T2D gelişimini azalttığı gösterilmiştir (Lilly ve diğ., 2009). Amerikan Diyabet Birliği (ADA), prediyabetin tedavi edilebilir, ciddi tıbbi bir durum olduğunu ifade etmektedir. Yapılan bir araştırmada, 11 yıl boyunca 36000 kişi takip edilmiş ve bunlardan bozulmuş açlık glukozuna (BAG) sahip bireylerde kalp-damar hastalıklardan meydana gelen ölüm riskinin yüksek olduğu bulunmuştur (Wen ve diğ., 2005). Bundan dolayı, gelecekte prediyabetik dönemi hedef alan ilaçların geliştirilmesi T2D için umut vaat etmektedir. Bu dönemde alınacak önlemler kadar, uygulanacak tedavi de diyabet epidemisini (yayılımını) ve komplikasyonlarını azaltmada büyük önem taşımaktadır. Prediyabetik dönemde insülin direncini azaltmak, glukoz emilimini yavaşlatmaya ve diyabetik dönemde en önemlisi de insülin sekresyonunu uyarmaya yönelik farklı türde antidiyabetik ajanlar kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalarda glukoz toleransı bozulmuş veya T2D'li bireylerde GLP-1 sekresyonunda azalma gösterilmiştir (Vilsboll ve diğ., 2001; Lugari ve diğ., 2002). Bundan dolayı bu bireylerin tedavisinde GLP-1 agonist ve analogları sıklıkla tercih edilmektedir.

Bu amaçla gerek *in vivo* hayvan deneylerinde gerekse *in vitro*'da lipotoksik şartlarda beta hücrelerinde GLP-1 ve analoglarının koruyucu ve iyileştirici (terapötik) etkisi kuraglutid hariç bilinmektedir. Bu literatür bilgilerine dayanarak ve yeni bir analog olmasından dolayı, çalışmamızda kuraglutid'in lipotoksik şartlarda INS-1 beta hücreleri

üzerine hem koruyucu hem de iyileştirici etkisine bakılmıştır. Lipotoksik şartlarda kuraglutid'in koruyucu etkisi için, hücelere önce 10 nM kuraglutid verilip daha sonra da, GLP-1 analoglarının plazma yarı ömürlerinin kısa olması da göz önüne alınarak, hasar oluşturucu ajanla (palmitik asit) birlikte tekrar 24 saat süreyle aynı dozda kuraglutid verilmiştir. Ayrıca, kuraglutid'in iyileştirici etkisini araştırmak için önce 24 saatte palmitik asit ile hücrelerde hasar oluşturulup, daha sonra 10 nM dozda kuraglutid uygulanmıştır.

Palmitik asit ile hangi dozlarda hangi hücre ölüm tipinin meydana geldiği tespit edildikten sonra, bu üç ölüm tipi meydana gelmeden öncesi ve sonrasında kuraglutid uygulanarak, bu yeni GLP-1 analogunun hem koruyucu hem de iyileştirici etkisine bakıldı. Lipotoksisite oluşturmadan kuraglutid uygulandığında hücre canlılığının her hücre ölüm tipinde de arttığı, ancak lipotoksisite oluştuktan sonra kuraglutid uygulamasının sadece otofajik dozda hücre canlılığını arttırdığı görüldü.

Tip 2 diyabetli bireylerde (Marchetti ve diğ., 2007) ve diyetle uyarılmış ya da genetik obez (ob/ob) farelerde (Ozcan ve diğ., 2004) yapılan çalışmalarla, serbest yağ asit miktarının ve endoplazmik retikulum stres belirteçlerinin artmış olduğu ve bunların da endoplazmik retikulum stresine neden olarak insülin direncini uyardığı gösterilmiştir (Peng ve diğ., 2011). *In vitro* ortamda palmitik asitin iskelet kasında, hepatositlerde ve pankreatik beta hücrelerinde endoplazmik retikulum (ER)-Golgi protein trafiğini azaltıp, protein miktarının artmasına neden olarak ER stresini uyardığını bildirmişlerdir (Hayashi ve diğ., 2014). Oluşan ER stresine karşı hücrenin yaşamını devam ettirebilmesi için, farklı araştırmacılar tarafından, iki farklı mekanizma ile ER stresinin otofajiyi uyardığı gösterilmiştir (Sano ve Reed, 2013). Çalışmamızda hücrelerde 24 saat süreyle 1.75 mM doz palmitik asit uygulaması ile oluşturulan otofajide, kuraglutid'in hem koruyucu hem de iyileştirici olarak verilmesinin LC3-I' in LC3-II'ye dönüşümünü azalttığı tespit edildi. GLP-1 reseptör agonistlerinin birçok dokuda otofajiyi arttırdığı gösterilmiş, ancak GLP-1 reseptörleri ve otofaji arasındaki moleküler mekanizma halen bilinmemektedir. Başka bir çalışmada, Atg7 delesyonlu farelerde insülin sekresyonunun azaldığı gösterilmiştir (Junk, 2008). Bundan yola çıkarak başka bir araştırmacı da, GLP-1 reseptör agonisti olan exendin-4'ün otofaji hasarı olan β hücrelerinde otofaji seviyesinde bir değişiklik yapmadan insülin sekresyon mekanizmasını uyararak β hücre

apoptozunu azalttığını göstermiştir (Abe, 2013). Buna karşın, başka bir GLP-1 analogu olan liraglutid'in 100 nM dozda 24 saat süreyle INS-1 hücrelerine uygulanmasının otofajiyi arttırdığını göstermişlerdir. Çalışmamızda ise buna karşın INS-1 hücrelerine kuraglutid uygulanmasının otofajiyi azalttığı gösterilmiştir. Literatürden ve çalışmamızdan elde ettiğimiz otofaji bulguları arasındaki farklılık otofajinin gelişme basamaklarındaki farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir. Bunun tam olarak açıklanabilmesi için erken ve ileri otofaji evresindeki belirteçler gösterilerek otofajinin hangi aşamada olduğunun belirlenmesi ile mümkündür. Koruyucu ya da iyileştirici ajanların "otofagozom" oluşumunun ilk basamağında uygulanmasının otofajiyi arttırması mümkün olabilir. Bu çalışmanın devamında bahsi geçen belirteçlerin gösterilerek detaylı mekanizmanın ortaya koyulması planlanmaktadır. Bu bilgilerden yola çıkarak, kuraglutid'in katlanmış protein cevabını arttırıp, ER stresini azaltarak otofajinin azalmasına neden olduğunu düşünmekteyiz. Prediyabet olduğu düşünülen bireylere kuraglutid uygulanmasının diyabet oluşumunu etkin bir şekilde azaltabileceğini, böylelikle diyabete karşı koruyucu olarak kullanılabileceğini ve T2D'li bireylere uygulanması ile de tedavi edici olarak kullanılabilceğini söyleyebiliriz.

GLP-1'in β hücrelerini apoptozdan koruduğu yapılan çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. ZDF fa/fa obez farelere iki gün boyunca GLP-1 uygulanması (Farilla, 2002), STZ ile uyarılan diabetik farelere ise exendin uygulanması ile (Li, 2003) apoptotik β hücre sayısının azaldığı, ayrıca MIN6 beta hücrelerine (Hui, 2003) GLP-1 uygulanması ile de, hücrelerin apoptozdan korunduğunun gösterilmesi ile hem *in vivo* hem de *in vitro* GLP-1'in antiapoptotik etkisi gösterilmiştir. Bu çalışmada kuraglutid'in apoptoz üzerine etkileri ile ilgili elde edilen bulgularımız daha önce başka analoglarla yapılan çalışmalara benzerdir. Apoptoz oluşumu öncesinde ve sonrasında kuraglutid uygulanması sonucunda p53, sitokrom-c ve aktif kaspaz-3 protein miktarlarının azaldığı tespit edilmiştir.

Nekrozun kontrol edilemeyen bir süreç olduğu düşünülmüşse de, son zamanlarda yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular bu sürecin de kontrol edilebileceğini düşündürmektedir. Antinekrotik çok fazla ajan tanımlanmamasına rağmen, 24 amino asitli bir peptid olan humanin (HN) ile yapılan bir çalışmada bu molekülün antinekrotik olduğu gösterilmiştir (Cohen ve diğ., 2015). Çalışmamızda palmitik asit ile nekroz

oluşumu öncesinde kuraglutid uygulanmasının nekrozu önlediği, nekroz oluştuktan sonra uygulandığında ise nekrozu azalttığı tespit edildi. Bu anlamda kuraglutid de antinekrotik bir ajan olarak tanımlanabilir. Aynı zamanda bu sonuçlara paralel olarak, kuraglutid'in INS-1 beta hücrelerindeki lipotoksisiteye karşı koruyucu olarak uygulandığında ROS üretimini azalttığı, iyileştirici olarak uygulandığında ise ROS miktarında hiç bir değişikliğe yol açmadığı gözlenmiştir.

Sonuç olarak,

- INS-1 beta hücrelerine geniş bir doz aralığında palmitik asitin farklı dozlarının uygulanması sonucu, hücrelerde artan doza bağlı olarak otofaji, apoptoz ve nekroz olmak üzere üç farklı ölüm tipi meydana geldiği ve ROS üretiminin arttığı gösterilmiştir.
- Yeni bir GLP-1 analogu olan kuraglutid'in INS-1 beta hücre canlılığını arttırdığı gösterilmiştir.
- Kuraglutid'in, INS-1 beta hücrelerinde palmitik asit ile uyarılan otofaji, apoptoz ve nekroz üzerinde hem koruyucu hem de iyileştirici etkisi olduğu gösterilmiştir.
- Ancak palmitik asitin 3 mM'dan sonraki dozlarda kuraglutid'in sadece koruyucu etkisi gösterilmiştir. Bundan dolayı belli bir dozdan sonra hücre hasarının geri dönüşümsüz bir hal aldığını ve bu noktada hastalıkların tedavisi kadar korunmasının da önemli olduğunu söyleyebiliriz.
- Yapılan tüm bu çalışmalar neticesinde, ilk kez çalışılmış olan kuraglutid'in lipotoksik şartlarda antiapoptotik, antiotofajik ve antinekrotik özelliklere sahip olduğunu söyleyebiliriz.
- Bu tez çalışmasında yapılan *in vitro* çalışmalara dayanılarak, gelecekte *in vivo* çalışmalar ile kuraglutid'in lipotoksik şartlarda gözlemlenen bu etkilerinin moleküler mekanizmasını aydınlatarak, preT2D ve T2D'de terapötik ajan olarak kullanılması, ayrıca meydana gelen bu üç farklı ölüm tipleri arasındaki ilişki incelenerek, ölüm tipleri arasındaki geçiş ve ortak yollarının bulunması hedeflenmektedir.

KAYNAKLAR

- Abe, H., 2013, Exendin-4 improves b-cell function in autophagy-deficient b-cells, *Endocrinology*, 154 (3), 4512–4524.
- Ahren, B., 2005, New strategy in type 2 diabetes tested in clinical trials. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) affects basic caused of the disease, *Lakartidningen*, 102(8), 545-549.
- Alexey, P., Northcott, P., Bikopoulos, G., Lee, A., Swaroop, R., Kushner, J.A., Farhang Fallah, J. and Rozakis-Adcock, M., 2007, Identification of a WD40 repeat containing isoform of PHIP as a novel regulator of beta-cell growth and survival, *Molecular and cellular biology*, 12 (3), 6484–6496.
- Alvarez, E., Roncero, I., Chowen, J.A., Thorens, B., Blazquez C., 1996, Expression of the glucagon-like peptide-1 receptor gene in rat brain, *Journal of neurochemical*, 66(3), 920-927.
- Amaravadi, R.K., and Thompson, C.B., 2007, The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment, *Clinical cancer research*, 13(24), 7271-7279.
- Anini, Y, Brubaker, P.L., 2003, Muscarinic receptors control glucagon-like peptide secretion by human endocrine L cells, *Endocrinology*; 144, 3244–3250.
- Aronoff, S.L., 2004, Glucose metabolism and regulation: beyond insulin and glucagon, *Diabetes spectrum*, 17, 183–189.
- Asfari, M., Janjic, D., Meda, P., 1992, Establishment of 2-mercaptoethanol dependent differentiated insulin- secreting cell lines, *Endocrinology*, 130, 167-178.
- Azevedo-Martins, A.K., Curi, R., 2008, Fatty acids decrease catalase activity in human leukaemia cell lines, *Cell biochemical function*, 26, 87-94.
- Baggio, L.L, Drucker D.J., 2004, Clinical endocrinology and metabolism. Glucagon-like peptide 1 and glucagon-like peptide-2, *Best practic research clinic endocrinology metabolism*, 18, 531–554.
- Boldin, M.P., Varfolomev, E., Pancer, Z., Mett, I.L., Camonis, J.H., Wallach, D., 1995, A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death, *Journal of biological chemistry*, 270 (13), 7795- 7798.
- Bradford, M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical biochemistry*, 72, 248-254.

- Bregenholt, S., Moldrup, A., Blume, N., Karlsen, A.E., Nissen Friedrichsen, B., Tornhave, D., Knudsen, L.B., Petersen, J.S., 2005, The long-acting glucagon like peptide-1 analogue, liraglutide, inhibits beta-cell apoptosis in vitro, *Biochemical and biophysical research communication*, 330(2), 577-584.
- Brubaker, P.L., 2006, The glucagon-like peptides: pleiotropic regulators of nutrient homeostasis, *Annals of the new york academy of sciences*, 1070, 10–26.
- Butler, A.E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R.A., Butler, P.C., 2003, Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes, *Diabetes*, 4 (8), 102-104.
- Chang-Chen, K.J., Mullur, R., Bernal-Mizrachi, E., 2008, Beta-cell failure as a complication of diabetes, *Endocrine and metabolic disorder*, 9, 329-343.
- Chen, Z.F., Li, Y.B., Han, J.Y., Yin, J.J., Wang, Y., Zhu, L.B., Xie, G.Y., 2013, Liraglutide prevents high glucose level induced insulinoma cells apoptosis by targeting autophagy, *Chinese medical journal*, 126(5), 937-41.
- Chinnaiyan, A.M., Ko'rouke, M., Tewari, V.M., Dixit, 1995, a Novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis, *Cell*, 81, 505–512.
- Choi, S.E., Jung, R., Lee, Y.L., Lee, S.J., Lee, J.H., Kim, Y., Jun, H.S., Lee, K.W., Park, C.B. and Kang, Y., 2011, Stimulation of lipogenesis as well as fatty acid oxidation protects against palmitate-induced INS-1 beta cell death., *Endocrinology*, 152(3), 816-827.
- Cnop, M., Hannaert J.C., Hoorens A., Eizirik D.L., and Pipeleers D.G., 2001, Inverse relationship between cytotoxicity of free fatty acids in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation, *Diabetes*, 50, 1771-1777.
- Cohen, A., Lerner-Yardeni, J., Meridor, D., Zamai, M., Valeria, R., Roni Kasher, C., Nathan, I., Abraham, H., 2015, The mechanism of inhibition of necrosis by humanin derivatives: A potential treatment for ischemia and related diseases, *Biophysical journal*, p154a.
- Cohen, J.J., 1993, Apoptosis, *Immunology Today*, 14(3), 126-130.
- Cummings, D.E., Overduin, J., Gastrointestinal regulation of food intake, *The journal of the clinical investigation*, 2007, 117, 13–23.
- Cunha, D.A., Ladrie're, L., Ortis, F., Igoillo-Esteve, M., Gurzov, E.N., Lupi, R., Marchetti, P., Eizirik, D.L. and Cnop, M., 2009, Glucagon-like peptide-1 agonists protect pancreatic β -cells from lipotoxic endoplasmic reticulum stress through upregulation of BiP and JunB, *Diabetes*, 58 (12), 2851–2862.
- Dalle, S., Burcelin, R., Gourdy, P., 2013, Specific actions of GLP-1 receptor agonists and DPP4 inhibitors for the treatment of pancreatic β -cell impairments in type 2 diabetes, *Cellular signalling*, 570–579.

- Danial, N.N., Grann, C.F., Scorrano, L., 2003, BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis, *Nature*, 424(6951), 952-956.
- Dardevet, D., Moore, M.C., Neal, D., Di Costanzo, C.A., Snead, W., Cherrington, A.D., 2004, Insulin-independent effects of GLP-1 on canine liver glucose metabolism: duration of infusion and involvement of hepatoportal region, *American journal of physiology endocrinology and metabolism*, 289(1), E75-E81.
- de Vries, J.E., Vork M.M., Roemen T.H.M., de Jong, Y.F., Cleutjens J.P.M., van der Vusse, G.J. and van Bilsen, M., 1997, Saturated but not mono-unsaturated fatty acids induce apoptotic cell death in neonatal rat ventricular myocytes, *The journal of lipid research*, 38:1384-1394.
- Deacon, C.F., Johnsen, A.H., Holst, J.J., 1995, Degradation of glucagon-like peptide-1 by human plasma in vitro yields an N-terminally truncated peptide that is a major endogenous metabolite in vivo, *The journal of clinical endocrinology and metabolism*, 80, 952-957.
- Del Prato, S., Tiengo, A., 2001, The importance of first-phase insulin secretion: implications for the therapy of type 2 diabetes mellitus, *Diabetes metabolism research and reviews*, 3 (1), 164-167.
- Ding, S.Y., Nkobena, A., Kraft, C.A., Markwardt, M.L., Rizzo, M.A., 2011, Glucagon like peptide 1 stimulates post-translational activation of glucokinase in pancreatic beta cells, *The journal of biological chemistry*, 286, 167-168.
- Dow, R.L., Kreutter, D.K., 1995, *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, Academic Press, In: Bailey, D. M. (ed.), chapter 30, New York, 159-168.
- Doyle, M.E., Egan, J.M., 2007, Mechanisms of action of glucagon-like peptide 1 in the pancreas, *Pharmacology & therapeutics*, 113, 541-546.
- Drucker, D.J., Asa S., 1988, Glucagon gene expression in vertebrate brain, *The journal of biological chemistry*, 263, 13475-13478.
- Drucker, D.J., Brubaker, P.L., 1989, Proglucagon gene expression is regulated by a cyclic AMP dependent pathway in rat intestine, *Proceedings of the national academy of sciences*, 86, 3953-3957.
- Drucker, D.J., Nauck, M.A., 2006, The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes, *Lancet*, 368, 1696-705.
- Dyrbukt, J.M., Ankarcróna, M., Burkitt, M., Sjöholm, A., Ström, K., Orrenius, S., Nicotera, P., 1994, Different prooxidant levels stimulate growth, trigger apoptosis or produce necrosis of insulin-secreting RINm5F cells. The role of polyamines, *The journal of biological chemistry*, 269, 30553-30560.

- Efrat, S., 2004, Regulation of insulin secretion: insights from engineered beta-cell lines, *Annals of the new york academy of sciences*, 1014, 88-96.
- Ellis, R.E., Yuan, J.Y., Horvitz, H.R., 1991, Mechanisms and functions of cell death, *Annual review of cell biology*, 7, 663-698.
- Eng, J., Kleinman, W.A., Singh, L., Singh, G., Raufman, J. P., 1992, Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analog, from Heloderma suspectum venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas, *The journal of biological chemistry*, 267(11), 7402-7405.
- Estall, J.L., Drucker, D.J., 2006, Glucagon-like peptide-2, *Annual review of nutrition*, 26, 391-411.
- Farilla, L., 2002, Glucagon-like peptide-1 promotes islet cell growth and inhibits apoptosis in Zucker diabetic rats, *Endocrinology*, 143 (11), 4397-4408.
- Ferraro, E., Cecconi, F., 2007, Autophagic and apoptotic response to stress signals in mammalian cells, *Archives of biochemistry and biophysics*, 462, 210-219.
- Fiers, W., Beyaert, R., Declerc, Q.W., Vandenabeele, P., 1999, More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage, *Oncogene*, 18, 7719-7730.
- Fotakis, G., Timbrell, A.J., 2006, In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride, *Toxicology letters*, 160, 171-177.
- Fujitani, Y., Kawamori, R., Watada, H., 2009, The role of autophagy in pancreatic β cell and diabetes, *Autophagy*, 5, 280-282.
- Gibson, S.B., 2010, A matter of balance between life and death: Targeting reactive oxygen species (ROS)-induced autophagy for cancer therapy, *Autophagy*, 6 (7), 835-837.
- Greig, N.H., Holloway, H.W., De Ore, K.A., Jani, D., Wang, Y., Zhou, J., Garant, M.J., Egan, J.M., 1999, Once daily injection of exendin-4 to diabetic mice achieves long-term beneficial effects on blood glucose concentrations, *Diabetologia*, 42(1), 45-50.
- Gross, A., McDonnell, J.M., Kormeyer, S.J., 1999, BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis, *Genes & Development*, 4 (12), 3-17.
- Ha, H.C., and Syender, S.H., 1999, Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion, *Proceedings of the national academy of sciences*, 9, 13978-13982.
- Han, Y.B., Wang, M.N., Li, Q., Guo, L., Yang, Y.M., Li, P.J., Wang, W., Zhang, J.C., 2012, MicroRNA-34a contributes to the protective effects of glucagon-like

- peptide-1 against lipotoxicity in INS-1 cells, *Chinese medical journal*, 125(23), 4202-4208.
- Hardy, S., Langelier, Y. and Prentki M., 2000, Oleate activates phosphatidylinositol 3 kinase and promotes proliferation and reduces apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells, whereas palmitate has opposite effects, *Cancer research*, 60, 6353-6358.
- Hayashi, H., Yamada, R., Das, S.S., Sato, T., Takahashi, A., Hiratsuka, M., Hirasawa, N., 2014, Glucagon-like peptide-1 production in the GLUTag cell line is impaired by free fatty acids via endoplasmic reticulum stress, *Metabolism clinical and experimental*, 63 (6), 800-811.
- Heit, J.J., Apelqvist, A.A., Gu, X., Winslow, M.M., Neilson, J.R., Crabtree, G.R., Kim, S.K., 2006, Calcineurin/NFAT signalling regulates pancreatic beta-cell growth and function, *Nature*, 443 (7), 443-445.
- Herrmann, C., Goke, R., Richter, G., Fehmann, H.C., Arnold, R., Goke, B., 1995, Glucagon-like peptide-1 and glucosedependent insulin-releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients, *Digestion*, 56, 117-26.
- Hickson-Bick, D.L., Buja, M.L. and McMillin, J.B., 2000, Palmitate-mediated alterations in the fatty acid metabolism of rat neonatal cardiac myocytes, *Journal of molecular and cellular cardiology*, 32, 511-519.
- Hjollund, K.R., Deacon, C.F., Holst, J.J., 2011, Dipeptidyl peptidase-4 inhibition increases portal concentrations of intact glucagon-like peptide-1 (GLP-1) to a greater extent than peripheral concentrations in anaesthetised pigs, *Diabetologia*, 54, 2206-2210.
- Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J.L., Sheinader, P., Seed, B., Tschopp, J., 2000, Fas triggers an alternative, caspase 8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule, *Nature immunology*, 1 (6), 489-495.
- Holst, J.J., 2004a, Treatment of Type 2 diabetes mellitus with agonist of the GLP-1 receptor or DPP-IV inhibitors, *Ekzpert opin emerg drugs*, 9(1), 155-166.
- Holst, J.J., Bersani, M., Johnsen, A.H, Kofod, H., Hartmann, B., Orskov, C., 1994, Proglucagon processing in porcine and human pancreas, *The journal of biological chemistry*, 269, 18827-18833.
- Holst, J.J., 2004b, Glucagon-like peptide 1 and inhibitors of dipeptidyl peptidase IV in the treatment of type 2 diabetes mellitus, *Current opinion in pharmacology*, 4, 589-586.
- Holz, G.G., Kuhlreiber, W.M., Habener, J.F., Glick, D., Barth, S., Macleo, K.F., 2010, Autophagy: cellular and molecular mechanisms, *Nature*, 463, 362-365.

- Holz, G.G., Willem, M. and Habener, J.F., 1993, Pancreatic beta-cells are rendered glucose-competent by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1(7-37), *Nature*, 13 (4), 362-365.
- Hui, H., 2003, Glucagon-like peptide-1 inhibits apoptosis of insulin-secreting cells via a cyclic 50-adenosine monophosphatedependent protein kinase A- and a phosphatidylinositol 3-kinasedependent pathway, *Endocrinology*, 144 (4), 1444-1455.
- Jacquier-Sarlin, M.R. and Polla, B.S., 1996, Dual regulation of heat-shock transcription factor (HSF) activation and DNA-binding activity by H₂O₂: role of thioredoxin, *Biochemical journal*, 318 (1), 187-193.
- James, D. L., Mark, N. F., and Surwit, R.S., 2008, Caffeine Increases Ambulatory Glucose and Postprandial Responses in Coffee Drinkers With Type 2 Diabetes, *Diabetes care*, 31 (2), 221-222.
- Janssen, P., Rotondo, A., Mulé, F. & Tack, J., 2013, Review article: a comparison of glucagon like peptides 1 and 2, *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 37, 18–36.
- Jhala, U.S., Canettieri, G., Screaton, R.A., Kulkarni, R.N., Krajewski, S., Reed, J., Lyssenko, J.V., Lupi, R., Marchetti, P., Del Guerra, S., Orho-Melander, M., Almgren, P., Walker, X. Lin, M. White, M. Montminy, 2003, Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma, *Genes & development*, 17, 1571-1575.
- Jiang, Y., Huang, W., Wang, J., Xu, Z., He, J., Lin, X., Zhou, Z., Zhang, J., 2014, Metformin plays a dual role in MIN6 pancreatic β cell function through AMPK dependent autophagy, *International journal of biological sciences*, 10 (3), 268-277.
- John, H., Maronde, E., Forssmann, W.G., Meyer, M., Adermann, K., 2008, N-terminal acetylation protects glucagon-like peptide GLP-1- (7-34)-amide from DPP-IV mediated degradation retaining cAMP and insulin-releasing capacity, *European journal of medical research*, 13 (2), 75-78.
- Jung, H.S., 2008, Loss of autophagy diminishes pancreatic b-cell mass and function with resultant hyperglycemia, *Cell metabolism*, 8 (4), 318–324.
- Kang, Z., 2012, *In Impaired Incretin Effects in Type 2 Diabetes: Mechanism and Therapeutic Implication*, Thesis (PhD), The Chinese University of Hong Kong.
- Karna, P., Zughair, S., Pannu, V., Simmons, R., Narayan, S. and Aneja, R., 2010, Induction of reactive oxygen species-mediated autophagy by a novel microtubule-modulating agent, *The journal of biological chemistry*, 285 (24), 18737–18748.
- Kayaalp, S.O., 2005, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 11. Baskı, Hacettepe Taş Kitapçılık Ltd. Şti., Ankara.

- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetic, *British journal of cancer*, 26, 239-257.
- Khan, S.E., 2003, The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes, *Diabetologia*, 46 (2), 3-19.
- Kim, M.J., Kang, J.H., Park, Y.G., Ryu, G.R., Ko, S.H., Jeong, I.K., Koh, K.H., Rhie, D.J., Loder, M.K., Silva Xavier, G., McDonald, A., Rutter, G.A., 2008, The role of incretins in glucose homeostasis and diabetes treatment, *biochemical society transactions* 36, 357.
- Klionsky, D.J. and Lane, J.D., 2010, Alternative macroautophagy, *Autophagy*, 6, 201-204.
- Komiya, K., Uchida, T., Ueno, T., Koike, M., Abe, H., Hirose, T., Kawamori, R., Uchiyama, R., Kominami, E., Fujitani, Y., Watada, H., 2010, Free fatty acids stimulate autophagy in pancreatic b-cells via JNK pathway, *Biochemical and biophysical research communications*, 401 (56), 561-567.
- Krammer, P.H., 2000, CD95's deadly mission in the immun system, *Nature*, 407(6805), 789-795.
- Kritikos, K., Soitou, K., Kapranou, R., Mavroidis, N., 2014, Uncontrolled diabetes resulting in diabetic cardiomyopathy in a young male patient and eventually presenting with a stroke, *Journal of family medicine and primary care*, 4 (3), 470-472.
- Kumar, V., Abbas, A.K, Fausto, N., 2005, *Cellular adaptations, cell injury, and cell death*, Pathologic Basis of Disease, In: Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., Robbins and Cotran (ed.), Chapter 7, Philadelphia: Elsevier Saunders, 3-46.
- Larsen, P.J., Hylleberg, B., Ng, K., Damsbo, P., 2001b, Glucagon-like peptide-1 infusion must be maintained for 24 h/day to obtain acceptable glycemia in type 2 diabetic patients who are poorly controlled on sulphonylurea treatment, *Diabetes care*, 24(8), 1416-1421.
- Larsen, P.J., Fledelius, C., Knudsen, L.B., Tang-Christensen, M., 2001a, Systemic administration of the long-acting GLP-1 derivative NN2211 induces lasting and reversible weight loss in both normal and obese rats, *Diabetes*, 50(11), 2530-2539.
- Lawrence, M.C., Bhatt, H.S., Easom, R.A., 2002, NFAT regulates insulin gene promoter activity in response to synergistic pathways induced by glucose and glucagon-like peptide-1, *Diabetes*, 51, 691-693.
- Lazebnik, Y.A., Cole, S., Cooke, C.A., Nelson, W.G., Earnshaw, W.C., 1993, Nuclear events of apoptosis in vitro in cell-free mitotic extracts: a model system for analysis of the active phase of apoptosis, *Journal of cell biology*, 123, 7-22.

- Lee, S.C., Shazib, A., Pervaiz, C., 2007, Apoptosis in the pathophysiology of diabetes mellitus, *The international journal of biochemistry & cell biology*, (39), 497-504.
- Lee, Y.S., Jun, H.S., 2014, Anti-diabetic actions of glucagon-like peptide-1 on pancreatic beta-cells, *Metabolism*, 63 (1), 9–19.
- Lennon, S.V., Martin, S.J., Cotter, T.G., 1991, Dose-dependent induction of apoptosis in human tumor cell lines by widely diverging stimuli, *Cell proliferation*, 24, 203-214.
- Li, Y., 2003, Glucagon-like peptide-1 receptor signaling modulates b cell apoptosis, *Journal biological chemistry*, 278 (1), 471–478.
- Lilly, M., Godwin, M., 2009, Treating prediabetes with metformin: systematic review and meta-analysis, *Canadian family physician*, 55 (4), 363-9.
- Lim, G.E., Brubaker P.L., 2006, Glucagon-like peptide 1 secretion by the L cell, *Diabetes*, 55(2), 70–77.
- Liu, Z., Habener, J.F., 2008, Glucagon-like peptide-1 activation of TCF7L2-dependent Wnt signaling enhances pancreatic beta cell proliferation, *The journal of biological chemistry*, 283, 8723-8725.
- Lobner, D., 2000, Comparison of the LDH and MTT Assay For Quantifying Cell Death: Validity For Neuronal Apoptosis?, *Journal neurosciences methods*, 96, 147.
- Loder, M.K., da Silva Xavier, G., McDonald, A., Rutter, G.A., 2008, TCF7L2 controls insulin gene expression and insulin secretion in mature pancreatic beta-cells, *Biochemical society transaction*, 36 (3), 357-359.
- Lugari, R., Dei Cas, A., Ugolotti, D., Finardi, L., Barilli, A.L., Ognibene, C., Luciani, A., Zandomenighi, R., Gnudi, A., 2002, Evidence for early impairment of glucagon-like peptide 1-induced insulin secretion in human type 2 (non insulin dependent) diabetes, *Hormone and metabolic research*, 34 (3), 150–4.
- Lyssenko, V., Lupi, R., Marchetti, P., Del Guerra, S., Orho-Melander, M., Almgren, P., Sjögren, M., Ling, C., Eriksson, K.F., Lethagen, A.L., Mancarella, R., Berglund, G., Tuomi, T., Nilsson, P., Del Prato, S., Groop, L., 2007, Mechanisms by which common variants in the TCF7L2 gene increase risk of type 2 diabetes, *The journal of clinic investigation*, 117 (8), 2155-2163.
- Lyssenko, V., Jonsson, A., Almgren, P., Pulizzi, N., Isomaa, B., Tuomi, T., Berglund, G., Altshuler, D., Nilsson, P., Groop, L., 2008, Clinical risk factors, DNA variants, and the development of type 2 diabetes, *The new england journal of medicine*, 359(21), 2220-2232.
- Maedler, K., Spinass, G.A., Dyntar, D., Moritz, W., Kaiser, N. and Donath, M.Y., 2001, Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on beta-cell turnover and function, *Diabetes*, 50,69-76.

- Marchetti, P., Bugliani, M., Lupi, R., 2007, The endoplasmic reticulum in pancreatic beta cells of type 2 diabetes patients, *Diabetologia*, 50 (3), 2486–2494.
- Marsden, V.S., Strasser, A., 2003, Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more, *Annual review of immunology*, 21, 71-105.
- Martin, D.A., Elkon, M.D., 2004, Mechanisms of apoptosis, *Rheumatic disease clinics of north america*, 30, 441-454.
- Martinet, W., De Meyer, G.R., Andries, L., Herman, A.G., Kockx, M.M., 2006, Detection of autophagy in tissue by standard immunohistochemistry possibilities and limitations, *Autophagy*, 2, 55-57.
- Martinez, S.C., Tanabe, K., Cras-Méneur, C., Abumrad, N.A., Bernal-Mizrachi, E., Permutt, M.A., 2008, Inhibition of Foxo1 protects pancreatic islet beta-cells against fatty acid and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis, *Diabetes*, 57(4), 846-859.
- Mcdonnell, T.J., Deane, N., Platt, F.M., 1989, Bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation, *Cell*, 57(1), 79-88.
- McGahon, A.J., Martin S.J., Bissonnette, R.P., Mahbaubi, A., Shi, Y., Mogil, R.J., Nishioka, W.K., Gren, D.R., 1995, The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro, In *“Methods in Cell Biology, Vol 46, Cell Death”*, LM Schwartz and BA Osborne (eds.), 150-181.
- Mentlein, R., 2005, Therapeutic assessment of glucagon-like peptide-1 agonists compared with dipeptidyl peptidase IV inhibitors as potential antidiabetic drugs, *Expert opin investing drugs*, 14(1), 57-64.
- Merchenthaler, I., Lane, M., Shughrue, P., 1999, Distribution of pre-pro-glucagon and glucagon-like peptide-1 receptor messenger RNAs in the rat central nervous system, *Journal of comparative neurology*, 403(2), 261-280.
- Meurer, J.A., Colca, J.R., Burton, P.S., Elhammer, A.P., 1999, Properties of native and in vitro glycosylated forms of the glucagon-like peptide-1 receptor antagonist exendin(9-39), *Metabolism*, 48(6), 716-724.
- Miao, X.Y., Gu, Z.H., Liu, P., Hu, Y., Li, L., Gong, Y.P., Shu, H., Liu, Y., Li, C.H., 2013, The human glucagon-like peptide-1 analogue liraglutide regulates pancreatic beta-cell proliferation and apoptosis via an AMPK/mTOR/P70S6K signaling pathway, *Peptides*, 39, 71-79.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M. and Klionsky, D.J., 2008, Autophagy fights disease through cellular self-digestion, *Nature*, 451, 1069-1075.
- Mohrabacher, R.J., Kiorpes, T.C., Bowden, C.R., 1987, Annual Reports in Medicinal Chemistry, In: Bailey, D.M. (ed), Academic Press, New York; Vol.22, pp.:213-222.

- Mu, Y.G., Yanase, T., Nishi, Y., Tanaka, A., Saito, M., Jin, C.H., Mukasa, C., Okabe, T., Nomura, M., Goto, M., and Nawata, H., 2013, Saturated FFAs, palmitic acid and stearic acid, induce apoptosis in human granulosa cells, *Endocrinology*, 1945-7170.
- Nielsen, L.L., Young, A.A., Parkes, D.G., 2004, Pharmacology of exenatide (synthetic exendin-4): a potential therapeutic for improved glycemic control of type 2 diabetes, *Regulatory peptides*, 117, 77–88.
- Ohsumi, Y., 2001, Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nature reviews*, 2, 211-216.
- Orskov, C., Holst, J.J, Knuhtsen, S., Baldissera., F.G., Poulsen, S.S., Nielsen, O.V., 1986, Glucagon-like peptides GLP-1 and GLP-2, predicted products of the glucagon gene, are secreted separately from pig small intestine but not pancreas, *Endocrinology*, 119, 1467–1475.
- Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., 2004, Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes, *Science*, 306 (2), 457–461.
- Paumen, M.B., Y. Ishida, M. Muramatsu, M. Yamamoto, and T. Honjo, 1997, Inhibition of carnitine palmitoyltransferase augments sphingolipid synthesis and palmitate-induced apoptosis, *The journal of biological chemistry*, 272, 3324-3329.
- Peng, G., Li, L., Liu, Y., 2011, Oleate blocks palmitate-induced abnormal lipid distribution, endoplasmic reticulum expansion and stress, and insulin resistance in skeletal muscle, *Endocrinology*, 152 (9), 2206–2218.
- Pfützner, A., Wilhelm, B., Forst, T., 2007, Rosiglitazone and glimeperide: review of clinical results supporting a fixed dose combination, *Journal of vascular health and risk management*, 3 (2), 211-220.
- Porter, A.G., and Janicke, R.U., 1999, Emerging roles of caspase-3 in apoptosis, *Cell death differentiation*, 6 (2), 99-104.
- Proskuryakov, S.Y., Konoplyanikov, A.G., Gabai, V.L., 2003, Necrosis: a specific form of programmed cell death?, *Experimental cell research*, 283, 1-16.
- Raz, I., Hanefeld, M., Xu, L., Caria, C., Williams-Herman, D., Khatami, H., 2006, Efficacy and safety of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin as monotherapy in patients with type 2 diabetes mellitus, *Diabetologia*, 49, 2564-2571.
- Reimann, F, Gribble, F.M, 2002, Glucosesensing in glucagon-like peptide-1- secreting cells, *Diabetes*, 51, 2757–2763.
- Rocca, A.S, Brubaker, P.L., 1999, Role of the vagus nerve in mediating proximal nutrient induced glucagon-like peptide-1 secretion, *Endocrinology*, 140, 1687-1694.

- Rosenstock, J., Baron, M.A., Dejager, S., Mills, D., Schwehizer, A., 2007, Comparison of vildagliptin and rosiglitazone monotherapy in patients with type 2 diabetes: a 24-week, double-blind, randomized trial, *Diabetes care*, 30, 217–223.
- Rouille, Y., Kantengwa, S., Irminger, J.C., Halban, P.A., 1997, Role of the prohormone convertase PC3 in the processing of proglucagon to glucagon-like peptide 1, *The journal of biological chemistry*, 272, 32810–32816.
- Sala, P.C., Torrinhas, R.S., Heymsfield, S.B., Waitzberg, D.L., 2011, Type 2 diabetes mellitus: a possible surgically reversible intestinal dysfunction, *Obesity surgery*, 7 (3), 185-189.
- Salling, H.K., Döhler, K.D., Engström, T., Treiman, M., 2012, Postconditioning with curaglutide, a novel GLP-1 analog, protects against heart ischemia-reperfusion injury in an isolated rat heart, *Regulatory peptides*, 178, 51-55.
- Sano, R., Reed, C., 2013, ER stress-induced cell death mechanisms, *Biochimica biophysica acta*, 1833 (4), 3460–3470.
- Saraste, A., Pulkki, K., 2000, Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis, *Cardiovascular research*, 45, 528-537.
- Scheen, A.J., Lefebvre, P.J., 1996, Insulin action in man, *Diabetes metabolism*, 22, 105-107.
- Scheen, A.J., 2007, Antidiabetic agents in subjects with mild dysglycaemia: prevention or early treatment of type 2 diabetes?, *Diabetes metabolism*, 33(1), 3-12.
- Shimabukuro, M., Wang, M.Y., Zhou, Y.T., Newgard, C.B. and Unger, R.H., 1998, Protection against lipoapoptosis of beta cells through leptin-dependent maintenance of Bcl-2 expression, *Proceedings of the national academy sciences USA*, 95, 9558-9561.
- Shintani, T. and Klionsky, D.J., 2004, Autophagy in health and disease: a double edged sword, *Science*, 306, 990-995.
- Shulman, G.I., 2000, Cellular mechanism of insulin resistance, *Journal of clinical investigation*, 6 (2), 171-176
- Sparagna, G.C., Hickson-Bick, D.L., Buja, L.M. and McMillin, J.B., 2000, A metabolic role for mitochondria in palmitate-induced cardiac myocyte apoptosis, *American Journal of physiology, heart and circulatory physiology*, 279, H2124-H2132.
- Stratton, I.M., Adler, A.I., Neil, H.A., Matthews, D.R., Manley, S.E., Cull, C.A., 2000, Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS35): prospective observational study, *British medical journal*, 321, 405-412.

- Stumvoll, M., Goldstein, B., Haeften, T.W., 2005, Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy, *Lancet*, 365 (9467), 1333-1346.
- Sun, H., Knippenberg, S., Thau, N., Ragancokova, D., Korner, S., Huang, D., Reinhard Dengler, R., Dohler, K., Petri, S., 2013, Therapeutic Potential of N-Acetyl Glucagon-Like Peptide-1 in Primary Motor Neuron Cultures Derived From Non Transgenic and SOD1-G93A ALS Mice, *Cell molecular neurobiology*, 33, 347-357.
- Thong, K.Y., Jose, B., Sukumar, N., 2011, Safety, efficacy and tolerability of exenatide in combination with insulin in the Association of British Clinical Diabetologists nationwide exenatide audit, *Diabetes obesity metabolism*, 13: 703-10.
- Tourrel, C., Bailbe, D., Meile, M.J., Kergoat, M., Portha, B., 2001, Glucagon-like peptide-1 and exendin-4 stimulate B-cell neogenesis in streptozotocin-treated newborn rats resulting in persistently improved glucose homeostasis at adult age, *Diabetes*, 50 (7), 1562-1570.
- Ugleholdt, R., Zhu, X., Deacon, C.F., Orskov, C., Steiner, D.F., Holst, J.J., 2004 Impaired intestinal proglucagon processing in mice lacking prohormone convertase 1, *Endocrinology*, 145, 1349-1355.
- Viltsboll, T., Krarup, T., Deacon, C.F., Madsbad, S., Holst, J.J., 2001, Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients, *Diabetes*, 50 (10), 609-613.
- Visboll, T., Agero, H., Kraup, T., Holst, J.J., 2003, Similar elimination rates of glucagon like peptide-1 in obese type 2 diabetic patients and healthy subjects, *Journal clinical endocrinology metabolism*, 88, 220-224.
- Wen, C.P., Cheng, T.Y., Tsai, S.P., Hsu, H.L., Wang, S.L., 2005, Increased mortality risks of pre-diabetes (impaired fasting glucose) in Taiwan, *Diabetes care*, 28(11), 2756-2761.
- Wideman, R.D., Yu, I.L., Webber, T.D., 2006, Improving function and survival of pancreatic islets by endogenous production of glucagon-like peptide 1 (GLP-1), *Proceedings of the national academy of sciences*, 103, 13468-13473.
- Wylie, A.H., Kerr, J.F.R., Currie, A.R., 1980, Cell death: the significance of apoptosis, *International review of cytology*, 68, 251-306.
- Xie, Z., Klionsky, D.J., 2007, Autophagosome formation: core machinery and adaptation. *Nature cell biology*, 9, 1102-1109.
- Xu, G., Stoffers, D.A., Habener, J.F., Bonner Weir, S., 1999, Exendin-4 stimulates both b-cell replication and neogenesis, resulting in increased b-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats, *Diabetes*, 48 (12), 2270-2276.

- Xu, Y., Huang, S., Liu, Z.G., Han, J., 2006, Poly(ADP-ribose) polymerase-1 signaling to mitochondria in necrotic cell death requires RIP1/TRAF2-mediated JNK1 activation, *Journal biochemistry chemical*, 281 (13), 8788-8795.
- Xu,G., Stoffers, D.A., Habener, J.F., Bonner-Weir S., 1999, Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats, *Diabetes*, 48(12), 2270-2276.
- Yamagishi, S., Okamoto, T., Amano, S., Inagaki, Y. , Koga, K., Koga, M., Choei, H. , Sasaki, N., Kikuchi, S., Takeuchi, M. and Makita, Z., 2002, Palmitate induced apoptosis of microvascular endothelial cells and pericytes. *Molecular medicine*, 8:179-184.
- Yang, H., Li, X, 2012, The role of fatty acid metabolism and lipotoxicity in pancreatic b-cell injury:Identification of potential therapeutic targets, *Acta pharmaceutica sinica b*, 2(4):396-402.
- Yang, Z. and Klionsky, D.J., 2010, Eaten alive: a history of macroautophagy, *Nature cell biology*, 12, 814-822.
- Yeh, W.C., Pompa, J.L., Mccurach, M.E., Shu, S.B., Elia, A.J., Shahinian ,A., Ng, M., Wakeham, A., Khoo, W., Mitchell, K., El Deiry, W.S., Lowe, S.W., Goeddel, D.V., Mak, T.W., 1998, FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis, *Science*, 279, 954-1958.
- Yorimitsu, T, Klionsky, D.J., 2005, Autophagy: molecular machinery for selfeating. *Cell death differantiation*, 12:1542–1552.
- Yusta, B., Baggio, L.L., Estall, J.L., Koehler, J.A., Holland, D.P., Li, H., 2006, Glp-1 receptor activation improves beta cell function and survival following induction of endoplasmic reticulum stress, *Cell metabolism*, 4 (5), 391–406.
- Zhang, W., Bieker, J.J., 1998, Acetylation and modulation of erythroid Kruppelike factor (EKLF) activity by interaction with histone acetyltransferases, *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 95, 9855–9862.
- Zong, W.X., Ditsworth, D., Bauer, D.E., Wang, Z.Q., Thompson, C.B., 2004, Alkylating DNA damage stimulates a regulated from of necrotic cell death, *Genes development*, 18 (11), 122-1282.

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Eda OYAR YILMAZ
Uyruğu	T.C.
Doğum tarihi, Yeri	1986, Altıntaş
Telefon	05065839041
E-mail	edaoyar@hotmail.com

Eğitim

Derece	Kurum/Anabilim Dalı/Programı	Yılı
Yüksek Lisans	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü/Biyoloji Anabilim Dalı /Zooloji Programı	2015
Lisans	Biyoloji Bölümü	2011
Ön Lisans	Selçuk Üniversitesi /Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu/Tıbbi Laboratuvar Bölümü	2007
Lise	Kütahya Sağlık Meslek Lisesi	2004

Makaleler / Bildiriler

Yılmaz Oyar E., Tunalı S., Demirci Bal T., Ulkuseven B., Yanardağ R., Bolkent S., 2013, The Curative Effect Of a Oxovanadium (IV) Complex Based On Thiosemicarbazone On Liver Damage Of Streptozotocin Induced Diabetic Rats, *Federation of european biochemical societies congress “ Mechanism in Biology”* St.Petersburg, RUSSIA.