

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BIYOLOJİ ANABİLİM DALI
BIYOLOJİ EĞİTİMİ

**6-{2-[(5-SİYANO-4,5-DİHİDROPIRAZOL-1-İL)-2-
OKZOETİLAMİNO] ETİLAMİNO} NİKOTİNONİTRİL
DİHİDROKLORİT HİDRAT BİLEŞİĞİNİN *İN VİTRO*
ANTİDİYABETİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BUKET AYAR

DENİZLİ, TEMMUZ - 2016

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BIYOLOJİ ANABİLİM DALI



6-{2-[(5-SİYANO-4,5-DİHİDROPIRAZOL-1-İL)-2-
OKZOETİLAMİNO] ETİLAMİNO} NİKOTİNONİTRİL
DİHİDROKLORİT HİDRAT BİLEŞİĞİNİN *İN VİTRO*
ANTİDİYABETİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BUKET AYAR

DENİZLİ, TEMMUZ - 2016

KABUL VE ONAY SAYFASI

BUKET AYAR tarafından hazırlanan “(6-{2-[(5-SİYANO-4,5-DİHİDROPİRİZOL-1-İL)-2-OKZOETİLAMİNO] ETİLAMİNO} NİKOTİNONİTRİL DİHİDROKLORİT HİDRAT BİLEŞİĞİNİN *IN VITRO* ANTI-DİYABETİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 15.07.2016 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Prof. Dr. Alaattin ŞEN

Üye
Doç. Dr. Tuğba TÜMER BOYUNEĞMEZ

Üye
Yrd. Doç. Dr. Aslı SEMİZ

Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 19.08.2016 tarih ve 31/26 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet Ali SARIGÖL

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

**Bu tez çalışması Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 2014FBE029 nolu proje ile desteklenmiştir.**

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.


BUKET AYAR

ÖZET

6-{2-[(5-SİYANO-4,5-DİHİDROPİRİZOL-1-İL)-2-OKZOETİLAMİNO] ETİLAMİNO} NİKOTİNONİTRİL DİHİDROKLORİT HİDRAT BİLEŞİĞİNİN İN VİTRO ANTİDİYABETİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BUKET AYAR

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. ALAATTİN ŞEN

DENİZLİ, TEMMUZ, 2016

Diabetes mellitus (DM) hasta sayısının gün geçtikçe arttığı yaygın metabolik bozukluklardan biridir. İnsülin dışında oral hipoglisemik ilaçlar hastalığın tedavisinde kullanılan önemli ajanlardır. Yine de hastalığın tam bir tedavisi için daha etkili bir antidiyabetik maddenin geliştirilmesi için arayışlar sürdürülmektedir. Bu amaçla laboratuvarımızda, ticari adı KR-62436 hidrat olan bileşiğin olası antidiyabetik özellikleri glikoz metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynayan bazı mekanizmalara ve ilgili bazı genlerin mRNA ifadesine etkisi ile araştırıldı. BTC6 hücre hattında gerçekleştirilen insülin salınım deneyinde KR-62436 bileşinin SODD ve SOYD uygulamaları ile kontrol ve glibenklamid (pozitif kontrol) ortamlarının absorban değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmaması ile bileşiğin insülin salınımını tetiklemediği sonucuna ulaşıldı. C2C12, Chang ve 3T3L1 hücre hatlarında glikoz kullanımı test edildi. Sonuçlar KR-62436 bileşiğinin antidiyabetik etkiye sahip olmadığı yönündeydi. Fakat glikoz metabolizması ve insülin yolağı birçok mekanizma tarafından kontrol edilmektedir. Kontrolü ve düzenlemeyi sağlayan diğer mekanizmalar veya enzimatik aktiviteler üzerine çalışırsak daha doğru sonuçlara ulaşılabilir.

ANAHTAR KELİMELELER: Diyabet, KR-62436, BTC6, C2C12, 3T3-L1, Chang.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE IN VITRO ANTI-DIABETIC EFFECTS OF 6-{2-[(5-CYANO-4,5- DIHYDROPIRAZOL-1-YL)-2-OXOETHYLAMINO] ETHYLAMINO} NICOTINONITRILE DIHYDROCHLORIDE HYDRATE

MSC THESIS

BUKET AYAR

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

SUPERVISOR: PROF. DR. ALATTIN SEN

DENIZLI, JULY, 2016

Diabetes mellitus (DM) is a common metabolic disorder that increasing the number of patients day by day. Although insulin, as well as oral hypoglycemic drugs are still the most important agents in treating the DM. Studies searching for a more effective antidiabetic agents are being carried out continuously. Based on that we aim to investigate the potential anti-diabetic effects of compound what is commercially known as KR-62436. We determined non-toxic doses by cytotoxicity assays and we used these doses to test some mechanisms involved glucose metabolism. We tested insulin secretion in BTC6 cell line. We can not determined a significant differences between the absorbance values of SODD-SOYD doses and control-possitive control (glibenclamide). It concluded that KR-62436 does not trigger the insulin secretion. Glucose utilization is tested in C2C12, 3T3L1 and Chang cell lines. The results show that KR-62436 compound has not anti-diabetic effect. But glucose homeostasis and insulin pathway are controlled by several mechanisms. Based on this reason, if we study other pathways or enzymatic activities, have access to accurate results.

KEY WORDS: Diabetes, KR-62436, BTC6, C2C12, 3T3-L1, Chang Liver.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ	vi
KISALTIMA LİSTESİ	vii
ÖNSÖZ.....	ix
1. TEZİN AMACI	1
2. GİRİŞ	2
2.1 Diabetes Mellitus	2
2.1.1 Tip I Diabetes Mellitus.....	2
2.1.2 Tip II Diyabetes Mellitus	3
2.1.3 Diğer Diyabet Tipleri	3
2.1.4 Diyabet Çalışmalarında Kullanılan Modeller	4
2.1.5 Diyabet Tedavisinde Kullanılan Ajanlar.....	5
2.2 6-{2-[(5-Siyano-4,5-dihidropirazol-1-il)-2-okzoetilamino]etilamino} nikotinonitril dihidroklorit hidrat (KR-62436) Bileşiği	6
2.3 İnsülin.....	7
2.3.1 İnsülinin Etki Mekanizmasına Genel Bir Bakış.....	9
2.4 İnsülin Yolağında Yer Alan Bazı Genler	11
3. GEREÇLER VE YÖNTEM.....	15
3.1 Gereçler	15
3.1.1 Sarf Malzemeleri	15
3.1.2 Cihazlar	16
3.2 Yöntemler.....	16
3.2.1 Hücre Hatlarının İdamesi	16
3.2.2 Sitotoksisite Testleri.....	17
3.2.3 Glikoz Kullanım Testi.....	18
3.2.4 İnsülin Salınım Testi	20
3.2.5 İnsülin Sinyal Yolağı Analizleri	22
3.2.6 İstatistiksel Analizler.....	27
4. BULGULAR	28
4.1 Sitotoksisite Testleri.....	28

4.1.1	Kristal Viyole Çözeltisi Testi.....	28
4.2	Glikoz Kullanım Testi.....	30
4.3	İnsülin Salınım Testi	31
4.4	İnsülin Sinyal Yolağı Gen İfade Analizleri.....	33
5.	SONUÇ ve TARTIŞMA	36
6.	KAYNAKLAR	45
7.	ÖZGEÇMİŞ.....	55



ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1: KR-62436 bileşiğinin yapısı	7
Şekil 2.2: Translasyon sonrası insülin modifikasyonu	8
Şekil 2.3: Kan glikozunun artışıyla tetiklenen insülin salgılanması	9
Şekil 2.4: İnsülinin genel etki mekanizması	10
Şekil 2.5: İnsülinin detaylı sinyal iletim yolları	14
Şekil 4.1: KR-62436 bileşiğinin artan konsantrasyonlarına göre BTC6 hücre hattındaki canlılığa etkisi	28
Şekil 4.2: KR-62436 bileşiğinin artan konsantrasyonlarına göre C2C12 hücre hattındaki canlılığa etkisi	29
Şekil 4.3: KR-62436 bileşiğinin artan konsantrasyonlarına göre 3T3L1 hücre hattındaki canlılığa etkisi	29
Şekil 4.4: KR-62436 bileşiğinin artan konsantrasyonlarına göre Chang hücre hattındaki canlılığa etkisi	30
Şekil 4.5: Glikoz standart eğrisi.....	31
Şekil 4.6: BTC6 hücre hattında Millipore İnsülin ELISA kiti ile elde edilen örnek plaka görüntüsü	32
Şekil 4.7: İnsülin standart eğrisi.....	32
Şekil 4.8: KR-62436 uygulamasında BTC6 hücre hattında IRS1 ve GLUT2 genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi	33
Şekil 4.9: KR-62436 uygulamasında C2C12 hücre hattında INSR, IRS1, IRS2, PI3K, GLUT4, AKR, PKM, G6P ve PEPCK genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi	34
Şekil 4.10: KR-62436 uygulamasında 3T3L1 hücre hattında INSR, IRS1, IRS2, PI3K, GLUT4, AKR, PKM ve G6P genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi	34
Şekil 4.11: KR-62436 uygulamasında Chang hücre hattında INSR, IRS1, IRS2, AKR, PKL ve G6P genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi	35

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 3.1: C2C12 hücre hattı için kuyucuklarda oluşturulan deney ortamı.....	19
Tablo 3.2: Chang karaciğer hücre hattı için kuyucuklarda oluşturulan deney ortamı	19
Tablo 3.3: BioVision glikoz tayin kiti bileşenleri	19
Tablo 3.4: Kuyucuklara eklenen reaksiyon ve kontrol karışımlarının içeriği.....	20
Tablo 3.5: İnsülin salınımı testi için kuyucuklarda oluşturulan deney ortamı	21
Tablo 3.6: Millipore İnsülin ELISA kit bileşenleri	21
Tablo 3.7: QIAGEN RNeasy Plus mini kit bileşenleri	23
Tablo 3.8: Bir tüp içerisinde bulunan PZR reaksiyon ortamı	25
Tablo 3.9: Çalışılan genler ve primer dizilerinin özellikleri	25
Tablo 4.1: KR-62436 bileşiğinin hücre hatlarında belirlenen sitotoksik olmayan konsantrasyonları	30
Tablo 4.2: C2C12 ve Chang hücrelerinin bulunduğu ortamlardaki başlangıç ve pozitif kontroller ve test bileşiğiyle inkübasyonu sonrası glikoz konsantrasyon farkı	31
Tablo 5.1: BTC6 hücrelerinde gen ifade düzeyinin değişimi	38
Tablo 5.2: C2C12 hücre hattında gen ifade düzeyinin değişimi	41
Tablo 5.3: Chang karaciğer hücre hattında gen ifade düzeyinin değişimi	41
Tablo 5.4: 3T3L1 hücre hattında gen ifade düzeyinin değişimi	42

KISALTMA LİSTESİ

3T3L1	Fibroblast Kökenli Preadiposit
ADA	Amerikan Diyabet Derneği
ADP	Adenozin İki Fosfat
ATP	Adenozin Üç Fosfat
BSA	Sığır Serum Albümin
BTC6	Pankreatik Beta Tümör Hücresi
C2C12	Kas Hücresi (Miyoblast)
CaCl₂	Kalsiyum Klorür
cDNA	Komplementer Deoksiribo Nükleik Asit
Chang	Karaciğer Hücresi (HeLa Kontaminant)
CO₂	Karbondioksit
DEX	Dekzametazon
dH₂O	Distile Su
DM	Diyabetes Mellitus
DMEM	Dulbecco Modifiye Eagle Medyum
DMSO	Dimetil Sülfoksit
dNTP	DiDeoksiribo Nükleik Asit
DPP-4	Dipeptidil peptidaz-4
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EtOH	Etil alkol
FSS	Fetal Sığır Serumumu
gDNA	Genomik Deoksiribo Nükleik Asit
GLP-1	Glukagon Benzeri Peptid-1
GLUT	Glikoz Taşıyıcı Protein
HEPES	2-[4-(2-Hidroksietil)-1-Piperazin]Etan Sülfonik Asit
IBMX	İzobütil Metilksantin
IGF	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
KCl	Potasyum Klorür
KRBH	Krebs-Ringer-Bikarbonat-HEPES Tamponu
MgSO₄	Magnezyum Sülfat
mM	Mili Molar
mU	Mili Ünite
mV	Mili Volt
ml	Mili Litre
µg	Mikro Gram
µl	Mikro Litre

μM	Mikro Molar
NaCl	Sodyum Klorür
NaHCO₃	Sodyum Bikarbonat
Ng	Nano Gram
Nm	Nano Metre
nmol	Nano Mol
SODD	Sitotoksik Olmayan Düşük Doz
SODD	Sitotoksik olmayan Yüksek Doz
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
T1DM	Tip I Diyabetes Mellitus
T2DM	Tip II Diyabetes Mellitus
TAE	Tris-Asetik Asit-EDTA
UV	Ultra Viyole (Mor Ötesi)
ve diğ.	ve diğerleri
Vb	ve benzeri
WHO (DSÖ)	Dünya Sağlık Örgütü

ÖNSÖZ

Dünya çapında yaygın olarak görülen diabetes mellitus metabolik bozukluk sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır. Hastalık tedavisinde insülin, sülfonilüreler ve biguanidler gibi ajanlar kullanılmaktadır. Bunlarla birlikte hastalığın tam bir tedavisi için daha etkili bir antidiyabetik maddenin geliştirilmesi için arayışlar durmaksızın devam etmektedir. Bu amaçla, daha önceki araştırmaların verdiği umutla KR-62436 (6-{2-[(5-Siyano-4,5-dihidropirazol-1-il)-2-okzoetilamino] etilamino}nikotinonitril dihidroklorit hidrat) bileşiğinin olası antidiyabetik etkileri *in vitro* ortamda araştırılmıştır. Çalışma süresince *in vitro* modellerde SODD ve SDYD belirleme çalışmaları yapılmış ve elde edilen veriler kullanılarak antidiyabetik etki tespiti için glikoz emilimi, depolanması ve taşınımı, insülin salınımı ve insülin sinyal yolağı ile ilgili analiz ve deneyler yapılmıştır.

Tüm bu süreç içinde bana çalışma imkânını sağlayan, engin bilgileriyle bilimsel bakış açımı genişletip zenginleştiren danışmanım Sayın Prof. Dr. Alaattin ŞEN'e; tezimin değerlendirilmesi ve düzenlenmesinde yardımcı olan Sayın Yard. Doç. Dr. Tuğba TÜMER BOYUNEĞMEZ ve Sayın Yard. Doç. Dr. Aslı SEMİZ' e; karşılaştığım her türlü zorlukta, aksilik ve talihsizlikte benden desteklerini, deneyimlerini ve bilgilerini esirgemeyen değerli ablalarım, arkadaşlarım Gurbet ÇELİK TURGUT'a, Özden ÖZGÜN ACAR'a; laboratuvar çalışmalarımnda manevi destekleri ve yardımları için Elif KALE'ye, Buket KABALAY'a ve Nazmiye BOZAĞAÇ'a; manevi desteği için değerli arkadaşlarım Asiye Büşra BOZ'a, Aslıhan Esra BİLDİRİCİ'ye, Yağmur ASAN KIZILIRMAK'a, Mustafa KAYA'ya, Gülistan BOYLU'ya; tezimi düzenlememde yardımcı olan arkadaşım Mustafa DEMİR'e, elbette bir de onlar olmasa olmazdım; BİRİCİK CANIM AİLEM'e şükranlarımı ve minnettarlığımı dile getirmeyi borç bilirim.

1. TEZİN AMACI

Tip II diyabet kalıtsal yatkınlığın da rol oynadığı ama daha çok çevresel faktörlere bağlı olarak ortaya çıkan diyabet türüdür. Gerek Dünya Sağlık Örgütü gerekse başka bilimadamlarının yaptığı araştırmalar tip II diyabetin görülme sıklığının her geçen gün hızla arttığını ortaya koymuştur. Değişen yaşam tarzı, fiziksel aktivite yetersizliği, stres, düzensiz beslenme vb tip II diyabetin ortaya çıkmasında rol oynayan başlıca etkenlerdendir. Diyabet vakalarının çok büyük bir kısmının tip II diyabet olması bu konuda yapılan çalışmaların önem kazanmasına yol açmıştır. Oral yoldan alınan birçok ilaç ve ajan, hastalığın tedavisi için yıllardan beri kullanılmaktadır. Fakat bu ilaçların yan etkileri ve etkilerinin yetersizliği gibi nedenler alternatif ilaç arayışını başlatmıştır. Bu arayışla geliştirilen KR-62436 bileşiğinin glikoz mekanizmasını, intestinal sistemde salgılanan Glukagon benzeri polipeptid-1 hormonunu enzimatik kesime uğratan Dipeptidil peptidaz-4 enziminin inhibisyonuyla etkilediği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Bu yüksek lisans tezi çalışmasında, KR-62436 bileşiğinin glikoz mekanizmasına olan etkisinin, 3T3L1 preadiposit, C2C12 miyoblast, BTC6 pankreas ve Chang karaciğer hücrelerinde glikoz kullanımı, insülin salınımı ve inslin sinyal yolağında önemli roldeki genlerin mRNA düzeylerindeki değişikliklerine bağlı olarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GİRİŞ

2.1 Diabetes Mellitus

Diyabet, insülin salgılanmasında, insülinin vücuttaki etkisinde veya her ikisinde birden meydana gelen bir bozukluktan kaynaklanan hiperglisemi ile karakterize bir metabolik hastalık türüdür (ADA, 2010). Diyabetin kontrol edilmediği durumlarda oluşan hiperglisemi veya yüksek kan şekeri, zamanla, özellikle sinirler ve kan damarları gibi vücudun birçok sistemlerinde ciddi hasarlara yol açar. Diyabet, dünya üzerindeki ülkelerin hepsinde artan grafik profili ile seyreden bir hastalıktır. Özellikle, Türkiye gibi, gelişmekte olan ülkelerde değişen yaşam şekline bağlı olarak gelişen halk sağlığını tehdit eden en büyük sorunlardan biri haline gelmektedir (Guariguata ve diğ. 2013; Satman ve diğ. 2013). Dünya çapında 347 milyon kişinin diyabet olduğu bildirilmektedir (Danie ve diğ. 2011; WHO, 2014). 2004 yılında, yaklaşık 3,4 milyon kişinin yüksek kan şekeri sebebiyle öldüğü bildirilmektedir (WHO, 2009). 2010 yılı için de benzer rakamlar tahmin edilmektedir. Yapılan yansıtım ve kestirim çalışmaları, diyabetin 2030 yılında dünyadaki ölümlerin 7. büyük nedeni olacağını öngörmektedir (Mathers ve Loncar, 2006).

2.1.1 Tip I Diabetes Mellitus

‘İnsüline bağımlı diyabet’, ‘juvenil diyabet’ veya ‘çocukluk çağında başlayan diyabet’ olarak da bilinir. Yaygın olarak çocukluk veya büyüme çağındaki bireylerde görüldüğü için bu şekilde adlandırılmıştır. Diyabetin bu tipinde, pankreasın beta hücrelerinde meydana gelen otoimmün veya idiyopatik kaynaklı bir yıkım sonucunda insülinin yeterli salgılanamaması söz konusudur. Diyabet vakalarının yaklaşık %5-10’u tip I diyabettir. Hastaların genetik açıdan yatkınlığının olması dışında, viral enfeksiyonlar gibi çevresel etkenler de hastalığın patolojik sürecini tetikleyebilir. Pankreasta oluşan enfeksiyona verilen immün cevap beta hücrelerinde yıkıma sebebiyet verebilir. İnsülin salgısı yeterli

olmayan tip I diyabet hastaları günlük düzenli olarak direkt insülin uygulaması yapmak zorundadırlar (ADA, 2010; Bikhazi ve diğ. 2011; Babu ve diğ. 2013).

2.1.2 Tip II Diyabetes Mellitus

‘İnsüline bağımlı olmayan diyabet’ veya ‘erişkin diyabet’ olarak da bilinir. Dünyadaki diyabet vakalarının yaklaşık %90’ı tip II diyabettir. Aslında insülin salgılayan hücrelerde bir bozukluk yoktur; fakat genetik olarak hastalığa yatkın kişilerin yaşam ve beslenme tarzlarından kaynaklanan insülin direnci, zamanla azalan insülin salgılanması, beta hücrelerinin apoptozu ve artan hepatik glikoz üretimi söz konusudur. Tip II diyabet hastalarının obez veya bel bölgesinde yağlanma olması düşündürücüdür. Yaş, obezite ve fiziksel aktivitenin yapılmaması diyabet riskini arttıran başlıca etmenlerdir (ADA, 2010, Babu ve diğ. 2013).

2.1.3 Diğer Diyabet Tipleri

Beta hücrelerindeki veya insülin yapısındaki genetik bozukluklar, pankreası etkileyen farklı hastalıklar (pankreas iltihabı, kanser, kistik fibroz), kullanılan ilaçlar veya kimyasallar, endokronolojik başka bozukluklar, enfeksiyonlar, diğer genetik sendromlar, farklı otoimmün hastalıklar (Stiff-man sendromu, Down sendromu) gibi faktörler ve süreçler de diyabeti tetikleyebilir. Bunlarla birlikte tip II diyabete benzeyen ve gebelikte ortaya çıkan gestasyonel diyabet de vardır. Genelde doğumdan sonra düzelir ama sonraki gebeliklerde de tekrarlayabilir (ADA, 2010).

Mitokondriyel oksidatif metabolizma ve ATP üretimi, yağ asidi oksidasyonu, proinflamatuvar sinyal oluşumu ve beta hücrelerinin gelişim ve metabolizmasındaki bir değişim insülin salınımını azaltabilir. Bu durum insülin sinyal oluşumunu bozacağından insülin direncine sebep olabilir (Zelezniak ve diğ. 2010).

2.1.4 Diyabet Çalışmalarında Kullanılan Modeller

In vivo antidiyabetik etkinlik çalışmaları için normoglisemik ya da hiperglisemik hayvan modelleri ve zaman zaman da insanlar kullanılmaktadır. *In vivo* deneyler, yeni hipoglisemik ajanların etkinliğini kanıtlamak için mutlaka gerekli ve önemli olmakla birlikte; hayvan testleri, bileşiklerin spesifik etki mekanizmalarını ortaya çıkarmakta nispeten daha az etkilidir. Çünkü kan glikoz seviyesini düşürebilen pek çok mekanizma vardır ve bunları hayvan modellerinde kontrol etmek daha zordur. Bunu yanı sıra, T2DM hayvanları temin etme, model oluşturma ve bakımı ile ilgili mali kısıtlamalar ile deney hayvanlarının kullanımındaki sosyal ve etik kısıtlamalar birleştiğinde potansiyel antidiyabetik ajanların taranması için bir dizi *in vitro* modeller daha pratik bir yaklaşım olarak ortaya çıkmaktadır. Bu modeller, ayrıca, deney hayvanlarının gereksiz yere kullanımlarını engellyerek olası etik sorunların aşılmasında da önemli olmaktadır. *In vitro* modellerde etkinliği kanıtlanan bileşiklerin daha sonra *in vivo* sistemlerde test edilmesi daha doğru bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir. Bu amaçla, potansiyel antidiyabetik ajanların etkinliklerini ve mekanizmalarını araştırmak için bir dizi *in vitro* modeller geliştirilmiştir (Patel ve Mishra, 2008; Skelin ve diğ. 2010).

In vitro tarama teknikleri, özel hücre hatlarında bileşiklerin/moleküllerin farmokinetik etkilerinin çalışılması için olanak sunar (Van de Venter ve diğ. 2008). Kas kökenli C2C12 miyosit hücreleri ile fibroblast kökenli 3T3L1 adiposit hücrelerinin insüline duyarlı olarak GLUT4 translokasyonu artışı ile kültür ortamından glikoz alımı yaptıkları gösterilmiştir (Brunetti ve diğ. 1989; Nedachi ve Kanzaki, 2006). Bu hücre hatları, memelilerde periferik insülin etkili glikoz homeostazında rol oynayan ve glikoz kullanımına katılan temel dokulara benzerlik göstermektedir. 3T3L1 adipositler, aynı zamanda yaygın olarak 30 yıldan fazla metabolik hastalık araştırmalarında kullanılmaktadır. Bu hücreler, diyabet ve metabolik bozukluklar ile ilişkili temel hücresel mekanizmalarının anlaşılmasında ve ilerleme sağlanmasında çok önemli rol oynamışlardır (ZenBio A.Ş. 2010). Kas hücrelerinin aksine karaciğer hücreleri (Chang vb.) insüline duyarlı olmayan glikoz taşıyıcıları içerirler ve insülin bağımlı glikoz alımı için daha az duyarlıdır. Chang karaciğer hücreleri, insülin reseptörü ifade eden insan

normal epitel hücresinden türetilmiştir ve insüline duyarlı olduğu gösterilmiştir (Rengarajan ve diğ. 2007; Parthasarathy ve diğ. 2009). Bir diğer model ise BTC6 (Beta Tümör Hücre) hattıdır. Bu hücreler pankreatik beta hücrelerinde SV40 (bölge sıçan insülin II geni promotörü tarafından kontrol edilir) ifade eden transgenik farelerden elde edilmiştir. Gelişen tümörler çıkarılır ve hücre hattı oluşturmak için kültüre edilir. Pankreatik B-hücresi metabolizmasındaki bozukluk ve işlevin giderek kaybolması T2DM ile doğrudan ilişkilidir (Fröde ve Medeiros, 2008). Bu hücreler hem proinsülin I ve hem de proinsülin II sentezlerler, glikozun fizyolojik konsantrasyonlarına yanıt oluştururlar ve proliferatif özelliklerini korurlar.

2.1.5 Diyabet Tedavisinde Kullanılan Ajanlar

Tip I diyabetli hastaların kan glikoz düzeylerinin düzenlenmesi için direkt insülin ihtiyaç duymalarına karşılık; tip II diyabetliler oral yoldan alacakları antidiyabetik ilaçlar sayesinde glikoz homeostazını sağlayabilmektedirler. Kimisi insülin üretimini arttıran, kimisi glikoz üretimini azaltan ve kimisi de insülin direncini azaltarak iş gören bu ilaçlar; sülfonilüre türevleri, non-sülfonilüre sekretogları, biguanidler, tiazolidinedionlar ve alfa-glikosidaz inhibitörleri olmak üzere gruplandırılabilir. Bu ajanların glikoz homeostazını düzenlerken sahip oldukları avantajların yanında elbette dezavantajları da vardır. Bu ajanları içeren ilaçlar tek kullanılabildiği gibi çoklu kombinasyonlar şeklinde de kullanılmaktadır. Tüm bunlar içerisinde tip II diyabette hastanın böbrek yetmezliği veya yan etkileri tolere edemeyecek bir bünyesi yoksa bir biguanidin olan ve glikofaj olarak da adlandırılan metformin tedavide ilk kullanılan ilaçtır. Hepatik glikoz üretimini ve glikozun bağırsakta emilimini azaltır ve böylece periferik glikoz alınımını ve kullanımının artırılmasıyla insülin duyarlılığını artırır (Brunetti ve Kalabalık, 2012; Hazman, 2011).

Birçok alternatif tedavi varmış gibi görünse de diyabeti tamamen tedavi etmek mümkün değildir. Hastalıktan veya tedavide kullanılan ilaçlardan kaynaklı ortaya çıkan diğer fizyolojik veya metabolik bozukluklar bilim adamlarını yeni ilaçlar geliştirme çabasına düşürmüştür. Neticede yeni nesil antidiyabetik ilaçlar

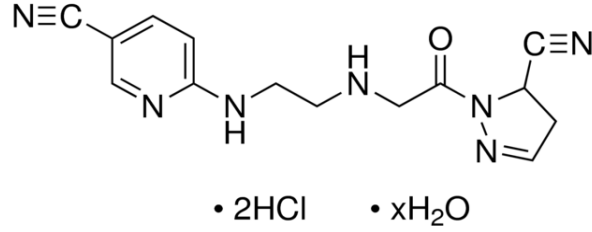
geliştirilmiştir. Bunlar; inkretin hormonlarının analogları (GLP-1 agonistleri), inkretinleri yıkıma uğratan dipeptidil peptidaz 4 enziminin inhibisyonu (DPP-4 inhibitörleri), böbrek sodyum-glukoz co-transporter 2 enzimini selektif olarak inhibe eden dapagliflozin (DGZ), endojen amylin molekülünün agonisti (pramlintide) gibi değişik mekanizmalar ile diyabette glisemik regülasyonu düzelten ilaçlardır (Hazman, 2011).

2.2 6-{2-[(5-Siyano-4,5-dihidropirazol-1-il)-2-okzoetilamino] etilamino} nikotinonitril dihidroklorit hidrat (KR-62436) Bileşiği

Diyabet hastalarında, insülin salgılanması veya etkinliği ile ilgili kusurdan dolayı kan şekeri düzeyinin düzenlenmesi tam olarak gerçekleştirilemez. Bu sebeple hastalarda kan şekerinin düzenlenmesi ağız yoluyla veya kasa enjeksiyon yöntemiyle alınan ilaçlarla sağlanmaktadır. Bu ilaç çeşitleri gün geçtikçe çeşitlenmekte ve insülinin veya benzer görevli moleküllerin rol oynadığı diğer mekanizmaları da hesaba katarak yeni oral ilaçlar geliştirilmektedir. Bu konuda bizim de çalışmamızda yer verdiğimiz dipeptidilpeptidaz-4 (DPP-4) inhibitörleri öne çıkan antidiyabetik ajanlardır.

Normal koşullarda glikoz alınımını takip eden süreçte, pankreasın beta hücrelerinde daha önceden salgılanıp depolanan insülin devreye girer. Ardından yeni salgılanan insülin kullanılır. Ağız yoluyla alınan glikozun arttırdığı kan şekere karşı insülin üretiminin artması inkretin olarak adlandırılır. Inkretin hormonlarından glukagon benzeri peptid 1 (GLP-1) ve gastrik inhibitör polipeptid (GIP) öğün sonrası insülin salgılanmasını artırır ve buna karşılık glukagon salgılanmasını inhibe eder ve glikoz homeostazını dengede tutar. Sağlıklı bireylerde bu şekilde işleyen süreç, hastalarda aksine bir şekilde gerçekleşir. T2DM hastalarında glikoz alınımını sonrası insülin salınımı azalmakta ya da gecikmeli olarak gerçekleşmekte, bununla beraber, glukagon salgılanması artmaktadır. Bunun sebebi, bir serin proteaz olan, DPP-4 enzimi ile yıkılan inkretin hormonların insülin benzeri etkilerinin T2DM hastalarında azalmasıdır. İşte bu noktada DPP-4 inhibitörleri kullanılarak ince bağırsak salgısı olan GLP-1 ve GIP inkretin hormonlarının seviyesi arttıp kan glikozunun dengelenmesi

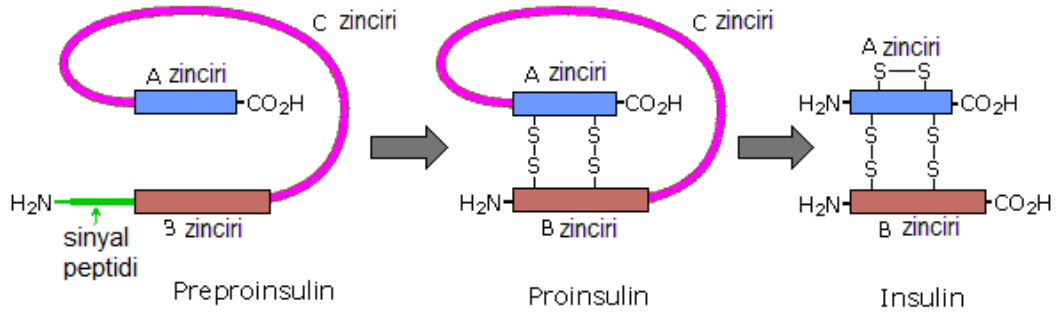
sağlanmaktadır (Ulusoy, N.B. ve diğ., 2000; Erkekoğlu, P. ve diğ., 2011; Hazman, Ö., 2011). Elde edilen bu veriler DPP-4 enziminin aktivitesini inhibe edici ajanlar üzerinde çalışmaları artırmıştır. KR-62436 bileşiği de çalışılan DPP-4 inhibitörlerindendir. Yapılan alışmalarda KR-62436 bileşiğinin plazmadaki DPP-4 enzimini inhibe ettiği *in vivo* ve *in vitro* modellerde gösterilmiştir (Kim ve diğ., 2005).



şekil 2.1: KR-62436 bileşiğinin yapısı (K4264 Sigma-Aldrich).

2.3 İnsülin

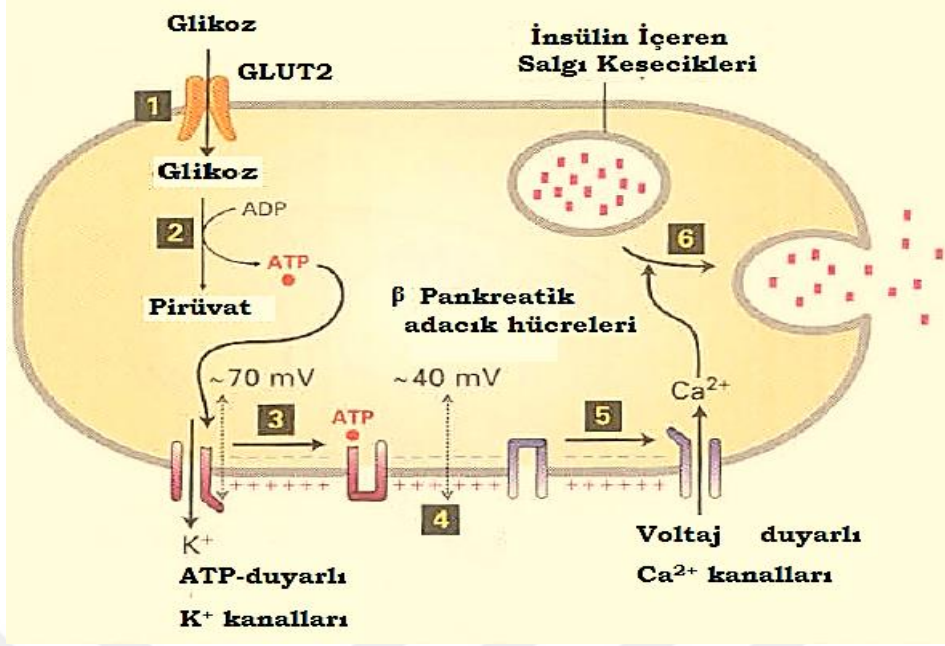
Amino asit rezidüsü 3-200 kadar olan hormonlar peptid hormonlar olarak adlandırılır. Bu hormonlar, ribozomlar üzerinde salgı granülleri içinde paketlenen daha uzun öncül proteinler şeklinde sentezlenir ve aktif peptidleri oluşturmak üzere proteolitik olarak kısaltılır. Pankreatik bir hormon olan insülin de iki disülfid bağı ile birleşen A ve B polipeptid zincirlerinden oluşan küçük bir peptid hormondur. Pankreasta, inaktif tek zincirli preproinsülin şeklinde sentezlenir. Preproinsülinin amino ucunda bulunan sinyal dizisi molekülün salgı veziküllerine geçişini yönlendirir. Sinyal dizisinin proteolitik olarak uzaklaştırılması ve üç disülfid bağının oluşumuyla proinsülin meydana gelir Snustad (1997) (şekil 2.2) ve pankreatik hücrelerdeki salgı granüllerinde depolanır. Artmış kan glikozu insülin salgılanmasını tetiklediği zaman, proinsülin özgül proteazlarla aktif insüline dönüştürölür (Lehninger, syf. 890).



Şekil 2.2: Translasyon sonrası insülin modifikasyonu (Snustad ve diğ.1997).

İnsülin, pankreasın başka bir adacık hücresinde üretilen glukagon peptid hormonuyla birlikte kandaki glikoz seviyesini düzenler. İnsülin kan şekerini düşürürken, glukagon ise tam tersi etki yapar. Normalde kandaki glikoz seviyesi yaklaşık 5 mM olmasına rağmen beslenmeye bağlı olarak bu seviye artmakta ve pankreatik beta hücreleri kana insülin salgılayarak bu yükselişe cevap vermektedir. İnsülinin başlıca hedefleri iskelet kası, karaciğer ve adipozit dokudur. Başta bu dokular olmak üzere hücre yüzeyinde bulunan insülin reseptörlerine bağlanır ve hücre içi sinyal iletimi için ilk adım atılmış olur (Gonzalez-Franquesa ve diğ., 2012).

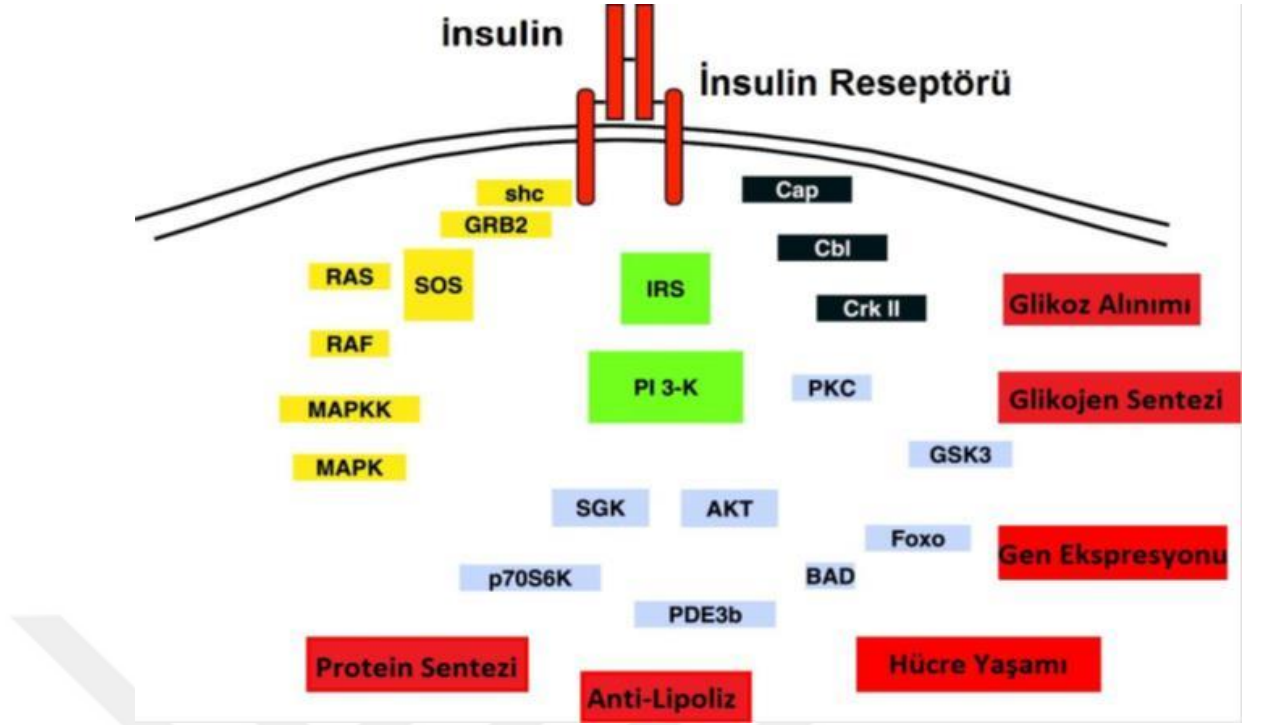
Pankreatik beta hücrelerine glikoz girişi GLUT2 glikoz taşıyıcısı tarafından yürütülür. Glikozun hücre dışındaki artışı bu proteinde konformasyonel değişiklik meydana getirir ve glikozun hücre içine alınması hızlanır. Bu durum glikozun pirüvata dönüşmesini hızlandırır ve sonuçta sitozoldeki ATP miktarında da artış olur. Artan ATP miktarı ATP-duyarlı K^+ kanalına bağlanır ve kanallar kapanır. Böylece hücre dışına K^+ akışı azalır. Bu durum hücre zarında depolarizasyon oluşturur ve bu da voltaj-duyarlı Ca^{2+} kanallarının açılmasına yol açar. Sitozolik Ca^{2+} iyonlarında artış meydana gelir ve bu da insülin-içeren salgı keseciklerinin plazma zarıyla birleşip insülin salgılanmasını tetikler (Lodish, syf. 765) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: Kan glikozunun artışıyla tetiklenen insülin salgılanması

2.3.1 İnsülinin Etki Mekanizmasına Genel Bir Bakış

İnsülin, büyüme faktörü reseptör tirozin kinazların bir alt familyasına ait bir hücre yüzey reseptörüne bağlanarak etki eder. Bu alt aile üç üyeden oluşur: İnsülin reseptör (INSR), tip 1 insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) reseptörü (IGF1R) ve INSR ilişkili reseptör (IRR). Reseptörün ekstraselüler domainine insülinin bağlanması sırasında reseptör otofosforilasyonu ve hücre içi protein substratların (IRS) tirozin fosforilasyonu ile sonuçlanan bir dizi yapısal değişikliği ortaya çıkmaktadır (Ullrich ve diğ., 1985; Bornfeldt ve Tabas, 2011; Gallagher ve LeRoith, 2011; Bayley ve Devilee, 2012).



Şekil 2.4: İnsülinin genel etki mekanizması (Nandi vd. 2004'ten revize edilmiştir).

İnsülin çok çeşitli ve değişik yolları aktive/inaktive etmektedir. Bunlar arasında, Akt/PKB (protein kinaz B) ve PKC ζ kaskadlar aracılı fosfatidilinositol 3-kinaz yolağı (PI3K) insülinin işlevinde çok önemli bir rolü vardır (Nakae ve diğ. 2001; Cheng ve diğ. 2010). Aktif Akt, GSK-3 (glikojen sentaz kinaz 3) inhibisyonu ile glikojen sentezini indükler. mTOR ve alt elemanları yoluyla protein sentezini baskılar ve çeşitli pro-apoptotik ajanlar (Bad, Forkhead ailesi transkripsiyon faktörleri, GSK-3) aracılığıyla da hücre yaşamını düzenler. İnsülin kas ve adipositlerde, plazma zarına GLUT4 veziküllerin translokasyonunu sağlayarak glikoz alınımasını teşvik eder. GLUT4 translokasyonu da PI3K/Akt yolu aracılığıyla oluşur (Rowland ve diğ. 2011). İnsülinin aynı zamanda çoğunlukla hem Akt kaskadı ve hem de Ras/MAPK yolağının aktivasyonu ile aracılık ettiği büyüme ve mitojenik etkileri vardır (Siddle, 2011). Buna ek olarak, insülin CREB/CBP/Torc2 bağlanmasını ketleyici etkisiyle karaciğerde glukoneogenezi inhibe eder (Fritsche ve diğ. 2008). İlave olarak, insülin sinyali CREBP-1C, USF1 ve LXR aktivasyonu ile yağasidi sentezini teşvik eder (Wong ve Sul, 2010; Altarejos ve Montminy, 2011). Bu veriler ışığında; T2DM ilişkili yüksek kan şekeri, bozulmuş glikoz toleransı ve insülin direnci gibi glikoz metabolizması

bozukluklarının tedavisinde klinik kullanımı da olabilecek yeni yapıların gelişimine yol açabilecek, insülinin etkisini taklit eden maddelerin tanımlanmasını kapsayan çalışmalar yıllardır sürdürülmekte ve halen devam etmektedir (Oshima ve diğ. 1987; Larner ve diğ. 1997; Pushparaj ve diğ. 2001; Chang ve diğ. 2007; Trapp ve diğ. 2010; Zhou ve diğ. 2012; Kumar ve diğ. 2013; Getel ve diğ. 2014; Ramadhan ve Phuwaspraisirian, 2015).

2.4 İnsülin Yolağında Yer Alan Bazı Genler

Potansiyel ajanların hipoglisemik etkinliği yukarıda tanımlanan *in vitro* sistemlerde genellikle üç ana başlık altında araştırılmaktadır: İnsülin salınımı, glikoz alınımı ve insülin yolağındaki enzimler üzerine etkileri. Hiper- ya da hipoglisemik koşullarda insülin salgılanması ve glikozun hücrelere alımı, glikoz metabolizmasını incelemek için araştırılan önemli biyolojik süreçlerdir. Glikoz alımı dokulara bağlı olarak farklılık gösterir. Glikoz alınımı ya kolaylaştırılmış difüzyon yolu (GLUT- glikoz taşıyıcılar) ile ya da ikincil aktif taşıma (SGLT- aktif taşıyıcılar) ile gerçekleştirilir (Medina ve Oven, 2002; Leney ve Tavare, 2009; Bogan, 2012). İnsanlarda 14 GLUT proteini ifade edilmektedir ve glikoz da dahil olmak üzere fruktoz, miyoinositol ve ürat gibi başka molekülleri de taşımaktadırlar. GLUT ifadesi hücre tipine özeldir ve hormonal ve çevresel faktörlerle kontrol edilir (Medina ve Oven, 2002). Diyabet çalışmalarında en yaygın GLUT1-5 araştırılmaktadır (Thorens ve Mueckler, 2010; Ernest ve diğ. 2011). GLUT1 her yerde bulunan birçok memeli dokusunda ifade edilen yüksek afiniteli bir glikoz taşıyıcısıdır. Kan-beyin bariyeri, eritrosit ve nöral hücre zarı boyunca glikoz taşınmasını sağlar. GLUT2 yetişkin karaciğer, böbrek, bağırsak epiteli ve pankreas beta hücrelerinde düşük afiniteli glikoz taşıyıcısıdır (Gorovits ve Charron, 2003). Karaciğerde olduğu gibi, heksokinaz glikozun glikolitik yolağa girişini düzenler ve GLUT2 ile birlikte beta hücrelerinde glikoz alınımında çok önemli bir rol oynar (Medina ve Oven, 2002). GLUT3 beyin nöral hücrelerinde bulunur ve bu hücrelere sürekli glikoz alınımını sağlar. Bu taşıyıcı glikozun insülin aracılı alınımında ve enerji sağlayan bir bileşik haline dönüştürülmesinde rol oynar (Katzung, 1995; Lienhard ve diğ. 1992). Kalp, iskelet kası ve yağ dokusu gibi özellikle insüline duyarlı olan dokularda ifade

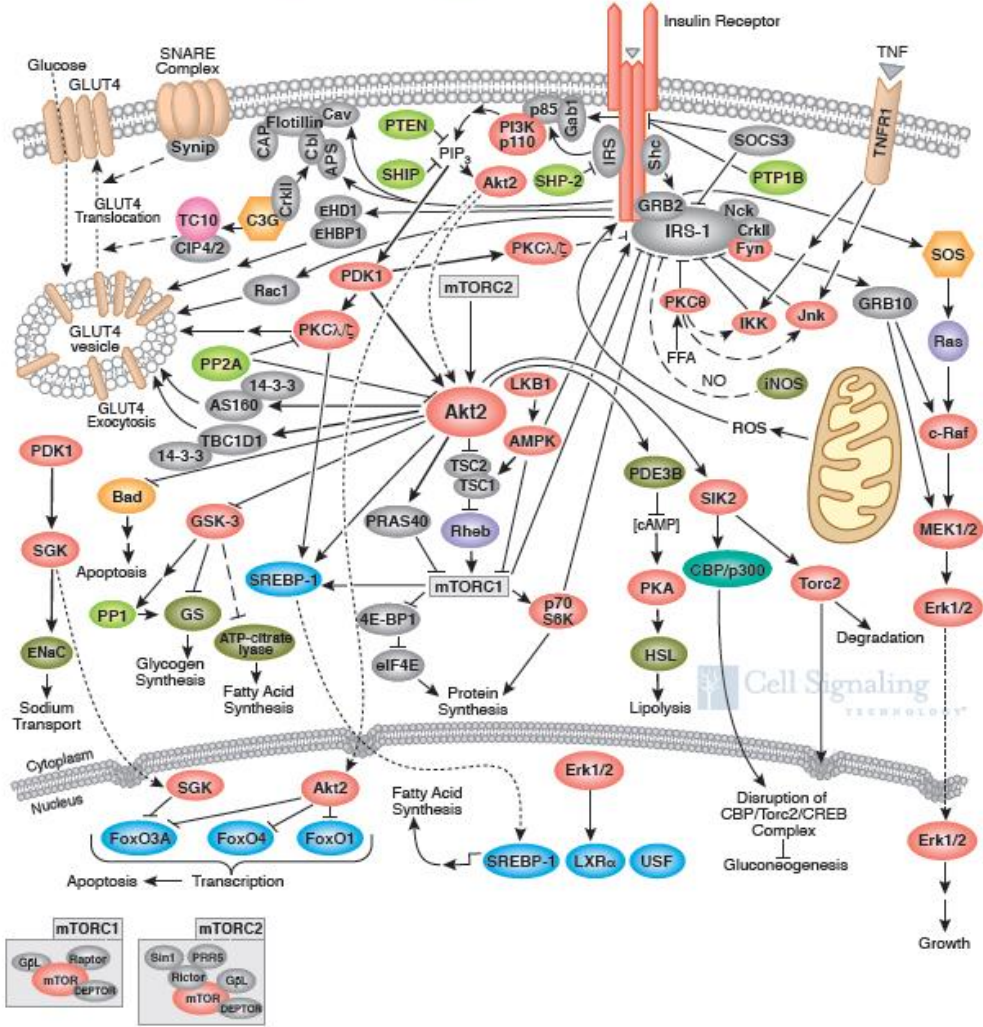
edilen GLUT4 yüksek afiniteli bir glikoz taşıyıcısıdır. GLUT4 şimdiye kadar karakterize edilmiş olan tek insülin duyarlı taşıyıcı olması nedeniyle benzersizdir. Fruktoz emiliminde rol oynayan GLUT5 ince bağırsak ve böbrekte ifade edilir (Katzung, 1995; Lienhard ve diğ. 1992). Şekerler, anyonlar, vitaminler ve kısa zincirli yağ asitleri için ko-taşıyıcılar olan insan SGLT (SLC5) gen ailesinin 12 üyesi vardır. Sodyum-bağımlı glikoz taşıyıcıları ince bağırsak mukozasında (enterositler SGLT1) ve nefron proksimal tübülde (SGLT2) bulunan glikoz taşıyıcı ailesidir.

İnsülin reseptörü, insülin etkisinin membran üzerinden iletilmesinde çok önemli rol oynayan bir membran glikoproteindir. Bu nedenle, çeşitli diyabetik sendromlarda bu proteinin işlevsel ve ekspresyonel araştırılması anlamlı bir yaklaşımdır (Sechi ve diğ. 1992; George ve diğ. 2012). İnsülin reseptörü, alfa alt biriminin COOH terminalinde 12 aminoasitten oluşan bir dizinin (Ex11) alternatif birleştirme neticesinde varlığı ya da yokluğuna göre farklı iki izoform halinde bulunmaktadır. Bu iki izoformun T2DM durumunda ekspresyon düzeylerinde farklılıklar olduğu bildirilmiştir (Sesti ve diğ. 2001). İnsülin reseptör substratı-1 (IRS1) insülin sinyal yollarında önemli bir unsurdur ve IRS1 genindeki mutasyonların tip 2 diyabet ile ilişkili özelliklerin belirlenmesinde rol aldığı bildirilmiştir (Laakso ve diğ. 1994; Almind ve diğ. 1996; Caruso ve diğ. 2014). IRS proteinleri katalitik etkinliğe sahip olmayan, ancak birden fazla etkileşim domainleri ve fosforilasyon motiflerinden oluşur. İnsanda en az dört IRS proteini ifade edilir. IRS1 ve IRS2 yaygın olarak ifade edilen izoformlardır (Morris 2001). İnsüline dirençli bireylerde insülin etkisinin hedef dokularında IRS ifade ve işlev kusurları bildirilmiştir. Obez bireylerden elde edilmiş iskelet kas örneklerinde IRS1 içeriğinde önemli bir azalma gözlenmiştir (Goodyear ve diğ. 1995; Sesti ve diğ. 2001). IRS proteinleri insülin reseptörünü PI3K ve ekstraselüler sinyal aktive edilmiş kinaz (ERK) kaskadlarına bağlayan önemli iskele proteinleridir. PI3K 110 kDa bir katalitik alt birim ile 85 ya da 55 kDa'luk bir düzenleyici alt birimden oluşan heterodimerdir (Schultze ve diğ., 2012). IRS'ın periferalinsülin yanıtı yanı sıra pankreatik beta hücrelerinin proliferasyonu ve işlevi için de önemli bir rolü vardır. Farelerde IRS sinyalizasyon düzensizliğinin periferik insülin direnci sırasında telafi edilemeyen hiperinsülinemiye neden olduğu gösterilmiştir (Yong ve White, 2004). IRS protein sinyal yolağı, akut yaralanma ve enfeksiyon ile veya

yaşlanma ve obezite ile bağlantılı kronik stres sonucu insülin direnci oluşumunda önemli bir mekanizma olan serin fosforilasyonu ya da proteazom aracılı yıkım ile baskılanmakta ve düzenlenmektedir. Bu nedenle diyabetik çalışmalarda IRS protein işlev ve ifadeleri, baskılanmaları ve proteozomal yıkımları da sıklıkla araştırılmaktadır (Aguirre ve diğ. 2000).

Genel olarak, belirli bir metabolik yolun fonksiyonel aktivitesi bu yolu düzenleyen enzimlerin seviyeleri tarafından yansıtılır. Bu nedenle glikoliz, glukoneogenez ve pentoz fosfat yolağında yer alan ve glikoz homeostazında önemli rol oynayan düzenleyici enzimlerin (hekzokinaz, pirüvat kinaz, PEP karboksilaz, glikoz-6-fosfataz, fosfofruktokinaz, fruktoz 1,6-bifosfataz, gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz, glikoz 6-fosfat dehidrogenaz vb.) ekspresyon ve aktivite düzeyleri de genel olarak diyabet çalışmalarında incelenen parametreler arasında yer almaktadır (Nehal ve Baquer, 1989; Nandan ve Beale, 1992; Clore ve diğ. 2000; Jeong ve diğ. 2012; Unakal ve Newman, 2014). Alfa-glikosidaz (α -D-glikozit glikohidrolaz) substratın indirgeyici olmayan ucundan α -glikoz salınımını katalizleyen ekzo tip bir karbohidrolazdır (Kimura ve diğ. 2004). İnce bağırsak epitelinde bir membran enzimidir ve oligosakkaritlerin absorbe edilebilir monosakkaritler haline hidrolitik parçalanmasını katalize ederek ince bağırsakta glikoz emilimini sağlar. Bu nedenle α -glikosidaz inhibitörleri karbohidrat alınımı sonrasında kan şekerinin yükselmesini yavaşlatır (Kumar ve diğ. 2011).

Aldoz redüktaz (AKR, E.C 1.1.1.21) hiperglisemi patogeneğinde önemli rol oynayan glikasyon ürünlerinin sentezinde yer alan polyol yolakta ilk hız sınırlayıcı basamağı katalizleyen enzimdir (Brownlee ve diğ. 2005). AKR diyabet komplikasyonlarında etkilenen gözler, böbrekler ve diğer dokularda ifade edilmektedir. Artmış glikoz polyol yolağına gire ve AKR tarafından sorbitole indirgenir (Huebschmann ve diğ. 2006). Çeşitli AKR inhibitörlerinin bazı hayvan modellerinde ya da hastalarda diyabetik nefropati önlemede önemli olduğu ortaya konmuştur. Benzer olarak, doğal ürünlerden elde edilen AKR inhibitörlerinin hayvan modellerinde diyabetik komplikasyonların gelişmesini geciktirdiği tespit edilmiştir (Obrosova ve diğ. 2003; Kim ve diğ. 2008; Sung ve diğ. 2010).



Şekil 2.5: İnsülinin detaylı sinyal iletim yolları (www.cellsignal.com adresinden izinle alınmıştır. Erişim 15 Ekim 2015).

3. GEREÇLER VE YÖNTEM

3.1 Gereçler

3.1.1 Sarf Malzemeleri

1,1-Dimetilbiguanid hidroklorid (D150959), 3-İzobütil-1-metilksantin (I7018), 96 kuyucuklu mikroplakalar (Costar), D-(+)-Glikoz (G7021), Dekzametazon (D4902), Dimetil sülfoksit (D4540), İnsülin çözeltisi (I0516), Kalsiyum klorid (C5670), L-Glutamin (G8540), Maltoz çözeltisi (63423), Sığır serum albümin (A4919), Sükroz (S1888), Tripan Mavisi çözeltisi (93595) Sigma-Aldrich (Chemie GmbH, Export Department, Eschenstrasse 5, 82024 Taufkirchen, Germany) firmasından; EasyScript™ Plus cDNA Sentez Kiti (G236) ve KiloGreen 2X qPCR (MasterMix-KS) ABM (Applied Biological Materials Inc., #1-3671 viking Way, Richmond, BC, V6V 2J5 Canada) firmasından; Chang Liver (HeLa-CCL-13), 3T3L1 (CL-173), C2C12 (CRL-1772) ve BTC6 (CRL-11506) hücre hatları LGC (LGS Standards GmbH, Mercatorstr. 51, 46485 Wesel, Germany) firmasından; 50 nmol, Oligo-DNA (primerler) Genescript (GenScript, 860 Centennial Ave., Piscataway, NJ 08854, USA) firmasından; Fetal Sığır Serumu Gibco (Thermo Fisher Scientific, 81 Wyman Street, Waltham, MA 02451 USA) firmasından; Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, 12-741F), Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS, 17-513), Eagle's Modified Essential Medium (EMEM, 12-662F), Penisilin-Streptomisin karışımı (17602) ve Tripsin-EDTA çözeltisi (17-161F) Lonza (Lonza Group Ltd., Muenchensteinerstrasse 38, CH-4002 Basel, Switzerland) firmasından; İnsülin ELISA kiti (EZRFMI-13K) Milipore (290 Concord Road, Billerica, Massachusetts 01821 USA) firmasından; RNeasy Plus Mini Kit (74136) Qiagen (27220 Turnberry Lane, Suite 200, Valencia, CA 91355, USA) firmasından; UltraFlux kapaklı PZR tüpleri (0,2 ml, 3247-40) SSI (Scientific Specialties, Inc., 1310 Thurman Street Lodi, CA 95240, USA) firmasından temin edilerek kullanıldı.

3.1.2 Cihazlar

Bu tez kapsamında başlıca şu cihazlar kullanılmıştır: Bioneer gerçek zamanlı PZR cihazı, Biosa kuru blok ısıtma termostadı, Maestrogen Nanodrop cihazı, Sigma 3K30 soğutmalı santrifüj, Sigma 1-14K soğutmalı/soğutmasız santrifüjler, Bioneer ExiSpin PZR tüp karıştırıcısı, Thermo agaroz jel elektroforez sistemi, DNR jel görüntüleme sistemi, Cisco laminar flow, Nuaire CO₂ inkübatörü, Olympus ters mikroskop, Olympus CX31 mikroskop ve Thermo Scientific Multiskan GO mikroplaka okuyucu spektrometre.

3.2 Yöntemler

3.2.1 Hücre Hatlarının İdamesi

3.2.1.1 BTC6 (Pankreatik Beta) Hücre Hattı

Hücreler %15 inaktive edilmiş FSS (fetal sığır serumu) ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) besiyerinde, 37°C'de, %5 CO₂ içeren nemli bir ortamda büyütüldü. Yaklaşık 32 saat sonra %80 yoğunluğa ulaştı. Bu durumda hücreler tripsin-EDTA solüsyonuyla kaldırılarak tripan mavisi ile boyandı ve Thoma lamında sayıldı. Hücreler petri kabı başına 1×10^5 hücre olacak şekilde yeni ortamlara bölündü. Saklanmak istendiğinde ise %5 DMSO (dimetilsülfoksit) içeren besiyerinde dondurma tüplerine alınıp -80°C'de muhafaza edildi.

3.2.1.2 C2C12 (Kas) Hücre Hattı

Hücreler %10 inaktive edilmiş FSS ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM besiyerinde, 37°C'de, %5 CO₂ içeren nemli bir ortamda büyütüldü. Yaklaşık 48 saat sonra %80-90 yoğunluğa ulaştı. Bu durumda hücreler tripsin-EDTA solüsyonuyla kaldırılarak tripan mavisi ile boyandı ve Thoma lamında

sayıldı. Hücreler petri kabı başına 1×10^5 hücre olacak şekilde yeni ortamlara bölündü. Saklanmak istendiğinde ise %5 DMSO içeren besiyerinde besiyerinde dondurma tüplerine alınarak -80°C 'de muhafaza edildi.

3.2.1.3 3T3L1 (Preadiposit) Hücre Hattı

Hücreler %10 inaktive edilmiş FSS ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM besiyerinde, 37°C 'de, %5 CO_2 içeren nemli bir ortamda büyütüldü. Yaklaşık 60 saat sonra %80-90 yoğunluğa ulaştı. Bu durumda hücreler tripsin-EDTA solüsyonuyla kaldırılarak tripan mavisi ile boyandı ve Thoma lamında sayıldı. Hücreler petri kabı başına 1×10^5 hücre olacak şekilde yeni ortamlara bölündü. Saklanmak istendiğinde ise %5 DMSO içeren besiyerinde besiyerinde dondurma tüplerine alınarak -80°C 'de muhafaza edildi.

3.2.1.4 Chang Karaciğer (HeLa) Hücre Hattı

Hücreler %10 inaktive edilmiş FSS ve %1 penisilin/streptomisin içeren EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) besiyerinde, 37°C 'de, %5 CO_2 içeren nemli bir ortamda büyütüldü. Yaklaşık 36 saat sonra %80-90 yoğunluğa ulaştı. Bu durumda hücreler tripsin-EDTA solüsyonuyla kaldırılarak tripan mavisi ile boyandı ve Thoma lamında sayıldı. Hücreler petri kabı başına 1×10^5 hücre olacak şekilde yeni ortamlara bölündü. Saklanmak istendiğinde ise %5 DMSO içeren besiyerinde besiyerinde dondurma tüplerine alınarak -80°C 'de muhafaza edildi.

3.2.2 Sitotoksite Testleri

3.2.2.1 Kristal Viyole Çözeltili Testi

Bu işlemler için hücreler 96 kuyucuklu plakalara, her kuyucukta 1×10^4 hücre olacak şekilde ekildi ve plakaların üzeri toplamda 200 μl olacak şekilde

besiyeri ile tamamlandı. Hücrelerin plakaya yapışması için 24 saat CO₂ inkübatöründe bekletildi. KR-62346 bileşiği 1,35 mM konsantrasyonda olacak şekilde dH₂O'da çözdürülüp ve 0,2 mikronluk filtreden geçirildi. Sitotoksosite uygulaması öncesinde dH₂O ile 10 kat seyreltilip ve konsantrasyonu 135 µM olan stok çözelti hazırlandı. Daha önce 96 kuyucuklu plakaya (1x10⁴ hücre/kuyucuk) ekilen BTC6, C2C12, 3T3L1 ve Chang karaciğer hücre hatları artan konsantrasyonlarda uygulanan KR-62436 bileşiği uygulandı. Kontrol grubuna sadece besiyeri ortamı eklendi. Tüm kuyucuklar besiyeri ile 200 µl'ye tamamlanarak 24 saat CO₂ inkübatöründe bekletildi. Süre sonunda kuyucuklardaki ortam dökülerek her bir kuyucuğa 100 µl kristal viyole çözeltisi (%10 EtOH içinde %0,5'lik) eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Süre sonunda boya döküldü ve plaka çeşme suyunda boyanın fazlası gidene kadar yıkandı. Kuyucuklara 100 µl sodyum sitrat çözeltisi (%50 EtOH içinde çözdürülmüş, 1M, pH 4,2) eklendi. Oda sıcaklığında 15 dakika çalkalanarak 630 nm dalgaboyunda ELISA mikropilaka okuyucuda absorbans değeri ölçüldü. Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak yüzde yaşam verileri saptandı. Bu verilerden yaklaşık Sitotoksik Olmayan Düşük Doz (SODD) ve Sitotoksik Olmayan Yüksek Doz (SODD) değerleri saptanarak takip eden etki saptama deneylerinde kullanılmıştır.

3.2.3 Glikoz Kullanım Testi

Glikoz alımını deneyleri C2C12 ve Chang karaciğer hücre hatları ile gerçekleştirildi. Bu deneyler için taze olarak pasajlanmış hücreler 96 kuyucuklu mikropilakalara kuyucuk başına 4500 hücre olacak şekilde ekildi ve 48 saat boyunca büyütüldü. Bu süre sonunda besiyere 8 mM glikoz + %0,1 BSA + test bileşik ve test bileşiğinin etkileriyle karşılaştırmak amacıyla pozitif kontrol olarak 1 µM metformin ve 1 µM insülin eklendi (Tablo 1). 2 saatlik ilave bir süre daha inkübe edildi. Süre sonunda her bir kuyucuktan 10 µl ortam alınarak yeni bir 96 kuyucuklu mikropilakaya transfer edildi. Üzerine glikoz reaktifi eklenerek son hacim 200 µl'ye tamamlandı ve 37°C de 30 dakika inkübe edildikten sonra mikropilaka okuyucusu kullanılarak 450 nm dalgaboyunda absorbans değerleri

okundu. Glikoz tayini esas olarak BioVision kolorimetrik glikoz tayin kiti (Kat. No: K606-100) kullanılarak, üreticinin direktifleri doğrultusunda gerçekleştirildi.

Tablo 3.1: C2C12 hücre hattı için kuyucuklarda oluşturulan deney ortamı

Kuyucuk Etiketi	Kuyucuk İçeriği
Kontrol B (Besiyeri Kontrol)	8 mM glikoz + %0,1 BSA
Kontrol P1 (Pozitif Kontrol)	8 mM glikoz + %0,1 BSA + 1 µM Metformin
Kontrol P2 (Pozitif Kontrol)	8 mM glikoz + %0,1 BSA + 1 µM İnsülin
Test Bileşiği SODD	8 mM glikoz + %0,1 BSA + 10 µM KR-62436

Tablo 3.2: Chang karaciğer hücre hattı için kuyucuklarda oluşturulan deney ortamı

Kuyucuk Etiketi	Kuyucuk İçeriği
Kontrol B (Besiyeri Kontrol)	8 mM glikoz + %0,1 BSA
Kontrol P1 (Pozitif Kontrol)	8 mM glikoz + %0,1 BSA + 1 µM Metformin
Kontrol P2 (Pozitif Kontrol)	8 mM glikoz + %0,1 BSA + 1 µM İnsülin
Test Bileşiği SODD	8 mM glikoz + %0,1 BSA + 6 µM KR-62436

Kit bileşenleri ve prosedürü aşağıdaki gibidir:

Tablo 3.3: BioVision glikoz tayin kiti bileşenleri

Glikoz analiz tamponu
Glikoz probu
Liyofilize enzim karışımı
Glikoz standardı (100 nmol/µl)

Glikoz standardı glikoz analiz tamponu ile 10 kat seyreltildi. Duplike olarak kuyucuklara sırasıyla 0, 2, 4, 6, 8 ve 10 µl eklendi ve üzerlerine son hacim 50 µl olacak şekilde analiz tamponundan eklendi. Böylece kuyucuklarda 0, 2, 4, 6, 8 ve 10 nmol glikoz standardı oluşturuldu. Örneklerden 10'ar µl alındı ve üzerlerine son hacim 50 µl olacak şekilde analiz tamponundan eklendi. Test ve

standart içeren kuyucuklar için reaksiyon karışımı kullanılırken; kontrol grupları için artalan kontrol karışımı kullanıldı. Aşağıda karışım içerikleri verilmiştir (bu hacimler bir kuyucuk içindir):

Tablo 3.4: Kuyucuklara eklenen reaksiyon ve kontrol karışımlarının içeriği

	Reaksiyon karışımı	Artalan karışımı
Glikoz analiz tamponu	46 µl	48 µl
Glikoz probu	2 µl	2 µl
Glikoz enzim karışımı	2 µl	–

Reaksiyon ve artalan karışımları ilgili kuyucuklara eklendikten sonra, plaka 37°C'de ışıktan korunaklı bir yerde 30 dakika bekletildi ve 570 nm dalgaboyunda absorbans değerleri ölçüldü. Standart değerleri kullanılarak oluşturulan grafik ve eğri değerleri kullanılarak bilinmeyen test miktarları hesaplandı.

3.2.4 İnsülin Salınım Testi

Taze pasajlanan BTC6 hücreleri 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu mikropalakaya ekildi ve 2 gün boyunca uygun şartlarda inkübe edildi. Süre sonunda, her bir kuyucuk 200 µl Krebs-Ringer-Bikarbonat-HEPES tamponu (KRBH: 118,4 mM NaCl, 4,75 mM KCl, 1,192 mM MgSO₄, 2,54 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 2 mM NaHCO₃, % 0,1 BSA) ile iki kez yıkandı. Her bir kuyucuğa tekrar 200 µl KRBH tamponu eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Süre sonunda ortam uzaklaştırıldı ve kuyucuklar aşağıda belirtilen şekilde tampon ve test bileşiği içeren ortamda oda sıcaklığında 40 dakika bekletildi. Kuyucuklarda oluşturulan ortamlar aşağıdaki gibidir:

Tablo 3.5: İnsülin salınımı testi için kuyucuklarda oluşturulan deney ortamı

Kontrol B (Besiyer Kontrol)	KRBH
Kontrol P (Pozitif Kontrol)	KRBH + 1 µM Glibenklamid
Test SODD	KRBH + 5 µM KR-62436
Test SOYD	KRBH + 7 µM KR-62436

Bekleme süresinin ardından her bir kuyucuk ortamında ayrı ayrı 10 µl başka bir 96 kuyucuklu plakaya aktarıldı. Ortamdaki insülin miktarı Millipore Sıçan/Fare İnsülin ELISA kiti (Kat. No: EZRMI-13K) (kolorimetrik) kullanılarak ve üreticinin direktifleri uygulanarak gerçekleştirildi. Kit bileşenleri ve prosedürü aşağıdaki gibidir:

Tablo 3.6: Millipore İnsülin ELISA kit bileşenleri

Sıçan/fare insülin ELISA plakası
Yapışkan plaka kaplayıcı
10X yıkama tamponu
İnsülin standartları (0,2- 0,5- 1- 2- 5- 10 ng/ml)
Kalite kontrol 1 ve 2
Matriks çözeltisi
Analiz tamponu
İnsülin belirleme antikoru
Enzim çözeltisi
Substrat
Durdurma çözeltisi

Reaktifler deneye başlamadan önce oda sıcaklığına ısıtıldı. 10X yıkama tamponu 10 kat seyreltilerek kullanıldı. Gereken sayıda mikrotitre analiz plaka şeritleri çıkarıldı. Her kuyucuk 300 µl seyreltilen yıkama tamponu ile yıkandı (bu işlem 3 kez tekrar edildi). Yıkama tamponu dikkatle döküldü. Tamamen boşaltmak için temiz kurutma kağıdı üzerine ters çevrilip fazla sıvı uzaklaştırıldı. Fakat kuyucukların tamamen kurumamasına dikkat edildi. Her bir kuyucuğa 10 µl analiz tamponu eklendi. Blank kuyucuğuna 10 µl daha analiz tamponu eklendi. 10

μ l sıçan insülin standartları artan konsantrasyonda duplike olarak uygulandı. İlgili kuyucuklara kontrol-1 ve kontrol-2 solüsyonlarından 10 μ l eklendi. Kalan kuyucuklara analiz edilmek istenen örnekten 10 μ l eklendi. Bütün kuyucuklara 80 μ l belirleme antikorü eklendi. Şeritler kapatıldı ve 400-500 rpm'de oda sıcaklığında 2 saat boyunca çalkalanarak inkübe edildi. Süre sonunda solüsyon döküldü. Kuyucuklar 300 μ l yıkama tamponu ile yıkandı (bu işlem 3 kez tekrar edildi). Her kuyucuğa 100 μ l enzim çözeltisi eklendi. Kuyucuklar kapatıldı ve orta hızda çalkalanarak oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Süre sonunda kuyucuklardaki sıvı döküldü. Kuyucuklar 300 μ l yıkama tamponu ile 6 kez yıkandı. Her bir kuyucuğa 100 μ l substrat solüsyonu eklendi. Kuyucuklar kapatıldı ve 5-20 dakika çalkalanarak inkübe edildi. Standartların bulunduğu kuyucuklarda artan insülin konsantrasyonlarına göre mavi renk oluşumu gözlemlendi. Ardından kuyucuklara 100 μ l durdurma çözeltisi eklendi ve kuyucuklar çözeltinin karıştığına emin oluncaya kadar elde çalkalandı. Mavi renk sarıya döndüğü görüldü. 5 dakika içinde 450 ve 590 nm dalgaboylarında absorbans okundu. Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak standart eğri çizildi ve bilinmeyenler hesaplandı.

3.2.5 İnsülin Sinyal Yolağı Analizleri

İnsülin sinyal yolağı gen ifade düzeylerinin tespiti uygun hücre hatlarında ilgili test bileşiklerinin farklı konsantrasyonlarda uygulamaları neticesinde elde edilen hücrelerde aşağıdaki yöntemler uygulanarak saptanmıştır. Test bileşiğinin uygulama şekilleri sitotoksisite testlerinde belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.

3.2.5.1 RNA İzolasyonu

İzolasyon QIAGEN RNeasy Plus Mini kit (Kat. No: 74136-250) kullanılarak laboratuvarımızda optimize ettiğimiz şekliyle aşağıdaki prosedüre göre gerçekleştirildi.

Tablo 3.7: QIAGEN RNeasy Plus mini kit bileşenleri

RLT plus lizis tamponu
RW1 yıkama tamponu
RPE yıkama tamponu
RNazdan arındırılmış su
gDNA tutan kolon
RNeasy kolon

Besiyeri hücrelerden uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkandı. Yıkama işlemi ortamın besiyerinden arındığına kanaat getirilene kadar tercihe göre birkaç kez yapıldı (genelde 3 kez yeterlidir). Yıkama işleminin ardından hücre yoğunluğuna göre 350-600 µl RLT plus tamponu eklendi. Bu işlem neticesinde hücreler mukusumsu bir yapı kazandı, yumuşadı ve kolayca kazınır hale geldi. Parçalama tamponu hücre kazıyıcı ile iyice hücreler üzerine yayıldı ve toplanıp ependorfa alındı. Birkaç kez yavaşça altüst edildi. Süspansiyon gDNA tutan kolona alındı. 100 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve sıvı kısım kolondan geçmediyse işlem daha yüksek hızda veya daha uzun süre tekrarlandı. Kolon atıldı ve alta geçen kısmın üzerine 500 µl %70'lik EtOH eklendi. Yavaşça ve nazikçe pipetaj yapıldı ve iyice karıştırıldı. Sıvıdan en fazla 600 µl RNeasy spin kolona aktarıldı. Kalan sıvı olmayı halinde işlem tekrar edildi. 11.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve sıvı kısım kolondan geçmediyse işlem daha yüksek hızda veya daha uzun süre tekrar edildi. Alta geçen kısım döküldü ve kolona 700 µl RW1 yıkama tamponu eklendi. 11.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve tekrar alta geçen kısım döküldü. Kolona 500 µl RPE tamponu eklendi ve 11.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve alta geçen kısım döküldü. Bu işlem 2 kez daha tekrar edildi. Kolon bir şey ekmeden 11.000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi. Kolon yeni bir ependorfa alındı ve üzerine 45 µl RNaz içermeyen su eklenerek 9000 xg'de 1 dakika 15 saniye santrifüj edildi. Kolon atıldı ve RNA bulunan ependorf etiketlenerek ve temsili bölüntülere bölünerek -80°C'ye kaldırıldı.

İzole edilen RNA'lar %1'lik agaroz jelde Thermo yatay agaroz jel elektroforez sisteminde yürütülerek kalite kontrolleri gerçekleştirildi. %1'lik agaroz jel, Tris-Asetik Asit-EDTA (TAE) tamponu ile hazırlandı. 2 µl RNA örneği, 6 µl steril su ve 2 µl yürütme boyası ile muamele edilerek mikropipet ile

jelde bulunan kuyucuklara yüklendi. Yürütme bitince jel UV transilluminatörde görüntülenip DNR LightBis ProImage Analysis System (DNR BioImage System Ltd. Jerusalem, Israel) cihazında fotoğraflandı. Ayrıca nanodrop cihazı ilede konsantrasyonları tespit edilerek cDNA sentezi için kullanıldı.

3.2.5.2 cDNA Sentezi

Nanodrop cihazında konsantrasyonları belirlenen yüksek kaliteli total RNA'lar kullanılarak ABM cDNA sentez kiti ile cDNA sentezi gerçekleştirildi. Bir PZR tüpü içerisinde 2,5 µg total RNA kit içerisindeki oligo d(T) primerleri (1 µl), dNTP çözeltisi (1 µl) ve RNAz içermeyen su (bu aşamada son hacim 14,5 µl olacak şekilde eklendi) ile karıştırılarak 65°C'de 5 dakika ön işleme tabi tutuldu. Ardından bu karışım yine kit içeriğinde yer alan reaksiyon tamponu (4 µl), RNAz inhibitörü (0,5 µl) ve 'EasyScript RTase' enzimi (1 µl) ile birleştirildi. Böylece bir tüpteki son hacim 20 µl olur ve 50°C'de 50 dakika inkübe edilerek cDNA sentezlendi. Süre sonunda, enzim inhibe edilmek üzere 85°C'de 5 dakika bekletildi. Sentezlenen cDNA'lar temsili bölüntülere bölünerek gerçek zamanlı nicel PZR (qRT-PCR) yapmak üzere -80°C'de muhafaza edildi.

3.2.5.3 Gerçek Zamanlı Nicel PZR (qRT-PCR)

Elde edilen tek zincirli cDNA su ile 5 kat seyreltildi. Floresans boya olarak 'ABM-KiloGreen 2X qPCR MasterMix RT2-PCR Master Mix' kullanıldı. Deney ortamı, her tüp için, son hacim 25 µl olacak şekilde aşağıda verildiği gibi oluşturuldu.

Tablo 3.8: Bir tüp içerisinde bulunan PZR reaksiyon ortamı

Reaksiyon Bileşeni	Hacim (µl)
Su	6,1
İleri primer	0,7
Geri primer	0,7
KiloGreen MasterMix	12,5
cDNA	5

Çalışılan KR-62436 bileşiğinin gen ifadeleri düzeylerine etkilerini saptamak için mRNA düzeyleri qRT-PCR (gerçek zamanlı PCR) yöntemi ile kantite edildi. Bu amaçla makalelerden dizileri saptanan genler veya “Primer Blast” programı ile tasarlanan primerler Pubmed’in nükleotit blast bölümünde taranıp erişim numaraları belirlendi. Güvenirliği artırmak için pubmed’in primer blast bölümünde erişim numaraları ile uygun organizma seçilip tarandı. Sıcaklık genellikle 57-60°C seçildi. Yanlış eşleşme yapıp yapmadığına, GC oranının %50 üzerinde olmasına dikkat edildi. Seçilen primerlerin en fazla 300 bp büyüklüğünde olmasına özen gösterildi. Yanlış yapmamak için Pubmed’in primer blast bölümüne tekrar forward ve revers primerler yazıldı, organizma seçildi ve doğru gen bölgesi olup olmadığı kontrol edildi. Çalışma kapsamında kullanılan genler ve primerlere ait özellikler Tablo 3.9’da sunulduğu gibidir:

Tablo 3.9: Çalışılan genler ve primer dizilerinin özellikleri

Gen Kısa Adı/Adı	PrimerF (5'→3') bp, Tm, Lokasyon	PrimerR(5'→3') bp, Tm, Lokasyon	Amplikon (bp)
hINSR insülin reseptör	AAAACGAGGCCCGAAGATTTTC 21 60.9 199-219	GAGCCCATAGACCCGGAAG 19 61.2 288-270	90
mINSR	ATGGGCTTCGGGAGAGGAT 19 62.1 1-19	CTTCGGGTCTGGTCTTGAACA 21 61.7 214-194	214
hIRS-1 insulin reseptör substratı-1	ACAAACGCTTCTTCGTAAGTGC 21 61.2 77-97	AGTCAGCCCGCTTGTGATG 20 62.8 232-213	156
mIRS-1	CGATGGCTTCTCAGACGTG 19 60.2 21-39	CAGCCCGCTTGTGATGTTG 20 62.2 229-210	209

IRS-2 insulin reseptör substratı-1	CGGTGAGTTCTACGGGTACAT 21 61.0 1608-1628	TCAGGGTGTATTCATCCAGCG 21 61.6 1801-1781	194
mIRS-2	ACCGACTTGGTTCAGCGAAG 19 61.9 418-436	CACGAGCCCCTAGTTGTCAT 20 61.9 552-533	135
hPI3K fosfotidil inositol 3-kinaz	ACCACTACCGGAATGAATCTCT 22 60.3 1217-1238	GGGATGTGCGGGTATATTCTTC 22 60.3 1423-1402	207
mPI3K	ACACCACGGTTTGGACTATGG 21 62 5-25	GGCTACAGTAGTGGGCTTGG 20 62 144-125	140
hPKL piruvat kinaz karaciğer	TCAAGGCCGGGATGAACATTG 21 62.7 230-250	CTGAGTGGGGAACCTGCAAAG 21 62.9 347-327	118
mPKL	GAACATTGCACGACTCAACTTC 22 60.0 243-264	CAGTGCATCTCGGGACC 19 61.9 400-382	158
hPKM piruvat kinaz kas	ATGTCGAAGCCCCATAGTGAA 21 60.9 1-21	TGGGTGGTGAATCAATGTCCA 21 61.4 118-98	118
mPKM	CGCCTGGACATTGACTCTG 19 60.2 94-112	GAAATTCAGCCGAGCCACATT 21 61.3 228-208	135
hG6P glikoz 6 fosfataz	CGAGGCGCTACAGAACCAG 19 62.4 36-54	CACTCGGTGATGAGGCTGAT 20 61.4 197-178	162
mG6P	CTGAGCGCGGGCATCATAAT 20 62.8 13-32	GATTCTTAGGATCGCCCAGAAAG 23 60.5 112-90	100
hPEPCK fosfoenolpiruva t karboksikinaz	AAAACGGCCTGAACCTCTCG 20 62.4 17-36	ACACAGCTCAGCGTTATTCTC 21 60.1 114-94	98
mPEPCK	CTGCATAACGGTCTGGACTTC 21 60.4 13-33	CAGCAACTGCCCGTACTCC 19 62.7 171-153	159
hAKR1B1 aldo-keto redüktaz ailesi 1, üye B1	TTTTCCATTGGATGAGTCGG 21 60.0 365-385	CCTGGAGATGGTTGAAGTTGG 21 60.3 499-479	135
mAKR1B10	CTAGTGCCAAACCAGAGGACC 21 62.1 656-676	TCCTGTATTTCGAGAAGGTGTCA 22 60.2 815-794	160
hSLC2A2 (GLUT2) çözünen taşıyıcı	GCTGCTCAACTAATCACCATGC 22 61.8 265-286	TGGTCCCAATTTTGAAAACCCC 22 61.2 447-426	183

ailesi 2 üye 2			
mSLC2A2 (GLUT2)	TCAGAAGACAAGATCACCGGA 21 60.2 4-24	GCTGGTGTGACTGTAAGTGGG 21 62.6 218-198	215
hGLUT4 çözünen taşıyıcı ailesi 2 üye 4	TGGGCGGCATGATTTCTC 19 62.4 269-287	GCCAGGACATTGTTGACCAG 20 60.9 356-337	88
mGLUT4	ACACTGGTCCTAGCTGTATTCT 22 60.0 67-88	CCAGCCACGTTGCATTGTA 19 60.7 184-166	118

*h (human) – İnsan * m (mouse) – Fare

3.2.6 İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler, Windows için GraphPad Prism 6.0 istatistiksel yazılım paketi kullanılarak, öğrenci t-testi ile yapılmıştır. $P < 0,05$ anlamlılık düzeyi seçilerek değerler Ortalama \pm Standart Sapma olarak ifade edildi. qRT-PCR verilerinin analizleri Qiagen firmasının ücretsiz olarak sağlandığı RT2 Profiller™ PCR Array Data Analysis v3.4 ile web üzerinden çevrimiçi gerçekleştirilmiştir.

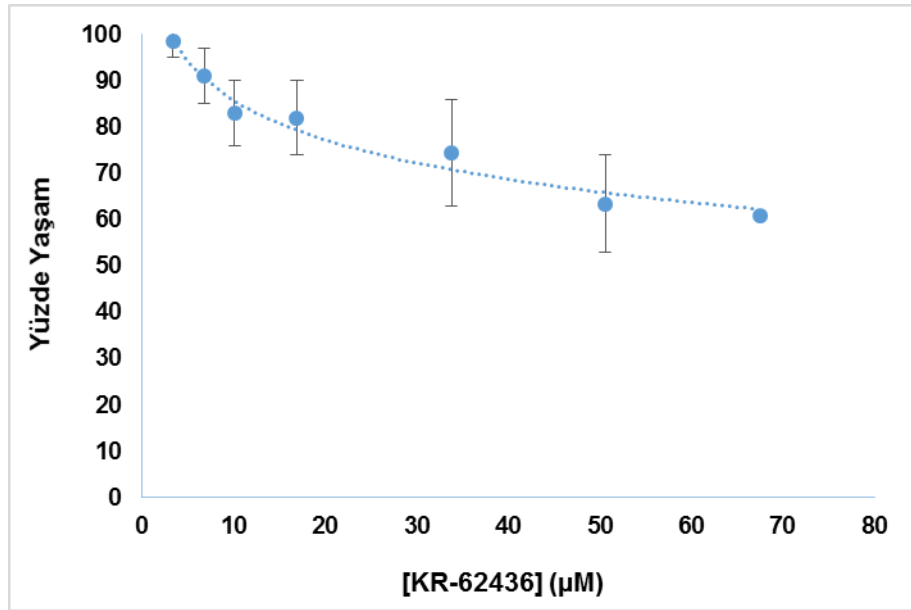
4. BULGULAR

Tekrarlanan deneyler sonunda elde edilen veriler ortalama \pm standart sapma deęerleri řeklinde verilmiřtir. Aksi belirtilmedięi sūrece tūm veriler her birinde triplike yapılan en az ū baęımsız tekrar deneylerin ortalaması řeklinde dir.

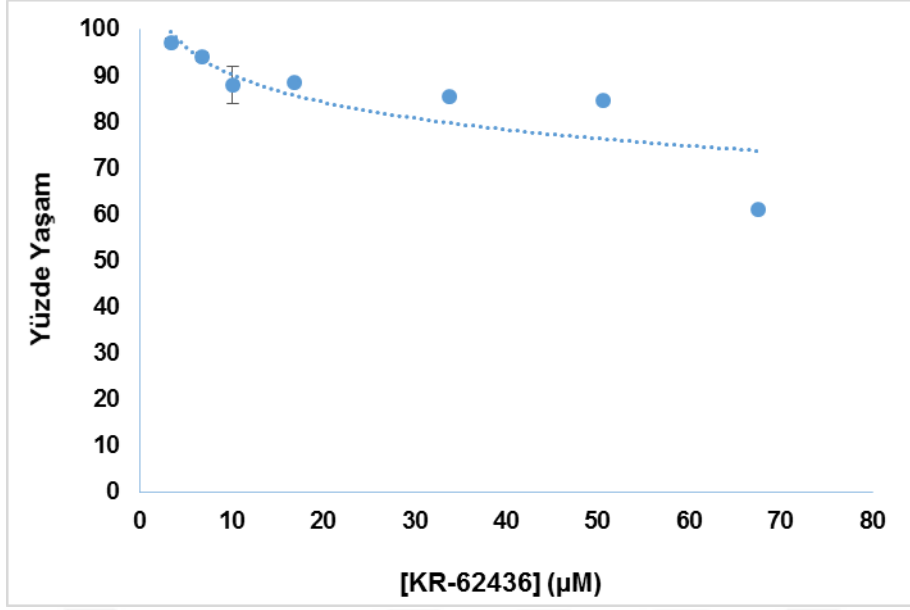
4.1 Sitotoksisite Testleri

4.1.1 Kristal Viyole Çözeltisi Testi

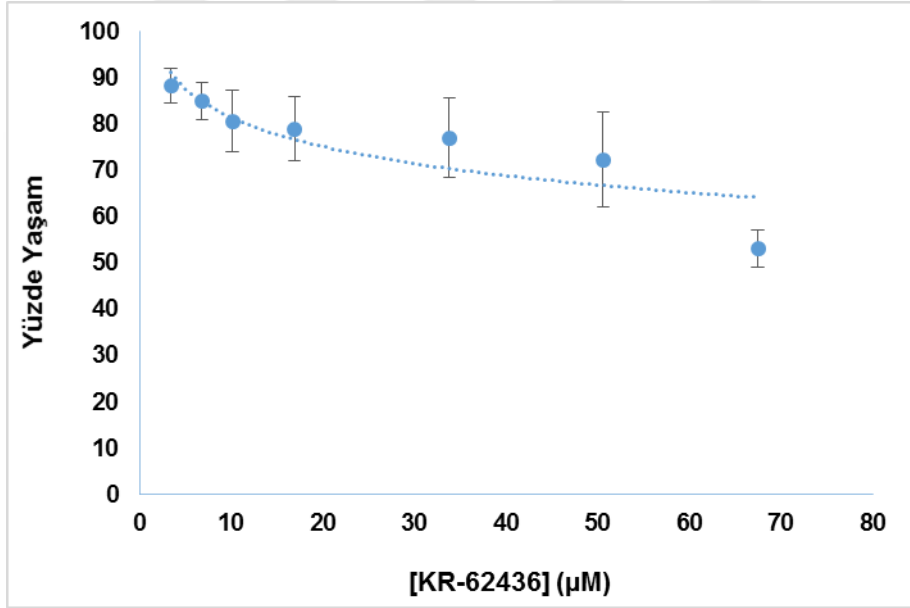
KR-62436 bileřinin artan konsantrasyonlarının BTC6, C2C12, 3T3L1 ve Chang hūcre hatlarındaki canlılıęa etkisi, kristal viyole çōzeltisi kullanılarak ELİSA okuyucuda ölçūlen absorbands deęerlerine gōre belirlenmiřtir (řekil 4.1, 4.2, 4.3 ve 4.4).



řekil 4.1: KR-62436 bileřinin artan konsantrasyonlarına gōre BTC6 hūcre hattındaki canlılıęa etkisi.

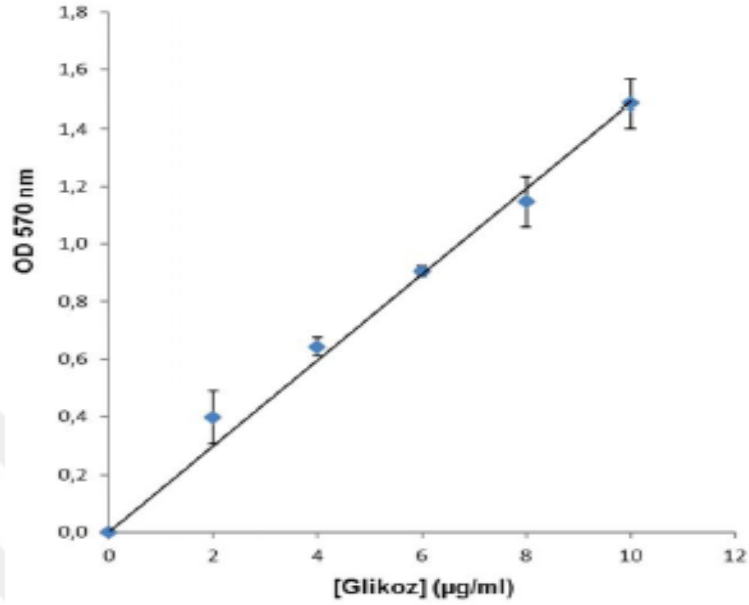


Şekil 4.2: KR-62436 bileşiğinin artan konsantrasyonlarına göre C2C12 hücre hattındaki canlılığa etkisi.



Şekil 4.3: KR-62436 bileşiğinin artan konsantrasyonlarına göre 3T3L1 hücre hattındaki canlılığa etkisi.

absorbansına göre standart eğri oluşturuldu (Şekil 4.5). Ortamdaki glikoz miktarı standart eğri baz alınarak tayin edildi ve Tablo 4.2’de verildi.



Şekil 4.5: Glikoz standart eğrisi

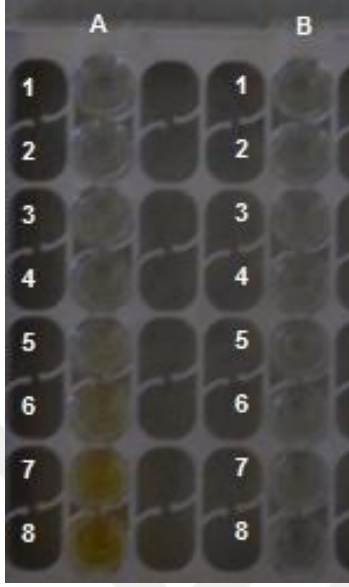
Tablo 4.2: C2C12 ve Chang hücrelerinin bulunduğu ortamlardaki başlangıç ve pozitif kontroller ve test bileşiğiyle inkübasyonu sonrası glikoz konsantrasyon farkı.

Bileşikler	[ΔGlikoz]/Saat	
	C2C12	Chang
Kontrol	2,344 ± 0,032	2,344 ± 0,032
Metformin	0,474 ± 0,017	0,346 ± 0,004
İnsülin	0,284 ± 0,026	0,229 ± 0,008
KR-62436	0,033 ± 0,051	-0,312 ± 0,058

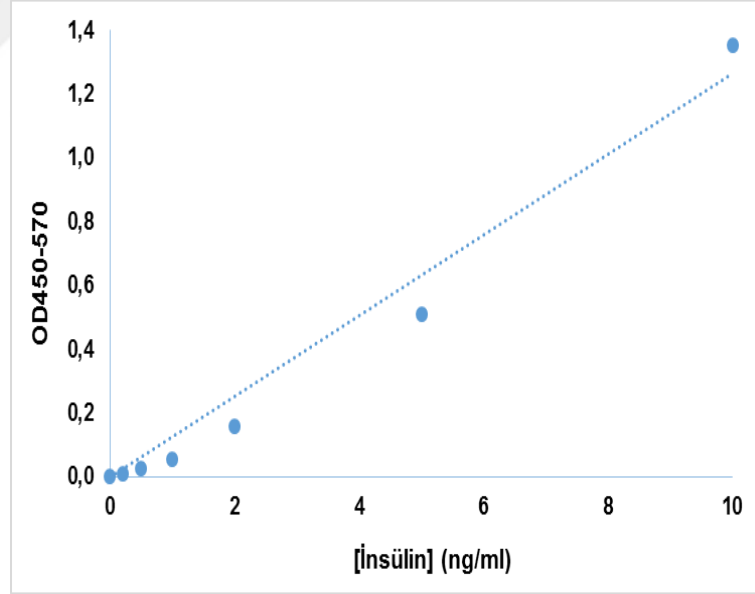
4.3 İnsülin Salınım Testi

İnsülin salınım testi bu fizyolojik fonksiyona sahip BTC6 hücreleri ile Bölüm 3.2.4’te detaylı anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Taze pasajlanmış BTC6 hücreleri test bileşiği ile inkübe edilerek ortama salınan insülin miktarı Millipore

İnsülin ELISA kiti ile tayin edildi. Elde edilen plaka görüntüsü aşağıdaki Şekil 4.6'da verilmektedir:



Şekil 4.6: BTC6 hücre hattında Millipore İnsülin ELISA kiti ile elde edilen örnek plaka görüntüsü. Kuyucuk içerikleri şu şekildedir: A1: Blank; A2: Krebs-Ringer-Bikarbonat-Hepes tamponu; A3: Standart 1 (0,2 ng/ml); A4: Standart 2 (0,5 ng/ml); A5: Standart 3 (1 ng/ml); A6: Standart 4 (2 ng/ml); A7: Standart 5 (5 ng/ml); A8: Standart 6 (10 ng/ml); B1-2: Glibenklamid B3-4: Besiyer kontrol; B5-6: KR-62436 SOYD; B7-8: KR-62436 SOYD.



Şekil 4.7: İnsülin standart eğrisi

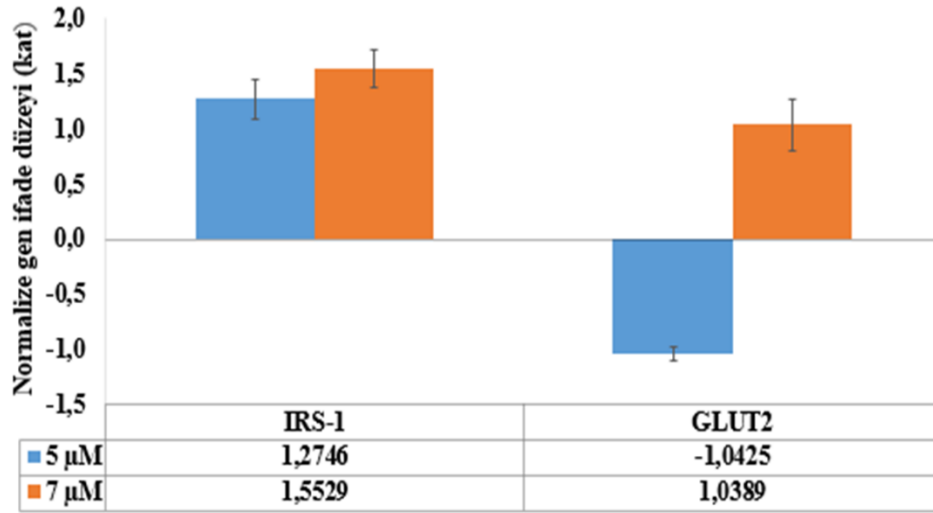
İnsülin salınım testinde kit içinde kullanıma hazır olan 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 10 ng/ml konsantrasyonlarındaki insülin standart çözeltileri kullanılarak Şekil 4.7'deki standart eğri grafiği elde edildi. Pozitif kontrol olarak glibenklamid kullanıldı. KR-62436 bileğinin SODD ve SOYD uygulamaları ile kontrol ve

pozitif kontrol ortamlarının absorbans değerleri arasında anlamlı bir fark görülemedi.

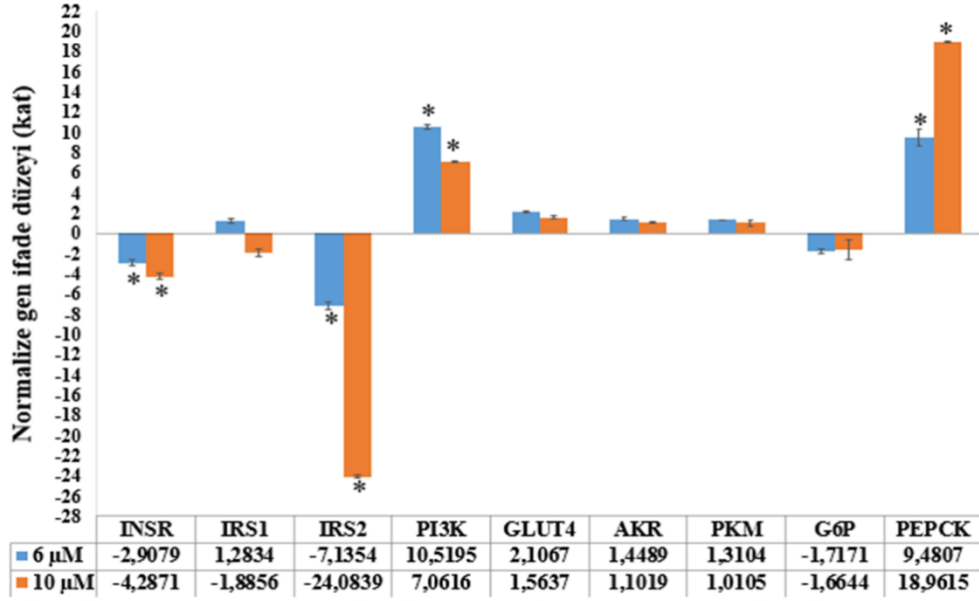
4.4 İnsülin Sinyal Yolağı Gen İfade Analizleri

İnsülin yolağının çeşitli basamaklarında yer alan genlerin ifade düzeyleri ilgili genin ekspres edildiği hücre hatları kullanılarak mRNA düzeyindeki ifadeleri gerçek zamanlı PZR ile tayin edildi. Bu işlem için öncelikle çalışılacak her bir gen için amplikasyon analizi ve erime eğrisi analizleri yapıldı. Daha sonra bu değerler kullanılarak her bir gen için mRNA ekspresyon düzeyleri kontrol, KR-62436 bileşiğinin SODD ve SOYD dozları uygulanan örneklerde saptandı.

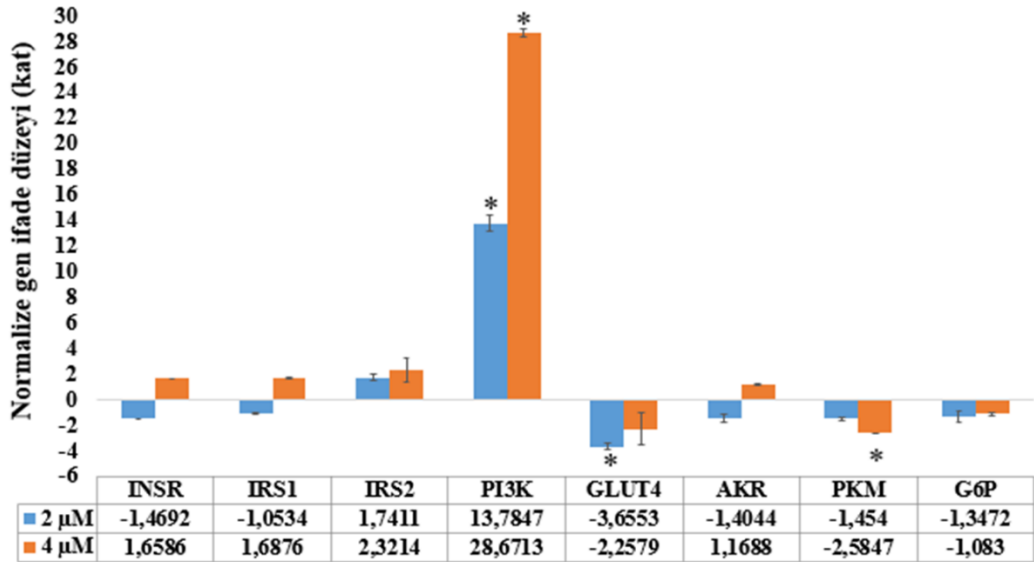
KR-62436 test bileşiğinin kontrol, SODD ve SOYD dozlarının hücre hatlarındaki mRNA ifadesi üzerine etkileri Şekil 4.8, 4.9, 4.10 ve 4.11’ de gösterilmiştir.



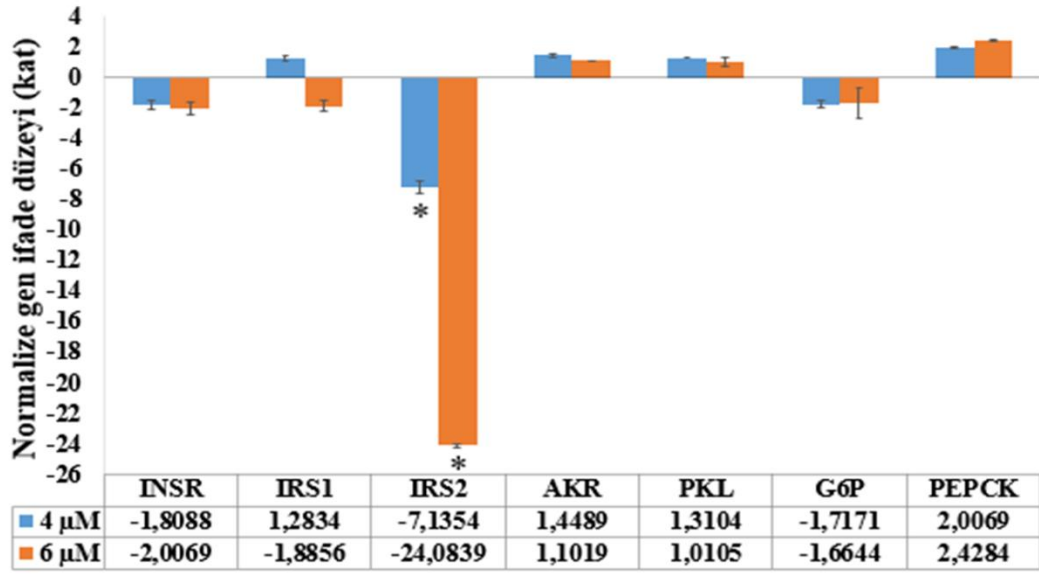
Şekil 4.8: KR-62436 uygulamasında BTC6 hücre hattında IRS1 ve GLUT2 genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar Beta-Aktin (ACTB) geni ile normalize edilmiş ve kontrol değeri 1 alınmıştır. Sonuçlar iki farklı zamanda gerçekleştirilen ikili uygulamaların ortalaması alınarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.9: KR-62436 uygulamasında C2C12 hücre hattında INSR, IRS1, IRS2, PI3K, GLUT4, AKR, PKM, G6P ve PEPCK genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar Beta-Aktin (ACTB) geni ile normalize edilmiş ve kontrol değeri 1 alınmıştır. Sonuçlar iki farklı zamanda gerçekleştirilen ikili uygulamaların ortalaması alınarak hesaplanmıştır. (*) p < .05 düzeyinde kontrol grubuna göre anlamlı farklılık gösteren gen ifadesidir.



Şekil 4.10: KR-62436 uygulamasında 3T3L1 hücre hattında INSR, IRS1, IRS2, PI3K, GLUT4, AKR, PKM ve G6P genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar Beta-Aktin (ACTB) geni ile normalize edilmiş ve kontrol değeri 1 alınmıştır. Sonuçlar iki farklı zamanda gerçekleştirilen ikili uygulamaların ortalaması alınarak hesaplanmıştır. (*) p < .05 düzeyinde kontrol grubuna göre anlamlı farklılık gösteren gen ifadesidir.



Şekil 4.11: KR-62436 uygulamasında Chang Karaciğer hücre hattında INSR, IRS1, IRS2, AKR, PKL ve G6P genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar Beta-Aktin (ACTB) geni ile normalize edilmiş ve kontrol değeri 1 alınmıştır. Sonuçlar iki farklı zamanda gerçekleştirilen ikili uygulamaların ortalaması alınarak hesaplanmıştır. . (*) $p < .05$ düzeyinde kontrol grubuna göre anlamlı farklılık gösteren gen ifadesidir.

5. SONUÇ ve TARTIŞMA

Diyabet, dünya üzerindeki ülkelerin hepsinde artan grafik profiliyle insan sağlığını tehdit eden hastalıkların başında gelmektedir. Diyabetle ilgili yapılan çalışmalar özellikle tip II yani insülin-bağımlı olmayan diyabetin dünya üzerinde hızla arttığını göstermiştir. Bu artışta özellikle beslenme alışkanlığı, yaşama şekli, hareketsizlik ve beraberinde gelen obezite sorunu, insülin direnci ve diğer metabolik bozukluklar başlıca etkenlerdir (Guariguata ve diğ. 2013, Shaw ve diğ. 2010).

Diyabet türlerinden özellikle tip I ve tip II yaygın ve üzerinde daha çok çalışılanlardır. Diyabetik hastalığa sebep olan etkenler ve metabolizmadaki bozukluk belirlendikten sonra uygun tedavi yöntemi uygulanmaktadır. Bu amaçla bazen enjeksiyon yoluyla direkt insülin uygulaması veya oral yoldan alınan ilaçlar kullanılmaktadır. İlaçlara ek olarak yapılan çalışmalarda antidiyabetik etkisi olan bitkiler veya bitkisel özütler de kullanılmaktadır. Bu ilaçların veya ajanların avantajı olduğu gibi yetersiz gelme veya başka metabolik rahatsızlıklara sebep olma gibi dezavantajları da bulunmaktadır (ADA, 2010, Bikhazi ve diğ. 2011, Babu ve diğ. 2013). Bu sebeple inkretin hormonların analogları (GLP-1 agonistleri), inkretinleri yıkıma uğratan enzimin inhibisyonu (DPP-4 inhibitörleri) ve endojen amylin molekülünün agonisti (pramlintide) gibi farklı etki mekanizmaları ile diyabette glisemik regülasyonu düzelten alternatif yeni ilaçlar geliştirilmiştir. Beslenme sonrası artan karbonhidrat miktarına cevap olarak ince bağırsak hücrelerinden inkretin adlı polipeptidler salgılır. İnkretinler pankreastan insülin salınımını arttırırken gastrik boşalmayı da yavaşlatır. GIP (gastrik inhibitör polipeptid ya da glukoz bağımlı insülinotropik polipeptid) ve GLP-1 inkretin polipeptidleridir. GLP-1 preproglukagonun translasyon sonrası proteolizinden türetilmiş bir bağırsak hormonu olarak bildirilmiştir (Ükinç ve diğ., 2007; Larsen ve diğ. 2005). Hormonun insülinotropik özelliği ve glukagon salınımı, iştah ve gastrik boşalma üzerindeki inhibisyon etkisi tip II diyabet tedavisinde kullanılabilir öncü bir bileşik olma imkânı sağlamaktadır. GLP-1 hormonunun DPP-4 ile enzimatik kesimi sonucu yarı ömrü hızla düşer. Tip II diyabetle savaşabilmek için GLP-1 hormonunun yapısını korumak ve terapötik etkisini arttırmak için DPP-4 inhibitörleri ve GLP-1 analogları geliştirilmiştir (Anagnostis

ve diğ. 2011, Deacon ve diğ. 1995). KR-62436 bileşiği de DPP-4 enzimine özgü bir inhibitör olarak kullanılmaktadır (Kim ve diğ. 2005). GLP-1'in daha dayanıklı ve uzun ömürlü olması antidiyabetik etkisinin kalitesini arttırmaktadır. Bu sebeple kullanılan GLP-1 analoglarından oluşan antidiyabetik ilaçların DPP-4 inhibitörleriyle desteklenmesiyle etkisi arttırılabilir. Bu amaçla DPP-4 inhibitörü olan KR-62436 bileşiği kullanılabilir.

Bu çalışmada, inkretin hormon olan GLP-1'i enzimatik kesime uğratan DPP-4 enziminin inhibitörü olarak laboratuvar ortamında üretilen KR-62436 bileşiğinin muhtemel antidiyabetik etkilerinin araştırılması amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda bileşiğin glikoz homeostazına etkilerini görebilmek için insülin salınımı, glikoz kullanımı gibi kilit mekanizmalar ve insülin sinyal yolağında rol oynayan genlerin mRNA ekspresyon düzeylerindeki değişimlere bakıldı. Deneyle başlamadan önce her bir hücre hattı için KR-62436 bileşiğinin çalışma dozları, *in vivo* sistemlerde toksik ve yan etki göstermeyen konsantrasyonlarda olacak şekilde, belirlendi. Belirlenen bu toksik olmayan dozlar yapılan çalışmaların tamamında uygulandı.

Bileşiklerin canlıdaki etkisinin araştırılması için *in vivo* deneklerin teminindeki, bakımındaki, sosyal ve etik olarak kullanımındaki kısıtlamalar *in vitro* modellerin kullanımını arttırmıştır. Kullanımındaki pratiklik ve deney hayvanlarının gereksiz yere kullanımını engellemesi düşünüldüğünde *in vitro* modellerde etkinliği kanıtlanan bileşiklerin daha sonra *in vivo* sistemlerde test edilmesi daha doğru bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir. Bu amaçla, potansiyel antidiyabetik ajanların etkinliklerini ve mekanizmalarını araştırmak için birçok *in vitro* model geliştirilmiştir (Patel ve Mishra, 2008; Skelin ve diğ., 2010). Bu yüksek lisans tez çalışmasında da glikoz homeostazında rol oynayan kilit organ ve dokuları temsil eden hücre hatları kullanılmıştır.

Glikoz homeostazındaki başrol oyuncularından biri insülin hormonudur. Pankreas ise yapısındaki beta hücreleri ile vücudun ihtiyaç duyduğu insülini üreten merkezdir. Beta hücrelerinde bir sorun olmamasına rağmen insülin salınımının ya da daha çok vücudun insülini etkin kullanımının azalması ile tip II diyabet ortaya çıkmaktadır (Matthews, 2003). Dolayısıyla glikoz metabolizmasıyla ilgili çalışmalarda akla ilk gelen unsur pankreas dokusunu

modelleyen hücre hatlarının kullanımınıdır. Bu doğrultuda çalışmamızda transgenik farelerden elde edilen pankreatik beta tümör hücresi BTC6 kullanıldı. BTC6 hücre hattında KR-62436 bileşiğinin antidiyabetik etkisini araştırmak üzere; insülin salınımına ve glikoz metabolizmasında rol oynayan IRS1 ve GLUT2 proteinlerini kodlayan genlerin mRNA ekspresyon düzeylerine bakıldı. İnsülin salınımı testinde pozitif kontrol olarak glibenklamid kullanıldı. Deney sonrası plakadaki insülin standartlarının bulunduğu kuyucuklarda artan konsantrasyonlarla orantılı renk oluşumu gözlenirken; pozitif kontrol ve test bileşiğini içeren kuyucuklarda renk oluşumu gözlenmedi. ELISA okuyucuda da bu görüntüyle paralel absorbans değerleri elde edildi. Bu durum test bileşiğinin insülin salınımını tetiklemediği buna dayanarak antidiyabetik etkisinin olmadığı sonucuna götürmesine karşın pozitif kontrolde de herhangi bir etkinin gözlenmemesi daha kesin ve sağlıklı bir yargıya varmak için farklı bir yol izlenmesini akla getirdi. Beta hücrelerinden insülin salınımı, kandaki seviyesi artan glikozun GLUT2 proteini ile hücre içine alınmasını takip eden olaylar sonucunda tetiklenir (Lodish, syf. 765). İnsülin salınım deneyi öncesi hücre ortamına glikoz eklenmesiyle hücre dışındaki glikoz artışı, artan glikozun hücre içine alınımı ve dolayısıyla hücrede insülin salınımının tetiklenmesi sağlanabilir. İnsülin yolağındaki IRS1 ve GLUT2 genlerinin mRNA ekspresyon düzeylerinde de anlamlı bir değişim gözlenmemesi insülin salınım testinde ulaşılan sonucu destekler nitelikteydi (Tablo 5.1).

Tablo 5.1: BTC6 hücresinde gen ifade düzeyinin değişimi

Gen Adı	Düşük Doz	Yüksek Doz
IRS1	1,275	1,553
GLUT2	-1,043	1,039

Bir başka yaklaşım olarak, test bileşiğinin hücre canlılığında aşırı ve ani değişime neden olmadığı ve 10 μ M KR-62436 bileşiğinin DPP-4 enzimini neredeyse tamamen inhibe ettiği Villhauer ve diğ. (2003) göz önüne alındığında; ortama eklenen bileşik konsantrasyonunun arttırılması da düşünülebilir.

Genetik yatkınlıkla birlikte, beslenme, ilerleyen yaş ve yaşama düzeni gibi çevresel faktörlere bağlı olarak gelişen ve erişkinlik döneminde ortaya çıkan tip II diyabetin asıl nedeni insülin salınımındaki yetersizlikten çok periferik dokuların

insüline karşı oluşturdukları insülin direncidir (Kavak, 2008). Kontrol edilemeyen hepatik glikoz üretimi, kas ve yağ dokusu tarafından azalmış glikoz alımıyla karakterize insülin direnci; karaciğer, yağ dokusu ve kaslar gibi hedef dokuların dolaşımdaki insüline verdiği efektif yanıtın azalmasıdır (Beers ve diğ., 2006; King ve diğ., 2005). İnsülin direnci, glikoz-aracılı insülin taşınması ve metabolizmasını azaltır Rhoades ve Bell (2009) ve insülin salınımının telafisinde kusura yol açar (Mcphree ve diğ., 2008). İskelet kası tip II diyabete yol açan insülin direncinin esas yeridir. Yapılan bir çalışmada, kontrol gruplarına kıyasla tip II diyabetlilerin vücudundaki insülinle uyarılan glikoz alımının yaklaşık % 30-40 oranında azaldığı belirlenmiştir (DeFronzo ve diğ., 1985). Bundan sadece iskelet kası rol oynamaz. Adipoz, iskelet ve hepatik doku hücrelerindeki insülin sinyal yolağında meydana gelen sorunlar insülin direncinin gelişmesine neden olur (Seifter ve diğ., 2005). İnsülin direncinin bir sonucu olarak, adipoz doku ve iskelet kası hücrelerinde glikoz taşınımı azalır ve karaciğerdeki glikoz üretiminin baskılanması engellenir (Rhoades ve Bell, 2009). Bu durum diyabet oluşumuna sebep olur. Anlaşıldığı üzere adipoz doku, iskelet kası dokusu ve karaciğer dokusu hücrelerindeki insülin sinyal yolağı ve glikozun taşınması önem arz etmektedir. Bu sebeple çalışmamızda bu üç dokuyu modelleyen 3T3L1 (preadiposit), C2C12 (iskelet kası) ve Chang karaciğer hücre hatları kullanıldı.

Glikoz homeostazında ilk basamak olan glikoz alımını incelemek için glikoz metabolizmasında insülin salgısına cevap olarak glikozun hücre içine alımını sağlayan GLUT4 glikoz taşıyıcı proteinine sahip olan C2C12 (kas) ve Chang (karaciğer) hücre hatları kullanılarak, yöntem kısmında ayrıntılı olarak bahsedilen glikoz kullanım testi yapıldı. Yapılan bu deneylerle glikoz homeostazındaki kilit noktaların incelenmesi sağlanmaya çalışıldı. Amacımız, KR-62436 bileşiğinin, bu iki hücre hattında glikoz alımını tetikleyip tetiklemediğini araştırmaktı. Deneyimizde KR-62436 test bileşiğinin etkilerini belirlemek ve karşılaştırmak üzere pozitif kontrol olarak insülin ve insülin duyarlılığını arttıran bir biguanidin olan metformin kullanıldı. Glikozun yanı sıra pozitif kontrol ve test bileşiğinin eklendiği deney ortamlarındaki glikoz miktarı method kısmında anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Glikoz standart eğrisi kullanılarak C2C12 (kas) ve Chang (karaciğer) hücrelerinde başlangıç ve oluşturulan deney ortamındaki inkübasyonları sonrası ortamdaki glikoz

konsantrasyon değişimi hesaplandı. Elde edilen sonuçlara bakıldığında, pozitif kontrol olan insülin ve metformin içeren ortamdaki glikoz oranının azaldığı yani glikoz alınımının tetiklendiği gözlenirken, test bileşiminin glikoz kullanımında anlamlı bir tetikleyici etki göstermediği saptandı. Bu sonuç bizi, KR-62436 bileşiminin hücrelerde glikoz alınımını tetiklemediği dolayısıyla antidiyabetik etkinin aksine diyabetik bir etki yarattığı çıkarımına götürdü. Bununla beraber, bu bileşimin asıl mekanizmasının intestinal sistemden salınan DPP-4 enziminin inhibisyonu olduğu göz önüne alınırsa, yaptığımız çıkarımın kesinleşmesi için farklı yöntemlerin uygulanması ve başka deneylerle desteklenmesi gerekir. Glikozun hücre içine alınması insülinin reseptörüne bağlanmasıyla tetiklenir. Bundan yola çıkarak sadece pozitif kontrol olarak değil glikoz alınımını tetikleyici ajan olarak tüm deney ortamlarına insülin eklenip, yapılacak bir kontrol ortamı ile test bileşiminin hücre içine glikoz alınımını nasıl etkilediği araştırılabilir. Böylece, hiçbir etkisinin olmaması, insülinin etkin kullanımının dolayısıyla glikoz alınımının tetiklenmesi veya insülin kullanımını inhibe ederek ters etki yaratması gibi veriler ışığında bileşimin muhtemel antidiyabetik potansiyelinin glikoz alınımı üzerine etkisinin daha farklı bir açıdan incelenmesi ve bu konuda daha sağlıklı sonuçlara ulaşılabildiği sağlanabilir. İnsülin salınımı deneyinde olduğu gibi, yine, test bileşiminin uygulanan dozunda konsantrasyonunun artırılması da bir başka öneri olarak düşünülebilir. Laboratuvar ortamında yaratılma aşaması düşünüldüğünde kolon dokusunu modelleyen bir hücre hattı üzerinde de bu çalışmalar yapılabilir. Normalde etki yeri olan bu hücre hatlarındaki glikoz alınımına etkisinin araştırılması daha sağlıklı bilgilere ulaşmamızı sağlayabilir. Glikoz alınım testine ek olarak insülin sinyal yolağındaki önemli genlerin mRNA düzeylerindeki değişimlere de bakıldı. Glikoz alınım testine ek olarak, insülin yolağındaki genler ile yapılan kalitatif PZR deneylerinin sonucuna göre anlamlı artış ve azalış gösteren genler tespit edildi. Ayrıca gen ifade düzeylerinin farklı hücre hatlarında farklı şekilde etkilendiği de gözlemlendi ve analizlere göre anlamlı artış gösteren genler kırmızı renkle ifade edilirken; anlamlı azalma gösteren genler mavi renkle ifade edildi (Tablo 5.2 ve 5.3).

Tablo 5.2: C2C12 hücre hattında gen ifade düzeyinin değişimi

Gen Adı	Düşük Doz	Yüksek Doz
INSR	-2,908	-4,287
IRS1	1,283	-1,886
IRS2	-7,135	-24,084
PI3K	10,520	7,062
GLUT4	2,107	1,564
AKR	1,449	1,102
PKM	1,310	1,011
G6P	-1,717	-1,664
PEPCK	9,481	18,962

C2C12 hücre hattında PI3K ve PEPCK genlerinin NEOL ve SOYD dozların her ikisinde GLUT4 geninin SODD dozda anlamlı artış gösterdiği; INSR ve IRS2 genlerinin SODD ve SOYD dozlarının her ikisinde de anlamlı azalma gösterdiği belirlendi.

Tablo 5.3: Chang karaciğer hücre hattında gen ifade düzeyinin değişimi

Gen Adı	Düşük Doz	Yüksek Doz
INSR	0,553	0,498
IRS1	1,283	0,530
IRS2	0,140	0,042
AKR	1,449	1,102
PKL	1,310	1,011
G6P	0,582	0,601
PEPCK	2,007	2,428

Chang Karaciğer hücre hattında PEPCK geninin SOD ve SOYD dozlarının ikisinde de anlamlı artış gösterdiği; IRS2 geninin SODD ve SOYD dozlarında ve INSR geninin SOYD dozunda anlamlı azalış gösterdiği belirlendi.

Adipoz dokuyu modelleyen 3T3L1 hücresinde insülin sinyal yolağındaki önemli genlerin mRNA düzeylerindeki değişimlere bakıldı. Sonuçlar Tablo 5.4'te verildiği gibidir:

Tablo 5.4: 3T3L1 hücre hattında gen ifade düzeyinin değişimi

Gen Adı	Düşük Doz	Yüksek Doz
INSR	0,681	1,659
IRS1	0,949	1,688
IRS2	1,741	2,321
PI3K	13,785	28,671
GLUT4	0,274	0,443
AKR	0,712	1,169
PKM	0,688	0,387
G6P	0,742	0,923

3T3L1 hücre hattında PI3K geninin SODD ve SOYD dozlarının her ikisinde ve IRS2 geninin SOYD dozunda anlamlı artış gösterdiği; GLUT4 geninin SODD ve SODD dozların her ikisinde ve PKM geninin SODD dozunda anlamlı azalma gösterdiği belirlendi. Özellikle PI3K genindeki yüksek artış göze çarpmaktadır.

PZR sonucu elde edilen sonuçlarda dikkat çeken IRS, PI3K ve GLUT proteinlerini kodlayan genlerin mRNA düzeylerindeki değişimlerdi. INSR ve IRS2 genlerinin mRNA düzeylerindeki azalma insülin sinyal yolağını inhibe eden bir sonuçken; PI3K geninin mRNA düzeyindeki artma sinyal yolağını aktive eden ve GLUT translokasyonu ile glikoz alımını sağlayan bir sonuçtur. Bununla birlikte PEPCK enzimini kodlayan genin mRNA düzeyindeki artma glikoneogeneze doğru bir gidiş olduğunu göstermektedir. INSR ve IRS genlerindeki azalmayla birlikte PEPCK genindeki artma test bileşiğinin diyabetik bir etki yaptığını gösterirken; PI3K genindeki artma antidiyabetik bir etkinin göstergesidir.

İnsülin reseptörü, birbirine disülfid bağlarla bağlı iki alt birimden oluşan bir tirozin kinazdır. İnsülin bu reseptöre bağlanınca fosforilasyon ve

defosforilasyon reaksiyonlarının birbirini takip ettiği bir dizi olay başlar. Reseptör kendini fosforile eder ve aktive olur. Aktive olan insülin reseptörü, IRS1 ve IRS2 gibi diğer hücre içi proteinleri fosforile eder. IRS proteinleri, PI3K ile etkileşirler. PI3K enziminin aktivasyonu sonrasında GLUT proteinleri ile glikoz taşınması ve glikojen sentaz aktivasyonu gerçekleşir (Kashyap ve DeFronzo, 2007). GLUT proteinlerinden en önemlisi kasta ve adipoz dokuda bulunan GLUT4 proteindir. GLUT4 hücre içinde veziküllerde depolanır ve insüline yanıt olarak veziküllerden mobilize olur ve hücre zarı ile birleşerek glikozu hücre içine alır. Çalışmalar GLUT4'ün insülin uyarımına bağlı olarak gerçekleşen glikoz alımı ve kastaki glikojen sentezinde hız kontrol edici basamak olduğunu göstermiştir (Zisman ve diğ., 2000). Görüldüğü gibi glikoz ve insülin yolları birbirini etkileyen birçok protein tarafından düzenlenir. Dolayısıyla bir yargıya varmak için sadece bir gen ya da bir protein veya bir enzimin etkisine, miktarına, ifade düzeyine bakmak yeterli olmayabilir. Yapılan çalışmalarda benzer şekilde GLUT4 geni susturulan modellerde farklı tip II diyabet patolojileri gözlemlendiği ve diyabetik özellikteki hayvan ve insan modellerinde GLUT4'ün adipoz dokulardaki ifadesinin azalmasına karşılık kas dokusunda böyle bir durumun olmaması, bu durumun insülin direncine direkt sebep olamayacağı belirtilmiştir (Wood ve Trayhum, 2003). Bir başka örnek olarak; PI3K inhibitörleri, glikoz taşınımının uyarılması, glikojen ve lipit sentezi ve adipozite farklılaşması gibi insülinin metabolik faaliyetlerinin neredeyse tümünü bloke ederken; PI3K proteininin düzenleyici alt ünitesindeki bir azalma, p85 α monomerinde bir azalmaya ve insülinin fosforillenmiş IRS proteinlerine bağlanmasına yol açarak insülin etkisini arttırabilir (Taniguchi ve diğ. 2006).

Gen ifade düzeylerindeki sonuçlar DPP-4 enzimi inhibitörü olan KR-62436 bileşiğinin Kim vd. (2005) literatürdeki antidiyabetik etkisiyle çelişir nitelikte olsa da bir genin düzenlenmesinde birden fazla faktörün etkili olduğu düşünüldüğünde sadece mRNA ifade düzeylerine bakarak kesin bir yargıya varmak için yeterli değildir. GLUT proteinleriyle hücre içine alınan glikoz, glikoliz yolağına iletilir. Glikolizde üretilen ATP molekülleri ATP-duyarlı K⁺ kanallarını etkiler. Ortamda değişen polarizasyon voltaj-duyarlı kanallardan Ca²⁺ iyonunun akışını ve bu da pankreatik insülin salınımı, iskelet kasına glikoz alınımını, karaciğerde glikoz metabolizmasını dengeleyen hormonların salınımı

kontrol eder. Bu proteinleri kodlayan genlerde meydana gelecek bir polimorfizm tip II diyabete davetiye çıkarabilmektedir (Arıkoğlu ve diğ. 2012). Bu durumda sadece insülin sinyal yolağı ve glikolizde rol alan proteinlerin yanı sıra diğer membran proteinlerin yapısal ve işlevsel düzgünlüğü de önemlidir. Kalitatif PZR ile mRNA ifade düzeylerinin belirlenmesine ek olarak genlerin kodladığı proteinlerin miktarı ve aktiviteleri incelendiği takdirde daha sağlıklı sonuçlar elde edileceği öngörülmektedir. GLP-1 bağırsak hücrelerinden salınan bir polipeptittir. Bu sebeple yaptığımız çalışma bağırsak hücreleri üzerinde yapılabilecek çalışmalarla enzimatik çalışmalarla ve glikojen depolanmasının da test edilmesiyle daha iyi sınıanıp daha net sonuçlara ulaşılabilir.

Çalışmamızda DPP-4 enzimine özđü bir inhibitör olarak laboratuvarda üretilen KR-62436 bileşiğinin antidiyabetik etkisi araştırıldı. Bunun için BTC6 hücrelerinde insülin salınım testi ve C2C12 ve Chang hücrelerinde glikoz alımın testi yapıldı. Testlerin beraberinde gerçek zamanlı PZR prosedürü ile insülin sinyal yolağındaki genlerden, kullandığımız hücre hatlarında ifade edilebilirliği dikkate alınarak, bazı önemli olanların mRNA düzeyindeki ifade seviyelerine bakıldı. Testler sonucu elde edilen bulgulara göre test bileşiğinin her hangi bir antidiyabetik etki göstermediği çıkarımında bulunuldu. PZR ile elde edilen verilere göre çelişkili sonuçlara ulaşıldı. Literatür taramalarında, DPP-4 inhibitörü veya başka diyabetik ilaçlarla beraber kullanılarak çalışılmış olan KR-62436 bileşiğin olası antidiyabetik etkisinin, çalışmamızda izlediğimiz yollardan denenmemiş ve araştırılmamış olduğu görüldü. Bu durum bizim çalışmamızın özđünlüđünü gösteren bir değer olsa da aynı zamanda sonuçlarımızı kıyaslayabileceğimiz bir referansın olmaması anlamına da gelmektedir. Unutulmamalıdır ki böylesi deneyler yapmak ve daha ilerisini düşünmek mali açıdan külfetli olmaktadır. Bu yüksek lisans tez çalışması mevcut imkânlarımız ve laboratuvarımızda optimize ettiğimiz koşullar dikkate alınarak yapıldı. Ulaştığımız sonuçların kesinlik kazanması açısından daha kapsamlı projeler dâhilinde yeni prosedürler ve malzemelerle ayrıntılı çalışmalar yapılabilir.

6. KAYNAKLAR

Aguirre, V., Uchida, T., Yenush, L., Davis, R., White, M.F., “The c-Jun NH2-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser307“, *J Biol Chem*, 275 (12), 9047-9054. doi: 10.1074/jbc.275.12.9047, (2000).

Almind, K., Inoue, G., Pedersen, O., Kahn, C.R., “A common amino acid polymorphism in insulin receptor substrate-1 causes impaired insulin signaling: evidence from transfection studies“, *J Clin Invest*, 97, 2569–2575, (1996).

Altarejos, J.Y., Montminy, M., “CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals“, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(3), 141–51, (2011).

American Diabetes Association, “Diagnosis and classification of diabetes mellitus“, *Diabetes Care*, Volume 33, Supplement 1, doi: 10.2337/dc10-S062, (2010).

Anagnostis, P., Athyros, V. G., Adamidou, F., Panagiotou, A., Kita, M., Karagiannis, A “Glucagon-like peptide-1-based therapies and cardiovascular disease: looking beyond glycaemic control“, *Diabetes Obes Metab*, 13: 302–312, (2011).

Annadurai, T., Muralidharan, A.R., Joseph, T., Hsu, M.J., Thomas, P.A., Geraldine, P. “Antihyperglycemic and antioxidant effects of a flavanone, naringenin, in streptozotocin-nicotinamide-induced experimental diabetic rats“, *J. Physiol Biochem*. 68, 307-318doi: 10.1007/s13105-011-0142-y, (2012).

Arıkoğlu, H.Kaya, D. E.Özdemir, H., “İnsülin salınımının metabolik sensörleri pankreatik K_{ATP} kanallarının moleküler genetik yapısı ve patolojisi“, *Eur J Basic Med, Sci* 2(2): 56-67, (2012).

Artursson, P., “Epithelial transport of drugs in cell culture: I. A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells“, *J Pharm Sci*, 79, 476-482, (1990).

Babu, P.V.A., Liu, D.M., Gilbert, E.R., “Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids“, *J Nutr Biochem*, 24,1777-1789. doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.06.003, 2013).

Bailey, C.J., Day, C., “Traditional treatment for diabetes“, *Diabetes Care* 12, 553–564, (1989).

Bayley, J.P., Devilee, P., “The Warburg effect in 2012“, *Curr Opin Oncol* 24(1), 62–7, (2012).

Beers M. H. and Berkow R., ‘ ‘ In: Disorders of Carbohydrate Metabolism‘ ‘, *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy*, 18:1274-1276, (2006).

Bikhazi, A. B., Zwainy, N. S., Al Lafi, S. M., Artinian, S. B., Boutary, S. S., 'Type 1 diabetes mellitus: redefining the future of cardiovascular complications with novel treatments', (ed: D. Wagner), *Type 1 Diabetes Complications*, ISBN 978-953-307-788-8, under CC BY 3.0 license, (2011).

Bissonnette, P., Gagne, H., Coady, M.J., Benabdallah, K., Lapointe, J.Y., Berteloot, A., "Kin 'etic separation and characterization of three sugar transport modes in Caco-2 cells'. *Am J Physiol*, 270, G833-43, (1996).

Bogan, J.S., "Regulation of Glucose Transporter Translocation in Health and Diabetes", *Ann Rev Biochem.*, 81, 507-532. doi: 10.1146/annurev-biochem-060109-094246, (2012).

Bornfeldt, K.E., Tabas, I., "Insulin resistance, hyperglycemia, and atherosclerosis", *Cell Metab.*, 14(5), 575–85, (2011).

Brownlee, M., "The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism", *Diabetes*, 54,1615–1625, (2005).

Brunetti, A., Maddux, B.A., Wong, K.Y. and Goldfine, I.D., "Muscle cell differentiation is associated with increased insulin receptor biosynthesis and messenger RNA levels", *J Clin Invest*; 83(1), 192-198, (1989).

Brunetti, L., Kalabalık, J., 'Management of type-2 diabetes mellitus in adults' *Phar Ther*, 37(12): 687–696, (2012).

Caruso, M., Ma., D, Msallaty, Z., Lewis, M., Seyoum, B., Al-janabi, W., Diamond, M., Abou-Samra, A.B., Højlund, K., Tagett, R., Draghici, S., Zhang, X., Horowitz, J.F., and Yi, Z., "Increased Interaction with Insulin Receptor Substrate-1, a Novel Abnormality in Insulin Resistance and Type 2 Diabetes", *Diabetes*, doi: 10.2337/db13-1872, (2014).

Cell Signalling Technology., "Detailed signal transduction mechanisms of insülin". www.cellsignal.com., (2015).

Chang,T-S., Huang, S-F., Yang, T-C., Chan, F-N., Lin H-C. and Chang, W-L., "Effect of Ginsenosides on Glucose Uptake in Human Caco-2 Cells Is Mediated through Altered Na⁺/Glucose Cotransporter 1 Expression", *J. Agric. Food Chem*, 55, (2007).

Cheng, Z., Tseng, Y., White, M.F., "Insulin signaling meets mitochondria in Metabolism", *Trends Endocrinol. Metab.*, 21(10), 589–98, (2010).

Clore, J.N., Stillman, J., Sugerman, H., "Glucose-6-phosphatase flux in vitro is increased in type 2 diabetes", *Diabetes*, 49, 969-974, (2000).

Constantin, R.P., Bracht, A., Yamamoto, N.S., Ishii-Iwamoto, E.L., Constantin, J., "Molecular mechanisms of citrus flavanones on hepatic gluconeogenesis", *Fitoterapia*, 92, 148-162. doi: 10.1016/j.fitote.2013.11.003, (2014).

Cui, L., Lee, H.S., Ndinteh, D.T., Mbafor, J.T., Kim, Y.H., Le, T.V.T., Nguyen, P.H., Oh, W.K., "New Prenylated Flavanones from *Erythrina abyssinica* with Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) Inhibitory Activity", *Planta Medica*, 76, 713-718. doi: 10.1055/s-0029-1240682, (2010).

Danaei, G., Finucane, M.M., Lu, Y., Singh, G.M., Cowan, M.J., Paciorek, C.J. ve diğ., “National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants” *Lancet*, 378(9785):31–40, (2011).

Deacon C. F., Johnsen A. H., Holst J. J., ‘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’, *J Clin Endocrinol Metab* 80: 952–957, (1995).

DeFronzo RA, Gunnarsson R, Bjorkman O, Olsson M, Wahren J., ‘Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in noninsulin-dependent (type II) diabetes mellitus’, *J Clin Invest*, 76:149–55, (1985).

Demir, G., Altundağ, S., Kılınçarslan, Ö., ‘Hibiscus sabdariffa, Teucrium alyssifolium ve Myrtus communis’in HepG2 hücre hattında antidiyabetik etkilerinin araştırılması’ Yayınlanmamış Bitirme Tezi, PAÜ, Denizli, (2013).

Esmaeili, M.A. and Yazdanparast, R., “Hypoglycaemic effect of Teucrium polium: studies with rat pancreatic islets”, *J. Ethnopharmacol*, 95, 27–30, (2004).

Fritsche, L., Weigert, C., Häring, H.U., Lehmann, R., “How insulin receptor substrate proteins regulate the metabolic capacity of the liver--implications for health and disease”, *Curr Med Chem*, 15(13), 1316–29, (2008).

Gallagher, E.J., LeRoith, D., “Diabetes, cancer, and metformin: connections of metabolism and cell proliferation”, *Ann N Y Acad Sci*, 1243, 54–68, (2011).

Genet, C., Strehle, A., Schmidt, C., Boudjelal, G., Lobstein, A., Schoonjans, K., Souchet, M., Auwerx, J., Saladin, R., Wagner, A., “Structure–activity relationship study of betulonic acid, a novel and selective TGR5 agonist, and its synthetic derivatives: potential impact in diabetes”, *J Med Chem*, 53, 178–190, (2010).

George, N., Kumar, T.P., Antony, S., Jayanarayanan, S., Paulose, C.S., “Effect of vitamin D3 in reducing metabolic and oxidative stress in the liver of streptozotocin-induced diabetic rats”, *Br J Nutr*, 108(8),1410-8, (2012).

Gętek, M., Czech, N., Muc-Wierzoń, M., Grochowska-Niedworok, .E, Kokot, T., Nowakowska-Zajdel, E., “The Active Role of Leguminous Plant Components in Type 2 Diabetes”, *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014:293961. Epub (2014).

Gharaibeh, M.N., Elayan, H.H., Salhab, A.S., “Hypoglycemic effects of Teucrium polium”, *J Ethnopharmacol*, 24, 93–99, (1988).

Goodyear, L.J., Giorgino, F., Sherman, L.A., Carey, J., Smith, R.J., Dohm, G.L., “Insulin receptor phosphorylation, insulin receptor substrate-1 phosphorylation, and phosphatidylinositol 3-kinase activity are decreased in intact skeletal muscle strips from obese subjects”, *J Clin Invest*, 95, 2195-2204, (1995).

Gorovits, N., Charron, M.J., “What we know about facilitative glucose transporters”, *Biochem Mol Edu*, 31(3), 163-172, (2013).

Guariduata, L., Whiting, D. R., Hambleton, I., Beagly, J., Linnenkamp, U., Shaw, J. E., ‘Global estimates of diabetes prevalence for and projections for 2035’, *IDF Diabetes Atlas*, Diabetes research and clinical practice 103 (2014) 137-149, (2013).

Habtemariam, S., ‘The anti-obesity potential of sigmoidin A’ *Pharmaceutical Biology*, 50, 1519-1522. doi: 10.3109/13880209.2012.688838, (2012).

Harris, D.S., Slot, J.W., Geuze, H.J., James, D. E., ‘Polarized distribution of glucose transporter isoforms in Caco-2 cells’, *Proc Natl Acad Sci, U.S.A.*, 89, 7556-7560, (1992).

Hidalgo, I.J., Raub, T.J., Borchardt, R.T., ‘Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco 2) as a model for intestinal epithelial permeability’, *Gastroenterology*, 96, 736-749, (1989).

Jeong, Y.W., Lee, G.-S., Kim, J.J., Park, S.W., Ko, K.H., Kang, M., Kim, Y.K., Jung, E.-M., Hyun, S.H., Shin, T., Jeung, E.-B., Hwang, W.S., ‘Establishment of a canine model of human type 2 diabetes mellitus by overexpressing phosphoenolpyruvate carboxykinase’, *Int J Mol Med*, 30, 321-329, (2012).

Kashyap SR ve Defronzo RA., ‘The insulin resistance syndrome: physiological considerations’, *Diabetes and Vascular Disease Research*, 4, 13-19, (2007).

Katzung, B.G., ‘Basic and Clinical Pharmacology’, (Eds: Appleton ve Lange), 6. Basım, 448-457, 637-650, (1995).

Kavak S., ‘Roziqlitazonun Diyabetik Sıçan Papiller Kalp Kasının Mekanik ve Elektriksel Aktiviteleri Üzerine Etkisi’, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik Anabilim Dalı, Adana, (2008).

Kılıç, N. (çev. ed.), *Lehninger biyokimyanın ilkeleri*, 3.baskıdan çeviri, Palme yayıncılık, 2005.

Kim ,Y.S., Kim, N.H., Jung, D.H., Jang, D.S., Lee, Y.M., Kim, J.M., Kim, J.S., ‘Genistein inhibits aldose reductase activity and high glucose-induced TGF-beta2 expression in human lens epithelial cells’, *Eur J Pharmacol*, 594, 8–25, (2008).

Kim, K. R., Rhee S. D., Kim H. Y., Jung W.H., Yang S.D., Kim S.S., ‘KR-62436, 6-{2-[2-(5-cyano-4,5-dihydropyrazol-1-yl)-2-oxoethylamino] ethylamino} nicotinonitrile, is a novel dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) inhibitor with anti-hyperglycemic activity’, *Eur J Pharmacol*, 518: 63–70, (2005).

Kimura, K., Lee, J.H., Lee, I.S., Lee, H.S., Park, K.H., Chiba, S., ‘Two potent competitive inhibitors discriminating alpha-glucosidase family I from family II’, *Carbohydr Res*, 339,1035-40, (2004).

King, KD, Jones, JD and Warthen, J., ‘Microvascular and macrovascular complications of diabetes mellitus’, *Am J Pharm Educ*, Vol. 69, pp. 87, (2005).

Kumar, S., Narwal, S., Kumar, V., Prakash, O., ‘α-glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes’, *Phcog Rev*, 5, :19-29, (2011).

Kumar, S., Narwal, S., Kumar, V., Prakash, O., “ α -glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes”, *Phcog Rev*, 5, :19-29, (2011).

Kumar, V., Ahmed D., Verma, A., Anwar, F., Ali M. and Mujeeb, M., “Umbelliferone β -D-galactopyranoside from *Aegle marmelos* (L.) corr. an ethnomedicinal plant with antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidative activity”, *BMC, Complementary and Alternative Medicine*, 13, 273, (2011).

Laakso, M., Malkki, M., Kekalainen, P., Kuusisto, J., Deeb, S.S., “Insulin receptor substrate-1 variants in non-insulin-dependent diabetes”, *J Clin Invest*, 94, 1141–1146, (1994).

Larner, J., Price, J., Picariello, T., Huang, L., “Method of treating defectiglucose metabolism using synthetic insulin substances”, *United States Patent*, (1997).

Larsen P. J., Holst J. J., ‘Glucagon-related peptide 1 (GLP-1): hormone and neurotransmitter’ *Regul Pept*, 128: 97–107, (2005).

Leney, S.E., Tavaré, J.M. “The molecular basis of insulin-stimulated glucose uptake: Signalling, trafficking and potential drug targets (Review)”, *J Endocrin*, Volume 203, 1-18, (2005).

Lienhard, G.E., Slot, J.W., James, D.E., Muecklar, M.M. “How cells absorb glucose”, *Scientific American*, 206: 34-39, (1992).

Lin, C.C., “Crude drugs used for the treatment of diabetes mellitus in Taiwan”, *Am J Chin Med*, 20, 269-279, (1992).

Liu, C., Wong, P., Lii, C., Hse, H. and Sheen, L., “Antidiabetic effect of garlic oil but not diallyl disulfide in rats with streptozotocin-induced diabetes”, *Food Chem Toxicol*, 44, 1377–1384, (2006).

Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A., *Molecular cell biology*, Library of Congress Control Number: 2012932495, 7. Edition, New York, USA: W. H. Freeman and Company, 2013.

Lv, H.W., Zhu, M.D, Luo, J.G., Kong, L.Y., “Antihyperglycemic glucosylated coumaroyltyramine derivatives from *Teucrium viscidum*”, *J Nat Prod.*, 77(2), 200-5. doi: 10.1021/np400487a, (2014).

Mahraoui, L., Rodolosse, A., Barbat, A., Dussaulx, E., Zweibaum, A., Rousset, M., Brot-Laroche, E., “Presence and differential expression of SGLT1, GLUT1, GLUT2, GLUT3 and GLUT5 hexose-transporter mRNAs in Caco-2 cell clones in relation to cell growth and glucose consumption”, *Biochem J*, 298, 629-633, (1994).

Mastoi, A. A., ‘Comparison between diabetic patients and hepatitis B and C by clinical metabolic investigations’, Doktora Tezi, *Dr. M. A. Kazi Institute of Chemistry, University of Sindh, Jamshoro, Pakistan*, (2012).

Mathers, C.D., Loncar, D., “Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030”, *PLoS Med*, 3(11): e442, (2006).

Matthews, D. D., (Ed), *Diabetes Sourcebook*, (3. Ed.), Detroit, MI: omnigraphics, (2003).

McPhee SJ, Tierney LM and Papadakis MA., ‘‘Masharani U. Diabetes Mellitus & Hypoglycemia. In: Current medical diagnosis and treatment’’,(Eds: Appleton & Lange), Mc Graw Hill LANGE., 47 (Middle East Edition): 1032-1073, (2008).

Medina, R.A., Owen, G.I., ‘‘Glucose transporters: expression, regulation and cancer’’, *Biol. Res.*, 35, 9-26, (2002).

Mesonero, J., Matosin, M, Cambier, D., Rodriguez-Yoldi, M. J., Brot-Laroche, E., ‘‘Sugar-dependent expression of the fructose transporter GLUT5 in Caco-2 cells’’, *Biochem. J.*, 312, 757-762, (1995).

Mosihuzzman, M., Naheed, S., Hareem, S., Talib, S., Abbas, G., Khan, S.N., Choudhary, M.I. Sener, B., Tareen, .B., Israr, M., ‘‘Studies on alpha-glucosidase inhibition and anti-glycation potential of *Iris loczyi* and *Iris unguicularis*’’, *Life Sci*, 92, 187-192. doi: 10.1016/j.lfs.2012.11.022, (2013).

Nakae, J., Kido, Y., and Accili, D., ‘‘Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-I receptors’’, *Endocr Rev*, 22: 818–835, (2001).

Nandan, S.D., Beale, E.G., ‘‘Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA in mouse liver, kidney, and fat tissues by fasting, diabetes, and insulin’’, *Lab Anim Sci*, 42, 473-477, (1992).

Nandi, A., Kitamura, Y., C. Ronald Kahn R., Domenico Accili, D., ‘*Physiological Reviews*, 84, 623-647. doi: 10.1152/physrev.00032.2003, (2004).

Nedachi, T. and Kanzaki, M., ‘‘Regulation of glucose transporters by insulin and extracellular glucose in C2C12 myotubes’’ *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 291: E817–E828, (2006).

Nehal, M., Baquer, N.Z., ‘‘Effect of diabetes and insulin-induced hypoglycemia on hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in red blood cells’’, *Biochem Int*, 19, 185-191, (1989).

Nisha, P., Mini, S., ‘‘Flavanoid rich ethyl acetate fraction of *Musa paradisiaca* inflorescence down-regulates the streptozotocin induced oxidative stress, hyperglycaemia and mRNA levels of selected inflammatory genes in rats’’, *J Funct Foods*, Volume 5 (4) 1838-1847, (2013).

Nugroho, A.E., Lindawati, N.Y., Herlyanti, K., Widyastuti, L., Pramono, S., ‘‘Anti-diabetic effect of a combination of andrographolide-enriched extract of *Andrographis paniculata* (Burm f.) Nees and asiaticoside-enriched extract of *Centella asiatica* L. in high fructose-fat fed rats’’, *Indian J Exp Biol.*, 51(12), 1101-8, (2011).

Obrosova, I.G., Minchenko, A.G., Vasupuram, R., White, L., Abatan, O.I., Kumagai, A.K., Frank, R.N., Stevens, M.J., ‘‘Aldose reductase inhibitor fidarestat prevents retinal oxidative stress and vascular endothelial growth factor overexpression in streptozotocin-diabetic rats’’, *Diabetes*, 52, 864–871, (2003).

Oshima, Y., Sato, K., Hikino, H., ‘‘Isolation and Hypoglycemic Activity of Quinquefolans A,B, and C, Glycans of *Panax quinquefolium* Roots’’, *J. Nat. Prod.*, 1987, 50 (2), 188–190, (1987).

Parthasarathy, C., Renuka, V.N. and Balasubramanian, K., "Sex steroids enhance insulin receptors and glucose oxidation in Chang liver cells" *Clinica Chimica Acta*, 399, 49-53, (2009).

Patel, M.B., Mishra, S.H., "Cell lines in Diabetes Research: A Review", *Pharmacogn Rev*, 2(4),188-205, (2008).

Pergola, P.E., Krauth, M., Huff, J.W., Ferguson, D.A., Ruiz, S., Meyer, C.J., Warnock, D.G., "Effect of Bardoxolone Methyl on Kidney Function in Patients with T2D and Stage 3b-4 CKD", *Am J Nephrol*, 33 (5), 469-476. doi:10.1159/000327599, (2011a).

Pergola, P.E., Raskin, P., Toto, R.D., Meyer, C.J., Huff, J.W., Grossman, E.B., Krauth, M., Ruiz, S., Audhya, P., Christ-Schmidt, H., Wittes, J., Warnock, D.G., "Bardoxolone Methyl and Kidney Function in CKD with Type 2 Diabetes", *N Engl J Med*, 365, 327-336. doi:10.1056/NEJMoa1105351, (2011b).

Poitout, V., Stout, L. E., Armstrong M. B., "Morphological and functional characterization of betaTC-6 cells", *Diabetes*, 44:306-314, (1995).

Pushparaj, P.N., Tan, B.K.H., Tan, C.H., "The mechanism of hypoglycemic action of the semi-purified fractions of *Averrhoa bilimbi* in streptozotocindabetic rats". *Life Sciences*, 70, 535-547, (2001).

Rahal, A., Mahimab, Verma, A.K., Kumar, A., Tiwari, R., Kapoor, S., Chakraborty, S., Dhama, K. "Phytonutrients and nutraceuticals in vegetables and their multi-dimensional medicinal and health benefits for humans and their companion animals: A review", *J Biol Sci*, 14, 1-19, (2014).

Ramadhan, R., Phuwapraisirisan, P., "New arylalkanones from *Horsfieldia macrobotrys*, effective antidiabetic agents concomitantly inhibiting α -glucosidase and free radicals", *Bioorg Med Chem Lett*, Volume 25, Issue 20, Pages 4529-4533, ISSN 0960-894X, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.08.069>, (2015).

Rengarajan, S., Parthasarathy, C., Anitha, M. and Balasubramanian, K., "Diethylhexylphthalate impairs insulin binding and glucose oxidation in Chang liver cells", *Toxicol in Vitro*, 21, 99-102, (2007).

Rhoades RA and Bell DR., "Physiology and Body Fluids Medical Physiology. In: Principles for Clinical Medicine", *Lippincott Williams and Wilkins*, 3rd Edition: 419-441, (2009).

Rhoades RA and Bell DR., "The Endocrine Pancreas. In: Principles for Clinical Medicine", *Lippincott Williams and Wilkins*, 3rd Edition: 641-655, (2009).

Rowland, A.F., Fazakerley, D.J., James, D.E., "Mapping insulin/GLUT4 circuitry", *Traffic*, 12(6), 672-81, (2011).

Saltiel, A.R. and Kahn, C.R., "Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid Metabolism", *Nature*, 414: 799-806, (2001).

Satman, İ., Ömer, B., Tütüncü, Y., Kalaca, S., Gedik, S., Dinççağ, N., Karşıdağ, K., Genç, S., Telci, A., Canbaz, B., Turker, F., Yılmaz, T., Çakır, B., Tuomilehto, "Türkiye ve Bölge Ülkelerinde Diyabet Sorunu", *J. Eur J Epidemiol*, 28:169-180, DOI 10.1007/s10654-013-9771-5, (2013).

Schultze, S.M., Hemmings, B.A., Niessen, M., Tschopp, O., ‘PI3K/AKT, MAPK and AMPK signalling: protein kinases in glucose homeostasis’, *Expert Rev Mol Med*, 11,14:e1. doi: 10.1017/S1462399411002109, (2012).

Sechi, .IA., Griffin, C.A., Grady, E., Grunfeld, C., Kalinyak, J.E., Schambelam, M., “Tissue-specific regulation of insulin receptor mRNA in rats with STZ-induced diabetes mellitus”, *Diabetes*, 41,1113-1118, (2012).

Seifter J, Sloane D and Ratner A., ‘The Endocrine Pancreas: Fed and Fasted Metabolic States. In: Concepts in medical physiology’, *Lippincott Williams & Wilkins*. 498-507, (2005).

Sesti, G., Federici, M., Hribal, M.L., Lauro, D., Sbraccia, P. and Lauro, R., “Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders”, *The FASEB J*, 15, 2099-2111. doi:10.1096/fj.01-0009rev, (2001).

Sesti, G., Federici, M., Lauro, D., Sbraccia, P., Lauro, R., “Molecular mechanism of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus: role of the insulin receptor variant forms”, *Diabetes Metab Res Rev.*, 17(5), 363-73, (2001).

Siddle, K., “Signalling by insulin and IGF receptors: supporting acts and new players”, *J. Mol. Endocrinol*, 47(1), R1–10, (2011).

Skelin, M., Rupnik, M. and Cencič, A., “Pancreatic Beta Cell Lines and their Applications in Diabetes Mellitus Research”, *Altex*, 27, 105-113, (2010).

Sung, J.K., Koh, J.H., Lee, M.Y., Kim, B.H., Nam, S.M., Kim, J.H., Yoo, J.H., Kim, S.H., Hong, S.W., Lee, E.Y., Choi, R., Chung, C.H., “Aldose reductase inhibitor ameliorates renal vascular endothelial growth factor expression in streptozotocin-induced diabetic rats”, *Yonsei Med J*, 51, 385–391, (2010).

Taniguchi, C. M., Emanuelli, B., Kahn, C. R., ‘Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action’, *Nature Rev, Molecular Cell Biology*, Volume 7, (2006).

Thorens, B., Mueckler, M., “Glucose transporters in the 21st Century (Review)”, *Am J Physiol – Endocrinol Metab*, 298, E141-E145, (2010).

Topcu, G., Eris, C., Kurucu, S., Ulubelen, A., “A new flavanone from *Teucrium alyssifolium*”, *Turk J Chem*, 20, 265-267, (1996).

Topcu, G., Eris, C., Ulubelen, A., “Neo-Clerodane diterpenoids from *Teucrium alyssifolium*” *J Natural Products*, 60, 1045-1047, (1997).

Topcu, G., Eriş, C., Ulubelen, A., Krawiec, M. and Watson W.H., “New Rearranged Neo-clerodane Diterpenoids from *Teucrium alyssifolium*”, *Terrahedron*, 51, 11793-11800, (1995).

Trapp, C., Barnard, N., Katcher, H., “A plant-based diet for type 2 diabetes: scientific support and practical strategies”, *Diabetes Educ*; 36(1), 33-48. doi: 10.1177/0145721709357797, (2010).

Ullrich, A., Bell, J.R., Chen, E.Y., Herrera, R., Petruzzelli, L.M., Dull, T.J., Gray, A., Coussens, L., Liao, Y.C., Tsubokawa, M., Mason, A., Seeburg, P.H., Grunfeld, C., Rosen, O.M., and Ramachandran, J., “Human insulin receptor and

its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes”, *Nature*, 313, 756-761, doi:10.1038/313756a0, (1985).

Unakal, C. and Mercy Newman, M., “Antidiabetic activity of *Amaranthus dubiosus* ethanolic leaf extract on alloxan induced diabetic mice” *Int J Curr Microbiol App Sci*, 3(2), 584-590, (2014).

Ükinç, K., Gürlek, A., Usman, A., ‘Yeni antidiyabetik ilaçlar’, *Hacettepe Tıp Dergisi*, 38:113-120, (2007).

Van de Venter, M., Roux, S., Bungu, L.C., Louw, J., Crouch, N.R., Grace, O.M., Maharaj, V., Pillay, P., Sewnarian, P., Bhagwandin, N. and Folb, P., “Antidiabetic screening and scoring of 11 plants traditionally used in South Africa”, *J Ethnopharmacol*; 119, 81-86, (2008).

Vilsbol, T., Brock, B., Perrildt, H., Levin, K., Lervang, H. H., Kolendorf, K., Krarup, T., Schmitz, O., Zdravkovic, M., Le-Thi, T., Madsbad, S., “Liraglutide, a once-daily human GLP-1 analogue, improves pancreatic B-cell function and arginine-stimulated insulin secretion during hyperglycaemia in patients with Type 2 diabetes mellitus”, *DiabeticMed*, doi: 10.1111/j.1464-5491.2007.02333.x, (2007).

Wong, R.H., Sul, H.S., “Insulin signaling in fatty acid and fat synthesis: a transcriptional perspective”, *Curr Opin Pharmacol*, 10(6), 684–91, (2010).

Wood, I. S., Trayhum, P., ‘Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins’, *Br J Nutr*, 89, 3–9, doi: 10.1079/BJN2002763, (2003).

World Health Organization. “*Diabetes*”. 4 April 2014.

World Health Organization., “Global health risks. Mortality and burden of disease attributable to selected major risks”, Geneva, (2009).

Yong, H.L., White, M.F., “Insulin receptor substrate proteins and diabetes”, *Arch Pharm Res*, 27, 361-370, (2004).

Zelezniak, A., Pers, T.H., Soares, S., Patti, M. E., Patil, K. R., “Metabolic Network Topology Reveals Transcriptional Regulatory Signatures of Type 2 Diabetes”, *PLoS Comput Biol*, 6(4): e1000729, doi:10.1371/journal.pcbi.1000729, (2010).

ZenBio Instruction Manual, ‘Maintenance and Differentiation of 3T3L1 Preadipocytes to Adipocytes’, ZBM0009.02 3T3L1 Cell Care Manual, *ZenBio Inc.*, NC, USA, (2010).

Zhou, J., Chan, L., Zhou, S., “Trigonelline: a plant alkaloid with therapeutic potential for diabetes and central nervous system disease”, *Curr Med Chem.*, 19, 3523-31, (2012).

Zima, A., Hosek, J., Treml, J., Muselik, J., Suchy, P., Prazanova, G., Lopes, A., Zemlicka, M., “Antiradical and Cytoprotective Activities of Several C-Geranyl-substituted Flavanones from *Paulownia tomentosa* Fruit”, *Molecules*, 15, 6035-6049. doi: 10.3390/molecules15096035, (2010).

Zisman A, Peroni OD, Abel ED. *ve diğ.*, ” Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance”, *Nat Med*, 6 924–8, (2000).



7. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Buket AYAR

Doğum Yeri ve Tarihi : Divriği / 15.07.1990

Lisans Üniversite : Cumhuriyet Üniversitesi

Elektronik posta : ayarbuket@gmail.com

İletişim Adresi : Bahçelievler Mh. Uğur Mumcu Cd.
3023. Sk. Sağlık Müd. Loj. No:11

Kongre Bildiri Özeti Listesi :

• AYAR, B., Ozgun, O., C. TURGUT, G., YILMAZ, A., GAZIOGLU, I., TOPCU, G., SEN, A., “Evaluation of Antidiabetic Potential of Circilineol Using B-TC-6, 3T3-L1, C2C12, Chang Liver and Caco-2 Cell Lines”, IV. International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, 2015, (Middle East Technical University).

• AYAR, B., Ozgun, O., C. TURGUT, G., YILMAZ, A., GAZIOGLU, I., TOPCU, G., SEN, A., “Investigation of The In Vitro Anticancer Activities of The Diterpenoid Alysine B Isolated from Teucrium Alyssifolium”, IV. International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, 2015, (Middle East Technical University).