

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

NEONATAL VE ERİŞKİN DÖNEM ADACIK GELİŞİMİNİN PROTEOMİK
STRATEJİLER İLE AYDINLATILMASI

Hatice YILDIZHAN

Danışman Öğretim Üyesi
Doç. Dr. F. Duygu Özel DEMİRALP

TEMMUZ
2015

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağlı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Hatice YILDIZHAN

Doç. Dr. F. Duygu ÖZELDEMİRALP danışmanlığında, Hatice YILDIZHAN tarafından hazırlanan bu çalışma 09/07/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. F. Duygu ÖZEL DEMİRALP İmza:

Üye :Doç. Dr. Erkan YILMAZ İmza:

Üye :Prof. Dr. Çetin KOCAEFE İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Neonatal ve Erişkin Dönem Adacık Gelişiminin Proteomik Yöntemlerle Tanımlanması

Hatice YILDIZHAN

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Doç. Dr. F. Duygu ÖZEL DEMİRALP

Glikoz metabolizmasında gözlenen aksaklıklara bağlı diyabet gelişimi dünya genelinde çok sık rastlanan bir patolojidir. Diyabete yol açan faktörler arasında pankreas adacıklarının sayısında azalmanında yer alması nedeniyle, adacık nakli diyabet tedavisinde umut vericidir. Ancak yöntem henüz rutinde uygulanmamaktadır ve geliştirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla adacık fizyolojisinin tanımlanması önemlidir. Neonatal dönemde adacıkların çoğalma kapasiteleri erişkin döneme göre daha yüksek iken erişkin dönemde insülin metabolizması daha aktiftir. Tez kapsamında adacık nakli öncesinde yeterli hücre grubu sayısına ulaşabilmek ve insülin metabolizmasını aktifleştirebilmek için uygulanması gereken yöntemleri tanımlamak amacı ile neonatal ve erişkin dönem adacıkları arasında karşılaştırılmalı analizler yapılmıştır.

Çalışma kapsamında yeni doğan (n=18) ve erişkin (n=12) dönem Wistar sıçanlardan adacık hücreleri izole edilmiştir. İzole edilen adacıkların canlılıkları tespit edildikten sonra adacıklardan protein izolasyonu yapılmıştır. İki boyutlu jel elektroforezi ile protein haritalaması yapılarak, protein profilleri elde edilmiş ve PDQuest 8.0.1 programı ile farklı ifadelenen protein kümeleri tespit edilmiştir. Matriks Yardımlı Lazer İyonizasyon Kütle Spektrometreleri (MALDI-TOF) ile elde edilen peptit kütlelerinden MASCOT programı kullanılarak protein kimliklendirmesi yapılmıştır. Peptit kütle parmak izi (PMF) yöntemi ile tanımlanan proteinlerin adacık metabolizması üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla Cytoscape 3.1.1 programı kullanılarak ontoloji analizi yapılmış ve protein listesi proliferasyon, immün sistem ve insülin metabolizması açısından tartışılmıştır.

Neonatal dönemde adacık içinde yer alan hücrelerin çoğalma hızlarının yüksek olması ve insülin metabolizmasında gözlenen farklılıklar, bu iki yaşam dönemini nakil amaçlı çalışmalar için değerli birer kaynak haline getirmektedir. İki boyutlu jel elektroforezi ve

MALDI-TOF kütle spektrometresi kullanılarak yapılan kimliklendirmeler neticesinde adacık gelişiminde ve hücre döngüsünde etkin olan mihenk proteinler tespit edilmiştir. zet olarak yapılan çalışma ile başta enerji metabolizması proteinleri olmak üzere 19 adet proteinin neonatal ve erişkin dönem aktivitetlerinde etkin olabileceği tespit edilmiştir.

2015, 88 sayfa

Anahtar Kelimeler: Adacık nakli, MALDI-TOF, neonatal dönem adacıkları, erişkin dönem adacıkları, 2-D jel elektroforezi

ABSTRACT

M.Sc Thesis

Identification of differences between neonatal and adult stage islets by using Proteomics Strategies

Hatice YILDIZHAN

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Doç. Dr. F. Duygu ÖZEL DEMİRALP

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disease that has high incidence around the world. One of the reasons of diabetes is islet beta cells dysfunction. Islet transplantation is a promising way for treatment of diabetes. Although there are some limitations such as beta cell mass and immune reaction, it is possible to overcome these problems by further studies on islet physiology. To elucidate underlying physiological mechanisms, neonatal and adult stage islets were compared at the protein level.

In this study, pancreatic islets were isolated from neonatal rats (n=18) and adult wistars (n=12). In order to measure islet viability, Floresceindiacetate/propidium iodide (FDA/PI) staining was performed after isolation. Two groups of isolated islets were analyzed by bottom-up proteomic strategies to detect differentially expressed proteins. Briefly, islet protein profile maps were compared by PDQuest 8.01 software and proteins were identified with Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF/MS) by Peptide mass fingerprint (PMF) analysis. The identified proteins were analyzed by using Cytoscape 3.1.1. tool to elucidate important factors for islet transplantation regarding proliferation, immunity and insulin stimulation activity.

Neonatal and adult stages were compared to overcome islet transplantation limitations caused by insulin metabolism differences, beta cell number, immune attacks. Neonatal and adult stages islets comparisons can be promising strategy in enlightning the underlying molecular mechanisms to improve islet transplantation. In this study; we showed that while energy metabolism is important for neonatal islet proliferation, chapaeron molecules are crucial for adult stage's insulin metabolism rate.

2015, 88 pages

Keywords: Diabetes, MALDI-TOF, neonatal stage islets, adult stage islets, 2-D gel electrophoresis

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince bana bilgi ve tecrübesiyle yol gösteren, dağıldığım zamanlarımda yönümü bulmamı sağlayan, her anlamda destek olan ve laboratuvar imkânlarından yararlanmamı sağlayan canım hocam Sayın Doç. Dr. F.Duygu ÖZEL DEMİRALP'e,

Çalışmalarım süresince bütün sorularımı nezaketle karşılayan, bilgi ve tecrübesini bütün samimiyetiyle paylaşan ve biz öğrencilerine her zaman destek olacağını bildiğim sevgili hocam Sayın Yrd.Doç. Dr. Doruk ENGİN'e,

Laboratuvara geldiğim ilk günden itibaren arkadaşlıklarını ve tecrübelerini benden esirgemeyen, grup arkadaşından ziyade aile gibi gördüğüm değerli çalışma arkadaşlarım Beycan AYHAN, Naşit İĞCİ, Selen PEKER, Pınar BARKAN, Seçil KARAHİSAR TURAN, Şerife KORKMAZ'a,

Tüm hayatım boyunca bana destek olan ve her zaman yanımda olacaklarını bilmenin vermiş olduğu güvenle hayata karşı daha sağlam durmamı, istediğim şeylerin peşinden gidebilmemi sağlayan biricik ailem annem Firdevs YILDIZHAN, babam Halil YILDIZHAN, kardeşlerim Rıdvan ve Ramazan YILDIZHAN'a,

Uzun yıllardır yanımda olan, tanıştığımız günden itibaren iyi kötü heranımı paylaştığım dostum Gamze ÇAĞATAY'a; tezimin her aşamasında bana destek olan, beni benden çok anlayan Cemre DEMİR'e,

Tez çalışmamın deneysel aşaması için her türlü imkân ve olanakları bana açan Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı çalışanlarına,

113Z124 ve 214Z276 numaralı 1001 ve 1002 projeleri kapsamında verdiği maddi desteğinden dolayı Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırmalar Kurumu (TÜBİTAK)'a

TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM.

Hatice YILDIZHAN

ANKARA, Temmuz 2015

İÇİNDEKİLER

1	GİRİŞ	1
2	KURAMSAL TEMELLER	2
2.1	GLİKOZ METABOLİZMASI	2
2.1.1	PANKREAS HAKKINDA GENEL BİLGİ	2
2.1.2	PANKREAS ADACIK HÜCRE DAĞILIMI	4
2.1.3	LANGERHANS ADACIKLARININ İÇERİĞİNDE YER ALAN HÜCRELERİN FONKSİYONLARI VE SALGILARININ METABOLİZMADAKİ ROLÜ	5
2.1.4	PANKREASIN GLİKOZ METABOLİZMASINDAKİ ROLÜ	8
2.2	DİYABETES MELLİTUS HAKKINDA GENEL BİLGİ	9
2.2.1	DİABETES MELLİTUS ALT GRUPLARI	10
2.2.2	DİABETES MELLİTUS KOMPLİKASYONLARI	11
2.3	DİYABET TEDAVİSİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER	12
2.3.1	DİYET	12
2.3.2	FARMAKOLOJİK TEDAVİ YÖNTEMLERİ:	13
2.3.3	İNSÜLİN ALIMI:	14
2.3.4	DİYABET TEDAVİSİNDE TRANSPLANTASYON	15
2.3.4.1	Pankreas Doku Nakli	15
2.3.4.2	Adacık Hücre Grubu Nakli	16
2.4	ADACIK GELİŞİM SÜRECİ	19
3	GEREKÇE VE AMAC	22
3.1.1	GEREKÇE VE AMAÇ	22
4	MATERYAL VE YÖNTEM	23
4.1	MATERYAL	23
4.2	YÖNTEM	23
4.2.1	SIÇAN ADACIK HÜCRELERİNİN İZOLASYONU	23
4.2.1.1	Edmonton Protokolü ile adacık izolasyonu	24
4.2.1.2	Adacıkların Sayı, Saflık ve Morfolojik Değerlendirilmesi:	25
4.2.1.3	Adacık Hücrelerinin Canlılıklarının Değerlendirilmesi:	25
4.2.2	ADACIK HÜCRELERİNDEN PROTEİN İZOLASYONU	26
4.2.2.1	Protein miktar tayini (Bradford Yöntemi)	27
4.2.2.2	İki yönlü jel elektroforezi/2-DE ile proteinlerin ayrıştırılması	27
	□ İzoelektrik noktalarına göre ayırma (IEF)	28
	□ SDS Page jel (Molekül ağırlıklarına göre ayırma)	29
	□ Jel üzerindeki proteinlerin tespiti/boyama (OrioleFluorescent Gel Stain)	29
4.2.2.3	Jellerin görüntüsünün alınması (VERSA DOC)	30
4.2.2.4	Jellerin analizi (PDQUEST 8.0.1)	30
4.2.2.5	Jel üzerinden protein kümelerinin kesilmesi ve proteinlerinin tripsin ile peptitlerine ayrılması	30
4.2.2.6	Kütle Spektrometresi cihazında (MALDI-TOF MS) peptit kütlelerinin belirlenmesi.	31
4.2.2.7	PMF Biyoinformatik analizleri	32

4.2.2.8 Ontoloji ve Yolak Analizleri	37
5 BULGULAR	38
5.1 ADACIK İZOLASYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ	38
5.1.1 IEQ BİLGİLERİ:	38
5.1.2 DTZ BOYAMASI SONUÇLARI:	38
5.2 PROTEOMİK ÇALIŞMALAR	40
5.2.1 PROTEİN MİKTAR TAYİNİ	40
5.2.2 İKİ BOYUTLU JEL ELEKTROFOREZİ	42
6 SONUÇLAR VE TARTIŞMA	58
6.1 DİYABET TEDAVİSİNDE PROTEOMİK YAKLAŞIMLARIN ÖNEMİ	58
6.2 PROLİFERASYON ETMENLERİ AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ	59
6.3 İMMÜN SİSTEM AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ	64
6.4 İNSÜLİN SALINIMI AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ	65
6.5 ASINAR HÜCRE KAYNAKLI TESPİT EDİLEN PROTEİNLER	69
6.6 TARTIŞMA ÖZET	69
KAYNAKLAR	73
EKLER	86
ÖZGEÇMİŞ	87
TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR	88

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Pankreas genel anatomisi	3
Şekil 2.2 Adacık hücre gruplarının içeriği	4
Şekil 2.3 Beta Hücrelerinden insülin salınımının şematik olarak gösterilmesi.....	6
Şekil 2.4 İnsan adacık izolasyonu ve naklinin şematik gösterimi.....	16
Şekil 2.5 Adacık hücre grubunun DTZ ile boyanmasının şematik olarak gösterimi.	17
Şekil 2.6. Edmond Ryan ve arkadaşlarının 65 Tip 1 diyabetli hasta ile gerçekleştirdikleri deneyde beşinci yıl süresince HbA _{1c} takip verileri.....	19
Şekil 4.1 Protein kümesinin ifade verisinin PDQuest 8.1.1 programı ile gösterimi.Jel üzerinde buldukları bölgeler (çerçeve içine alınmıştır ve kümelerin özellikleri çizelgelerde verilmiştir) ve küme yoğunluklarının grafiksel gösterimi	33
Şekil 4.2 Protein kümesinden elde edilmiş peptitlerin, MALDI TOF MS ile tespit edilmiş kütleler.....	34
Şekil 4.3 .Kesimi yapılan protein kümesinin mascot araştırma sonucu	35
Şekil 4.4. Protein kümesinden tespit edilen Trim 35 proteinine ait bilgiler, eşleşen peptitlerin proteinde buldukları kompozisyonları ve sekansları	36
Şekil 5.1.DTZ Boyaması Sonuçları.....	39
Şekil 5.2. FDA/PI Boyaması sonuçlarının tek bir örnek ile temsili sunumu.	39
Şekil 5.3 Standard OD değerleri neticesinde elde edilen grafik ve R ² değeri.....	41
Şekil 5.4.Neonatal ve erişkin dönem adacıklarının protein haritalarının gösterimi.....	43
Şekil 5.5. İki gruba ait deney özetleri tablosu görüntüsü	44
Şekil 5.6. PDQuest programında küme(spot) eşleştirilmesi (matchset) sonucu bulunan protein spotları ve deneysel değerler.....	45
Şekil 5.7 Elde edilen neonatal iki boyutlu protein profil haritaları	46
Şekil 5.8 Elde edilen erişkin adacık iki boyutlu protein profil haritaları	47
Şekil 5.9 Kesim yapılan spotlardan protein tanımlaması yapılabilen spotlar	47
Şekil 5.10. Tanımlaması yapılan spotlardan anlamlı fark olan protein kümelerinin grafik ile gösterimi.....	53
Şekil 6.1. Purin metabolizması ve AMPD2'nin rolü	62

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1 2-D jel elektroforezi için kullanılan gruplar ve gruplan ile ilgili veriler.....	28
Çizelge 4.2 MALDI-TOF MS cihazının kalibrasyonunda kullanılan peptitler.....	32
Çizelge 4.3 Protein kümesinin yoğunluk verilerinin piksel cinsinden değerleri.....	34
Çizelge 5.1 Bradford yöntemi ile protein miktar tayini için kullanılan standartların OD Değerleri.....	40
Çizelge5.2 Standartların ve örneklerin OD değerleri.....	41
Çizelge 5.3 Bradford sonuçlarına göre birinci boyut ayrımları için gereken toplam örnek ve rehidrasyon tamponu miktarları	42
Çizelge 5.4 Kütle spektrometresi ile tanımı yapılan protein kümeleri ve bu kümelere ait bilgiler	48
Çizelge 5.5. PMF yöntemleri ile tanımlaması yapılan protein kümelerinin anlamlı fark gösteren ifade verileri.....	51
Çizelge 5.6. Tanımlaması yapılan proteinlerin KEGG,Cytoscape programları kullanılarak ontolojisi ve buldukları yollar	54
Çizelge 6.1. Tanımlanan proteinlerin üç etmen açısından özet değerlendirme tablosu	70

SİMGELER DİZİNİ

2-DE	İki Boyutlu Jel Elektroforezi
Cys_CAM	Sistein Karbamidometil
FISH	Floresan InSitu Hibridizasyon
M	Monoklonal protein
MALDI	Matriks Yardımcı Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu
SSP	Sample spot protein
PMF	Peptide Mass Fingerprint/Peptit Kütle Parmakizi
TOF	Time of Flight
CHCA	α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid.
UPR	Katlanmamış Protein Cevabı
ACTH	Adrenokortikotropik Hormon
BSA	Sığır serum albumini
cAMP	Siklik adenzin monofosfat
DTT	Dithiothreitol
EGF	Epidermal büyüme faktörü
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
Glu-Fib	Glu 1- fibrinopeptit B
IAA	İyodoasetamit
IEF	İzoelektrik Nokta Odaklama
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IL-6	İnterlökin-6
IPG	İmmobilize pH gradiyent
MAPK	Mitojen-aktif protein kinaz
PI3K	Fosfatidilinositol-3 kinaz
PKA	Protein kinaz A
EPI	Egzokrin pankreas yetersizliği
FPG	Hızlı plazma glikozu
HDPP	Human Diabetes Proteom Project
IAPP	Adacık amiloid polipeptit

1 GİRİŞ

Diabetes Mellitus yüksek kan şekerinin sebep olduğu komplikasyonlarla ortaya çıkan metabolik bir hastalıktır. Yüksek kan şekeri iki sebepten açığa çıkar. Yeterli insülin üretilmemesi; Tip 1 diyabet, üretilen insülinin vücut hücrelerince metabolize edilememesi; Tip 2 Diyabet olarak karşımıza çıkmaktadır. Tip 1 Diyabetin sıklığı Tip 2 diyabete oranla daha düşüktür. Günümüzde tip 1 diyabet tedavisi için insülin alımı gerekmektedir. Diabetes Mellitus (DM) patolojisinde insülin yetersizliğinden kaynaklı olan tipleri için çeşitli tedavi yöntemleri arasında adacık nakli umut vadetmektedir. İki temel patoloji gösteren diyabette adacık naklinin ön plana çıkan bir tedavi yöntemi olmasının sebepleri arasında hastaların ilaç almadan uzun süreler hayatlarını idame ettirebilmeleri yer almaktadır. Bu sürenin ömür boyuna uzatılmasına yönelik çalışmalar sürmektedir. Bu tedavinin uygulanabilmesi için bazı problemlerin aşılması gerekmektedir. Bunların başında izole edilen hücre sayısının yetersizliği gelmektedir. Ayrıca immün sistem saldırıları ve nakledilen hücrelerin insülin salınımının yeterli düzeye ulaşamaması da engel teşkil etmektedir. Bu engellerin aşılmasına yönelik çalışmalar hızla devam etmektedir.

Literatür bilgisi bize göstermektedir ki, neonatal dönem adacıklarının proliferasyon hızı erişkin döneme oranla on kat daha fazladır (1). Buna ek olarak neonatal dönem adacıklarının immün sistem saldırılarına karşı kendilerini daha iyi korudukları düşünülmektedir. Ayrıca erişkin dönem adacıkları glikoz stimüle insülin salınımında neonatal döneme göre daha aktiftir. Bu amaçla organizmalarda hücresel işlevlerin tam olarak anlaşılması için ifade edilen proteinlerin tanımlanması, sentez sonrası geçirdikleri değişimlerin saptanması ve organizmada buldukları yerler ve miktarlarının belirlenmesi önem arz etmektedir. Tez çalışması kapsamında, yeni doğan ve erişkin dönem Wistar sıçan adacıklarının karşılaştırmalı proteom analizleri ile adacık hücre gelişim sürecinde etken moleküllerin protein düzeyinde tanımlanması ve bu süreç esnasında adacık fizyolojisinde farklılık gösteren özelliklerin altında yatan moleküler mekanizmaların incelenmesi hedeflenmiştir.

2 KURAMSAL TEMELLER

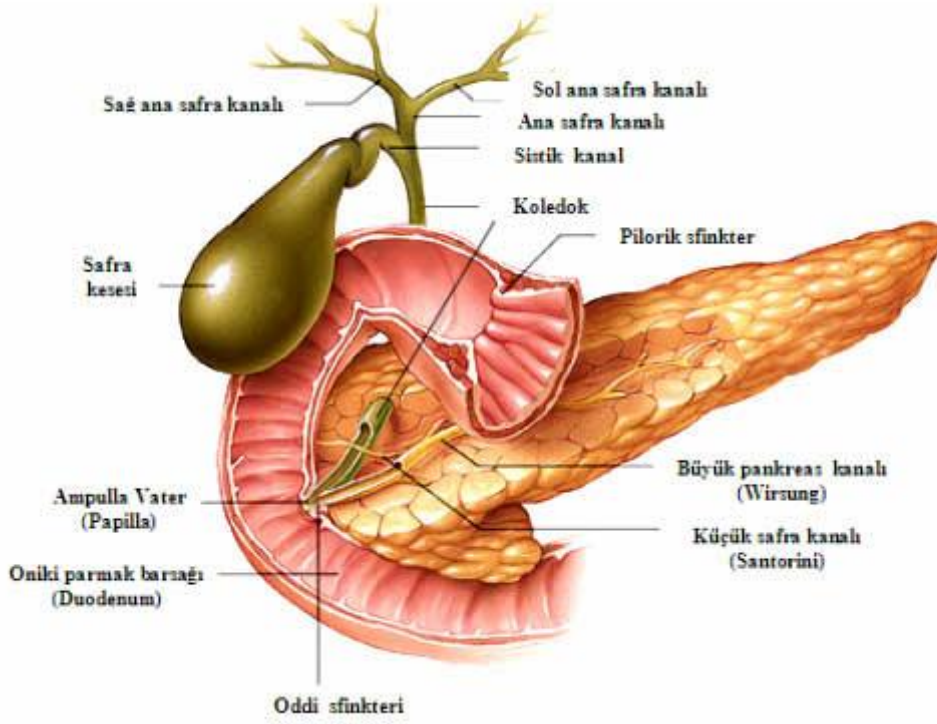
2.1 GLİKOZ METABOLİZMASI

Bilindiği gibi, günlük yaşamdaki temel fonksiyonların gerçekleşebilmesi için gerekli enerji glikozdan elde edilir. Glikoz molekülü tüketilen besinlerden temin edilir ve sindirim kanalı yolu ile alınan glikoz kana karıştıktan sonra hücrelere enerji amacı ile taşınır, Glikozun organizmada dengede tutulabilmesinden temel olarak insülin ve glukagon hormonları sorumludur (2). Glikoz metabolizmasında rol alan iki temel hormondan biri olan insülin, pankreasta bulunan ve adacık hücre grubunun büyük çoğunluğunu oluşturan beta hücreleri tarafından salgılanmaktadır (3). Glikoz iç dengesinin sağlanmasında rol alan diğer etken hormon glukagondur ve bu hormon pankreasta yer alan alfa hücreleri tarafından sentezlenmektedir. İnsülin-glukagon işbirliğinde oluşabilecek dengesizlikler sonucu diyabet patolojisi gözlenmektedir.

2.1.1 Pankreas Hakkında Genel Bilgi

Pankreas antik zamanlardan beri dikkat çeken bir organ olmuştur. Pankreasın ilk adlandırması antik Yunan döneminde “bütün beden” anlamına gelen “pan kreas” olarak yapılmıştır (4). Adlandırmasından da anlaşılacağı üzere pankreas, vücut dengesinin korunmasında etken role sahip bir organdır (5).

Pankreas yaklaşık olarak 70-100 gram ağırlığında pembemsi bir renge sahip ve mide ile küçük bağırsak arasında yer alan bir organdır (5). Pankreas hem ekzokrin hemde endokrin salgı fonksiyonu gerçekleştirebilen dokulardan biri olmakla birlikte organizmada farklı görevlere sahiptir. Bu fonksiyonları gerçekleştiren hücreler dinamik bir özelliğe sahiptir. Pankreas dokusunda görev dağılımı koşullara bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (6).



Şekil 2.1 Pankreas genel anatomisi (7)

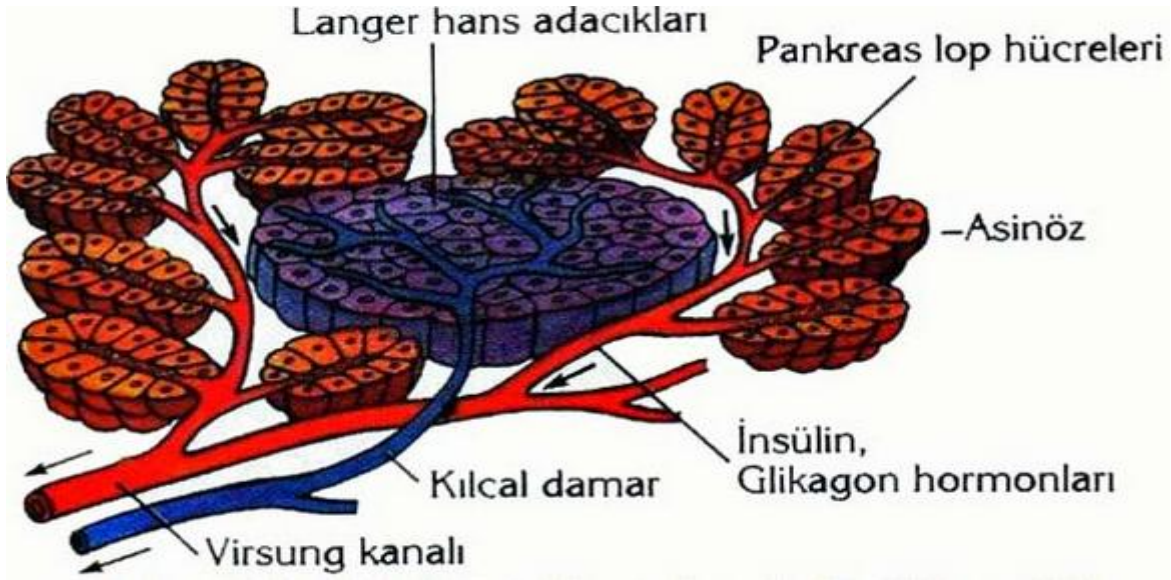
Pankreasta bulunan hücrelerin bir bölümü küçük gruplar halinde koordineli olarak çalışmaktadır. Bu koordinasyon ile oluşan hücre grubuna Langerhans Adacıkları denmektedir ve pankreasın endokrin fonksiyonu gösteren hücre grubunu oluşturmaktadırlar (8). Detaylı olarak 2.1.2 alt başlığında anlatıldığı gibi, adacık grubu hücreleri temel olarak dört hücre grubundan oluşmaktadır (5). Bu konu detaylı olarak alt başlıkta incelenecektir.

Endokrin fonksiyonuna ek olarak pankreas aynı zamanda ekzokrin aktiviteye de sahiptir. Ekzokrin fonksiyonu daha çok sindirim tabanlı olarak fonksiyon görmektedir. Pankreasta karbonhidrat, protein ve yağların sindiriminde rol alan enzim ve biyoaktif maddelerin salgısından asinar (acinar) hücreleri sorumludur. Asinar hücrelerin bu fonksiyonu sindirimde ve besinlerin hücre içine alımı ve emiliminde önemli rol oynamaktadır. Bu enzimler arasında lipaz, amilaz, tripsin ve kimotripsin gibi enzimler yer almaktadır. Enzimlerin fonksiyonlarının hassasiyeti nedeniyle düzenlenmesinde birçok endojen ve ekzojen yolaklar etki etmektedir (5,9). Pankreasın ekzokrin fonksiyonunda oluşacak aksaklıklar çeşitli hastalıklar ile sonuçlanmaktadır. Bu hastalıkların ortak özelliği ise malnutrisyon olarak bilinmektedir ve alınan besinlerin organizmanın enerji ihtiyacını

karşılacak düzeyde olmaması ya da tam verimle kullanılamaması anlamına gelmektedir (10).

Özetle pankreas vücutta glikoz iç dengesi başta olmak üzere birçok hormon ve enzimin salgılanmasından sorumludur.

2.1.2 Pankreas Adacık Hücre Dağılımı



Şekil 2.2 Adacık hücre gruplarının içeriği (11).

Adacık grubunun hücre içeriğinde alfa, beta, delta ve F (PP) hücreleri bulunmaktadır. Hücrelerin yerleşimi şekil 2.1-2’de gösterildiği gibidir. Bu hücre grubunun içerik yüzdesi canlıya göre değişiklik göstermektedir. İnsana yakınlık derecesi en yüksek olan farelerin içerik yüzdesi alfa, beta, delta ve PP hücreleri için sırasıyla % 25, %60-70, %5-15 ve %2’dir (5).

Adacık hücrelerinin tipini klasik boyama teknikleri ile ayırmak pek mümkün olmamakla birlikte, salgıladıkları peptid tabanlı hormonlar yardımıyla hücre tipleri ayrılabilir. Beta hücreleri insülin salgısından sorumlu iken, alfa hücreleri insülin ile dengede olacak şekilde sentezlenmesi gereken glukagon hormonunun salgılanmasından sorumludur. Delta

hücreleri somatostatin hormonunu salgılayan, yüzde içeriği en düşük olan hücre grubu olan F hücreleri pankreatik polipeptit salgısından sorumludur (12).

2.1.3 Langerhans Adacıklarının İçeriğinde Yer Alan Hücrelerin Fonksiyonları ve Salgılarının Metabolizmadaki Rolü

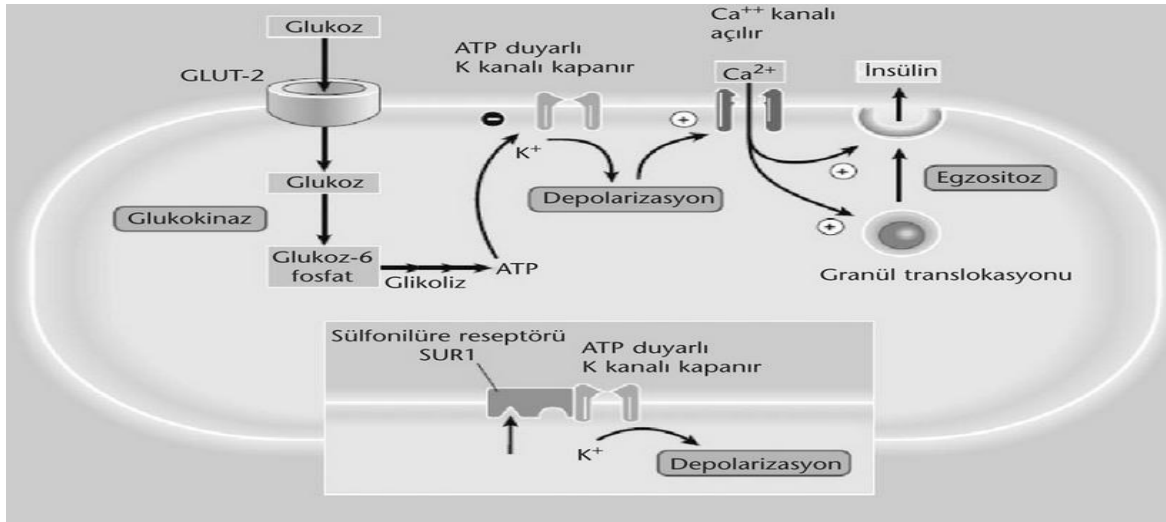
Adacık hücreleri birbirleriyle iletişimde ve küme halinde bulunmalarına karşın, birbirlerinden farklı özelliklere ve farklı salgılara sahip oldukları yukarıda belirtilmiştir. Bu başlık altında ilk olarak adacık içeriğinde en yüksek yüzdeye sahip olan beta hücrelerinden bahsedilecektir.

Beta Hücreleri (β hücreleri) normal bir insanda pankreas ağırlığının yaklaşık %2'sini oluşturmaktadır. Bu oran ağırlık cinsinden yaklaşık olarak 1-2 grama karşılık gelmektedir. (13). Beta hücreleri insülin, C-peptit ve amylin adı verilen üç temel hormonun salgısından sorumludur. Bunlardan C-peptit hormonu, insülin ile eşit molaritelerde salgılanmaktadır ve beta hücrelerinin miktarlarının belirlenmesinde kullanılan bir moleküldür. Diyabete bağlı olarak gelişen nöropati gibi komplikasyonların engellenmesinde rol almaktadır (15).

Amylin ise ağırlıklı olarak beta hücreleri tarafından salgılanan ve adacık amiloid polipeptit (IAPP) olarak da bilinen peptit tabanlı bir hormondur (15–17). İlk olarak Oxford Üniversitesi'nde tanımlanan bu polipeptitin, geniş çaplı etkileri olduğu bilinmektedir. En çok dikkat çeken özelliklerinden biri glikoz iç dengesi üzerindeki etkisidir. Ayrıca amino asitlerin uyarımı ile gerçekleşen glukagon hormonunun salınımını engelleyerek, endojen glikoz alımı üretimini düşürebildiği de bilinmektedir (16,18).

Adacık hücre grubunda yer alan ve ikinci büyük kütleyle sahip olan bir diğer hücre alfa hücreleridir. Alfa hücrelerinin tarihi 1907'deki keşfiyle başlar. Alfa hücrelerinin temel görevi bir polipeptit türevi olan glukagon hormonunu salgılamaktır (19). Bu görevine ek olarak beta hücrelerinin oluşumunda da etken rol oynadığı düşünülmektedir (20,21). Alfa hücrelerinden salgılanan glukagon hormonu insülin bağlı olarak glikoz metabolizmasında önemli rollere sahiptir. Bu alanda kanda glikoz konsantrasyonunun artması durumunda aktive olan glukagon salgısı ile bu denge korunmaya çalışılır (38-40).

Beta hücrelerinin vücuttaki en temel fonksiyonu insülin yapımı ve yüksek miktarlarda depolayabilme-salgılayabilme kabiliyetidir. Beta hücrelerinden salgılanan insülinin dengede tutulması hayati önem taşımaktadır. Beta hücrelerinden insülin salınımındaki temel regülatör glikoz seviyesidir. Glikozun normal bir insandaki seviyesi 4-8 mM arasında olmalıdır ve bu da hücre yüzeyinde bulunan glikoz taşıyıcı reseptörler ile sağlanmaktadır (23,24). Eğer hücre dışında glikoz seviyesi yüksek ise, hücre içine glikoz alımı gerçekleşir, beta hücresinde bulunan glikokinaz enzimleri sayesinde glikoz metabolizmaya alınır ve ATP üretimi gerçekleşerek, ATP'nin ADP'ye dönüşümü artar. Dinlenme sürecinde açık olan ATP- duyarlı kanallar kapanır; beta hücrelerinin sitoplazmik kısmının biriken potasyum iyonu ile birlikte negatif özellik kazanmasıyla. dengede -70 mV olan zar potansiyeli artar (25). Bu durumda zar dengesini sağlamak için kalsiyum kanalları açılır ve hücre içine kalsiyum iyonu geçişi olur. Kalsiyum iyonunun hücre içine akışı zar dengesini sağlamanın yanında, hücre içinde insülin içeren keseciklerin zara doğru hareket etmesini sağlar. Böylece beta hücrelerinin içinde bulunan insülin hormonu, egzozitoz ile dışarı salınır (26–28).



Şekil 2.3 Beta Hücrelerinden insülin salınımının şematik olarak gösterilmesi (29).

Beta hücrelerinden salgılanan insülin, glikoz iç dengesinde en etken moleküllerden biridir. Bu durumda insülinin yapısını ve işlevlerini daha yakından incelemek faydalı olacaktır. İnsülin 51 amino asitten oluşan, 5808 Da ağırlığında anabolik bir polipeptit hormundur. Karaciğer, kas ve yağ gibi hedef dokularda etkinlik göstererek enerji iç dengesini kontrol

eder. Karbonhidrat metabolizması üstündeki etkisinin yanında insülinin vücut üstünde oldukça geniş spektrumlu etkileri vardır (30).

İnsülinin amino asit sekansı omurgalı canlılar arasında yüksek derecede korunmuştur. INS geninden sentezlenen preproinsülin sahip olduğu 24- kalıntı sinyal peptiti ile granüllü endoplazmik retikuluma gider (RER) (31). Daha sonra sinyal peptitleri kesime uğrar ve preproinsülin, RER'de proinsulin olarak sentezlenir (32). Daha sonra RER'de doğru şekilde katlanan proinsulin, trans-golgi ağına (TGN) gider. Hücre içinde bulunan endopeptitazlar yardımı ile proinsülin aktif insüline dönüşür. Bu aşamada görev alan endopeptitaz enzimler prohormon konvertaz ve karboksipeptitaz E'dir (33). Endopeptitaz kesimi proinsülin üstünde iki noktada gerçekleşmektedir. İlk kesimle C-peptit ile B ve A zincirleri oluşmaktadır ve ikinci kesim sonrasında B ve A zincirlerine birbirlerine disülfid bağı ile bağlanmaktadır ve daha sonra aktif haldeki insülin gerekli metabolik sinyaller için hücre içi keseciklerde bekler (34).

İnsülinin organizmada çeşitli yollarda rol aldığına daha önce değinilmişti. Bu rolleri arasında karbonhidrat metabolizması, yağ metabolizması vb gibi organizma canlılığı açısından hayati önemi olan yollar bulunmaktadır (30-34).

Pankreasın fonksiyon kaybında organizmada gözlenmesi beklenen metabolik bozukluklar ya da hastalıklar olması doğaldır. Pankreasta oluşabilecek hataların sonucunda olması muhtemel hastalıklar şöyle sıralanabilir: pankreatitis; pankreasın rutinde salgıladığı tripsin enziminin bağırsak sistemi dışında pankreasta aktif olması halinde pankreasta oluşan inflamasyon ile meydana gelen fonksiyon bozukluğudur (36). Egzokrin pankreas yetersizliği (EPI), çoğunlukla köpeklerde görülen ancak diğer sistemik bozukluklar etkisi ile insanda da görülme olasılığı olan bir rahatsızlıktır. EPI, pankreasta sindirimden sorumlu hücrelerin fonksiyonelliğini bir şekilde yitirmesi sonucunda sindirimin ya da besin emiliminin yetersizliği ile tanımlanabilir (37,38). Sistik fibrosis hastalığı da pankreas tabanlı bir rahatsızlıktır. Sistik fibrosis adında yer alan 'cyst' pankreasta oluşan kütle anlamına gelmektedir. Bu rahatsızlık esasen 'cystic fibrosis transmembrane conductance regulator' (CFTR) geninde meydana gelen mutasyon sonucu oluşan ve erken ölüme neden olan bir rahatsızlıktır (39,40). Diabetes mellitus, pankreastaki insülin ve glukagon

hormonlarının dengesizliği sonucunda oluşan bir hastalıktır. Diyabet hastalığı ve pankreas ilişkisinden aşağıdaki b6l6mlerde detaylı olarak bahsedilecektir.

2.1.4 Pankreasın Glikoz Metabolizmasındaki Rol6

Kandaki glikoz miktarının d6zenlenmesi, canlılık için hayati 6nem taşımaktadır unk6 glikoz canlılık için en temel ihtiyaç olan enerjinin kaynağıdır. Bu sebepten v6cut glikoz dengesini sağlamak için hassas reg6lasyon sistemlerine sahiptir (41,42). Organizmanın glikoz kaynağı 6 yoldan elde edilir. Bunlar sırasıyla; besinlerden alınan glikoz, karaciğer ve adipoz dokuda depo halde bulunanlar ve son olarak glikoz kaynağı glukoneogenesis ile farklı 6nc6 molek6llerden elde edilen glikozdur (43). H6crelerin enerji elde edebilmeleri için kandan aldıkları glikoz seviyesinin normal homeostaziste olması beklenmektedir. Kandaki glikoz seviyesinin 6l6m6 için farklı metotlar kullanılmaktadır. Bunlardan hızlı plazma glikoz (FPG) seviyesinin 6l6m6 bilinen en standart metotlardandır, hem hızlı hem de g6venilir sonuç alınabilen bir y6ntemdir. Bu y6ntemle 6l6len plazma glikoz seviyesi yaklaşık olarak 79.2 – 110 mg/dL değerleri arasında olmalıdır (44).

Kan glikoz seviyesindeki dengenin dar bir aralıkta tutulmasının 6neminden yukarıda bahsedilmiştir. Bu dengenin sağlanmasından pankreas adacık h6creleri sorumludur. Adacık h6crelerinden salgılanan ins6lin ve glukagon birbirleri ile ters y6nde geri-beslenme (feed-back) mekanizması ile çalışmaktadır (45–47).

Eğer kan glikoz seviyesi d6şerse, pankreas adacık h6crelerinde alfa h6creleri glukagon hormonu salgılar. Bu hormonun etkisi ile karaciğerde bulunan glikojen depoları yıkılır (glikoneolizis) ve karaciğer kana yıkılan glikojenden açığa çıkan glikozu salar. B6ylece kandaki glikoz seviyesinde artış olur (48). Eğer karaciğerdeki glikojen depoları yetersiz ise, glukagon hormonu bu defa da karaciğer ve dalağı ekstra glikoz sentezlemesi için uyarır, glukoneogenesis reaksiyonunu başlatır. Bunlara ek olarak, kandaki glikoz seviyesini azaltan, karaciğerdeki glikolizis reaksiyonunun durmasını sağlar. Glukagon bu fonksiyonunu gerçekleştirmek için bir G protein (G protein – coupled receptor) resept6r6ne bağlanarak konformasyonda değişikliğe sebep olur. Bu değişim sonucunda adenilat siklaz enziminin aktivasyonu gerçekleşir. B6ylece sırayla siklik AMP, protein kinaz A, fosforilaz kinaz ve fosforilaz A enzimlerinin aktivasyonu gerçekleşir. Aktif

haldeki fosforilaz A, glikojenden glikoz ayrılışını sağlayarak, karaciğerden glikoz salınımını artırır (49,50).

Glukagonu da etkileyen ve kan şekeri düzenlenmesindeki esas faktör olarak bilinen hormon insülin hormonudur. İnsülin hormonu, glukagonun aksine kan şekerini düşürmeye yönelik fonksiyon gösterir. İnsülin besinlerden elde edilen glikozun, karaciğerde glikojen olarak depolanmasını (glikojenez) aktive ederek kandaki glikoz seviyesinde artış olması durumunda glikoz miktarının düşürülmesini sağlar. Buna ek olarak insülin, kandaki glikozun hücreler tarafından alınmasında da rol oynar (2,51–53).

Glikoz metabolizmasında oluşabilecek aksaklıklar sonucu kan şekerinin homeostazisinin bozulması ile bazı metabolik rahatsızlıkların oluşması olasıdır. Bu fonksiyonların bozulması ile oluşan olası aksaklıklar hiperglisemi ya da hipoglisemidir.

Hiperglisemi, kan şekerinin olması gereken değerden daha yüksek olması durumudur. Hipoglisemi ise kan şekerinin beklenen değerden daha düşük olduğu durumlar için kullanılan bir terimdir. Bu iki mekanizma ve organizmadaki etkileri daha detaylı bir şekilde aşağıdaki başlıklarda açıklanacaktır (54).

Kanın şeker homeostasisinin bozulması sonucunda olası hastalıklar yukarıda bahsedilmiştir. Ancak bu hastalıklar başında gelen Diabetes mellitus daha detaylı olarak incelenecektir.

2.2 DİYABETES MELLİTUS HAKKINDA GENEL BİLGİ

Diabetes Mellitus organizmanın glikoz seviyesini dengede tutamamasından kaynaklı olarak ortaya çıkan, majör ve minör komplikasyonlara sebep olan bir rahatsızlıktır. Diyabetin komplikasyonları çeşitlilik gösterirken, temel patolojisi hiperglisemi durumudur. Diyabete ilk olarak Mısır kayıtlarında rastlanmıştır ve sık idrara çıkma ve kilo kaybı ile tanımlanmıştır. Daha sonra antik Yunan kayıtlarında rastlanan Diabetes Mellitus'da diyabet, geçip giden anlamına gelirken; mellitus bal ve tatlı anlamına gelmektedir (55). Diyabet bazı ülkelerde hastalık olarak bile kabul edilmez iken, dünyada her 10 saniyede 1 kişinin hayatını kaybettiği bir rahatsızlıktır. Dünya genelinde 2003 yılında 194 milyon kişi

diyabete yakalanmış iken 2025 yılında bu rakamın 380 milyon kişi olması beklenmektedir (56).

2.2.1 Diabetes Mellitus Alt Grupları

Diabetes Mellitus'ta temel patoloji hiperglisemi olmakla birlikte, diyabet oluşum tiplerine göre çeşitlilik göstermektedir. Bu çeşitlilikteki temel farklar insülin salgısından sorumlu beta hücrelerinin kütle olarak azalması, salınan insülinin çeşitli sebeplerden dolayı etkin olarak fonksiyon gösterememesi ya da belli durumlarda geçici olarak görülen hiperglisemi bu ayrımın yapılmasında kullanılan ana faktörlerdir.

Tip 1 Diyabet: Tip 1 Diyabet, oto-immün saldırılar sonucu gözlenmektedir. Tip 1 diyabette hiperglisemi oluşumu beta hücrelerinin immün sistem hücreleri tarafından yıkılması ile oluşur. Bu yıkımda CD4, CD8 T hücreleri ve antijen sunucu hücre grupları (makrofaj, DC, doğal öldürücüler) etken rol oynamaktadır (57). Bu tip diyabet genetik ve çevresel faktörlerin etkisi ile oluşmaktadır ve görülme sıklığı 100,000 kişide 8-17 olarak bilinmektedir, tip 2 diyabete oranla daha nadirdir (58). Yapılan çalışmalar ışığında HLA (insan lökosit antijenleri) grubunun hastalık oluşumunda etken rol oynadığı ispatlanmıştır. İmmün-sistemin aktifleştirilmesi için 6. Kromozomdan ifadelenen HLA antijenlerin taşıdığı peptitlerin immün hücreler tarafından yabancı olarak algılanması gerekmektedir (59). HLA'lar farklı gruptan oluşmaktadır ve bunlardan DR ve DQ olarak bilinen iki HLA grubu, tip 1 diyabetin oluşumuna öncülük etmektedir (59). Doğal genetik yatkınlığa ek olarak tip 1 diyabete bazı virüslerin enfeksiyonun da katkı sağlayabileceği düşünülmektedir (60). Tip 1 diyabet grubunda sınıflandırılacak ancak etioloji olarak farklılık gösteren diğer alt formlarda mevcuttur ancak hepsinin ortak noktası insülin üreten beta hücrelerinin kütledeki azalmaya bağlı olarak hiperglisemi oluşumudur.

Tip 2 Diyabet: En sık görülen diyabet türüdür. Tip 2 Diyabet, insülinin yetersiz olarak salgılanması ve insülin alması gereken hücrelerin insüline karşı dirençli olması ile karakterize edilmiştir (61). Uzun dönemde hayati fonksiyonları tehdit edecek düzeyde komplikasyonları vardır ve dünya genelinde hızla ilerlemekte olan bu hastalığın iki grubu vardır. Bunlar obeziteli diyabet ve obezitesiz olanıdır. Obeziteli diyabette abdominal yağların düzensiz dağılımı sonucunda vücut hücrelerinin oluşan endojen insüline karşı dirençli olmasının yanında obezitesiz diyabet insülin üretim ve salınımında meydana gelen aksaklıklar neticesinde oluşur (55). Bu tip diyabetin oluşumunda genetik faktörlerin

etkisinden ziyade hayat stili ve diyet daha etkindir. Bu sebepten tip 2 diyabeti önlemek amaçlı pek çok ülkede insanları bilinçlendirmeye yönelik kampanyalar yapılmaktadır.

Gastesyonel ve Diğer Diabetes Mellitus Türleri: Gastesyonel Diyabet hamilelik ve emzirme döneminde görülen ve sonrasında geçen yani kronik olmayan bir diyabet türüdür. Hamilelik döneminde hızlı glikoz yüklenmesi ile yüksek miktarda sentezlenen insüline karşı hücrelerin oluşturduğu direnç ile karakterize edilen bir diyabet alt türüdür (62).

2.2.2 Diabetes Mellitus Komplikasyonları

Diyabet hiperglisemi ile karakterize edilmiş bir hastalık olmasının yanında bu durumun getirdiği diğer komplikasyonlarda belirtiler arasında tanımlanmaktadır. Bunlar aşağıdaki gibi sıralanabilir;

Ketoasidosis (DKA): Diyabetin ilk belirtilerinden biri olmakla birlikte, yüksek alkol alımı sonucunda da oluşabilir. Vücuttaki insülin miktarı yetersiz olunca karaciğer depolanmış yağ asitlerini yakmaya başlar. Böylece keton cisimcikleri oluşur, sık idrara çıkma gözlenir ve kan ile idrar yüksek miktarda keton içerir. İlerlemiş durumdaki bir DKA, rahatlıkla hipertansiyon, şok ve hatta ölüme yol açabilir (63).

Hiperosmatik Durum (HNS): DKA ile benzer patoloji göstermesine karşın, tamamen farklı sebeplerden meydana gelir. HNS patolojisinin gözlenmesinde kanda bulunan yüksek glikoz sebebiyle hücreden kana sıvı geçişi etkindir. Kana geçen sıvı ile böbrekler glikozu sıvı ile atmaya başlar ve kanın osmotik dengesi bozular. Vücuttaki düzensizlikler neticesinde hücreler dehidrate olur ve diğer komplikasyonlarla beraber akut dengesizlikler görülür (64).

Hipoglisemi: Kandaki düşük glikoz miktarı ile karakterize edilen bu durum bazı diyabet tedavileri sonrasında nadiren gözlenen bir durumdur (61). Eğer çok ağır seyreden bir durum gözlenmiyorsa kişi doğrudan dekstran ya da başka karbonhidrat türevi alarak kendini tedavi edip oluşacak muhtemel etkileri telafi edebilir. Daha ağır seyreden durumlarda dışarıdan doktor kontrolü ile glukagon alımı gerekli olabilir. Eğer durum daha sıkıntılı ise pankreasın bir bölümünün alınması ile çözüme ulaşılmaya çalışılır (65).

Diyabetin akut komplikasyonlara ek olarak, kronik komplikasyonları da mevcuttur. Bu komplikasyonlar endotel hücrelerinin yüksek glikoz seviyesi ile dejenere olan kılcal damarlar dolayısıyla daha fazla glikoz alması esasına dayanır. Sonrasında gerçekleşen yüksek glikoprotein sentezi ile hücreler daha kalınlaşır ve daha zayıf hal alır. Diyabet sonucu oluşan bu tür komplikasyonlar mikrovasküler ve makrovasküler hastalıklar olmak üzere iki temel gruba ayrılır (66,67). Makrovasküler hastalıklarda, dolaşım sistemindeki damarlar 2-3 kat daha geniş olup, kalp krizine, ek olarak ülser ve kangrene de sebep olabilir. Mikrovasküler rahatsızlıklar ise daha çok kılcal damarların diyabet sebebi ile hasarlanması ile oluşan rahatsızlıklardır. Bu grupta nöropati (sinir sistemi hasarı), nefropati (böbrek rahatsızlığı) ve retinopati (gözde meydana gelen hasar) yer almaktadır. Diyabetik Nöropati, oluşan bölümlere göre, sürecinde değişiklikler oluşan bir hastalık grubudur ve his kaybı, acı ve zayıflık olarak kendini gösterir. Nefropati ise renal hastalıkların kökeni olarak bilinir ve çoğunlukla böbrek nakli ile sonuçlanır. Retinopati ise retinal vaskülerin zarar görmesi ile oluşur. Görme kaybı ile sonuçlanabilecek kadar ilerleyebilir. Bunlara ek olarak diyabetik ayak olarak bilinen, ayak morfoloji ve yüzeyinde oluşabilecek rahatsızlıklar ile hayat kalitesini düşürebilecek faktörler arasında yer almaktadır. İşte bu komplikasyonlar neticesinde, diyabet hayat standartlarını düşürmenin yanında ilerlemiş durumlarda koma ve hatta ölüme neden olabilecek kadar tehlikeli bir hastalıktır (68–70). Diyabetin yüzde yüz tedavisi günümüz şartlarında olmamakla birlikte, tedavi amaçlı kullanılan yöntemlerden aşağıda bahsedilmektedir.

2.3 DİYABET TEDAVİSİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER

Diyabet tedavisinde amaç kanın yüksek olan glikoz seviyesini hipoglisemi yapmadan mümkün olduğunca normal seviyeye taşımaktır. Bu amaç doğrultusunda kullanılan tedavi yöntemleri diyet kontrolü, ilaç kullanımı, günlük insülin enjeksiyonu ve ağır seyreden durumlarda nakil gibi ameliyatlar olarak özetlenebilir (71).

2.3.1 Diyet

Henüz başlangıç seviyesinde olan diyabetin tedavisinde dengeli beslenmenin önemi yadsınamayacak kadar çoktur. Dengeli beslenme Amerikan Diyabetliler Kurulu tarafından günlük besin alımı içerik yüzdeleri şöyle açıklanmıştır; %45-65 karbonhidrat, %25 yağ ve kalanı protein içerikli olmalıdır (72). Diyabet hastalarının günlük beslenmelerinde aldıkları

karbonhidrat kontrolünü yapabilmeleri gerekmektedir çünkü ancak bu kontrol ile enjeksiyon yoluyla alınan insülinin etkin olarak çalışması sağlanabilmektedir. Karbonhidrat kontrolünün yanında, kolesterolde kontrol altında tutulması gereken öğeler arasında bulunmaktadır, günlük kolesterol alımı 300 mg ile sınırlı olmalıyken eğer kişide kolesterol tabanlı rahatsızlık mevcut ise bu durum da doktor tavsiyesi ile kontrollü alımı sağlanmalıdır. Bütün bunlara ek olarak, eğer diyabetli hastada nefropati oluşumu gözlenirse protein alımında günlük 0.8 kg gibi bir rakamın altında tutulmasına özen gösterilmelidir. Yukarıda bahsi geçen mevzulardan yola çıkarak, diyabet komplikasyonlarının etkisini azaltmak hatta ortadan kaldırmak için dengeli beslenme vazgeçilmez bir unsur olarak karşımıza çıkmaktadır. Dengeli beslenmenin yanında kişi yaptığı egzersizler ve kilo kontrolü ile diyabet komplikasyonlarını kontrol altına alabilir.

2.3.2 Farmakolojik Tedavi Yöntemleri:

İlaçların ağız yoluyla ya da enjeksiyon yolu ile alınımı ile de kandaki şeker seviyesi kontrol edilebilir. Bu amaçla kullanımda olan ilaçların modları yani etki mekanizmaları birbirinden farklılık gösterebilir ancak hepsi ortak bir amaca hizmet etmektedir. Hipergliseminin oluşma sebebi doğrultusunda ilaçlardan hangisinin kullanılacağına karar verilmektedir. Oral ilaç alımı çoğunlukla tip 2 diyabet hastaları için uygulanmakta olup, farklı etki mekanizmaları devreye girmektedir. Genel olarak özetlemek gerekirse, tip 2 diyabette ilaçların modları insülin sentezini arttırmaya yönelik, hücrelerin insüline karşı olan duyarlılığını arttırmak ya da hücrelerdeki karbonhidrat yıkımını engellemek temel amaçlardan da sayılmaktadır (73,74). Etki mekanizmalarını kısaca özetlemek ve örneklemek gerekirse; insülin sekresyonunu arttırmak amaçlı kullanılacak ilaçlar grubunda sülfonilüre aktivitesi üzerinden çalışan ilaçlar bulunmaktadır. Bu ilaçlar beta hücre yüzeyinde yer alan sülfonilüre reseptörünü inhibe ederek hücre içine kalsiyum alımını hızlandırarak insülin hormon salınımı arttırmırlar. Bu yolla çalışan ilaçlara TZD ve metformin örnek olarak verilebilir (75–77). Diğer mekanizma ise hücrelerin insülin duyarlılığını arttırmak olacaktır. Bu yolla etki eden ilaçlara Biguniades verilebilir. Bu ilacın etki mekanizması adenosin mono-fosfat protein kinaz reseptörünü aktive eden bu ilaç bu yolla hepatik hücrelerde glukoneogenez reaksiyonunu inhibe ederek hücrelerin daha az salgılanan insüline karşı daha duyarlı olmasını sağladığı düşünülmektedir. Ancak bu ilacın henüz net bir şekilde etki mekanizması açıklanamamaktadır (78–80). Oral yol ile kullanılan tedavi yöntemlerine son olarak alfa-glikoz inhibitörlerinden bahsedilecektir. Bu

inhibitörler sindirim sisteminde nişasta temelli besinlerin sindiriminden sorumlu olan alfa glikoz enzimini inhibe ederler böylece kana glikoz salınımı yavaşlatılmış olur. Acarbose bu ilaçlara örnek olarak verilebilir (81–83).

Oral yol ile alıma ek olarak enjeksiyon yolu doğrudan kana verilerek etki eden ve peptit analogları olan ilaçlarda bulunmaktadır. İlk olarak glukagon-benzer peptit (GLP-1) grubuna örnek vermek gerekirse exanatide gibi ajanlar hücre yüzeyinde bulunan GLP reseptörüne bağlanarak beta hücrelerinde insülin salınımını artırır. Bu gruba ek olarak amilin benzeri peptitlerde bulunmaktadır. Pramlitide glukagon hormon sentezini azaltarak, insülin salınımını arttırmaya yönelik etki eder (84).

2.3.3 İnsülin Alımı:

Farmosatik grubunda yer alan insülin enjeksiyonunu özel olarak incelemek gerekecektir. İnsülin dışarıdan alımı her iki grup diyabet için geçerli olmakla birlikte tip 1 diyabette ki önemi elzemdir çünkü tip 1 diyabet durumunda doğrudan beta hücrelerinin ölümü sonucu oluşan hiperglisemi için en olası çözüm düzenli olarak insülin alımı olacaktır. Ancak insülin enjeksiyonu tip 2 diyabet içinde kullanılmaktadır. İnsülinin glikoz metabolizmasının regülasyonundan sorumlu temel hormon olması sebebiyle insülin alımının sıkı kontrol altında olması gerekmektedir. Olası yan etkilerinden dolayı insülin alımı doktorlar tarafından mümkün olduğunca ertelenmeye çalışılır. Ancak ilaçların fayda etmediği durumlarda başvuru ikinci etken tedavi yöntemidir.

İnsülin etki mekanizması evrim sırasında korunduğu gibi yapısal özellikleride farklı türler arasında yüksek benzerlik göstermektedir. Bu durum bizlere tedavi amaçlı insülin eldesi için diğer canlılarında kullanılabilmesini sağlamaktadır. 1980’li yıllarda keşfedilen rekombinant DNA teknolojileri ile yapay insan insülinini üretmek mümkün olmuştur. Bu teknoloji ile yüksek miktarlarda elde edilen insülinin izolasyonu ve işlenmesi rahatlık kazanmıştır. Günümüzde kullanılan insülin iğnelerini bu teknolojiye borçluyuz (85).

İnsülin teknolojisi bugün yüksek verimle tedavide kullanılabilir. Ancak insülini üretilip, organizmaya vermekle diyabetik komplikasyon sorunları çözülememektedir çünkü organizma içinde insülin sıkı regülasyona tabi tutulan bir hormondur. Dışarıdan alım ile bu regülasyon sağlanamayacağı için olası yan etkileri bulunmaktadır. Bunlar arasında

hipoglisemi oluşumu ilk sırayı alır çünkü insülinin adsorpsiyonunda ki kontrolsüzlük ile kan şekerinde artış olabilir ve bu durum beraberinde daha farklı komplikasyonları getireceği için dikkat edilmesi gereken bir husustur. İnsülin alerjisi, dirençliliği, lipopihipertopi gibi hastalıklarda dışarıdan inhale ya da enjekte ile alınan insülinin yan etkilerindedir (86).

İşte bu olası yan etkilerden dolayı, araştırmacılar insülinin üretimini mümkün olduğunca organizma içinden sağlamaya çalışmışlar ve sonucunda nakil çalışmaları çıkmıştır. Bu konu bir alt başlıkta daha detaylı incelenecektir.

2.3.4 DİYABET TEDAVİSİNDE TRANSPLANTASYON

Dışarıdan müdahaleler ile insülin dolayısıyla glikoz metabolizmasının regülasyonunda oluşan sıkıntılar dolayısı ile glikoz metabolizmasının en önemli organlarından biri olan pankreas ve insülin-glukagon hormonlarının salınımından sorumlu adacık hücrelerinin nakli söz konusu olmuştur. Bu nakil reaksiyonları ile canlı, insülin kontrolünü vücut durumuna göre düzenleyebileceği için daha etkin bir tedavi olacağı düşünülmüştür. Nakil reaksiyonları iki tiptir ve her iki tipinde kendi içinde aşağıda bahsedildiği gibi avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır.

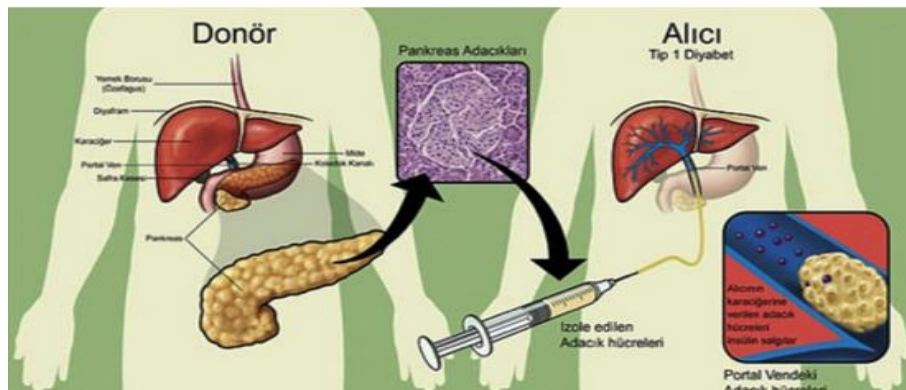
2.3.4.1 Pankreas Doku Nakli

Kadavradan alınan pankreasın uygun alıcıya aktarılmasıdır. Günümüzde hala rutinde optimize edilemeyen bir tedavi yöntemi olmakla birlikte dünya genelinde 32 000 başarılı pankreas nakli ameliyatları gerçekleştirilmiştir. Pankreas nakil ameliyatları oldukça zorlu geçen bir ameliyattır (87). Pankreas vücut için hayati fonksiyonları yerine getiren bir organ olduğu için nakil esnasında donörden gelen pankreas uygun bir şekilde alıcıya eklenmeden çıkarılması ciddi kayıplara yol açabilir. Bu durumu kompanse edebilmek için donör pankreası uygun bir alana eklendikten sonra alıcının pankreası çıkartılabileceği gibi özel sistemler ile alıcı pankreasının döngüsü vücuda eklenerek donör uygun alana yerleştirilebilir (88,89). Pankreas nakli çoğu zaman tek başına yapılmaz çünkü böyle bir riske giren ya da böyle bir ihtiyaç içinde olan hastaların pek çoğu renal fonksiyonlarını da yitirdiği için pankreas çoğunlukla böbrek ile koordineli bir şekilde nakledilir. Aksi durumlarda yani böbrek nakli olmadan nakillerde zaten böbrekleri zayıflamış olan hastalar

nakil ile daha da güç duruma düşüp diyalize ihtiyaç duyabilirler. Bütün organ nakli, nakil kaynak ve böbrekle birlikte nakil sırasına göre dört temel gruba ayrılır. Bunlar pankreas nakli, önce pankreas sonra böbrek , pankreas ve böbreğin aynı anda nakli ve kadavradan alınan pankreas ile nakildir. Bu gruplarda en sık karşılaşılan problem doku uyumu olacağı için ve aynı anda iki organdan uyum beklendiği için uygun donörün bulunmasıdır. Pankreas naklinin uygun koşullarda yani böbrekle bir yapılabilmesi durumunda uzun dönemli insülin bağımsızlığı gözlenmiştir. Bu nakiller neticesinde elde edilen uzun dönemli insülin bağımsızlığı beraberinde bazı komplikasyonları da getirmektedir. Öncelikli olarak nakil ameliyatları sonrasında hastanın kullanması gereken immün-baskılayıcı ilaçlar ve yan etkileri örnek olarak verilebilir. Söz konusu iki adet organ nakli olduğu için bu ilaçların dozajlarındaki artış ile immün sistemin baskılanması olası enfeksiyonlara davetiye çıkaracaktır. Bu duruma ek olarak olası başka komplikasyonlar da söz konusu olacaktır. Pankreasta, nakil öncesi maruz kaldığı işlemler sebebiyle nakil sonrası pankreatitis oluşumu gerçekleşebilir. Bu durum, ileride kansere yol açabileceği için ciddi patoloji riski taşımaktadır. Tromboz oluşumu, hemorajik ve dolaşım sisteminde oluşabilecek ekstra aksaklıklarda söz konusu olabileceği için araştırmacılar daha invaziv yöntemler bulma arayışına geçmişlerdir ki buda adacık nakli çalışmalarını başlatmıştır.

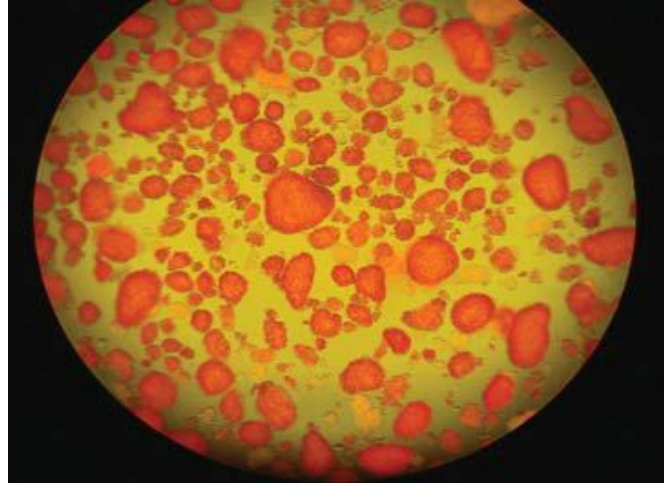
2.3.4.2 Adacık Hücre Grubu Nakli

Langerhans adacık hücre nakli özellikle tip 1 olmak üzere umut vadeden bir tedavi yöntemi olmuştur. Adacık nakli uygulanan 65 tane tip 1 diyabet hastasının insülin bağımsızlığı 5 yıl kadar sürmüş ve bunlardan %10'unun insülin bağımsızlığı 5 yıldan daha uzun sürmüştür (90).



Şekil 2.4 İnsan adacık izolasyonu ve naklinin şematik gösterimi (91).

İzolasyon protokolünü kısaca özetlemek gerekirse; öncelikle kollojenaz gibi enzimler karaciğer duct damarından eklenerek pankreasın şişmesi sağlanır. Bu aşama sıçanlar için gereklidir çünkü bu tür hayvanlarda pankreas dokusu jel kıvamında olduğu için alımı zor olacaktır. Bunu önlemek için doku öncelikle şişirilir ve eklenen enzim ile parçalama işlemi de başlatılmış olur. Daha sonra jel kıvamındaki pankreas için 0,45 um çapındaki elekler yardımı ile doku mekanik parçalamaya tabi tutulurken, aynı zamanda adacık gruplarının genişliği doğrultusunda geçişine izin verir. İnsan pankreas dokusu katı formatta olduğu için ricordi kazanı yardımıyla hem mekanik hem enzimatik kesim uygulanır. Ricordi kazanı, özel aksamı ile enzimin döngüsel olarak dokuyla etkileşmesini sağlamaktadır. Bunun yanında içindeki bilyeler ile mekanik olarak pankreas dokusu mekanik olarak parçalanmaktadır. Parçalama işlemi sonrasında elde edilen hücre grupları ağırlıklarına göre ayırım gerçekleşir, 1060 civarındaki adacık hücreleri pipet yardımıyla ayrıldıktan sonra eğer sıçan gibi küçük miktarlarda ise elle aşağıdaki şekildeki gibi gözlenen adacıklar toplanarak asinar hücrelerden ayrılır. Ancak insan gibi büyük miktarlarda hücre grubu söz konusu ise elle toplama işlemi gerçekleştirilmez ve sonrasında elde edilen hücreler RPMI 1640 ya da Miami besiyerleri ile kültüre alınır (92–94).



Şekil 2.5 Adacık hücre grubunun DTZ ile boyanmasının şematik olarak gösterimi (92).

Bu işlemler sonrasında elde edilen adacıklar üstünde kültür esnasında daha sağlıklı nakiller yapmak ve nakil ömrünü uzatmak amacıyla modifikasyonlar yapmak mümkün olduğundan dolayı, adacık nakil öncesi çalışmalara yönelim giderek artmaktadır (95).

Adacık naklinin pankreas doku nakline olan avantajları arasında implementasyon işlemlerinin daha az invaziv yöntemlerle gerçekleşmesi yer almaktadır. Adacık naklinin de

bazı limitasyonları söz konusudur. Bu limitasyonları aşmak için kültür aşamasında yapılan çalışmalar aşağıdaki gibi özetlenebilir:

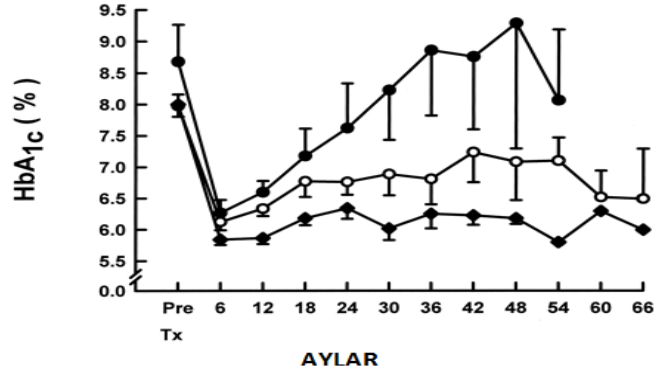
İlk olarak karşılaşılan problem adacık hücre sayısındaki yetersizlikler olmuştur. Hücrelerin pek çoğu nakil esnasında görülen hipoksi sonucunda ölmesi ile, nakil için gerekli olan hücre sayısına tek bir donörden ulaşmak mümkün olmamaktadır. Bu nedenle, nakil için hastaya iki donör gerekli olmaktadır. Ancak bu durumda HLA uyumluluğu söz konusu olacağı için nakil olasılığı yarı yarıya düşecektir. Bu durumun üstesinden gelebilmek için adacık hücre sayısını arttıracak çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalara GABA uygulanması örnek olarak verilebilir, ayrıca yapılan son çalışmalar ile birlikte gelişim esnasında pankreas dokusunun gelişmesine katkı sağlayan ajanlar tanımlanmaya çalışılmaktadır. Bu tür ajanlar yardımı ile nakil için gerekli sayıya tek bir donörden elde edilmesi hedeflenmektedir (96-98).

Bu limitasyonların giderilmesinde yapılan diğer çalışmalarda ise nakli yapılan hücrelerin immün sistemden korunması amaçlanmaktadır. Nakil esnasında ve sonrasında hücre gruplarının büyük bölümü komplement sistem ve diğer bağışıklık fonksiyonlarına gitmektedir. Bu problemin üstesinden gelinmesi için yapılan farklı araştırmalar bulunmaktadır. Örneğin, immün sistem hücrelerinin aktivasyonunda rol alan CTL-4 gibi moleküllerin ifadesinin baskılanması ya da oto-antijen olarak tanımlanmış ajanların ortadan kaldırılması gibi çalışmalar yapılmaktadır. Ancak yapılan bu çalışmaların rutin olarak uygulanabilir olması için hücrelerin kanser hücrelerine dönüşme tehlikesinin de ortadan kaldırılması için araştırmalara devam edilmektedir (99,100).

Bunlara ek olarak sayı kaynaklı sıkıntıları aşmak için beta hücrelerinin salgı kapasitesini artırmaya yönelik ilaç çalışmaları yapılmaktadır. Salgı kapasitelerinin artırmaya yönelik olan çalışmalar ile az sayıda kullanılan hücre ile daha fazla etki elde edilebilir.

Registry, 2010 yılı raporuna göre 1999-2009 yılları arasında 571 hastaya adacık nakli gerçekleştirilmiştir. Nakil yapılan hastaların %60'ı bir yıl boyunca insülin almalarına gerek kalmadan hayatına devam ederken, %50'si ikinci yılın sonunda 14 gün kadar insülin almadan devam edebilmiştir. Buna ek olarak Ryan ve arkadaşlarının 2005 yılında 65 hasta

ile gerçekleştirdikleri çalışmadan elde ettiği verileri özetleyen grafik şekil 2.3-3'te gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Edmond Ryan ve arkadaşlarının 65 Tip 1 diyabetli hasta ile gerçekleştirdikleri deneyde beşinci yıl süresince HbA_{1c} takip verileri

2.4 ADACIK GELİŞİM SÜRECİ

Pankreatik adacık hücreleri en çok özelleşen hücre gruplarından olmakla birlikte gelişim sürecinde yaşanan değişimleri henüz tam olarak aydınlatılamamış hücre gruplarıdır. Adacık gelişim sürecinin aydınlatılması adacık nakli için önem arz etmektedir. Gelişim süreci basamaklarının öneminden bahsetmeden önce pankreas ve adacık grubunun gelişimden ve bu gelişimde yer alan etken yollardan kısaca bahsetmek gerekmektedir, çünkü beta hücrelerinin embriyogenez aşaması yeni hücre kaynakları için önemlidir. Gastrulasyon evresi sonrası oluşan ektoderm, mezoderm ve endoderm tabakalarından endodermal katmanda pankreas oluşumu gözlenir. Bu oluşum komşu dorsal ve ventral endodermilerin ve FGF, TGF β , VEGF, retinoik asit, Sonik hedgehog hedeflerinin karşılıklı iletişimi neticesinde E 9,5 gününde oluşum gözlenir. Daha sonra E13,5. günde asinar hücreleri merkeze doğru ilerleyerek adacık oluşumunu başlatır. Gelişim döneminde transkripsiyonel kontrol altında olmasından dolayı, gelişim sürecinde etkin olan yolların tanımlanması önemlidir. Bu amaçla yapılan çalışmalara örnek olarak adenoviral transfeksiyon yöntemi ile Ngn3 geninin ifadenmesi artırılarak pankreatik kanal hücreleri, beta hücreleri gibi hareket etmeye ve insülin salgılamaya başlamıştır (27).

Gelişim sürecinin incelenmesi yeni hücre kaynaklarına ek olarak gelişim dönemleri arasında adacık fizyolojisinde gözlenen farklılıklar sebebiyle de önemlidir. Gözlenen fizyolojik farklılıkların başında adacık beta grubu hücrelerinin proliferasyon hızının çok daha yüksek olmasıdır (101–103). Günümüzde adacık içi hücrelerinin kaynağı henüz tam olarak açıklanamamakla birlikte ileri yaş döneminde adacık gelişiminde neogenez ve proliferasyonun önemli olduğu düşünülmektedir. Her iki durum için de adacık gelişim sürecinin aydınlatılması önemlidir. Bu durum yeni doğan dönemi adacıklarının farklılaşma çalışmaları için de önemli bir kaynak haline getirmektedir. Beta hücre kütlelerinin artırılmasına yönelik çalışmalar büyük önem arz etmektedir çünkü beta hücre kütleindeki azalma hem tip 1 hemde tip 2 diyabet durumunda hiperglisemi ile sonuçlanmaktadır. Bilindiği üzere tip 1 diyabette beta hücreleri oto-immün saldırılar ile azalmakta ve diyabeti oluşturmaktadır. Tip 2 diyabet ise esas olarak insülin direnci ile tanımlanmasına karşın insülin üretiminde aksaklıklar ve beta hücre kütlelerinde ki azalmaların sonucunda da oluşmaktadır (11, 51, 101). Görüldüğü üzere beta hücre kütleleri diyabet oluşumunun başlıca sebepleri arasındadır. Bu sebeple beta hücrelerinin yerine koyulabilmesi için yukarıda bahsedildiği üzere adacık hücre nakilleri büyük umut vadeden tedavi yöntemlerinin başında gelmektedir. Ancak tek bir kadavradan elde edilen adacıkların nakil için yeterli olmaması da beraberinde yine beta hücre kütleleri sorununu getirmektedir. Ancak adacık nakli öncesi hücrelerin kültür edilebilmesi tedavi sürecinde kolaylaştırıcı adımlar atılabilmesini sağlamaktadır. Bunların başında adacık içinde yer alan hücrelerin proliferasyon hızını arttırmak yer almaktadır (104,105). Bu amaçla yapılan çalışmaların genel prosedürü proliferasyonda etken yolların tanımlanması ardından bu yollar üstünde etken ajanların muamelesi ile proliferasyon artırılması şeklindedir. Bu çalışmaların yanında yukarıda da bahsedildiği gibi kök hücre uygulamaları da umut vadeden çalışmalar içinde yer almaktadır. Farklılaşmada etkin olan moleküller tanımlandıktan sonra yapılacak yönlendirmeler ile sayıca yetersiz adacıkların artırılması amaçlanmaktadır. Bunun yanında neogenez basamakları da önem arz etmektedir. Yukarıda sayılan bütün basamakların sağlanabilmesi için neonatal dönem adacıkları bize değerli bilgi kaynakları sunmaktadır. Bahsedildiği üzere bu dönemde adacıkların tam olarak olgunlaşmaması farklılaşma ve neogenez için elzem bilgiler barındırmaktadır. Proliferasyon hızının ise en yüksek olduğu dönem olması hücre döngüsü için önemlidir.

Hem nakil için hem de genel tip 1 diyabet için adacık hücrelerinin immün sistem saldırılarından korunması önemlidir. Tip 1 diyabet bilindiği üzere immün saldırılar neticesinde oluşmaktadır. Nakil sonrasında immün-baskılayıcı ilaçların kullanımı hasta için sıkıntılı bir süreç olacağından, immün sistem saldırılarından korunmak önemlidir. Diane J ve arkadaşları yaptığı çalışma göstermektedir ki post-natal gelişimin ilk evrelerinde immün sistem hücreleri pankreas içinde infiltre olarak bulunmaktadır bu durumda araştırmacılara bu dönemlerde hücrelerin immün sistemden kaçınmak için bir mekanizması olduğunu düşündürmektedir (106). Yapılan bazı çalışmalar göstermektedir ki neonatal dönem adacıkları ile yapılan nakillerde immün sistem saldırılarına karşı daha uzun süreli bir direnç sağlanmaktadır. Bu dönemde hücrelerin kendilerini immün sisteme karşı koruduklarını düşündürmektedir. İmmün sistemden kaçış mekanizmasında yer alan yolların tanımlanması sürecinde neonatal dönem adacıkları önemli bir bilgi kaynağı olmaktadır (14, 15, 34, 35, 44, 65, 79). Bu farklılıklara ek olarak neonatal ve erişkin dönem adacıkları arasında glikoz stimüle insülin sentezleri arasında da farklar bulunmaktadır. Fetal ve neonatal dönemde glikoz stimüle insülin sentezi erişkin döneme oranla daha düşüktür (107,108).

Diyabet komplikasyonlarına yönelik olarak yapılan araştırmalarda proteom çalışmaları büyük öneme sahiptir. Bu amaçla HUPO (Human Proteome Organization), 2012 yılında HDPP (Human Diabetes Proteom Project) adlı bir grup kurarak diyabet gibi multi fonksiyonel bir hastalığın araştırılmasında protein tabanlı bir yöntem tercih etmiştir. Yapılan çalışmalar neticesinde interleukin-1 β , rosiglitazone ve artan glikoz konsantrasyonunun adacık nakli üzerindeki etkileri tanımlanmıştır. Bu çalışmalar bize adacık naklinin geliştirilmesine yönelik çalışmalarda proteomik yaklaşımlar önemli bir yere sahip olduğunu göstermektedir.

İki grubun kıyaslanmasında protein ve RNA tabanlı yapılan tek araştırma Martens GA ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptığı çalışmadır. Çalışmada LC-MS/MS kullanılarak iki grup arasında kıyaslama yapılmıştır. Çalışma sonucunda başta insülin metabolizması olmak üzere, TCA döngüsünde, protein sentezi yollarında aktif 36 adet proteinin farklı ifadelendiği tespit edilmiştir. 2014 yılında çıkan bu yayına ek olarak yaş bağımlı olarak uygulanacak ajanların proliferasyona etkisine değinilen çalışmalar yapılmıştır (109).

3 GEREKÇE VE AMAÇ

3.1.1 Gerekçe ve Amaç

Diabetes Mellitus patalojisi için çeşitli tedavi yöntemleri arasında adacık nakli umut vadetmektedir. Yöntemin rutin olarak kullanılabilmesi için geliştirilmesi gerekmektedir ve iyileştirilmesi için aşılması gereken problemlerin başında tek donörden izole edilen hücre sayısının yetersizliği gelmektedir. Buna ek olarak immün sistem saldırıları ve nakli yapılan hücrenin insülin salınım kapasitesinin yetersizliğide adacık naklinin limitasyonları arasındadır. Bu engellerin aşılmasına yönelik çalışmalar hızla devam etmektedir. Adacık naklinin geliştirilmesi, rutin uygulamasının iyileştirilmesi konusunda etkin olabilecek moleküler yolların tanımlanması önem arz etmektedir. Neonatal dönemde adacık hücre grubunun proliferasyon hızının yüksek olması ve immün sistemden kendini daha iyi koruduğunun düşünülmesine ek olarak erişkin dönemde gözlenen insülin metabolizmasının aktivitesi sebebiyle neonatal dönem ve erişkin dönem kıyaslamaları bize önemli bilgiler verebilecek kaynaklardır.

Bu tez kapsamında adacık naklinin iyileştirilmesi sürecinde etken yolların neonatal ve erişkin dönem adacıkları arasında proteom tabanlı karşılaştırmalı analizler ile tanımlanması amaçlanmaktadır. Neonatal ve erişkin dönem adacıklarının karşılaştırmalı analizleri ile adacık nakli sürecinin idealize edilmesinde yani hücre proliferasyonunun artırılması, insülin salınımının iyileştirilmesi ve immün sisteme karşı direnç mekanizmasının geliştirilmesi konusunda etkin olan yollar tanımlanır hipotezi ile yola çıkılmıştır ve hücre dengesinin sağlanmasında önemli olan başta protein katlanmasından sorumlu olan proteinler olmak üzere TCA döngüsünde ve tranlasyon sürecinde yer alan proteinlerin bu fizyolojik farklılıklarda önemli olduğu düşünülmektedir.

4 MATERYAL VE YÖNTEM

4.1 Materyal

Proje kapsamında, 06/06/2014 tarihli ve 2014/29 karar nu'lu etik kurulu onayı (EK 1) ile Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Deneş Hayvanları Laboratuvarından alınan neonatal dönem dört günlük, erişkin dönem sekiz haftalık Wistar Hannover sıçanlar kullanılmıştır.

4.2 Yöntem

Uygulanan yöntemlerin özeti aşağıda sıralanmıştır:

- ✓ Adacık hücrelerinin izolasyonu
- ✓ Adacık hücrelerinden protein izolasyonu
- ✓ İzole edilmiş proteinlerin miktar tayinlerinin Bradford yöntemi ile tespit edilmesi
- ✓ Proteinlerin iki boyutlu jel elektroforezi
- ✓ Jelde ayrımı yapılan proteinlerin floresan özellikli boyalar ile boyanması
- ✓ Jellerin PDQuest 8.1.1 Programı ile analizi
- ✓ Tripsinizasyon yöntemi ile jelden peptit eldesi
- ✓ Peptit kütlelerinin kütle spektrometresi ile belirlenmesi
- ✓ Biyoinformatik analiz ile protein kimliklendirilmesi
- ✓ PMF yöntemi ile tanımlanan proteinlerin ontoloji bilgisinin eldesi

4.2.1 Sıçan Adacık Hücrelerinin İzolasyonu

Tez kapsamında, Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hayvan laboratuvarından temin edilen sıçanlarla çalışılmıştır. Güç analizi yöntemi ile belirlenen 21 adet yeni doğan dönem sıçanları için etik kurul izni alınmış olmasına karşın, 18 (10 adet erkek, 8 adet dişi) adet yeni doğan dönem, 12 adet (8 adet dişi, 4 adet erkek) erişkin dönem sıçanları ile deneyler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen hücreler havuzlanarak çalışılmıştır. Bireysel farklılıktan kaynaklı olarak oluşabilecek olası etkileri elemek amacıyla gruplandırmalar yapılmıştır. Bu gruplandırmalar aşağıda özetlendiği gibidir;

- ✓ Neonatal dönem sıçanları altışar adet olmak üzere üç bölünerek pankreasları toplandı ve izolasyona üç ayrı örnek gibi devam edildi.

- ✓ Erişkin dönem sıçanlar dörder adet olarak alınıp; üç ayrı örnek olarak devam edildi.

*Sıçanların sayılarına karar verme aşamasında öncelikle bir adet sıçandan toplanan toplamda 245 adet adacık hücre grubundan elde edilen Bradford verileri sonucunda karar verilmiştir.

Uygulama

4.2.1.1 Edmonton Protokolü ile adacık izolasyonu

- ✓ Abdominal bölge kesildikten sonra karaciğere bastırılarak duktus belirginleşti. Ampullavateriklemlenip, sarı ya da mavi renk katater kullanılarak pankreasa 7 mL 1 mg/mL derişimindeki soğuk kollajenaz tip 5 enzimi perfüze edildi.
- ✓ Sıçanın kalbi kesilerek denek öldürüldü. Pankreas bağlantılı olduğu dokulardan ayrılarak 50 mL lik falkon tüpün içerisine koyularak buza gömüldü.
- ✓ Hazır olan 37 °C deki su banyosunda pankreaslar 18 dakika inkübe edildi.
- ✓ İnkübasyon sonrası pankreas çalkalanarak homojenize edilir. 25 mL soğuk HBSS (%10 fetalbovine serumu (FBS), % 1 L-Glutamin, % 1 Penisilin-streptomisin) [HBSS (+)] solüsyonu eklenip ve kuvvetlice çalkalandı.
- ✓ 1300 rpm'de 3 dakika 3 hız 1 frende 4 °C'de santrifüj edilip, süpernatant atıldı.
- ✓ Pellet çalkalanarak kırıldı ve 25 mL soğuk HBSS (+) solüsyonu eklenerek ve kuvvetlice çalkalandı.
- ✓ 1300 rpm'de 3 dakika 3 hız 1 frende 4 °C'de santrifüj edilip, süpernatant atıldı. Pellet çalkalanarak kırıldı.
- ✓ 50 mL soğuk HBSS (+) solüsyonu eklenir ve kuvvetlice çalkalandı. 425 µm'lik çelik elekten pankreas dokusu 50 mL'lik falkon tüp içerisine süzüldü.
- ✓ 1300 rpm'de 3 dakika 3 hız 1 frende 4 °C'de santrifüj edildi. Süpernatant atılıp, pellet çalkalanarak kırıldı.
- ✓ Pellet üzerine 5 mL Biocoll 1100 ilave edildi. Çalkalanarak homojenlik sağlandı. Üzerine yavaşça 10 mL Biocoll 1077 solüsyonu ilave edildi. En son olarak 10 mL RPMI 1640 solüsyonu ilave edildi. 2400 rpm'de 20 dakika 1 hız 0 frende 4 °C'de santrifüj edildi. 1077 yoğunluğu ve RPMI solüsyonu tabakalarının arasındaki adacık hücreleri RPMI 1640 (%10 fetalbovine serumu (FBS), % 1 L-Glutamin, % 1

Penisilin-streptomisin, 25 mM HEPES) [RPMI 1640 (+)] solüsyonu içerisine toplandı.

- ✓ 2 kez 1300 rpm'de 3 dakika 3 hız 1 frende 4 °C'de santrifüj edilerek yıkama yapıldı ve adacık hücreleri elde edildi.
- ✓ Elde edilen adacık hücrelerine handpicking işlemi uygulandı. Toplanan adacıklar iki gruba ayrıldı. İlk grup adacıkları canlılık testleri için kullanıldı. İkinci grup ise soğuk fosfat tamponu (PBS) içerisinde buz üzerinde Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı'na getirildi.

4.2.1.2 Adacıkların Sayı, Saflık ve Morfolojik Değerlendirilmesi:

- ✓ Bu deneyler aşamasında adacık hücreleri hücre kaybını azaltmak amacı ile ikinci bir havuzlamaya tabi tutuldu. Yani üç ayrı sıçandan alınmış gibi izole edilen hücre grupları neonatal dönem için üç örnekten alınan 100' er ul hücre havuzlandı. Aynı işlem erişkin dönem adacıkları içinde uygulandı.
- ✓ Elde edilen adacık hücrelerinden bir miktar alınarak DMSO içerisinde çözülerek hazırlanan 10 mg/mL dihidroetiltiazinone (DTZ, adacık beta hücrelerindeki insülindeki çinkonun şelatasyon ajanı) boyası ile boyandı. Boyama 100 ul hücre süspansiyonuna 1 ml DTZ boyası eklenerek 5 dk bekletmek suretiyle gerçekleştirildi.
- ✓ Ters mikroskop altında adacık hücrelerinin eşlik, IEQ (150 µm boyutundaki adacık referans alınarak yapılan hesaplama) bilgileri toplanarak

adacıkların sayısı, saflığı ve morfolojisi belirlendi.

4.2.1.3 Adacık Hücrelerinin Canlılıklarının Değerlendirilmesi:

Canlılık testi için Fluorescein diasetat/Propidium iyodür (FDA/PI) testi yapıldı.

FDA adacık hücrelerindeki canlı hücrelerin membranından geçerek sitoplazmada ki esteraz enzimi tarafından fluoresceine dönüşecek ve mavi floresan ışık altında ışımaya yapacaktır.

Böylelikle canlı hücreler belirlenecektir. Propidium iyodür ise canlı hücrelerin membranından geçemediği için adacık hücreesindeki ölü hücrelerin DNA larına bağlanacak ve yeşil floresan ışık altında kırmızı renkli ışımaya yapacaktır. Böylelikle ölü hücreler belirlenecektir.

- ✓ 35 mm'lik petri kabının içerisine 910 µL DPBS (pH 7,4) solüsyonu koyuldu.
- ✓ Üzerine 90 µL adacık örneği koyuldu. 20 µL fluoresceindiasetat (FDA) stok solüsyonundan (24 µM; 1 mg FDA, 100 mL asetonda çözüldü.), 20 µL de propidium iyodür (PI) stok solüsyonundan (750 µM; 5 mg PI, 10 mL PBS (pH 7,4) solüsyonu içerisinde çözümlenerek hazırlandı) ilave edilerek karanlık ortamda 5 dakika inkübe edildi.
- ✓ Fluoresan mikroskopunda 40 X büyütmede canlılık belirlendi.
- ✓ Her iki ışımaya altında da hücrenin fotoğrafları alındı ve çekilen fotoğraflar MATLAB programı kullanılarak birbirine karşılaştırılarak hücrelerin canlılık yüzdeleri hesaplandı.

4.2.2 Adacık hücrelerinden protein izolasyonu

- ✓ PBS içerisinde yer alan hücreler 1300 rpm' de 5 dk santrifüj edildikten sonra tampon çekildi ve üzerine lizis tamponu eklendi.

Lizis tamponu: 7M Üre, 2M Tiyöüre, %4 Chaps, %1 DTT, %2 Amfolit tamponu ve proteaz inhibitör kokteyl tablet (Roche)

- ✓ Pellet üzerine (pelletin miktarına bağlı olarak 300-500 µl) lizis tamponu eklendi ve 5 dakika buz üzerinde bekletildi.
- ✓ Tip sonikasyon işlemi gerçekleştirildi.
- ✓ Sonike edilerek homojonize edilen hücreler vorteks ile karıştırıldı ve 20000g'de 45 dakika santrifüj edildikten sonra homojen protein karışımı süpernatant çekilerek protein elde edildi.

4.2.2.1 Protein miktar tayini (Bradford Yöntemi)

Protein karışımı içindeki toplam protein miktarı; Bradford (Bradford protein assay kit Sigma_Aldrich US) yöntemi ile Elisa okuyucu (1420 Multilabel Counter Victor 3, Perkin Elmer) cihazı kullanılarak mikrolitredeki mikrogram protein olarak konsantrasyon belirlendi. Protein miktarını saptamak amacı ile BSA (Bovine Serum Albumin) standartları kullanıldı. Protein miktarlarının belirlenmesinde uygulanan işlemler aşağıda belirtilmiştir.

Uygulama

- ✓ Uygulama süresince buz üzerinde çalışıldı
- ✓ 1X kullanıma hazır halde bulunan Bradford Boyası (ThermoScientific, Coomassieplus, Bradford reagent, 1866210) buza yerleştirildi.
- ✓ Kör için örnek dilüsyonu ile aynı oranda dilüe edilmiş lizis tamponu 4'er tekrar olarak eklendi.
- ✓ BSA Standartlar 200, 400, 600, 800 ve 1000 µg şeklinde hazırlandı ve 4'er tekrar olarak elisa plakası kuyucuklarına 5'er µL konuldu.
- ✓ Adacık proteinleri gerekli seyreltmeler yapılarak 5µL konuldu.
- ✓ Tüm örneklerin üzerine 245µL 1X Bradford boyası konuldu. Deneyler süresince 10, 15 ve 20.dakikalarda okuma yapıldı.
- ✓ Plaka elisa okuyucusuna yerleştirildi ve 595 nm (nanometre) dalga boyunda ölçüm yapılmıştır.

4.2.2.2 İki yönlü jel elektroforezi/2-DE ile proteinlerin ayrıştırılması

Genel protein profili tanımlamasında yani protein haritası çıkarmada iki boyutlu jel elektroforezi kullanılmıştır. 2-DE (İki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi) olarak da adlandırılan bu yöntem proteinlerin izoelektrik noktalarına ve moleküler ağırlıklarına göre ayrımının yapılması sağlayan bir yöntemdir.

Tez kapsamında 7cm'lik ph 4-7 IPG (İmmobilize pH Gradyent) şeritleri kullanılmıştır. Bu şeritler pH gradyentine sahiptirler ve proteinlerin izoelektrik noktalarının sıfırlandığı yerde

immobilize olmaları esasına dayanır. Dolayısıyla bu şeritler üzerinde yürütülen proteinlerin birinci boyut ayrımı olarak bilinen IEF (İzoelektrik Odaklama) gerçekleştirilir. Daha sonra da moleküler ağırlıklarına göre ayrımın gerçekleştiği SDS-PAGE ile ikinci boyut ayrımları gerçekleştirilir.

Bu çalışmada her grup için jeller 4 tekrarlı olarak yapılmış bunlardan analize en uygun 3 tanesi seçilerek karşılaştırmalı analizlerde kullanıldı (tablo 5.2-2).

Çizelge 4.1 2-D jel elektroforezi için kullanılan gruplar ve gruplan ile ilgili veriler

Gruplar	Grupları oluşturan örnek sayısı	Jel tekrarı	Yüklenen protein miktarı (jel başına)
Erişkin dönem adacıkları	12	4	75µg
Yeni Doğan adacıkları	18	4+2	75µg+50 µg

Uygulama

→ İzoelektrik noktalarına göre ayırma (IEF)

İzoelektrik noktalarına göre ayırma, örneklerin yüklenmesi (Rehidrasyon) ve yürütülmesi (IEF) olarak iki ayrı aşamada yapıldı.

Adacık proteinleri rehidrasyon aşamasında her şerit için 75 µg protein içerecek şekilde yüklendi.

- ✓ **Rehidrasyon:** Protein karışımı 7 M üre, 2 M tiyoüre , %4 CHAPS , %1 amfolit (pH 3-10), 10 mM DTT bromo fenol mavisi içeren rehidrasyon tamponu ile toplam hacim 125µL olacak şekilde karıştırılarak uygun rehidrasyon tepsileri üzerinde 7 cm'lik IPG şeritlere yüklendi. Ayrım BIO-RAD protean IEF (US) cihazında 16 saat 50mV akımda bekletilerek yapıldı.

- ✓ **İzoelektrik odaklama (IEF-izoelektiric focusing-):** Proteinler bu aşamada aynı strip üzerinde BIO-RAD protean IEF (US) cihazında şeritin boyutuna bağlı belirli basamaklarda belirli voltajlarda akıma tabi tutuldu ve izoelektrik noktalarına göre ayrıldı.

➔ **SDS Page jel (Molekül ağırlıklarına göre ayırma)**

Şeritler; SDS- PAGE jele yüklenmeden önce iki farklı dengeleme tamponu ile 15'er dakika sallayıcıda inkübe edildi.

Dengeleme tamponu 1 (Alkilleme): 6M Üre, 1.5M Tris-HCL, %2 Sodiumdodecylsulfate(SDS), %20 Gliserol, %2 Dithiothreitol (DTT)

Dengeleme tamponu 2 (Redükleme): 6M Üre, 1.5M Tris-HCL, %2 sodyum dodesil sülfat (SDS), %20 Gliserol ve %2.5iyodoasetamid

- ✓ SDS-PAGE jeli %4'lük toplama jeli (5M Tris-HCl tamponu, akrilamid-bisakrilamid (%40), %10 SDS, ultra saf su, %10 amonyum persülfat-APS- ve N'-tetrametilenediamin-TEMED-) ve %12'lik ayırma jelinden (1.5M Tris-HCl tamponu, akrilamid-bisakrilamid -%40-, %10 SDS, ultra saf su, %10 APS ve TEMED) oluşmaktadır.
- ✓ Şeritler, PAGE (poliakrilamid) jel üzerine %0,5'lik ısıtılmış agar yardımı ile yerleştirildi ve protein izlemesi agar solüsyonuna eklenen BMF ile tespit edildi.
- ✓ Moleküler ağırlığı bilinen bir standart protein karışımı (BioLabsP7703S) marker kuyucuğuna 3 uL yüklendi.
- ✓ Elektroforez işlemi sabit akımda yapıldı. İlk yarım saat 80 V (volt) , daha sonra ise 125 V ile proteinler yürütüldü.
- ✓ Bromofenol mavi boyası jelden döküldükten hemen sonra yürüme sonlandırıldı.

➔ **Jel üzerindeki proteinlerin tespiti/boyama (OrioleFluorescent Gel Stain)**

Tez kapsamında OrioleFluorescent Gel Stain (Bio-Rad 161-0497) boyası ile protein kümeleri jel üzerinde tespit edilmiştir.

Uygulama

Her bir jel içerisinde 25 mL Oriole boyası bulunan kaplarda 90 dakika süre ile çalkalanmış ve daha sonra distile su ile 3 kez 15 dk yıkanarak görüntüleme işlemine geçilmiştir.

4.2.2.3 Jellerin görüntüsünün alınması (VERSA DOC)

Jel zerindeki protein kümelerinin görüntüleri Bio-Rad Versadoc İmaging System Model 1000 cihazı ile alındı.

4.2.2.4 Jellerin analizi (PDQUEST 8.0.1)

PDQuest 8.0.1 software (Bio-Rad) kullanılarak protein profil haritalarının karşılaştırmalı analizleri yapıldı. Bu program ile gruplar arasında protein ifadesinde istatikselsel olarak anlamlı farklılık gösteren protein kümesi tespiti SPSS(Statistical Package for the Social Sciences) istatistik paket programı ile analiz edildi. Student t-test'e göre anlamlı farklılık gösteren spotlara ek olarak kat farklılığını ortalamada gösteren spotlar tespit edildi.

4.2.2.5 Jel üzerinden protein kümelerinin kesilmesi ve proteinlerinin tripsin ile peptitlerine ayrılması

Student t-test'e göre anlamlı farklılık gösteren protein kümeleri robotik bir sistem olan Spot Cutter (Bio-Rad) ile jelden kesilerek 96-kuyucuklu V-tabanlı plakalara alındı. Elde edilen jel parçaları tripsin enzimi tripsinizasyon işlemine tabi tutularak proteinlerin peptitler halinde jelden çıkarılması sağlandı. Tüm aşamaları laminar akışlı kabinde yapılan tripsinizasyon uygulaması aşağıda ana başlıkları ile sıralanmıştır.

- I. Öncelikle amonyum bikarbonat ve asetonitril ile jel parçalarından boya uzaklaştırıldı (destaining).
- II. Daha sonra DTT ile redükleme, iyodoasetamid ile alkilleme yapıldı.
- III. Bu işlemlerin ardından her bir kuyucuğa 30 µl tripsin solüsyonu (50 mM amonyum bikarbonat zcs ile hazırlandı ve içinde 150 ng. tripsin içeren solüsyon) eklendi. Enzimin kendi kendini sindirmeden jele geçmesini sağlamak için 4°C'de (bu sıcaklıkta enzimin aktif olmadığı kabul edilir) 1 saat bekletildi ve enzimin sindirim işlemini gerçekleştirebilmesi için de gece boyu 37°C'de inkübe edildi.

IV. Daha sonra ekstraksiyon tamponu (%1 formik asit, %2 asetonitril) ile muamele edildi, böylece jel içinde bulunan peptitler tampon ile açığa çıkarıldı ve sıvı halde temiz bir 96 kuyucuklu plakaya alınarak kurumaya bırakıldı. Tripsinizasyon işleminin bütün basamakları laminar akışlı kabinde yapıldı.

4.2.2.6 Kütle Spektrometresi cihazında (MALDI-TOF MS) peptit kütlelerinin belirlenmesi.

Örnek yükleme plakalarına, yükleme yapılmadan önce aşağıdaki hazırlıklar yapılmıştır.

- I. MALDI-TOF örnek yükleme plakası ultrasonik su banyosunda sırasıyla; % 3-4' lük amonyum hidroksit çözeltisi, ultra saf su, metanol ve asetonitril ile 5'er dakika muamele edilerek temizlendi ve örnek yüklemeye uygun hale getirildi.
- II. İyonlaşmayı sağlayacak matriks olarak rekristalize edilmiş alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) kullanıldı. CHCA, 50 µl/1mg olacak şekilde (%75 asetonitril, %0.1trifloro asetik asit (TFA) ve %25 HPLC su karışımından oluşan matriks tamponu içerisinde çözüldü.

96 kuyucuklu plaka içerisinde tripsinizasyon sonrası kuru halde bulunan peptit karışımları, ZipTip C18(Milipore ZTC 18S960) kolonundan geçirildi ve bu işlem sonunda matriks tamponu ile 1:1 oranında karıştırıldı. Daha sonra MALDI-TOF örnek yükleme plakasının kuyucuklarına 1,5 µl. yükleme yapıldı. Yükleme sonrası plaka 1 saat kadar laminar akışlı kabinde kurumaya bırakıldı.

MALDI-TOF kütle spektrometresinin kalibrasyonu örnek plakasında bulunan "LockMass" kalibrasyon kuyucuklarına yüklenen beş peptit karışımı ile yapıldı. Kütleleri bilinen bu peptitler aracılığı ile cihazın kalibrasyonu yapılarak kütle okumalarındaki kaymalar engellenmiştir. Bu amaçla, kullanılan Adrenokortikotropik Hormon (ACTH), Glu1-fibrinopeptit B (Glu-Fib), Substance P, renin-14 ve Anjiyotensin-1 peptitlerinin kütleleri Çizelge4.5'de verilmiştir. Bu peptitlerin MALDI TOF kütle spektrometresinde belirlenen kütleleri ise aşağıdaki şekilde verilmiştir.

Çizelge 4.2 MALDI-TOF MS cihazının kalibrasyonunda kullanılan peptitler

Peptitin adı	Kütlesi (Da)
ACTH	2465.1989
Glu-Fib	1570.6774
Substance P	1347.7360
Renin-14	1758.9326
Anjiyotensin 1	1286.6853

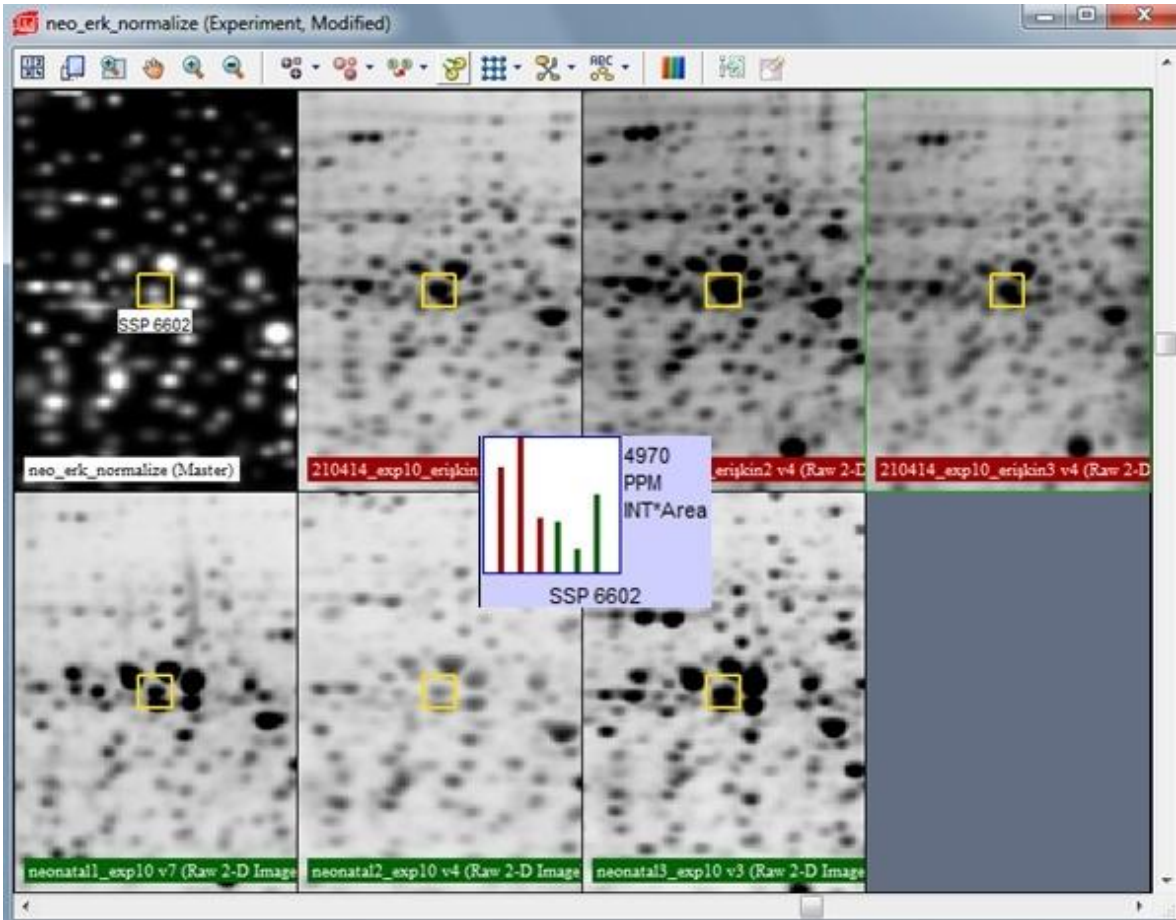
Tüm yüklemeler yapıp, plakanın kuruması tamamlandıktan sonra cihaz üzerinde ölçümlere geçildi. Tüm ölçümler MassLynx4.0 programı aracılığı ile WatersMicromass MALDI-TOF kütle spektrometresinde 500-3000 m/z arasında ve refletron pozitif iyon modunda gerçekleştirildi. M/z oranı kütle/yük oranını ifade etmektedir. Tüm peptit ölçümleri +1 yüklü olarak iyonlaştırılıp ölçüldüğü için m/z değeri doğrudan kütle olarak ifade edilebilir.

4.2.2.7 PMF Biyoinformatik analizleri

MassLynx4.0 programında spektrumlar elde edildikten sonra spektrum üzerindeki en uygun kütle okuma aralıklarını ortalaması alındı (combine) ve tüm örnek spektrumları arkaplan çıkarımı(substraction) işlemine tabi tutuldu. Peptit kütle değerleri MASCOT aracı kullanılarak PMF analizlerine tabi tutuldu.

Mascot yazılımı ile protein tanımlaması: MALDI-TOF spektrumlarından elde edilen m/z değerleri belirtilen Mascotveritabanında taranırken yazılım üzerinde yapılanlar aşağıda sıralanmıştır.

- Peptit örneklerine iyodoasetamid ile alkilleme yapıldığı (bu durum peptit kütlelerinde artışa neden olur) için sisteinkarbamidometillenmesi sabit modifikasyon olarak seçildi.
- Çalışılan canlı insan olduğu için yazılımda taksonomi bölümü *Rattus Norvegicus* (Sıçan) olarak seçildi. Böylece verilen m/z değerleri ile eşleşen peptitlerden yalnızca insanda bulunanların listelenmesi sağlandı. Peptit toleransı ± 0.4 ile ± 0.8 Da aralığında seçilmiş, en fazla 1 kaçırılan kesime (missed cleavages) izin verildi.
- Aşağıdaki şekillerde her protein için yapılan işlemler PMF analizleri ile tanımlanan Trim 35 proteini için gerçekleştirilen işlemler örnek şema olarak sunulmuştur.

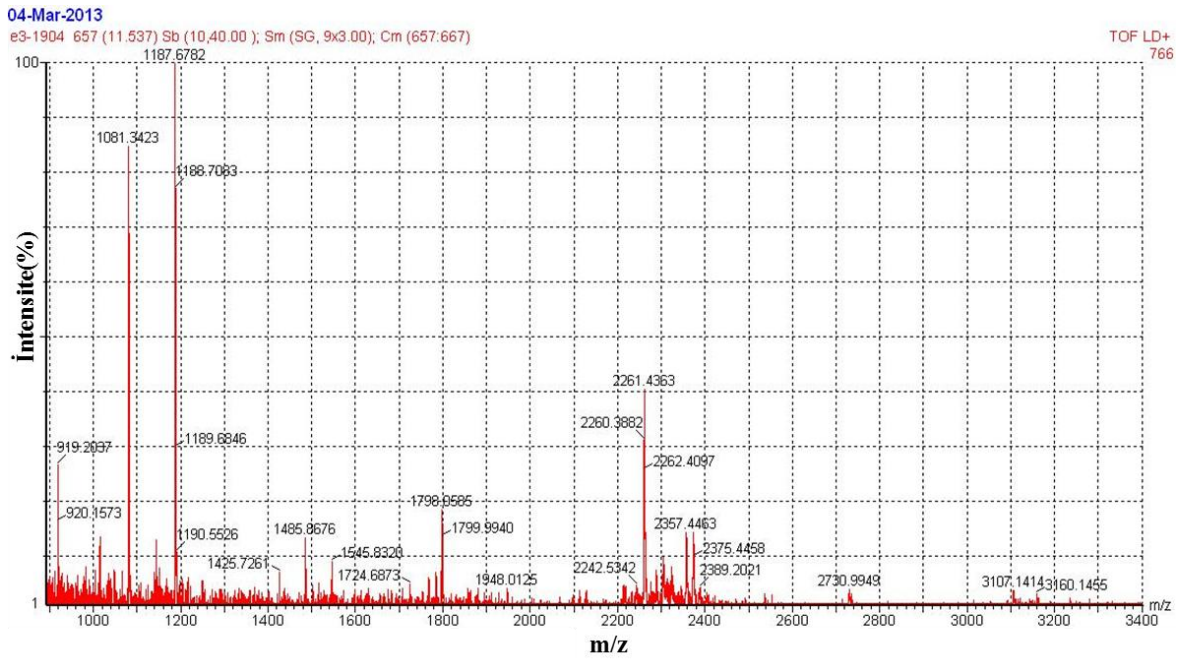


Şekil 4.1 Protein kümesinin ifade verisinin PDQuest 8.1.1 programı ile gösterimi. Jel üzerinde buldukları bölgeler (çerçeve içine alınmıştır ve kümelerin özellikleri çizelgelerde verilmiştir) ve küme yoğunluklarının grafiksel gösterimi

Çizelge 4.3 Protein kümesinin yoğunluk verilerinin piksel cinsinden değerleri

Erişkin 1	Erişkin 2	Erişkin 3	Neonatal 1	Neonatal 2	Neonatal 3
738,5	495,5	487,6	280,7	258,4	246,9

Kütle spektrometresi ile peptit kütleleri belirlendikten sonra(Şekil 4.2-4) Matrix Science Mascot programı kullanılarak yapılan PMF analizi sonrasında Tripartite motif-containing protein 35proteini %61 skorla tanımlandı.



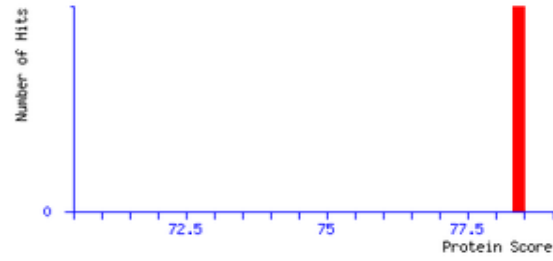
Şekil 4.2 Protein kümesinden elde edilmiş peptitlerin, MALDI TOF MS ile tespit edilmiş kütleler

MATRIX SCIENCE Mascot Search Results

User : hatice
Email : haticeyldzhn@gmail.com
Search title :
Database : SwissProt 2015_05 (548454 sequences; 195409447 residues)
Taxonomy : Rattus (7935 sequences)
Timestamp : 14 May 2015 at 11:04:51 GMT
Top Score : 78 for **TRI35_RAT**, Tripartite motif-containing protein 35 OS=Rattus norvegicus GN=Trim35 PE=2 SV=1

Mascot Score Histogram

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 52 are significant ($p < 0.05$).



Concise Protein Summary Report

Format As [Help](#)
Significance threshold $p <$ Max. number of hits
Preferred taxonomy

1. [TRI35_RAT](#) Mass: 58579 Score: 78 Expect: 0.00011 Matches: 5
Tripartite motif-containing protein 35 OS=Rattus norvegicus GN=Trim35 PE=2 SV=1

Şekil 4.3 .Kesimi yapılan protein kümesinin mascot araştırma sonucu

MATRIX SCIENCE MASCOT Search Results

Protein View: TRI35_RAT

Tripartite motif-containing protein 35 OS=Rattus norvegicus GN=Trim35 PE=2 SV=1

Database: SwissProt
 Score: 61
 Expect: 0.0059
 Nominal mass (M_r): 58579
 Calculated pI: 6.73
 Taxonomy: [Rattus norvegicus](#)

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of TRI35_RAT against nr.](#)

Search parameters

Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
 Fixed modifications: [Carbamidomethyl \(C\)](#)
 Mass values searched: 8
 Mass values matched: 5

Protein sequence coverage: 13%

Matched peptides shown in **bold red**.

```

1 MEFGFSVSPG PSRSFKEELL CAVCYDFFRD AVTLRCGHNF CRRCVSGCWE
51 VQTTPSCFVC KERAVPGELR TNHTLNNLVE TLLREEAEGA RWTGRRSPRP
101 CRAHRAPLTL FCVEDKELL CACQADARHQ EHRVQPIKDT AQDFRAKCKN
151 MEHVLREKAK SFWALRRTYE AIAKHNEVQT TWLEGRIRDE FDKLRDFLRV
201 EEQATVDAMK EESRKKHLLA EKKMQLAEQ TEALAREIER LQMEMKEDDM
251 TFLMKHKSRK RRLFCVTEFA PLQPGLLMDA CKYLESLQYR VVKKMLGSVE
301 SVFFSLDPNT AAGWLKVADD LITVINHGVR VQVENPERFS SAPCLLGSQV
351 FSKGSHSWEV DVGGLPSWRV GVVRVQAHAQ AQAQADVGGE GHSKSCYHDT
401 RSGFWYLCRT QGVDGDHGMT SDTATAPLVQ AMPRRLRVEL ECEEGELSPY
451 DSERHCHLYT FNAHFGVVRP YFYLGAIRGD GPPEPLRICH LRSIKEELD
501 I
  
```

Unformatted sequence string: [501 residues](#) (for pasting into other applications).

Sort peptides by Residue Number Increasing Mass Decreasing Mass

Show predicted peptides also

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta M	Peptide
62 - 70	1026.7003	1025.6930	1025.5618	0.1313 1	K.ERAVPGE LR .T
71 - 84	1638.1060	1637.0987	1636.8896	0.2091 0	R.TNHTLNNLVET LLR .E
226 - 240	1757.0986	1756.0913	1755.9115	0.1799 1	K.QLAEQTEALAREI ER .L
354 - 374	2279.4082	2278.4009	2278.1607	0.2402 1	K.GSHSWEVDVGG LPSWRV GVVR .V
493 - 501	1045.7635	1044.7562	1044.5703	0.1860 1	R.VSIKEELD I .-

Şekil 4.4. Protein kümesinden tespit edilen Trim 35 proteinine ait bilgiler, eşleşen peptitlerin proteinde buldukları kompozisyonları ve sekansları

4.2.2.8 Ontoloji ve Yolak Analizleri

Tanımlanan proteinlerin adacık nakli için öneminin yorumlanabilmesi için CytoScape 3.1.1 programı kullanıldı. Tanımlanan proteinlerin ilişkili olduğu proteinlerin listesi çeşitli veri tabanları kullanılarak alındıktan sonra, interaksiyon verileri yine CytoScape 3.1.1 programında ontoloji analizine tabi tutuldu. Elde edilen sonuçlar çizelge 4.4’de özetlenmiştir.

5 ARAŞTIRMA BULGULARI

Çalışma kapsamında jel tabanlı bottom-up proteomik stratejileri kullanılarak ilk dört günlük neonatal dönem ile sekiz haftalık erişkin dönem adacıklarının protein profilleri karşılaştırıldı. Elde edilen bulgular adacık izolasyonu ve proteomik bulgular olmak üzere iki bölümde detaylandırılmıştır.

5.1 Adacık İzolasyonunun Değerlendirilmesi

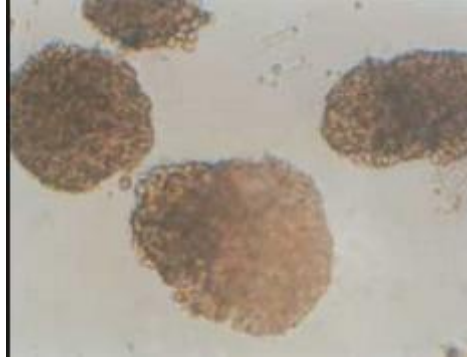
Sıçandan adacık eldesi sonuçları IEQ bilgileri, DTZ ve FDA/PI boyama sonuçları olmak üzere üç basamakta anlatılmıştır.

5.1.1 IEQ Bilgileri:

Yapılan ölçümler neticesinde Neonatal dönem IEQ değerleri 23,3, erişkin dönem IEQ değerleri 34,66 olarak hesaplanmıştır. Bu veriler elde edilen adacıkların IEQ sonuçlarına dayanarak nakil için uygun olduğunu göstermiştir.

5.1.2 DTZ Boyaması Sonuçları:

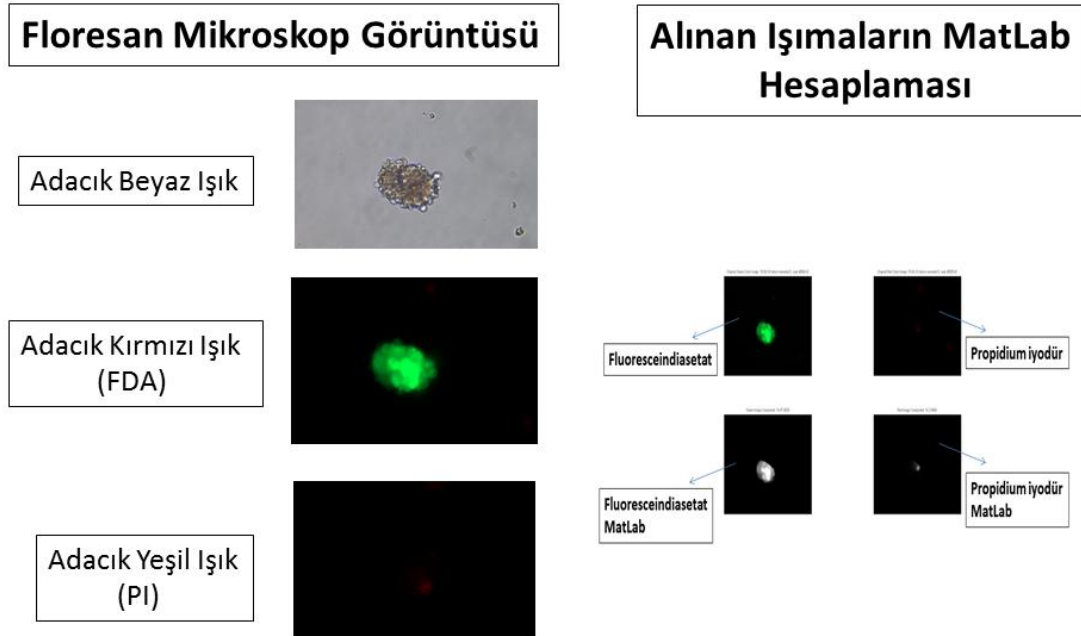
DTZ boyaması hand-picking işlemi sonrasında elde edilen adacıkların saflık oranını hesaplamak amacı ile gerçekleştirilmiştir. Sayım esnasında alınan görüntü kesitlerinden bir bölüm Şekil 5.1-1'de verilmiştir. Altı cm'lik kültür kaplarında yapılan sayım neticesinde, neoanatal dönemde DTZ ile kırmızı boyanan 11 adet adacık hücresi ve DTZ ile boyanmayan, parçalanmış halde çok küçük boyutlarda (7-10 mikron) olan 6 adet asinar hücre, erişkin dönem için 7 adet DTZ+ ve 3 adet parçalanmış boyanmayan hücre sayılmıştır. Böylece saflık oranının çalışmaya devam etmek için yeterli olduğuna karar verilmiştir.



Şekil 5.1.DTZ Boyaması Sonuçları

- Simgesel olarak bir fotoğraf kullanılmıştır çünkü imkanlar doğrultusunda kullanılan petri kabının tam boyutlarının fotoğrafı alınamamıştır.

İzolasyon sonrası elde edilen adacıkların canlılıklarını tespit etmek için, her izolasyon sonrası toplam beşer hücre ile sayım yapılmış ve beş hücreye ait sonuçların ortalaması alınmıştır (Şekil 5.1-2). MatLab Programı kullanılarak neonatal dönem adacıklarının canlılık oranları %90, erişkin dönem adacıklarının canlılık oranları ise %97 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 5.2. FDA/PI Boyaması sonuçlarının tek bir örnek ile temsili sunumu.

Alınan değerler neticesinde Wistar Hannover sıçanlardan elde edilen adacıkların izolasyon protokolünün başarı ile gerçekleştiğine karar verilmiştir. Handpicking uygulaması ile toplamda neonatal dönem adacıklarından 1870, erişkin dönem sıçanlarından yapılan iki ayrı izolasyonda toplamda 2000 adet adacık toplanmıştır. Proteom çalışmalarına elde edilen bu adacıklar ile devam edilmiştir.

5.2 Proteomik Çalışmalar

Tez kapsamında neonatal ve erişkin dönem adacıkları arasında kıyaslamalar yapılmıştır. Adacık izolasyonları için, dört günlük neonatal ve sekiz haftalık erişkin sıçanlar kullanılmıştır.

5.2.1 Protein Miktar Tayini

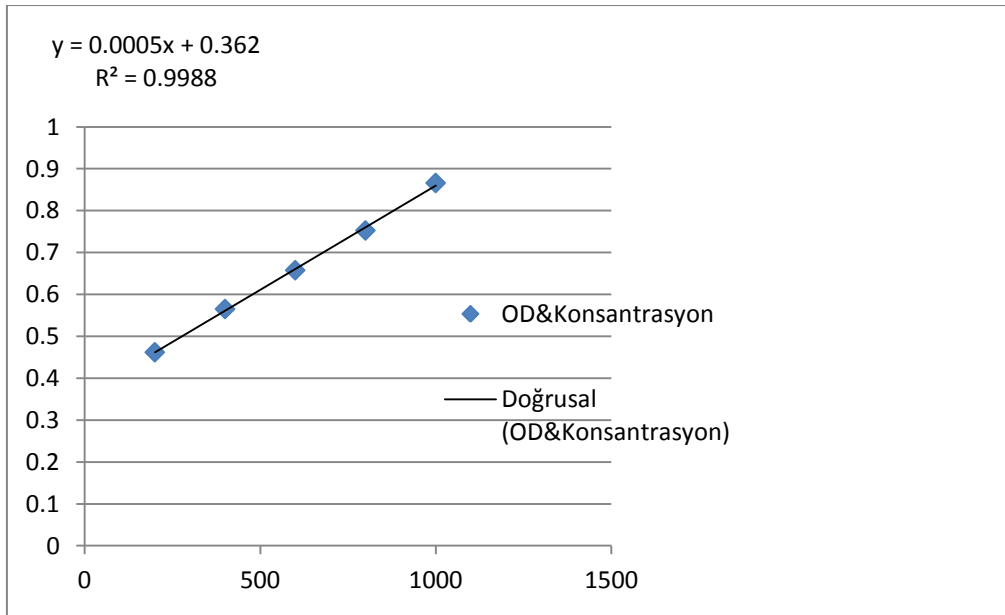
Neonatal ve erişkin gruplara ait total protein miktarları Şekil 5.2-3'te verilmiştir. Biyolojik tekrarların sağlanabilmesi için neonatal altı hayvandan, erişkin dönem dörder adet hayvandan oluşan üçerli alt grup oluşturulmuştur. Tabloda gözlendiği üzere erişkin dönem 1,2,3 ve neonatal 1,2,3 kodları bulunmaktadır. Çalışma da kullanılan sıçanlardan elde edilen adacık miktarı biyolojik tekrar yapma için yeterli olmaması nedeniyle havuzlama uygulanmasına karar verilmiştir. Kullanılan grup sayıları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Çizelge 5.1 Bradford yöntemi ile protein miktar tayini için kullanılan standartların OD Değerleri

Bradford Standartları (ug/ml)	OD Değerleri 1. Tekrar	OD Değerleri 2. Tekrar	OD Değerleri 3. Tekrar	Ortal ama	CV Değerleri
200	0,453	0,460	0,473	0,461 927	2,14996 323
400	0,575	0,558	0,563	0,565 16	1,55120 8245
600	0,645	0,662	0,666	0,657 829	1,70150 4278
800	0,750	0,746	0,762	0,752 743	1,12637 6707
1000	0,853	0,861	0,884	0,866 114	1,80927 5503

Çizelge5.2 Standartların ve örneklerin OD değerleri

Bradford Standartları (ug/ml)	OD Değerleri 1. Tekrar	OD Değerleri 2. Tekrar	OD Değerleri 3. Tekrar	Ortalama	CV Değerleri
Erişkin Dönem (n=1)	-	-	-	-	-
Erişkin Dönem 1 (n=4)	0,621	0,619	0,633	0,625	1,2
Erişkin Dönem 2 (n=4)	0,600	0,609	0,612	0,607	1,0
Erişkin Dönem 3 (n=4)	0,700	0,689	0,695	0,695	0,9
Neonatal 1 (n=9)	0,566	0,553	0,536	0,551 733	2,7
Neonatal 2 (n=9)	0,705	0,693	0,650	0,682	2,8
Neonatal 3 (n=9)	0,621	0,619	0,633	0,625	1,2



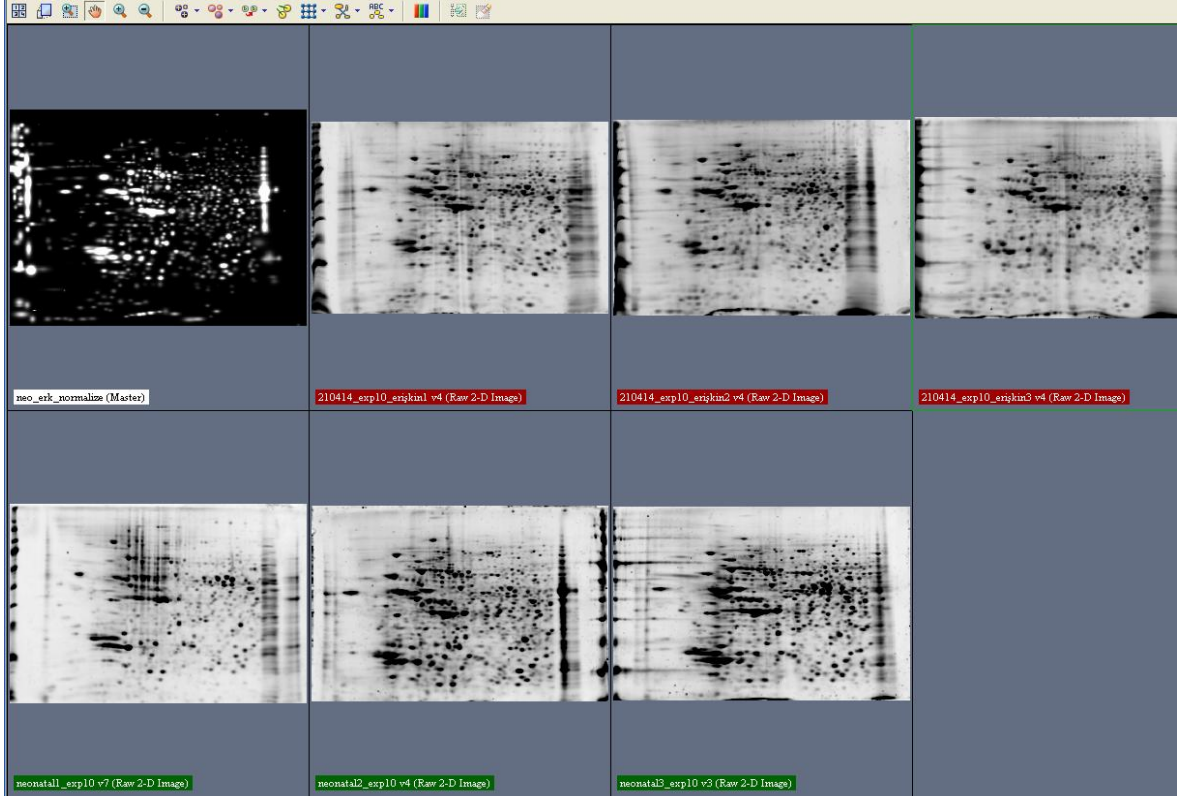
Şekil 5.3 Standard OD değerleri neticesinde elde edilen grafik ve R^2 değeri

Çizelge 5.3 Bradford sonuçlarına göre birinci boyut ayrımları için gereken toplam örnek ve rehidrasyon tamponu miktarları

Protein Miktarı	75µg yükleme için gerekli protein miktarı (µl)	Kullanılan rehidrasyon tamponu miktarı (µl)
Erişkin Dönem 1 (n=4)	6	119
Erişkin Dönem 2 (n=3)	6,177924	118,8221
Erişkin Dönem 3 (n=4)	5,395683	119,6043
Neonatal 1 (n=9)	6,796766	118,2032
Neonatal 2 (n=9)	5,498534	119,5015
Neonatal 3 (n=9)	6	119

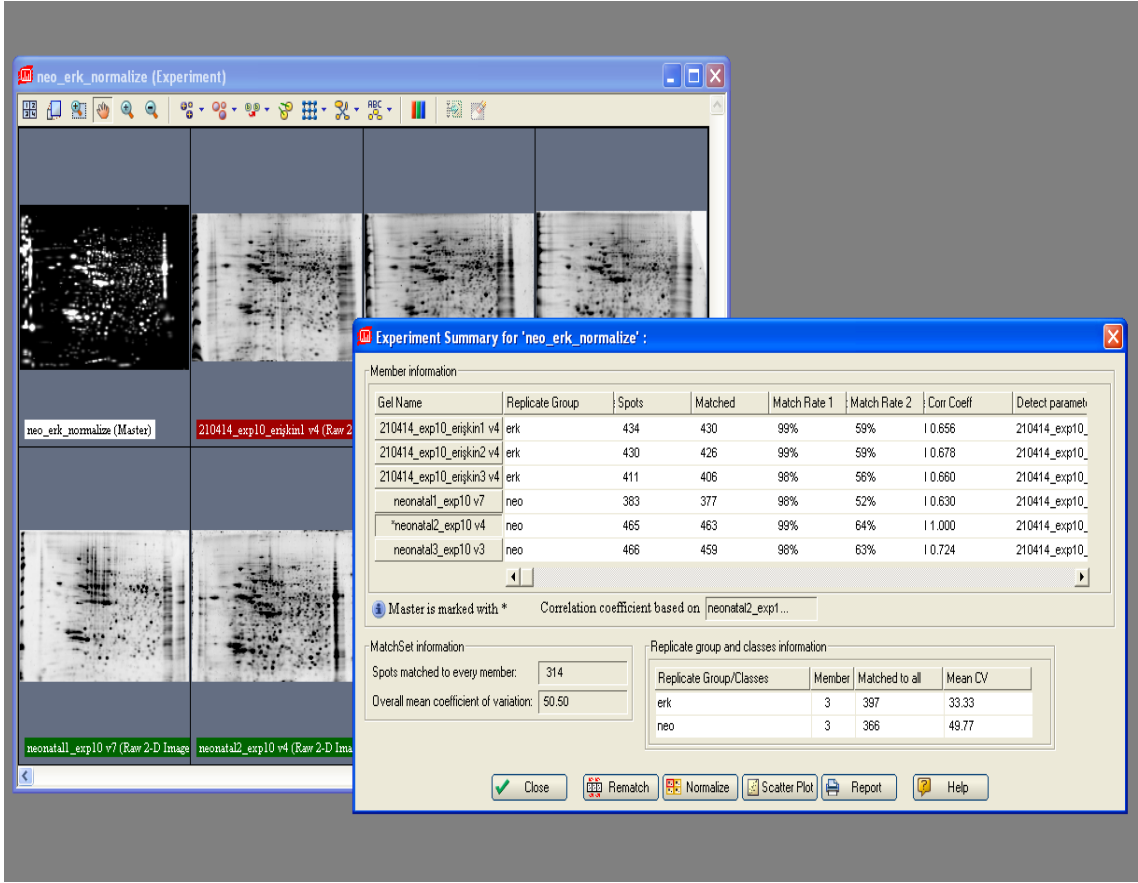
5.2.2 İki Boyutlu Jel Elektroforezi

Protein miktarları belirlendikten sonra, erişkin ve neonatal gruba ait örneklerden altışar adet 2-DE jel hazırlanmıştır. Erişkin örneklere ait jellerin tamamına toplam 75 µg protein yüklenirken; neonatal örneklere ait jellerin iki tanesine 50 µg, dört tanesine 75 µg protein yüklenmiştir. Bunlardan üçer tanesi PDQuest 8.0.1 programı ile analiz edilmiştir. Gruplara ait karakteristik protein profillerini içeren jeller Şekil 5.2-6’de gösterilmiştir. PDQuest programında gruplara ait protein kümelerinin (spot) karşılaştırmalı (matchset) sonuçları ve değerleri verilmiştir (Şekil 5.2-3,5.2-4, 5.2-5). Programda her gruptan üçer teknik tekrar analize alınmıştır. Yapılan optimizasyonlar ile oluşturulan karşılaştırma gruplarında (match set) normalizasyon için “ total density in gel image” seçilmiştir. Aynı zamanda referans jel olarak yeni doğan dönemine ait tekrarlardan biri kullanılmıştır.

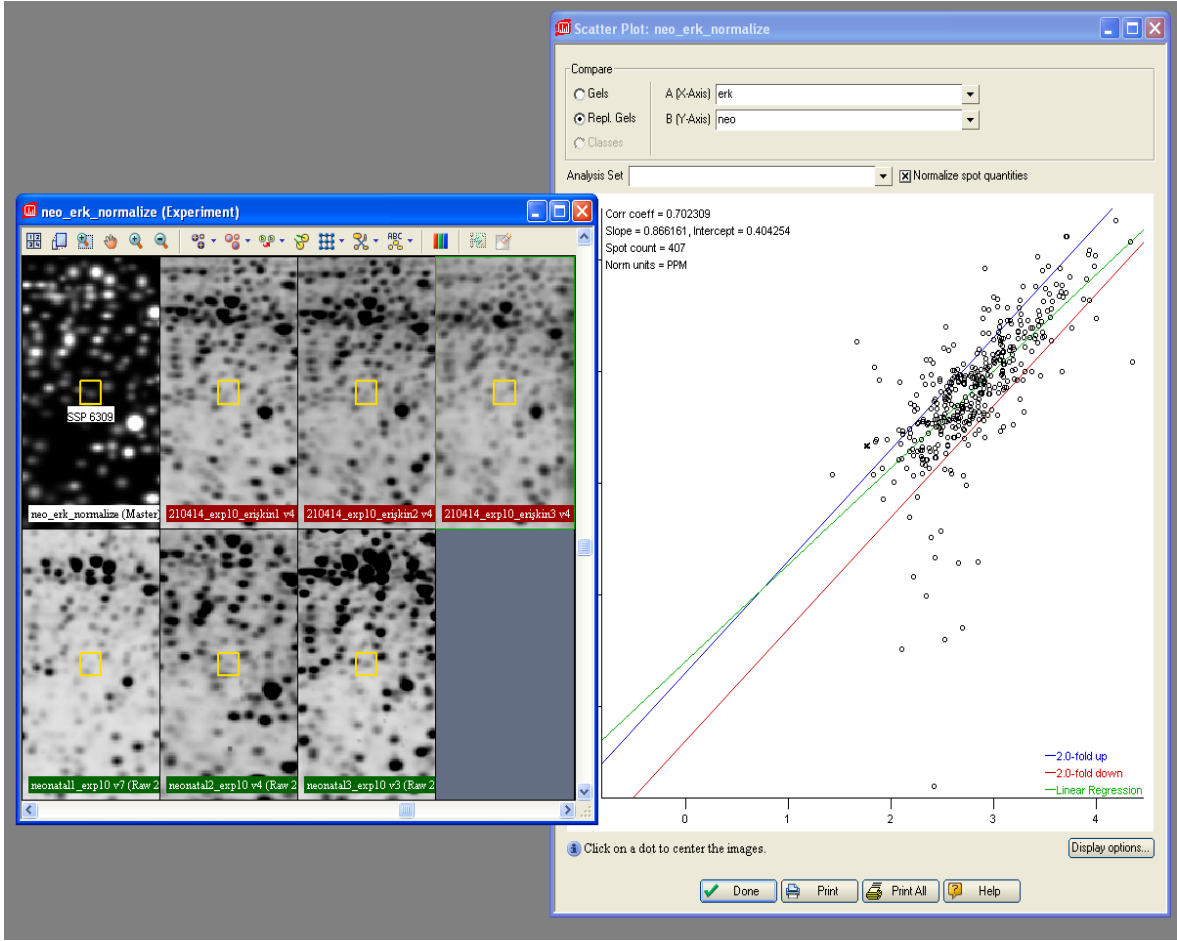


Şekil 5.4. Neonatal ve erişkin dönem adacıklarının protein haritalarının gösterimi

Jeller ilk çalışmada 4 teknik tekrar ile yapılmıştır. Havuzlama uygulanmasından dolayı gruplar için yapılan izolasyonda biyolojik tekrarın etkisinden kurtulmak amacı ile deneklerden pankreas alımı esnasında toplam denek sayısı 3' e bölünmüştür. Böylece oluşturulan gruplar birbirinin hem teknik tekrarı hemde biyolojik tekrarı olmuştur. PDQuest programı kullanılarak yapılan analizler neticesinde erişkinler için ortalama 425, neonatal dönemi içinse 431 protein kümesi tespit edilmiştir.



Şekil 5.5. İki gruba ait deney özetleri tablosu görüntüsü

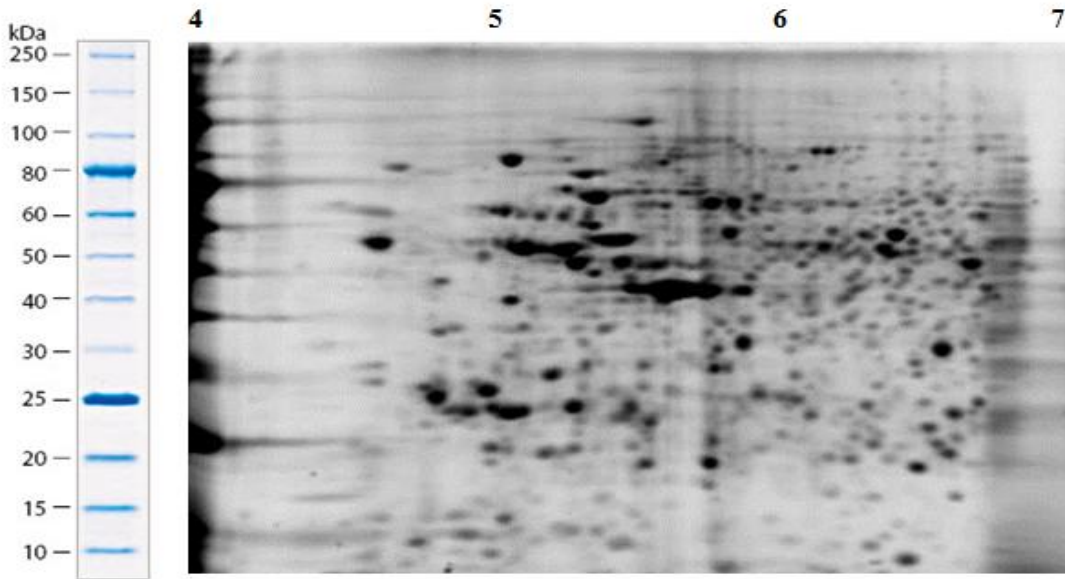


Şekil 5.6. PDQuest programında küme(spot) eşleştirilmesi (matchset) sonucu bulunan protein spotları ve deneysel değerler

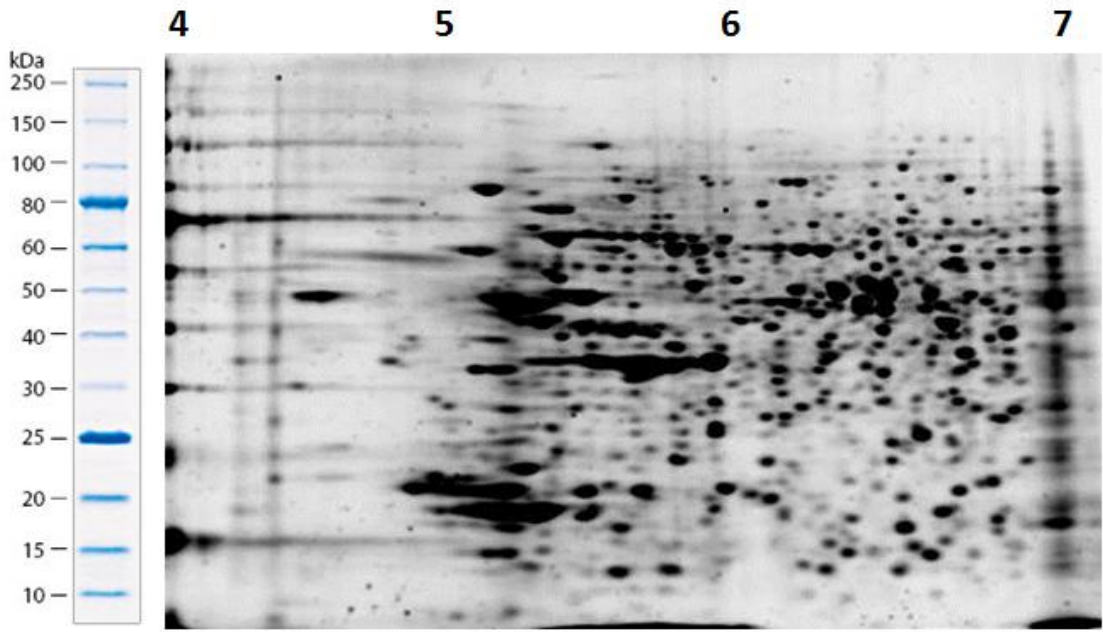
İki grup için alınan serpmе çizim (scatter plot) grafiği sonuçları Şekil 5.2-4’de gösterilmiştir. Verilen serpmе çizim grafikleri; gruplar arasında yoğunluğu en az 2 kat değişim gösteren protein kümelerini ifade etmektedir. Paralel çizgiler karşılaştırılan grupları temsil etmektedir. Paralel çizgiler arasında kalan protein kümelerinde önemli bir değişim yokken; çizgilerin dışında kalanlarda en az iki kat artış (üst bölge) ya da iki kat azalış (alt bölge) olduğu anlaşılmaktadır. Bu programla, iki boyutlu jellerdeki protein kümelerinin, gruplar arasındaki değişim durumlarını ifade eden serpmе grafikte karşılık geldikleri bölgeler, Şekil 5.2-4’de ki serpmе grafikte çarpı ile belirtilen alanda olduğu gibi, kolaylıkla belirlenebilmektedir.

Tüm bu veriler ışığında protein kümeleri tek tek incelenmiş ve önemli değişim gösterenler saptanmıştır.

Yapılan normalizasyonlar ile protein kümelerine ait kantitatif ışımaya verileri elde edilmiş ve bu veriler SPSS programında t-test kullanılarak değerlendirilmiştir. Peptit kütle parmak izi ile protein kimliklendirme çalışmaları için hem gruplar arası ifadeleri iki kat değişim gösteren protein kümeleri, hem de tanımlama yapılabilecek diğer tüm protein kümeleri jelden kesilerek çalışmaya dahil edilmiştir.

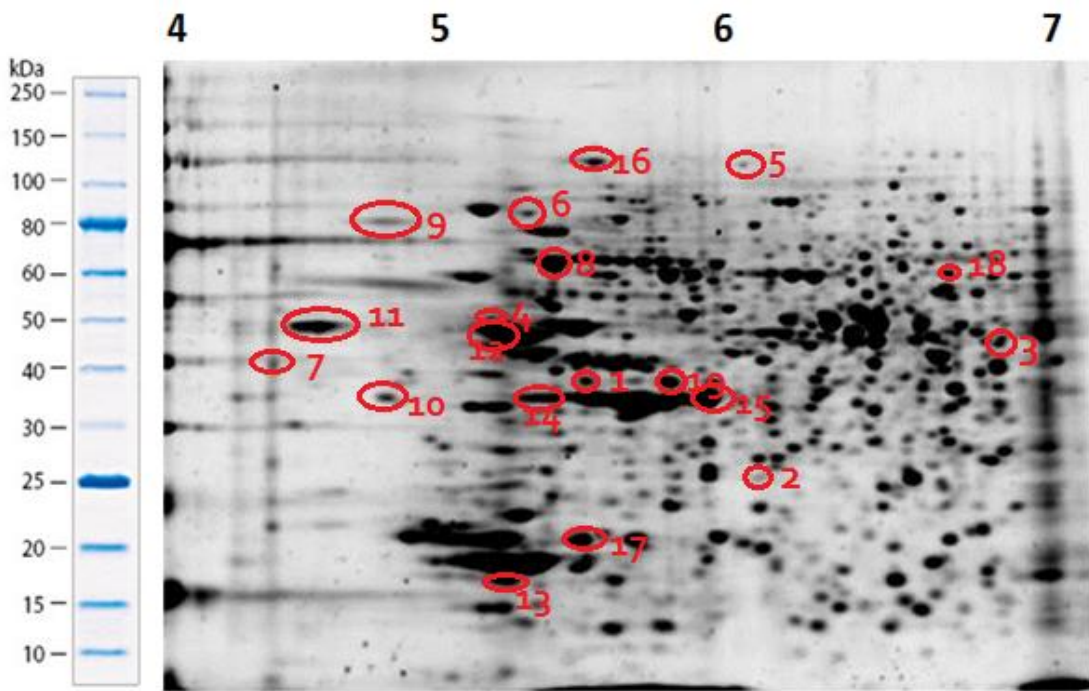


Şekil 5.7 Elde edilen neonatal iki boyutlu protein profil haritaları



Şekil 5.8 Elde edilen erişkin adacık iki boyutlu protein profil haritaları

MALDI TOF MS kütle spektrometresi ile tanımlaması yapılan proteinler Çizelge5.2-4'de gösterilmektedir.



Şekil 5.9 Kesim yapılan spotlardan protein tanımlaması yapılabilen spotlar

PMF Analizleri sonucunda toplamda 19 adet protein tanımlanmıştır. Tanımlanan proteinlerin skorları, uniprot giriş numaraları, kodlandıkları genlerin adları aşağıdaki çizelgede özetlenmiştir.

Çizelge 5.4 Kütle spektrometresi ile tanımlanan protein kümeleri ve bu kümelere ait bilgiler

SSP	Protein	UniProt numarası	NCBI Gen adları	Gözlenen kütle(Da)	Teorik kütle(Da)	Gözlenen pI	Teorik pI	Skor	Protein sekans kapsamı (%)	Araştırılan peptit sayısı /Eşleşen peptit sayısı
1	ELAV-like protein 4	O09032	Elavl4	45887	40937.73	5.40	6.45	68	%19	14/5
2	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	O88989	Mdh1	30000	36631	6.00	6.16	70	%30	14/8
3	Tripartite motif-containing protein 35	Q5RKG6	Trim35	49367	57267.21	6.00	6.73	61	%13	8/5
4	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	P10719	Atp5b	55674	56318.48	5.00	5.18	117	%39	23/15
5	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial	Q5SGE0	Lrpprc	140304	157808	6.00	6.20	87	%15	23/8
6	AMP deaminase 2	Q02356	Ampd2	96500	95411	6.00	6.06	70	%22	23/10
7	Tubulin alpha-1C chain (1B-1C-4A-1A-3)	Q6AYZ1	Tuba1c	50674	50590	4.00	4.96	91	%39	20/11

SSP	Protein	UniProt numarası	NCBI Gen adları	Gözlenen kütle(Da)	Teorik kütle(Da)	Gözlenen pI	Teorik pI	Skor	Protein sekans kapsamı (%)	Araştırılan peptit sayısı /Eşleşen peptit sayısı
8	78 kDa glucose-regulated protein	P06761	Hspa5	65400	72473	5.00	5.07	119	%31	22/16
9	Endoplasmin	Q66HD0	Hsp90b1	80986	92998	4.00	4.72	140	%15	12/12
10	Calreticulin	P18418	Calr	40130	48137	4.00	4.33	87	%17	16/8
11	Protein disulfide-isomerase	P04785	P4hb	51547	57315	4.00	4.82	80	%16	15/8
12	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	P63039	Hspd1	55953	61088	5.00	5.91	87	%24	25/9
13	Chymotrypsinogen B	P07338	Ptrb1	17521	28458	4.00	4.90	72	%34	19/5
14	Actin, cytoplasmic 1	P60711	Actb	39876	42052	5.00	5.29	68	%26	14/6
15	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1	Q9JJ19	Slc9a3r1	309752	39149	6.00	5.70	57	%28	21/8
16	Bile salt-activated lipase	P07882	Cel	59853	67397	5.00	5.31	76	%20	16/9
17	Leucine-rich repeat-containing protein 55	Q4KLL3	Lrrc55	27956	35289	5.00	5.87	54	%21	7/5

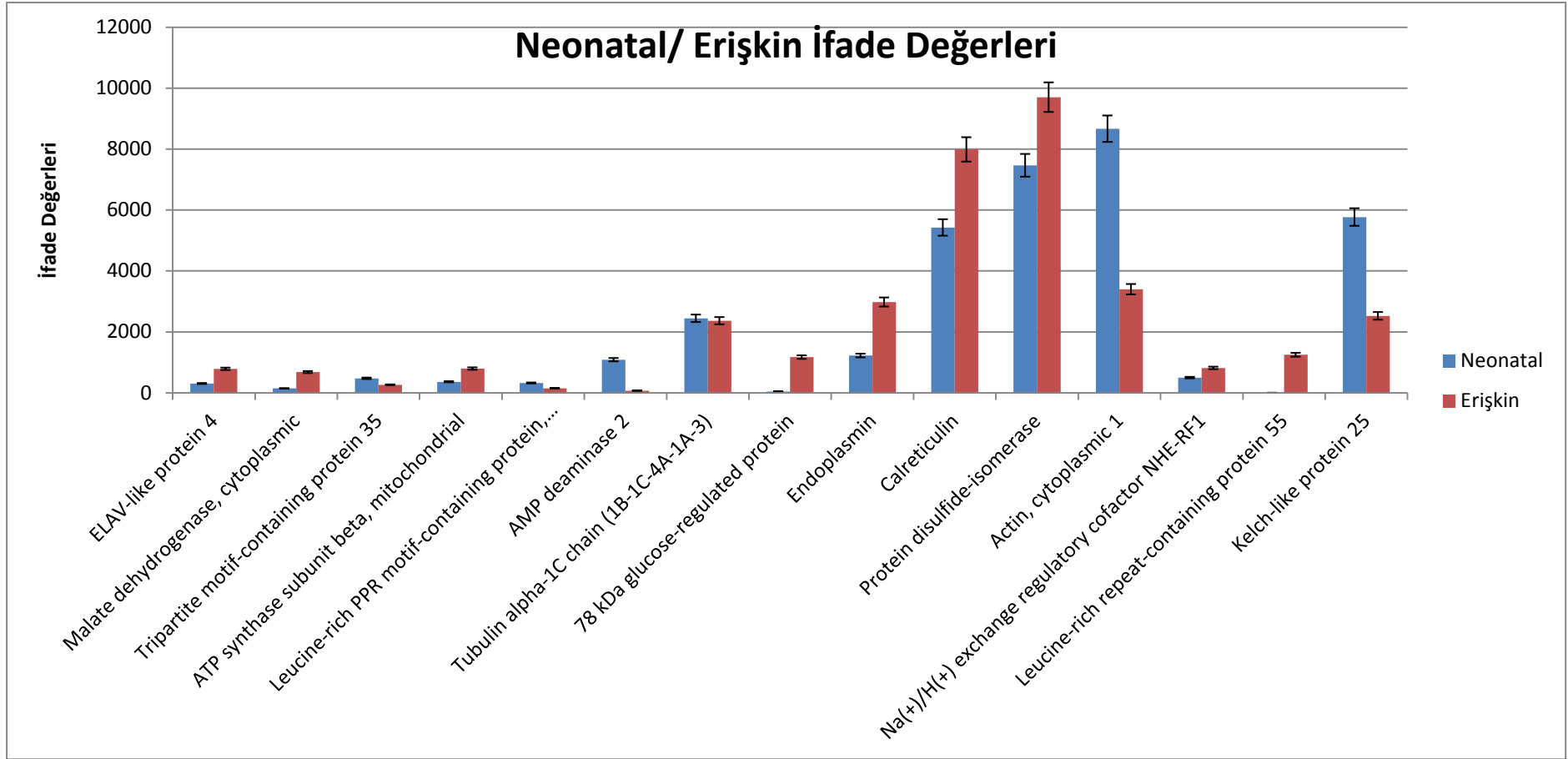
SSP	Protein	UniProt numarası	NCBI Gen adları	Gözlenen kütle(Da)	Teorik kütle(Da)	Gözlenen pI	Teorik pI	Skor	Protein sekans kapsamı (%)	Araştırılan peptit sayısı /Eşleşen peptit sayısı
18	Kelch-like protein 25	Q4KLM4	Klhl25	60843	66881	6.00	6.32	75	%19	12/9
19	Inactive pancreatic lipase-related protein 1	P54316	Pnliprp1	39856	53086	5.00	5.79	58	%19	12/7

PDQuest tarafından belirlenen kütle ve izoelektrik noktaları kesin değerler olarak kabul edilmezler, önemli sapmalar olabilir. Bu aşamada kullanılan programların skor verileri esas alınmıştır.

Çizelge 5.5. PMF yöntemleri ile tanımlaması yapılan protein kümelerinin anlamlı fark gösteren ifade verileri

SSP Nu	Tanımlanan Protein Adı	Neonatal Tekrar 1	Neonatal Tekrar 2	Neonatal Tekrar 3	Erişkin Tekrar 1	Erişkin Tekrar 2	Erişkin Tekrar 3	Neonatal/Erişkin İfade Oranları	P-değeri
4602	ELAV-like protein 4	420.2	275.5	217.4	336.1	715.3	906.9	0.4	0.122278
3107	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	96	146.3	188	668.9	347.7	720	0.2	0.021902
6306	Tripartite motif-containing protein 35	738.5	495.5	487.6	280.7	258.4	246.9	2.1	0.019775
3406	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	252.4	365.3	465.8	1143.5	477.4	762	0.4	0.099288
6708	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial	309	330.4	323.3	168.9	176.6	105.8	2.1	0.001855
2802	AMP deaminase 2	2806.3	172.2	280.1	51.4	88.6	66.8	15.7	0.302697
0304	Tubulin alpha-1C chain (1B-1C-4A-1A-3)	2281.3	3212.4	1839.3	3047.3	1936.5	2114	1.0	0.889861

SSP Nu	Tanımlanan Protein Adı	Neonatal Tekrar 1	Neonatal Tekrar 2	Neonatal Tekrar 3	Erişkin Tekrar 1	Erişkin Tekrar 2	Erişkin Tekrar 3	Neonatal/Erişkin İfade Oranları	P-değeri
1702	78 kDa glucose-regulated protein	0	50.8	80	961.7	1109.6	1438.3	0.03	0.001396
0701	Endoplasmin	742.3	1285.9	4637.1	3860.7	2810.6	2265.3	0.7	0.592844
0603	Calreticulin	5513.2	5031.9	5729.8	8921.5	8379.7	6662	0.6	0.022731
1601	Protein disulfide-isomerase	7413.4	7586.3	7396.3	11704.6	8867.1	8532.4	0.7	0.090806
2402	Actin, cytoplasmic 1	7014.8	7816.7	11167.8	3387.1	3896.3	2912.7	2.5	0.015578
5202	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1	368.6	741.3	382.7	1050.3	715.1	682.6	0.5	0.133225
5102	Leucine-rich repeat-containing protein 55	0	0	0	1470	1217.9	1052	0	0.000509
2503	Kelch-like protein 25	7776.8	4219.8	5304.8	2839.8	2551.3	2181.3	2.2	0.038709



Şekil 5.10. Tanımlaması yapılan spotlardan anlamlı fark olan protein kümelerinin grafik ile gösterimi

Çizelge 5.6. Tanımlaması yapılan proteinlerin KEGG,Cytoscape programları kullanılarak ontolojisi ve buldukarı yolaklar

Küme Numarası	Gen Sembolü	Gen Adı	KEGG Yolak/Ontoloji
1	Slc9a3r1	Solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), isoform 3 regulator 1	<ul style="list-style-type: none">• Büyüme faktörü reseptörleri ile doğrudan etkileşime girer. Proliferasyon açısından önemli olabilir.
2	Calr	Calreticulin	<ul style="list-style-type: none">• Antijenin proses edilmesi ve sunulmasını• Endoplazmik retikulumda proteinlerin katlanma kontrolleri• ER' de fagozom oluşum kontrolü• Hem proliferasyon hemde immün yanıt açısından önemli olabilir.
3	Atp5b	ATP synthase, H ⁺ transporting mitochondrial F1 complex, beta subunit	<ul style="list-style-type: none">• Oksidatif fosforilasyon ile ATP sentezi• Metabolik yolaklar• Hücre canlılığı ve proliferasyonu açısından önemli olabilir.
4	Lrpprc	Leucine-rich PPR-motif containing	<ul style="list-style-type: none">• Mitokondriyal Biyogenez• Hücre canlılığı ve proliferasyonu açısından önemli olabilir.• CRM1 taşıma yolağı

Küme Numarası	Gen Sembolü	Gen Adı	KEGG Yolak/Ontoloji
5	Hsp90b1	Tumor rejection antigen gp96	<ul style="list-style-type: none"> ER’de proteinlerin proses edilmesi PI3K-Akt sinyal yolağı Kanser yolaklarında etkin Proliferyasyonda etkin moleküllerden biri olabilir.
6	Ctrb1	Chymotrypsinogen B1	<ul style="list-style-type: none"> Pancreatik sekresyon Proteinlerin parçalanması ve emilimi Asinar hücre kaynaklı olabilir.
7	Ampd2	Adenosine monophosphate deaminase 2 (isoform L)	<ul style="list-style-type: none"> Metabolik yolaklar Pürin metabolizması
8	Hspa5	Heat shock 70kD protein 5 (glucose-regulated protein)	<ul style="list-style-type: none"> ER’de proteinlerin işlenmesi Antijenin işlenmesi ve sunulmasın Protein taşınması MAPK sinyal yolağı Canlılık ve insulin metabolizmasında etkin olabilir.
9	Actb	Actin, beta, cytoplasmic	<ul style="list-style-type: none"> Hücreler arası etkileşim Gelişim sürecinde hücrelerin hareketinden sorumlu Neonatal ve erişkin dönem farkları açısından önemlidir.

Küme Numarası	Gen Sembolü	Gen Adı	KEGG Yolak/Ontoloji
10	Trim35	Tripartite motif-containing 35	<ul style="list-style-type: none"> • Çinko bağlanmasında etkin • Başlangıç immün sistemde etkin (innate immune system) • Mitotik döngünün negatif regülasyonunda etkin
11	Pnliprp1	Pancreatic lipase related protein 1	<ul style="list-style-type: none"> • Gliserolipid metabolizması • Lipit metaboliklerin işlenmesi • Kalsiyum iyon bağlanması • Pankreasın gelişim sürecinde etkin
12	Cel	Carboxyl ester lipase	<ul style="list-style-type: none"> • Bile asid biyosentezi • Gliserolipid metabolizması
13	Mdh1	Malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)	<ul style="list-style-type: none"> • Sitrat döngüsü (TCA döngüsü) • Prüvat metabolizması • NAD ve NADH metabolic proses • Karbon fiksasyonu • Karbonhidrat metabolik proses

Küme Numarası	Gen Sembolü	Gen Adı	KEGG Yolak/Ontoloji
14	Hspd1	Chaperonin	<ul style="list-style-type: none"> • Type I diabetes mellitus yolağında görev almaktadır. • İnsüline bağlanır • De novo protein katlanması • GSIS'ta etkin olabilir.
15	Elavl4	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 4 (Hu antigen D)	<ul style="list-style-type: none"> • Nöral gelişim sürecinde aktif rol almaktadır.
16	Klhl25	Kelch-like 25 (Drosophila)	<ul style="list-style-type: none"> • Protein ubiquinasyonu • Translasyon başlama regülatörü
17	Tuba1c	Tubulin alpha-1C chain (1B-1C-4A-1A-3)	<ul style="list-style-type: none"> • GTPaz aktivitesi • Fagositoz yolağı
18	P4hb	Protein disulfide-isomerase	<ul style="list-style-type: none"> • ER etkilişimli degradasyon yolağı • Hipoksi oluşumuna cevap • ER stresi oluşması halinde denge kontrolü
19	Lrrc55	Leucine-rich repeat-containing protein 55	<ul style="list-style-type: none"> • İyonların Taşınması

6 SONUÇLAR VE TARTIŞMA

6.1 Diyabet tedavisinde proteomik yaklaşımların önemi

İnsan Genom Projesi sonrasında genomik çalışmalardan elde edilen bilgilerin sınırlı olduğunun anlaşılmasından sonra, genomün devamı olan proteomik; biyolojik olayların açıklanmasında önem kazanmıştır. Proteomik, belli şartlar altında ve belli bir dokuda genom tarafından kodlanan tüm proteinlerin toplamı anlamına gelmektedir. Proteomik çalışmaların esas amacı bütün hücre, doku ve vücut sıvılarındaki proteinleri, özellikleri ve ifade seviyelerini de içerecek şekilde, tanımlamaktır. Gelişmiş teknolojiler olmasına karşın, proteom çalışmalarının tekrarlanabilirliği ile ilgili sorunlar henüz aşılamamıştır. Tekrarlanabilirliğin sağlanabilmesi için proteomik yöntemlerin kullanıldığı çalışmalar üç tekrar elde edildikten ve adacık protein profilleri arasında tekrarlanabilirlik sağlandıktan sonra ana deneyler gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında sıçan adacık hücreleri kullanılmıştır. Adacıkların iki boyutlu jel elektroforezi kullanılarak protein haritaları elde edilmiştir. Bu tez çalışması ile izolasyonu yapılan neonatal adacık hücrelerinin protein profil haritaları ilk kez literatüre kazandırılmıştır. Bu protein profilinde yer alan protein kümeleri tek tek incelenerek, gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı değişim gösterenler belirlenmiştir. Gruplar arasında anlamlı değişim gösteren 70 protein kümesi jellerden kesilmiş ve PMF yöntemiyle toplam 19 protein tanımlanmıştır. Tez kapsamında bu iki grubun karşılaştırmalı analize tabi tutulmasında üç temel sebep vardır:

1. Neonatal dönemde adacık hücrelerinin proliferasyon hızlarının erişkin dönemlere oranla fazla olması (1),
2. Erişkin dönem adacıklarının immün sistem saldırılarına karşı daha açık olma olasılıkları (106),
3. Erişkin dönemde glikoz stimülasyonu ile insülin salınımının daha aktif olması (110).

PMF ile tanımlanan proteinler bu üç temel sebep çerçevesinde tartışılacaktır.

6.2 Proliferasyon Etmenleri Açısından Değerlendirilmesi

Bilindiği üzere neonatal dönemde başta beta adacık hücreleri olmak üzere adacık grubunda yer alan hücrelerde proliferasyon hızında artış gözlenen çalışmalar bulunmaktadır. Bu kapsamda elde edilen veriler ışığında aşağıda yer alan proteinlerin hücre çoğalmasında rol alabilecekleri düşünülmektedir.

- **Slc9a3r1:** NA/H transformasyon kanalı olarak da bilinen bu protein grubu, canlılığının evrim sürecinde en baştan beri var olan protein gruplarından. Çeşitli fizyolojik aktivitelerde önemli rol oynayan SLC ya da NHE olarak bilinen protein grubu pH dengesinin sağlanmasında görev almaktadır. Bu etki ile rol aldığı başlıca fizyolojik aktiviteler hücre döngüsü düzenlenmesi, hücre bölünmesi, transepitel sodyum akışı, tuz toleransı gelişimi, biyogenez ve sekresyon için kesicik oluşumudur. Bu aşamada tez kapsamında önemli olan nokta ise Slc9a3r1 proteininin hücre proliferasyonu ve biyogenezde rol alan moleküllerden biri olmasıdır (111). SLC grubuna ek olarak yer alan NA/H transformasyon regülatör proteinlerden olan Slc9a3r1 diğer adı ile NHE-RF1'nin, WNT sinyal yolunda yer alan beta katenin ile ilişki halinde olduğu bilinmektedir. Bu ilişki PDZ domain ile gerçekleşmektedir. NHE-RF1'nin beta katenin ile ilişkisi sonucu hücrede meydana gelen değişiklikler net olarak bilinmemektedir. Bazı çalışmalar bu ilişkinin hücre proliferasyonunu negatif etkilediğini göstermekte iken bazı çalışmalar ise tersine pozitif etkilediğini göstermektedir (112). Bu durum NHE-RF1 ile beta katenin etkileşiminin ektopik bir sonucunun olduğunu göstermektedir. Tez kapsamında elde ettiğimiz veriler ile NHE-RF1'nin erişkin dönem adacıklarında ifadesi artan grupta olmasından dolayı bu etkileşim neticesinde beta hücre proliferasyonunda baskılayıcı rolü olduğunu düşünülebilir.

- **Actb:** Beta Aktin olarak bilinen ACTB insanda tanımlanan altı farklı aktin izoformundan biridir. Kas kökenli olmayan iki aktin formundan birisi olan bu sitoplazmik protein, hücre hareketliliği, hücre yapısı ve bütünlüğünde önemli rol oynamaktadır (113).

Aktin bulunan protein kümesinin ifadesi neonatal dönem adacıklarında artış göstermiştir. Bu durum iki açıdan açıklanabilir. İlki aktinin hücre taşınmasına ek olarak aktif olarak görev aldığı olaylardan birisi olan hücre döngüsüdür. Yapılan bir

çalışmada, aktin knock-out mezenkimal hücrelerde hücre proliferasyonunun sekteye uğradığını tespit etmişlerdir (114). Çalışmanın devamında aktin ifadesinin arttırılması halinde hücrelerin nasıl bir değişim gösterdiğine bakılmamıştır. Bu durumda aktin ifadesinin artmış olmasının hücre proliferasyonunu arttırdığının net olarak söylenmesi doğru olmayacaktır ancak olası açıklamalar dahilinde sıralanabilir. Bu duruma ek olarak neonatal dönemde aktin molekülünün artış göstermesi o dönemde proliferasyon hızının fazla olması sebebiyle de olabilir.

İkinci açıklama ise aktinin gelişim sürecinde aktif rol oynayan moleküllerden biri olmasıdır. Aktinin en bilinen fonksiyonu hücre hareketliliğinden sorumlu moleküllerden biri olmasıdır. Bu rolü ile gelişim sürecinde hücrelerin doğru konumlanmasında yer almaktadır (115). Neonatal dönemde hücrelerin tam olarak olgunlaşmasını tamamlamamalarından dolayı hareketin devam etmesi ve aktinin artış göstermesi olasıdır.

- **Trim 35:** Tez kapsamında tanımlanan proteinlerden biri olan Trim35; tripartit-motif içerenler ailesindedir. İlk olarak kemik iliğinde yer alan makrofajlarda tanımlanmıştır. Genel anlamda tümör-baskılayıcı genler arasında da yer alan Trim 35'in bu fonksiyonunu tam olarak nasıl gerçekleştirdiğine dair net bir bilgi bulunmamaktadır. Trim 35'in HCC hücre hattında Warburg Etkisi üzerinden hücre proliferasyonunu baskılayıcı bir etki gösterdiği bilinmektedir (116). Aynı zamanda Xue W. ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada kanserleşme aşamasındaki hücrelerin kromozal delesyon aşamasında Trim 35'in de yer aldığı 8. kromozomdan geniş bölgelerin silindiğini gözlemlemişlerdir. Detaylandırılan çalışma kapsamında Trim 35'in hücre proliferasyonunu baskıladığı bu çalışma ile de onaylanmıştır (117). Tez kapsamında Trim 35'in tanımlandığı protein kümesinin ifadesinin PDQuest 8.1.1 programı ile erişkin dönemde anlamlı olarak artış gösterdiği tespit edilmiştir. Bu durumda Trim 35 'in kanser hücrelerinde gözlenen proliferasyonu bloklama özelliği ile erişkin dönemde proliferasyon hızının düşük olması durumu genel haritaya uymaktadır. Buna ek olarak Trim 35'in proliferasyon hızını düşürme etkisi preadiposit hücrelerinde de kanıtlanmıştır (118). Elde edilen sonuç ile iki farklı yorum yapmak mümkündür. Bunlardan ilki Trim 35 adacık

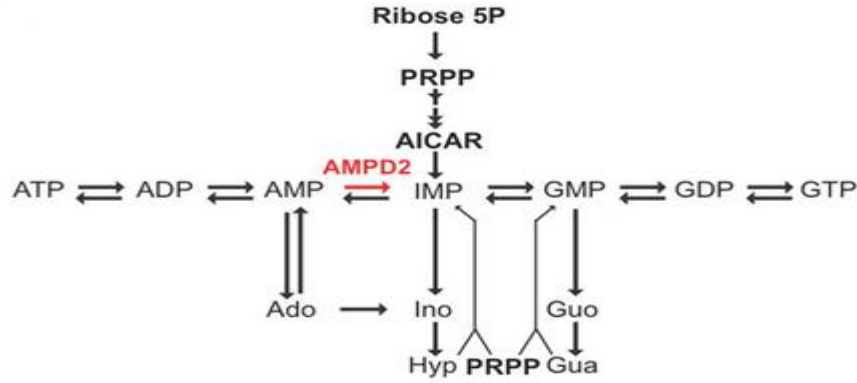
hücre grubunun erişkin döneme geçişi aşamasında proliferasyon hızını düşüren etmenlerden birisi olabileceğidir. İkincisi ise Trim 35'in bu etkisini sadece Warburg Etkisi üzerinden değil aynı zamanda kanserleşmemiş hücrelerde de gösterebileceğidir.

- **Elavl4:** Elavl4 proteinin temel olarak gelişme sürecinde de etkinliğini sağlayan temel fonksiyonları AU zengin olan RNA bölgelerine bağlanması temeline dayanır (119). AU bakımından zengin olan bölge taşıyan mRNA'lar ile olan iletişimleri neticesinde ELAVL4 ya da HuD proteininin hücre içindeki temel rolleri proliferasyon ve insülin metabolizması üzerindeki etkileri şeklinde iki açıdan incelenebilir. Hücre proliferasyonu üzerindeki etkisini 2011 yılında Choi ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada akciğer kanser hücre hattı olan A549 hücre grubunda Elavl4'ün susturulması ile hücrelerin proliferasyon kapasitelerinin düşüşü ile gözlenmiştir. Elavl4'ün RNA proses aşamasında ilişikte olduğu RNA'lar arasında hücre proliferasyonu açısından önemli olan yolaklarda etkin olanların olduğu düşünülmektedir. (120). Bu yolaklar arasında p53 ve PI3K-Akt yer almaktadır. p53 etkisinin DNA hasarı sonrasında gerçekleştiği düşünülmektedir. Elavl4'ün PI3K-Akt ile ilişkisinin hücre döngüsünü arttırıcı ve hatta apoptoz sürecini yavaşlatan bir süreci etkilediği düşünülmektedir (116).

Çalışma kapsamında neonatal dönem adacıklarda anlamlı bir artış gösteren Elavl4'ün bu grupta gözlenen yüksek proliferasyon kapasitesi ile ilgili moleküllerden biri olduğu düşünülmektedir. Bu hipotezin doğruluğunun gösterilmesi için nicel analizlerin yapılması gerekmektedir.

- **Ampd2:** AMP deaminaz 2 enzimi yaklaşık olarak 95KDa ağırlığında olan ve pürin metabolizmasında AMP'nin IMP'ye dönüşümünü sağlayan bir enzimdir. Görevinden de anlaşılacağı üzere Ampd2 enzimi pürin metabolizmasında önemli bir yere sahiptir. İskelet ve karaciğer hücrelerine özgün aktivite gösterdiği düşünülen Ampd2'nin diğer hücrelerde de glikozun hücre içine alınıp metabolize edilmesinde önemli olduğu bilinmektedir. 2013 yılında yapılan çalışma ile bu proteinin nöral gelişim sürecinde aktif rol aldığı ve gelişim sürecinde ortaya çıkan PCH9 olarak bilinen bir nörodejeneratif hastalıkta etken olduğu tespit edilmiştir

(121). Yapılan literatür araştırmalarında Ampd2 enziminin adacık hücrelerinde hangi rollerde yer aldığına dair açıklayıcı bir çalışmaya rastlanmamıştır.



Şekil 6.1. Purin metabolizması ve AMPD2'nin rolü (121).

Tez kapsamında Ampd2'nin neonatal dönem adacıklarında ifadesinin artış gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak bu artış anlamlı değildir. Yukarıda bahsedildiği üzere adacık hücrelerinde Ampd2'nin rolü hakkında bir çalışma bulunamamıştır. Elde edilen neonatal dönem artışı iki şekilde açıklanabilir. Bunlardan ilki 2013 yılında Akizu N. ve arkadaşlarının Ampd2, purin metabolizmasında dengeyi GTP'ye doğru kaydardıkları yönündeki bulgularıdır. Büyümeden sorumlu olan hangi genlerin Ampd2 yokluğundan etkilendiği henüz bilinmemektedir. Çalışmanın devamında Ampd2 yokluğunun yol açtığı sonuçların dışarıdan adenozin eklenmesi ile dengelenebildiği gözlenmiştir. Bu aşamada bu etkinin büyüme faktörlerinin genelinde gözlenmesi beklenmektedir. Hatta bu durum akla büyümenin tutulmasının sebebinin DNA replikasyonu için gerekli adenozinin sağlanamamasından olduğunu getirmektedir. (121). Neonatal dönemde hücrenin büyümeye devam ettiği, dolayısıyla bu proteine daha çok ihtiyacı olduğu için ifadesini arttırdığı düşünülebilir. Ancak konunun daha detaylı olarak araştırılması gerekmektedir.

Neonatal dönemde Ampd2 proteininin ifadesinde artış gözlenmesinin bir diğer açıklaması ise Ampd2'nin mikrotübül oluşmasındaki etkinliğidir. Neonatal dönem adacıklarının olgunlaşma yolunda olan hücre grubu olduğu bilinmektedir. Nitekim çalışma kapsamında tübülün ailesi ve aktin proteininin ifadesinin de artışı tespit edilmiştir. Literatür araştırması esnasında neonatal dönemde pankreasta adacık

hücre dağılımlarının nasıl olduğuna dair bir boyamaya rastlanmamıştır. Bu dönemde hücreler; aktivitelerini gösterebilecekleri doğru konuma gelebilmek için hareket kabiliyetinde etkin olan proteinlerini kullanabilirler.

- **LRPPRC:** Yaklaşık olarak 130 KDa olan mitokondriyal lösin zengin PPR motif içeren protein ilk olarak insan kanser hücre hattındaki ifade artışı ile dikkat çekmiştir. Hücre homeostazında ve mikrotübül oluşumundaki etkinliği bilinmektedir. Bu rollerine ek olarak yine hepatokarsinoma hücrelerinde anti-apoptotik rolü de keşfedilmiştir Correa ve arkadaşları, yapmış oldukları çalışma kapsamında LRPPRC'nin BTF3 ile fiziksel bir interaksyonu olduğunu tespit etmişlerdir. BTF3, Myc proteini ile etkileşimi olan bir proteindir. Myc ise hücre proliferasyonu üzerinde etkin olan proteinlerden biridir. Bu çalışma kanser hücre hattında yapıldığı için LRPPRC'nin ifade artışının proliferasyon üzerindeki pozitif etkisi adacık hücreleri için uygulanabilir olup olmadığı bilinmemekle beraber, neonatal dönem adacıklarının yüksek proliferasyon hızında LRPPRC'nin etkin olan moleküllerden biri olduğu düşünülmektedir (122).

Proliferasyon üzerinde ki etkisine ek olarak LRPPRC aynı zamanda CRM1 yolağında yer almaktadır ki bu yolak gelişim sürecinde rol almaktadır. Temel anlamda sekresyondan sorumlu olan bir yolaktır. Burdan da LRPPRC aynı zamanda gelişim sürecinde ki rolü itibari ile neonatal dönemde artış göstermesi olasıdır (123).

- **KLHL25:** Kelch motifi içeren KLHL ailesine ait izoformlardan biri olan bu protein translasyon başlamasında ve ubiquitinasyonda rol almaktadır. Translasyon üzerindeki etkisi ise E3 ubiquitinasyon üzerinden gerçekleşir. KLHL25 proteini eIF14' e bağlanıp onun translasyon başlama kompleksi oluşturmasına engel olan 4EBP1 proteinin degradasyonunu katalizler. Bu durumda KLHL25 proteini translasyon başlama aktivitesini arttıran proteinlerden biri olması ve bunu en düşük konsantrasyonda olan eIF14 üzerinden gerçekleştirmesi sebebi ile kanser tedavisinde kullanılması planlanan hedef moleküllerden birisidir. Translasyon başlama faktörü üzerindeki bu etkisi hücre büyümesi, proliferasyonu ve gelişimi sürecinde etkin olan yollarla doğrudan bağlantılıdır (124). Çalışma kapsamında

neonatal dönem adacıklarında fazladan ifadenmesi durumunu açıklayan bir sonuçtur. Daha önce neonatal ve erişkin dönem kıyaslamasında bu proteinin rolü üzerinde herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bu tez kapsamında yapılan çalışmalar ile tanımlanan bu protein, neonatal dönem adacıklarının yüksek proliferasyon hızının temelinde yatan proteinlerden biri olabilir.

Buna ek olarak KLHL25'in aktivitesi ile degrede olan 4EBP1 proteininin adacık hücrelerinde ATF4 bağlantısı ile ER stresinden koruduğunu gösteren bir çalışma bulunmaktadır. Bu durumda KHLH25 proteinin aktivasyonunun erişkin dönemde daha düşük olması çerçeveye uygun bir tutum sergilemektedir. Erişkin dönem adacıklarında yoğun insulin salgılanmasından dolayı hücre ER stresine girer. Bu durumda ATF4 aktivasyonu ile 4EBP1 proteini aktive olur ve translasyon inhibisyonu ile hücre ER stresinden korunur. Bu olayların başında yer alan protein KHLH 25 proteini olabilir. Bu dönemde adacık hücreleri KHLH 25 proteininin aktivitesi düşürerek kendini ER stresten koruyabilir (125).

6.3 İmmün Sistem Açısından Değerlendirilmesi

- **Gp96:** 94 kDa glucose-regulated protein veya tumor rejection antigen (Gp96) olarak da adlandırılan bu protein hsp90 ailesine ait bir ısı şoku (heat shock) ve, oldukça korunmuş olan bir glikoproteindir. Genellikle endoplazmik retikulumda (ER) bulunur ve şaperon olarak protein katlanmalarından sorumludur. Birçok antijenle de ilişkili olduğu bilinmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar; bu proteinin büyük doku uygunluk kompleksi sınıf-1-(MHC/ major histocompatibility complex class I) antijen sunum yolağınının bir parçası olduğunu göstermiştir (126). Gp96 proteini patojen kaynaklı olmayan aksine hücrenin gördüğü zarar doğrultusunda inflamatuvar etki gösteren (Damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs)), sitokin salgısında etken olan bir proteindir. Dolayısıyla GP96'nın inflamatuvar bir etki yarattığı da bilinmektedir. Aynı zamanda gp96 proteinin ifadenmesi Tip 1 diyabet hastalarında artış göstermektedir (127,128). Bu bilgilerden yola çıkarak erişkin dönemde ifadenmesinde artış tespit edilen bu proteinin, bu dönemin immün saldırılara daha açık olma olasılığını arttıran ve bu doğrultuda hedef olarak kullanılabilir bir protein olduğu söylenebilir.

- **Calr:** CALR geni tarafından kodlanan kalretikulin 46 kDa ağırlığında Ca^{+2} bağlayan multifonksiyonel bir proteindir. Afinitesi düşük olmakla birlikte depo kapasitesi yüksek olduğundan dolayı yüksek oranda kalsiyumu tutarak inaktif hale getirir ve kalsiyum dengesinin sağlanmasında etkin rol alır. ER'de kalneksin ile birlikte N-bağlı glikoproteinlerin şaperonu olarak görev alması Kalretikulin'in diğer bir önemli fonksiyonudur. Spesifik karbonhidrat yapıları için bir tanıma bölgesine sahip olan kalretikulin; oligosakkaritleri tanıyarak katlanmamış glikoproteinlere bağlanan, doğru katlanmalarını kontrol eden, organellere geçişini kolaylaştıran ve stres durumunda proteinlerin çökmesini engelleyen bir ısı şoku proteindir. Çalışma kapsamında kalretikulinin bulunduğu protein kümesi erişkin dönemde anlamlı olmasa da ifade olarak artış göstermiştir. Kalretikulin glikoprotein yapısında olan MHC 1 moleküllerinin katlanmasında ve kontrolündeki etkin proteinlerden biridir. Bu kapsamda adacık nakli için nakli yapılan hücrelerde avantaj ve dezavantaj tartımına alındıktan sonra aktivitesi düşürülecek proteinler arasına alınabilir (129–131).
- **HSPD1:** HSP60, HSP65, CNP60 olarak da bilinen bu proteinin bilinen en temel fonksiyonu protein katlanmasındaki rolüdür. Buna ek olarak Tip 1 Diyabet oluşumu esnasında etkinliği bilinmektedir HSPD1 proteini immün sistem aktivasyonunda rol alan proteinlerden olması sebebi ile Tip 1 Diyabet patolojisi gösteren hastalarda ifade artışı tespit edilmiştir. Ancak 2006 yılında yapılan başka bir çalışma bunun tek başına bir faktör olamayacağını sunmuştur (132,133). Tez çalışmaları kapsamında elde edilen sonuçlarda erişkin dönemde ifade artışı gösteren bu protein, erişkin döneme geçiş ile adacık hücrelerinin immün sistem saldırılarına daha açık olma hipotezine kanıt olarak gösterilebilecek proteinler arasında yer alabilir

6.4 İnsülin Salınımı Açısından Değerlendirilmesi

- **CALR:** CALR geni tarafından kodlanan kalretikulin; Endoplazmik retikulumda bulunan, 46 kDa ağırlığında Ca^{+2} bağlayan multifonksiyonel bir proteindir. Afinitesi düşük olmakla birlikte depo kapasite yüksek olduğundan dolayı yüksek

oranda kalsiyumu tutarak inaktif hale getirir ve kalsiyum dengesinin sağlanmasına yardımcı olurlar. ER’de kalneksin ile birlikte N-bağlı glikoproteinlerin şaperonu olarak görev alması Kalretikulin’in diğer önemli fonksiyonudur. Spesifik karbonhidrat yapıları için bir tanınma bölgesine sahip olan kalretikulin; oligosakkaritleri tanıyarak katlanmamış glikoproteine bağlanan, doğru katlanmalarını kontrol eden, organellere geçişini kolaylaştıran ve stres durumunda proteinlerin agregasyonunu engelleyen bir heat shock proteinidir. Çalışma kapsamında kalretikulinin bulunduğu protein kümesi erişkin dönemde artış göstermiştir. Yapılan çalışmalar göstermektedir ki ER’de katlanmadan sorumlu proteinler beta hücrelerinin GSIS fonksiyonunda etkindirler. Diyabet patolojisi oluşumunda katlanma proteinleri önemli rol oynamaktadır. Çalışmamız sonunda ifade artışı göstren kalretikulin adacık hücrelerinin olgunlaşması sürecinde insulin salınımı konusunda daha aktif bir rol üstlenmesinde önemli olan proteinlerden biri olabilir. Buna ek olarak kalsiyum metabolizmasında ki önemi de insülinin sekresyonu sürecinde etkin olmasından dolayı adacık nakli öncesinde hücrelerin GSIS aktivitesini arttırması için ifadesi arttırılması gereken proteinlerden birisi olabilir (134).

- **Elavl4:** Elavl4 proteinin gelişim sürecinde de etkinliğini sağlayan temel fonksiyonları AU zengin olan RNA bölgelerine bağlanması temeline dayanır. Ins2 mRNA ‘sı ise yaklaşık olarak 24 saatlik yarı ömrü ile uzun süre beta hücrelerinde translasyon için bekleyen RNA’lardan biridir. Bu uzunluğun sağlanmasında 3’ UTR bölgesi etkindir. HUD protein mRNA ‘ların 3’ UTR bölgelerine bağlanarak ifadenme düzeyini etkiler. Bu etki hem negatif hem de pozitif yönde olabilir. Lee ve arkadaşları 2012 yılında yaptıkları çalışma ile hem HUD proteinin nöronlara spesifik olmayıp beta hücrelerinde de ifadelendiğini tespit ettiler hem de HuD proteinin Ins2 mRNA’larının 5’UTR bölgesine bağlanarak insülinin ifadenmesini blokladığını tespit etmişlerdir. Bu çalışma sonucunda elde edilen bilgi HuD proteinin ifade düzeyinin artması insülinin mRNA seviyesi sabit olmasına karşın ifadenmesini azaltır şeklinde özetlenebilir (135).

Tez kapsamında yapılan çalışma sonucunda Neonatal dönem adacıklarının protein profili verilerinde HuD proteinin tanımlandığı protein kümesinde artış tespit

edilmiştir. Bu durumda neonatal dönemde glikoz stimüle insulin salınımının yeterinde aktif olamamasının sebeplerinden biri HuD proteininin artan ifadesi kaynaklı olabilir.

- **ATP5b** : ATP5B geni tarafından kodlanan 56 KDa olan bu protein ATP sentaz enziminin bir parçasıdır. Mitokondriyal ATP sentaz enzimin beta alt ünitesini oluşturan bu parça mitokondride ATP sentez/yıkım reaksiyonlarından sorumludur. Ayrıca oksidatif fosforilasyon esnasında protonların mitokondri zarındaki dengesini sağlar. Yapılan çalışmalar göstermektedir ki oksidatif fosforilasyon ile glikoz stimuli insulin salınımı arasında birbirleri ile doğru orantılı olmak üzere bir bağ bulunmaktadır (109) Glikoz varlığında beta hücreleri ATP sentezini oksidatif fosforilasyon ile arttırarak sitoplazmadaki ATP/ADP oranını arttırır. Bu da hücre içi Ca^{2+} oranını arttırır. Hücre içindeki bu oranın artışı ile üretimi yapılan ve katlanması sona eren insülin hücre dışına salınır. Bu durumda GSIS reaksiyonlarının daha aktif olduğu erişkin dönem hücrelerinde bu proteinin aktivitesinin artmış olması beklenir (136). Ancak çalışma kapsamında ATP5b ifadesi erişkin grupta daha fazla olarak tespit edilmiştir.

Bilindiği üzere ATP sentezine hücre içindeki birçok metabolik olayda ihtiyaç duyulmaktadır. Gelişim sürecinde gözlenen yüksek proliferasyon, farklılaşma, hareket gibi olaylar içinde hücre gerekli enerjiyi ATP sentezinin artışı ile sağlar. Dolayısıyla erişkin grupta gözlenen artış ile tezat bir tabloda karşımıza çıkmaktadır.

Tez kapsamında yapılan çalışmalar jel tabanlı proteomik analizleri içermektedir. Bu proteinin her iki grup içinde artışı olasıdır ve yapılan çalışmalar sonucunda kantitatif bir sonuç elde edilmemiştir. Çalışmanın devamında bu protein için Western Blot gibi yarı-kantitatif bir çalışma yapılması gerekmektedir. Böylece bu proteinin GSIS metabolizmasında mı yoksa gelişim sürecinde gözlenen süreçlerin doğal sonucu ile mi artış gösterdiği tespit edilmiş olacaktır.

- **Grp78 (Hspa5)**: HSPA5 geni tarafında kodlanan bu protein yaklaşık olarak 73 KDa ağırlığında olup heat-shock protein 70 ailesinin mensubudur. Endoplasmik retikulumun lumeninde yer almaktadır ve hücrede içinde ki temel fonksiyonu

protein katlanmasının regülasyonudur. Aynı zamanda protein taşınmasından da sorumludur. Yapılan çalışmalar göstermektedir ki ER’de katlanmadan sorumlu proteinler beta hücrelerinin GSIS fonksiyonunda etkindirler. Diyabet patolojisi oluşumunda katlanma proteinleri önemli rol oynamaktadır. HSPA5 proteinin aynı zamanda katlanmamış protein cevabının oluşmasında da rol almaktadır (137). Beta hücrelerinin erişkn dönemde yoğun bir şekilde insulin salgılamasından dolayı katlanmada rol alan HSPA5’nın ifade artışının olması beklenen bir sonuçtur.

- **P4HB:** PD1A1 proteinlerde sistein kalıntıları arasındaki disülfid bağlarının oluşumunu, yıkımını ve yeniden yapılandırılmasını katalizleyen çok işlevli bir proteindir. ER lümeninde yer alan bu protein hücre içinde protein katlanmasında disulfid bağlarının düzenlenmesinden sorumludur (137). Katlanmada olan rolü sebebiyle beta hücrelerinde gözlenen yoğun insulin üretimi neticesinde ve GSIS aşamasında ifadelenenin artışı beklenen bir sonuçtur.
- **HSPD1:** HSP60,HSP65,CNP60 olarak bilinen bu proteinin bilinen en temel fonksiyonu protein katlanmasında ki rolüdür ve katlanan insulin ile etkileşimi bilinmektedir (137). Dolayısı ile erişkin dönem adacıklarda ifade artışı göstermesi beklenmektedir.
- **MDH1:** Malat dehydrogenaz 1 enzimi TCA döngüsünde NAD/NADH metabolik süreçte aktif olarak rol alan bir enzimdir. Yapılan çeşitli çalışmalar MHD1 enziminin daha yüksek glikoz sensitivitesi gösteren beta hücre grubunda ifadesinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Daha önce Martens ve arkadaşları yapmış oldukları neonatal ve erişkin dönem adacık karşılaştırmasında erişkin dönemde glikoz stimuli insulin sentezinden etkin olan 2 enzimden biri olarak MDH1’i göstermişlerdir (109,137). Dolayısıyla çalışma kapsamında elde etmiş olduğumuz erişkin dönem MDH1 proteinin ifade artışı daha öncede yapılan çalışmalarını destekler şekildedir ve beklenen bir durumdur ve erişkin dönem adacıklarının daha aktif olan GSIS sürecinde etkin olan bir moleküldür.
- **LRRC55:** Lrrcc 55 proteini hücre membranında yer alan BK olarak bilinen voltaj kapılı Sodyum/kalsiyum kanallarının gamma alt grubunun bir üyesidir. Lrrc 26

daha yaygın olarak bilinen bir izoformudur ve Lrrc26'nın paraloğu olarak tanımlanmaktadır. Çalışma kapsamında Lrrc 55 proteininin bulunduğu protein kümesi erişkin dönem adacıklarında ifade artışı göstermiştir. Daha önce yapılan herhangi bir çalışmada bu proteinin adacık beta hücrelerinde ifadesi gözlenmediği için bu hücredeki olası roller hakkında yorum yapmak güçtür. Ancak Lrrc 55; BK gamma alt grubu olarak sinir hücrelerinde hücre içi kalsiyum dengesinde rol aldığı bilinmektedir (138). Proteinin her dokuda ki rolü ve etkinliği farklılık gösterebilir. Ancak adacık hücrelerinde kalsiyum dengesinin hücreden insülin salınımı konusundaki etkisi de bilinmektedir. Lrrc 55 proteininin adacık hücrelerinde ifadesinin kesin olarak tespit edilmesi halinde insülin salınımı üzerinde etkisi olan proteinlerden biri olabilir.

6.5 Asınar Hücre Kaynaklı Tespit Edilen Proteinler

- **Cel, Pnliprp1, Ctrb1:** Tanımlanan proteinler arasında yer alan bu 3 protein asınar hücre kaynaklı olan pankreatik salgı ürünleridir. Her ne kadar manuel ayırma ile mümkün olan en yüksek saflıkta adacık hücresi izole edilmeye çalışılsa da az miktarda asınar hücre karışımı da söz konusudur. Bu proteinler yine de listede verilmiştir çünkü asınar hücre kaynaklı olmasına karşın pankreasın dolayısıyla adacık hücrelerinin normal gelişimi için gerekli olan salgılardır. Günümüzde aktif olarak asınar hücre salgı lizatları ile çalışmalar yapılmakta ve bu çalışmalar ile beta hücrelerinin insülin salınım kapasitesinin arttırımı başta olmak üzere adacık nakli ya da diyabet patolojisinin iyileştirilmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmektedir. Dolayısı ile bu proteinlerin varlığının insülin salınım kapasitesi üzerinde ki etkilerinin de adacık nakli sürecinde hücrenin hazırlanması aşamasında etkin olabileceği düşünülebilir.

6.6 Tartışma Özeti

Bu çalışmalar ile; adacık hücre gelişim sürecinde etken moleküllerin protein seviyesinde tanımlanarak bu süreçte adacık fizyolojisinde farklılık gösteren özelliklerin altında yatan moleküler mekanizmalar için önemli olabilecek proteinler tanımlanmıştır. Elde edilen sonuçlar ile adacık gelişim sürecinde etkin olabilecek protein verileri elde edilmiştir. Erişkin ve neonatal olmak üzere oluşturulan iki grubun proliferasyon, insülin salınımı,

immün sistem ve gelişim süreci açısından proteom ebadında karşılaştırmalı analizleri ilk defa bu tez kapsamında gerçekleştirilmiştir.

Yapılan tez çalışması kapsamında Wistar sıçanlarından izole edilen adacık hücreleri kullanılmıştır. Özellikle yeni doğan dönem sıçanlarından adacık izolasyonu nun yöntemsel açıdan kısıtlamaların olması, hem yeni doğan hemde erişkin dönem verilerini özgün kılmaktadır. Ayrıca çalışma kapsamında elde ettiğimiz sonuçlardan birisi de neonatal sıçandan adacık izolasyonu protokolünde Ficoll yoğunluk ayrımının uygun bir yöntem olduğudur. Bazı literatür çalışmalarında neonatal dönem adacık izolasyonunun manuel yapılması gerektiği savunulmuştur, yapmış olduğumuz çalışma kapsamında Ficoll kullanılarak yapılarak ayırım ile hücrelerin daha az strese girmesinin yanında saflığının daha iyi kontrol edilebildiği tespit edilmiştir.

Çizelge 6.1. Tanımlanan proteinlerin üç etmen açısından özet değerlendirme tablosu

Proteinler	Proliferasyon	İmmün Sistem	İnsülin Metabolizması	Asinar Hücre
Elavl4	x		x	
Mdh1			x	
Trim35	x			
Atp5b			x	
Lrpprc	x			
Ampd2	x			
Tuba1c	x			
Hspa5			x	
Hsp90b1		x	x	
Calr		x	x	
P4hb			x	
Hspd1		x	x	
Ctrb1				x
Actb	x			
Slc9a3r1	x			
Cel				x
Lrrc55			x	
Klhl25	x			
Pnliprp1				x

Tartışma kısmında elde edilen veriler adacık nakli için önemli olan proliferasyon, insülin metabolizması ve immün sistem ile ilişkisinde etkin olabilecek proteinler olarak

gruplanarak incelenmiştir. Çizelge 6.1’de proteinlerin hangi grupta tartışıldığı özetlenmiştir. İfade farklılığı gösteren ve PMF yöntemi ile kimliklendirilmesini gerçekleştirdiğimiz proteinlerin pek çoğu proliferasyon sürecinde etkin olabilecek kanser hücre hatlarında rol alan proteinlerdir. Bu proteinler ilk kez bu tez çalışmasında adacık hücrelerinin proliferasyonu ile ilişkilendirilmiş olup, literatürde daha önce yapılan çalışmalarda rastlanmamıştır. İnsülin metabolizması ile ilgili olan proteinler ise daha önce adacık hücre hatlarında insülin katlanması ve salınımı sürecinde rol üstlendiği bilinen proteinlerdir. Ancak ilk kez bu çalışma ile iki grup arasında ki farklılığın sebebi olarak aday olarak sunulmuşlardır. Buna ek olarak immün sistem ile ilişkisi açısından incelenecek olursa, elde edilen proteinler; neonatal dönem adacıklarının kendilerini immün saldırıdan daha iyi koruduklarına dair hipotezini destekler niteliktedir. Western blot ile kantitatif analizlerinin tamamlanması ve protein ifade farklılıklarının onaylanmasının ardından bu proteinlerden bir kısmı literatürde ilk kez adacık içi hücrelerinin bu üç temel etmen ile ilişkilendirilen proteinleri olabileceklerdir.

Hüresel işlevlerin tam olarak anlaşılması için ifade edilen proteinlerin tanımlanması, sentez sonrası geçirdikleri değişimlerin saptanması ve organizmada buldukları yerler ve miktarlarını belirlenmesini proteomiks çalışmalar sağlayacaktır. Proteinlerin belirlenmesi daha ileriki çalışmalar için de belirleyici olacaktır. Tez kapsamında elde edilen veriler adacık naklinin iyileştirilmesi sürecinde önem arz edebilecek proteinlerdir. Fetal dönem sonrasında adacıkların gelişiminin devamı aşamasında yeniden modelleme kapsamında hücrenin temel işleyiş mekanizmasının regülasyonu seviyesinde yaşanan aşamaların hepsi dinamik yollardan gerçekleşmektedir. Bu yolların tespitinde proteomik araştırmalar önemli bir yere sahiptir çünkü mRNA çalışmalarının doğrudan protein seviyesi ve aktivitesini göstermediği bilinmektedir. Neonatal ve erişkin adacıkları arasında protein ebadında karşılaştırmalı analiz yapan az sayıda çalışma bulunmakla beraber, iki boyutlu jel elektroforezi yöntemi kullanılarak yapılan çalışma bulunmamaktadır. Jel tabanlı aşağıdan-yukarıya (bottom-up) proteomik analizler kullanılarak yapılan bir çalışma bulunmaması bu tezin özgün yönlerinden biridir. İki boyutlu ayırım yöntemi ile protein haritalaması yapıldığı için adacık 2-DE haritalamasına katkı sağlayacak özgün veriler sunulmuştur. Proteom çalışmalarında kullanılan yöntemler önem arz etmektedir çünkü protein gibi dinamik yapısı olan bir molekül ile çalışmanın gereği olarak kullanılan yöntemlerin farklılığı, tanımlanması mümkün olan proteinleri de etkilemektedir. Dolayısıyla daha önce

Martens ve arkadaşlarının yapmış oldukları ile çalışma ile benzer proteinler tanımlanmasına karşın farklılık gösterenlerin sayısı daha yüksektir. Pek çok değişken parametre içeren proteom çalışmalarında çokça rastlanan bu durumun nedeni örnek safsızlığı, örnek hazırlamada kullanılan tekniklerin farklılıkları, kullanılan yöntem ve cihaz farklılığı olabilir.

Tanımlaması yapılan proteinler, iki boyutlu protein profil haritalarının karşılaştırmalı analizleri sonucunda ifadesinde 2 kat fark görülen spotlardan, MALDI-TOF cihazı ve MASCOT programı kullanılarak PMF yöntemi ile tanımlanmışlardır. Jel tabanlı proteom çalışmalarında kantitatif bir sonuç elde etmek olası değildir. Bu çalışmalar ile amaç hücrenin genel haritasında ilgili farklılıkların protein seviyesinde tespitidir. Bu aşamada elde ettiğimiz proteinlerdeki kat değişimlerinin daha güvenilir bir şekilde gösterilmesi amacı ile çalışmanın devamında ilgili proteinlerin; protein seviyesinde kantitatif analizleri içeren Western Blot yöntemi ile doğrulanması da devamında yapılması planlanmaktadır. Buna ek olarak Cytoscape 3.1.1 programı kullanarak yapmış olduğumuz protein-protein ilişki verileri ile elde ettiğimiz sonuçlar kapsamında PI3K/AKT yolağının aktivasyonun bu iki dönem arasında ki proliferasyon farkında etkin olan bir yolak olduğu düşünülmektedir. Bu sebeple Akt protein ve fosforilasyonuna bakılması da yapılması planlanan çalışmalar arasındadır.

Yapılan ve yapılması planlanan çalışmaların amacı; Diyabet tedavi sürecinde umut vadeden bir yöntem olan adacık naklinin iyileştirilmesine yönelik yöntemler geliştirmektir. Dolayısıyla elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda proliferasyonu bloklayan Slc9a3r1 gibi proteinlerin ifadesini baskılama ile ya da immün yanıt oluşturan proteinlerin susturulması moleküler biyoloji uygulamaları ile gerçekleştirildikten sonra hücre fizyolojisi bozulmaması durumunda adacık nakli öncesinde sürecin iyileştirilmesine yönelik bir uygulama geliştirilebilir. Özet olarak çalışmada elde edilen sonuçlar ileri çalışmalar da adacık naklinin iyileştirilmesi konusunda aday olarak kullanılabilecek özgün verilerdir.

KAYNAKLAR

1. Montanya E, Nacher V, Biarnés M, Soler J. Linear correlation between beta-cell mass and body weight throughout the lifespan in Lewis rats: role of beta-cell hyperplasia and hypertrophy. *Diabetes*. 2000 Aug;49(8):1341–6.
2. Plum L. Central insulin action in energy and glucose homeostasis. *J Clin Invest*. 2006 Jul 3;116(7):1761–6.
3. Chang X, Jørgensen AMM, Bardrum P, Led JJ. Solution Structures of the R6 Human Insulin Hexamer^{†,‡}. *Biochemistry (Mosc)*. 1997 Aug 1;36(31):9409–22.
4. Busnardo AC, DiDio LJA, Tidrick RT, Thomford NR. History of the pancreas. *Am J Surg*. 1983 Nov;146(5):539–50.
5. Tan GD. The pancreas. *Anaesth Intensive Care Med*. 2008 Oct;9(10):424–7.
6. Stanger BZ, Hebrok M. Control of Cell Identity in Pancreas Development and Regeneration. *Gastroenterology*. 2013 May;144(6):1170–9.
7. The Endocrine Pancreas [Internet]. *Connexions*. [cited 2013 Dec 10]. Available from: <http://cnx.org/content/m46685/latest/?collection=col11496>
8. Hellman B, Gylfe E, Grapengiesser E, Dansk H, Salehi A. [Insulin oscillations--clinically important rhythm. Antidiabetics should increase the pulsative component of the insulin release]. *Läkartidningen*. 2007 Aug 8;104(32-33):2236–9.
9. Rinderknecht H, Maset R, Collias K, Carmack C. Pancreatic secretory profiles of protein, digestive, and lysosomal enzymes in Syrian golden hamster. *Dig Dis Sci*. 1983 Jun 1;28(6):518–25.
10. Microsoft Word - KRONİK BÖBREK YETMEZLİĞİ HASTALARINDA GÖRÜLEN.docx - 00480.pdf [Internet]. [cited 2013 Dec 10]. Available from: <http://lib.baskent.edu.tr/tezbaskent1/00480.pdf>
11. Atherosclerosis Part 6 [Internet]. [cited 2013 Dec 10]. Available from: http://web.campbell.edu/faculty/nemecz/308_lect/lect6/lect6.html

12. Costanzo L. *Physiology Cases and Problems*. Lippincott Williams & Wilkins; 2012. 374 p.
13. Weir GC, Bonner-Weir S. Islet β cell mass in diabetes and how it relates to function, birth, and death. *Ann N Y Acad Sci*. 2013 Apr;1281(1):92–105.
14. Ido Y, Vindigni A, Chang K, Stramm L, Chance R, Heath WF, et al. Prevention of vascular and neural dysfunction in diabetic rats by C-peptide. *Science*. 1997 Jul 25;277(5325):563–6.
15. Bronský J, Průša R. Amylin fasting plasma levels are decreased in patients with osteoporosis. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA*. 2004 Mar;15(3):243–7.
16. Castle AL, Kuo C-H, Ivy JL. Amylin influences insulin-stimulated glucose metabolism by two independent mechanisms. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 1998 Jan 1;274(1):E6–12.
17. Cooper GJ, Willis AC, Clark A, Turner RC, Sim RB, Reid KB. Purification and characterization of a peptide from amyloid-rich pancreases of type 2 diabetic patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Dec;84(23):8628–32.
18. Gerich JE, Schneider V, Dippe SE, Langlois M, Noacco C, Karam JH, et al. Characterization of the Glucagon Response to Hypoglycemia in Man. *J Clin Endocrinol Metab*. 1974 Jan 1;38(1):77–82.
19. Lane MA. The cytological characters of the areas of langerhans. *Am J Anat*. 1907;7(3):409–22.
20. Thorel F, Népote V, Avril I, Kohno K, Desgraz R, Chera S, et al. Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss. *Nature*. 2010 Apr 22;464(7292):1149–54.
21. Prasad K, Daume E, Preuett B, Spilde T, Bhatia A, Kobayashi H, et al. Glucagon is required for early insulin-positive differentiation in the developing mouse pancreas. *Diabetes*. 2002 Nov;51(11):3229–36.
22. Gromada J, Franklin I, Wollheim CB. α -Cells of the Endocrine Pancreas: 35 Years of Research but the Enigma Remains. *Endocr Rev*. 2007 Feb 1;28(1):84–116.

23. De Vos A, Heimberg H, Quartier E, Huypens P, Bouwens L, Pipeleers D, et al. Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expression. *J Clin Invest*. 1995 Nov;96(5):2489–95.
24. van de Bunt M, Gloyn AL. A tale of two glucose transporters: how GLUT2 re-emerged as a contender for glucose transport into the human beta cell. *Diabetologia*. 2012 Sep;55(9):2312–5.
25. Henquin J-C. The dual control of insulin secretion by glucose involves triggering and amplifying pathways in β -cells. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011 Aug;93 Suppl 1:S27–31.
26. Keizer J, Magnus G. ATP-sensitive potassium channel and bursting in the pancreatic beta cell. A theoretical study. *Biophys J*. 1989 Aug;56(2):229–42.
27. Tarasov AI, Griffiths EJ, Rutter GA. Regulation of ATP production by mitochondrial Ca(2+). *Cell Calcium*. 2012 Jul;52(1):28–35.
28. Lang V, Light PE. The molecular mechanisms and pharmacotherapy of ATP-sensitive potassium channel gene mutations underlying neonatal diabetes. *Pharmacogenomics Pers Med*. 2010;3:145–61.
29. 6. Pankreas fzyyp.pdf [Internet]. [cited 2013 Dec 10]. Available from: http://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/1045/mod_resource/content/1/6.%20Pankreas%20fzyyp.pdf
30. bok%3A978-0-387-09841-8.pdf [Internet]. [cited 2013 Oct 29]. Available from: http://download.springer.com/static/pdf/887/bok%253A978-0-387-09841-8.pdf?auth66=1383135261_c356895245091ce8b1a7fcd7a6f0a2ef&ext=.pdf
31. Bell GI, Pictet RL, Rutter WJ, Cordell B, Tischer E, Goodman HM. Sequence of the human insulin gene. *Nature*. 1980 Mar 6;284(5751):26–32.
32. Joslin EP, Kahn CR. *Joslin's Diabetes Mellitus*: Edited by C. Ronald Kahn ... [et Al.]. Lippincott Williams & Wilkins; 2005. 1244 p.
33. Steiner DF, Oyer PE. The biosynthesis of insulin and a probable precursor of insulin by a human islet cell adenoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1967 Feb;57(2):473–80.

34. Creighton TE. *Proteins: Structures and Molecular Properties*. W. H. Freeman; 1993. 534 p.
35. Dimitriadis G, Mitrou P, Lambadiari V, Maratou E, Raptis SA. Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011 Aug;93 Suppl 1:S52–9.
36. Pancreatitis [Internet]. University of Maryland Medical Center. [cited 2013 Dec 10]. Available from: <http://umm.edu/health/medical/altmed/condition/pancreatitis>
37. Westermarck E, Wiberg M. Exocrine pancreatic insufficiency in dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2003 Sep;33(5):1165–79, viii – ix.
38. Steiner JM, Rutz GM, Williams DA. Serum lipase activities and pancreatic lipase immunoreactivity concentrations in dogs with exocrine pancreatic insufficiency. *Am J Vet Res*. 2006 Jan;67(1):84–7.
39. Yankaskas JR, Marshall BC, Sufian B, Simon RH, Rodman D. Cystic fibrosis adult care: consensus conference report. *Chest*. 2004 Jan;125(1 Suppl):1S – 39S.
40. ANDERSEN DH. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: A clinical and pathologic study. *Am J Dis Child*. 1938 Aug 1;56(2):344–99.
41. Storlien LH, Kraegen EW, Jenkins AB, Chisholm DJ. Effects of sucrose vs starch diets on in vivo insulin action, thermogenesis, and obesity in rats. *Am J Clin Nutr*. 1988 Mar 1;47(3):420–7.
42. Pagliassotti MJ, Shahrokhi KA, Moscarello M. Involvement of liver and skeletal muscle in sucrose-induced insulin resistance: dose-response studies. *Am J Physiol*. 1994 May;266(5 Pt 2):R1637–44.
43. *Williams textbook of endocrinology*. 10th ed. Philadelphia: Saunders; 2003. 1927 p.
44. Engelgau MM, Thompson TJ, Smith PJ, Herman WH, Aubert RE, Gunter EW, et al. Screening for diabetes mellitus in adults. The utility of random capillary blood glucose measurements. *Diabetes Care*. 1995 Apr;18(4):463–6.
45. Prentki M, Tornheim K, Corkey BE. Signal transduction mechanisms in nutrient-induced insulin secretion. *Diabetologia*. 1997 Jul;40 Suppl 2:S32–41.

46. Matschinsky FM, Glaser B, Magnuson MA. Pancreatic beta-cell glucokinase: closing the gap between theoretical concepts and experimental realities. *Diabetes*. 1998 Mar 1;47(3):307–15.
47. Newgard BC, McGarry JD. Metabolic Coupling Factors in Pancreatic β -Cell Signal Transduction. *Annu Rev Biochem*. 1995;64(1):689–719.
48. Taborsky GJ. The Physiology of Glucagon. *J Diabetes Sci Technol*. 2010 Nov 1;4(6):1338–44.
49. Doyle ME, Egan JM. Mechanisms of action of glucagon-like peptide 1 in the pancreas. *Pharmacol Ther*. 2007 Mar;113(3):546–93.
50. Unger RH, Eisentraut AM, Madison LL. THE EFFECTS OF TOTAL STARVATION UPON THE LEVELS OF CIRCULATING GLUCAGON AND INSULIN IN MAN*. *J Clin Invest*. 1963 Jul;42(7):1031–9.
51. Negrato CA, Montenegro Junior RM, Kostrisch LM Von, Guedes MF, Mattar R, Gomes MB. Insulin analogues in the treatment of diabetes in pregnancy. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2012 Oct;56(7):405–14.
52. Reaven GM. Role of Insulin Resistance in Human Disease. *Diabetes*. 1988 Dec 1;37(12):1595–607.
53. Rowe JW, Young JB, Minaker KL, Stevens AL, Pallotta J, Landsberg L. Effect of Insulin and Glucose Infusions on Sympathetic Nervous System Activity in Normal Man. *Diabetes*. 1981 Mar 1;30(3):219–25.
54. Zimmet PZ. The pathogenesis and prevention of diabetes in adults. Genes, autoimmunity, and demography. *Diabetes Care*. 1995 Jul;18(7):1050–64.
55. Diabetes - An Old Disease, a New Insight [Internet]. [cited 2013 Dec 14]. Available from: <http://www.springer.com/biomed/book/978-1-4614-5440-3>
56. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care*. 1998 Sep;21(9):1414–31.
57. Phillips JM, Parish NM, Raine T, Bland C, Sawyer Y, La Pena H De, et al. Type 1 Diabetes Development Requires Both CD4+ and CD8+ T cells and Can Be Reversed by Non-Depleting Antibodies Targeting Both T Cell Populations. *Rev Diabet Stud RDS*.

2009;6(2):97–103.

58. Malani PN. HARRISON'S principles of internal medicine. JAMA. 2012 Nov 7;308(17):1813–4.

59. Thorsby E, Lie BA. HLA associated genetic predisposition to autoimmune diseases: Genes involved and possible mechanisms. *Transpl Immunol.* 2005 Aug;14(3-4):175–82.

60. Jun H-S, Yoon J-W. A new look at viruses in type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 2003 Feb;19(1):8–31.

61. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. Elsevier Saunders; 2005. 1556 p.

62. Diabetes Mellitus and Pregnancy. 2013 Dec 2 [cited 2013 Dec 16]; Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/127547-overview>

63. Kitabchi AE, Umpierrez GE, Miles JM, Fisher JN. Hyperglycemic crises in adult patients with diabetes. *Diabetes Care.* 2009 Jul;32(7):1335–43.

64. Stoner GD. Hyperosmolar hyperglycemic state. *Am Fam Physician.* 2005 May 1;71(9):1723–30.

65. Hypoglycemia - Symptoms, Causes and Treatment [Internet]. [cited 2013 Dec 17]. Available from: <http://www.diabetes.co.uk/Diabetes-and-Hypoglycaemia.html>

66. Boyle PJ. Diabetes mellitus and macrovascular disease: mechanisms and mediators. *Am J Med.* 2007 Sep;120(9 Suppl 2):S12–7.

67. Ceriello A. Hyperglycaemia and the vessel wall: the pathophysiological aspects on the atherosclerotic burden in patients with diabetes. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil Off J Eur Soc Cardiol Work Groups Epidemiol Prev Card Rehabil Exerc Physiol.* 2010 May;17 Suppl 1:S15–9.

68. Peleg AY, Weeraratna T, McCarthy JS, Davis TME. Common infections in diabetes: pathogenesis, management and relationship to glycaemic control. *Diabetes Metab Res Rev.* 2007 Jan;23(1):3–13.

69. Culina S, Brezar V, Mallone R. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Insulin and type 1 diabetes: immune connections. *Eur J Endocrinol*. 2013 Feb 1;168(2):R19–31.
70. Edwards JL, Vincent AM, Cheng HT, Feldman EL. Diabetic neuropathy: mechanisms to management. *Pharmacol Ther*. 2008 Oct;120(1):1–34.
71. Gambert SR, Pinkstaff S. Emerging Epidemic: Diabetes in Older Adults: Demography, Economic Impact, and Pathophysiology. *Diabetes Spectr*. 2006 Oct 1;19(4):221–8.
72. American Diabetes Association, Bantle JP, Wylie-Rosett J, Albright AL, Apovian CM, Clark NG, et al. Nutrition recommendations and interventions for diabetes: a position statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2008 Jan;31 Suppl 1:S61–78.
73. Turner RC, Cull CA, Frighi V, Holman RR. Glycemic control with diet, sulfonylurea, metformin, or insulin in patients with type 2 diabetes mellitus: progressive requirement for multiple therapies (UKPDS 49). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *JAMA J Am Med Assoc*. 1999 Jun 2;281(21):2005–12.
74. Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, Ferrannini E, Holman RR, Sherwin R, et al. Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care*. 2009 Jan;32(1):193–203.
75. Zeller M, Danchin N, Simon D, Vahanian A, Lorgis L, Cottin Y, et al. Impact of type of preadmission sulfonylureas on mortality and cardiovascular outcomes in diabetic patients with acute myocardial infarction. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010 Nov;95(11):4993–5002.
76. Eurich DT, Simpson SH, Majumdar SR, Johnson JA. Secondary failure rates associated with metformin and sulfonylurea therapy for type 2 diabetes mellitus. *Pharmacotherapy*. 2005 Jun;25(6):810–6.
77. Groop LC, Pelkonen R, Koskimies S, Bottazzo GF, Doniach D. Secondary failure to treatment with oral antidiabetic agents in non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes Care*. 1986 Apr;9(2):129–33.
78. Bailey CJ, Turner RC. Metformin. *N Engl J Med*. 1996 Feb 29;334(9):574–9.

79. Stumvoll M, Nurjhan N, Perriello G, Dailey G, Gerich JE. Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1995 Aug 31;333(9):550–4.
80. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest.* 2001 Oct;108(8):1167–74.
81. Meneilly GS, Ryan EA, Radziuk J, Lau DC, Yale JF, Morais J, et al. Effect of acarbose on insulin sensitivity in elderly patients with diabetes. *Diabetes Care.* 2000 Aug;23(8):1162–7.
82. Hoffmann J, Spengler M. Efficacy of 24-week monotherapy with acarbose, glibenclamide, or placebo in NIDDM patients. The Essen Study. *Diabetes Care.* 1994 Jun;17(6):561–6.
83. Holman RR, Cull CA, Turner RC. A randomized double-blind trial of acarbose in type 2 diabetes shows improved glycemic control over 3 years (U.K. Prospective Diabetes Study 44). *Diabetes Care.* 1999 Jun;22(6):960–4.
84. Eng J, Kleinman WA, Singh L, Singh G, Raufman JP. Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. *J Biol Chem.* 1992 Apr 15;267(11):7402–5.
85. NovoLog_PI.pdf [Internet]. [cited 2013 Dec 19]. Available from: http://web.archive.org/web/20070225205847/http://www.fda.gov/medwatch/SAFETY/2005/Oct_PI/NovoLog_PI.pdf
86. Cryer PE, Davis SN, Shamoon H. Hypoglycemia in diabetes. *Diabetes Care.* 2003 Jun;26(6):1902–12.
87. Perosa M, Boggi U, Cantarovich D, Robertson P. Pancreas transplantation outside the USA: an update. *Curr Opin Organ Transplant.* 2011 Feb;16(1):135–41.
88. Kelly WD, Lillehei RC, Merkel FK, Idezuki Y, Goetz FC. Allograft transplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy. *Surgery.* 1967 Jun;61(6):827–37.

89. Perosa M, Boggi U, Cantarovich D, Robertson P. Pancreas transplantation outside the USA: an update. *Curr Opin Organ Transplant*. 2011 Feb;16(1):135–41.
90. Rother KI, Spain LM, Wesley RA, Digon BJ, Baron A, Chen K, et al. Effects of Exenatide Alone and in Combination With Daclizumab on β -Cell Function in Long-Standing Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*. 2009 Dec 1;32(12):2251–7.
91. Pankreas Adacık Hücre Nakli Hakkında Herşey | Diyabet, Tip 1 Diyabet, Şeker Hastalığı, Karbonhidrat Sayımı, İnsülin, insülin pompası [Internet]. [cited 2015 Jun 26]. Available from: <http://www.diyabetimben.com/pankreas-adacik-hucre-nakli/>
92. Ricordi C, Lacy PE, Finke EH, Olack BJ, Scharp DW. Automated Method for Isolation of Human Pancreatic Islets. *Diabetes*. 1988 Apr 1;37(4):413–20.
93. Shapiro AMJ, Ricordi C, Hering BJ, Auchincloss H, Lindblad R, Robertson RP, et al. International Trial of the Edmonton Protocol for Islet Transplantation. *N Engl J Med*. 2006;355(13):1318–30.
94. Lacy PE, Kostianovsky M. Method for the Isolation of Intact Islets of Langerhans from the Rat Pancreas. *Diabetes*. 1967 Jan 1;16(1):35–9.
95. Agarwal A, Brayman KL. Update on Islet Cell Transplantation for Type 1 Diabetes. *Semin Interv Radiol*. 2012 Jun;29(2):90–8.
96. Drucker DJ. Glucagon-Like Peptide-1 and the Islet β -Cell: Augmentation of Cell Proliferation and Inhibition of Apoptosis. *Endocrinology*. 2003 Dec 1;144(12):5145–8.
97. Schisler JC, Fueger PT, Babu DA, Hohmeier HE, Tessem JS, Lu D, et al. Stimulation of Human and Rat Islet β -Cell Proliferation with Retention of Function by the Homeodomain Transcription Factor Nkx6.1. *Mol Cell Biol*. 2008 May;28(10):3465–76.
98. Soltani N, Qiu H, Aleksic M, Glinka Y, Zhao F, Liu R, et al. GABA exerts protective and regenerative effects on islet beta cells and reverses diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jul 12;108(28):11692–7.
99. Gibly RF, Graham JG, Luo X, Lowe WL, Hering BJ, Shea LD. Advancing islet transplantation: from engraftment to the immune response. *Diabetologia*. 2011 Oct;54(10):2494–505.

100. Ludwig B, Reichel A, Steffen A, Zimmerman B, Schally AV, Block NL, et al. Transplantation of human islets without immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Nov 19;110(47):19054–8.
101. Finegood DT, Scaglia L, Bonner-Weir S. Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas. Estimation with a simple mathematical model. *Diabetes*. 1995 Mar;44(3):249–56.
102. Rutti S, Sauter NS, Bouzakri K, Prazak R, Halban PA, Donath MY. In Vitro Proliferation of Adult Human Beta-Cells. *PLoS ONE*. 2012 Apr 26;7(4):e35801.
103. Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature*. 2004 May 6;429(6987):41–6.
104. Fatrai S, Elghazi L, Balcazar N, Cras-Méneur C, Krits I, Kiyokawa H, et al. Akt Induces β -Cell Proliferation by Regulating Cyclin D1, Cyclin D2, and p21 Levels and Cyclin-Dependent Kinase-4 Activity. *Diabetes*. 2006 Feb 1;55(2):318–25.
105. Cozar-Castellano I, Takane KK, Bottino R, Balamurugan AN, Stewart AF. Induction of β -Cell Proliferation and Retinoblastoma Protein Phosphorylation in Rat and Human Islets Using Adenovirus-Mediated Transfer of Cyclin-Dependent Kinase-4 and Cyclin D1. *Diabetes*. 2004 Jan 1;53(1):149–59.
106. Diana J, Simoni Y, Furio L, Beaudoin L, Agerberth B, Barrat F, et al. Crosstalk between neutrophils, B-1a cells and plasmacytoid dendritic cells initiates autoimmune diabetes. *Nat Med*. 2013 Jan;19(1):65–73.
107. Grill V, Lake W, Freinkel N. Generalized diminution in the response to nutrients as insulin-releasing agents during the early neonatal period in the rat. *Diabetes*. 1981 Jan;30(1):56–63.
108. Asplund K, Westman S, Hellerström C. Glucose stimulation of insulin secretion from the isolated pancreas of foetal and newborn rats. *Diabetologia*. 1969 Aug;5(4):260–2.
109. Martens GA, Motté E, Kramer G, Stangé G, Gaarn LW, Hellemans K, et al. Functional characteristics of neonatal rat β cells with distinct markers. *J Mol Endocrinol*. 2014 Feb;52(1):11–28.
110. Martens GA, Motté E, Kramer G, Stangé G, Gaarn LW, Hellemans K, et al. Functional characteristics of neonatal rat β cells with distinct markers. *J Mol Endocrinol*.

2014 Feb 1;52(1):11–28.

111. Georgescu M-M, Cote G, Agarwal NK, White CL. NHERF1/EBP50 controls morphogenesis of 3D colonic glands by stabilizing PTEN and ezrin-radixin-moesin proteins at the apical membrane. *Neoplasia* N Y N. 2014 Apr;16(4):365–74.e1–2.

112. Garbett D, Bretscher A. PDZ interactions regulate rapid turnover of the scaffolding protein EBP50 in microvilli. *J Cell Biol.* 2012 Jul 23;198(2):195–203.

113. Doherty GJ, McMahon HT. Mediation, modulation, and consequences of membrane-cytoskeleton interactions. *Annu Rev Biophys.* 2008;37:65–95.

114. Bunnell TM, Burbach BJ, Shimizu Y, Ervasti JM. β -Actin specifically controls cell growth, migration, and the G-actin pool. *Mol Biol Cell.* 2011 Nov;22(21):4047–58.

115. Tan K, An L, Wang S-M, Wang X-D, Zhang Z-N, Miao K, et al. Actin Disorganization Plays a Vital Role in Impaired Embryonic Development of In Vitro-Produced Mouse Preimplantation Embryos. *PloS One.* 2015;10(6):e0130382.

116. Xue W, Kitzing T, Roessler S, Zuber J, Krasnitz A, Schultz N, et al. A cluster of cooperating tumor-suppressor gene candidates in chromosomal deletions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 May 22;109(21):8212–7.

117. Chen Z, Wang Z, Guo W, Zhang Z, Zhao F, Zhao Y, et al. TRIM35 Interacts with pyruvate kinase isoform M2 to suppress the Warburg effect and tumorigenicity in hepatocellular carcinoma. *Oncogene.* 2014 Sep 29;

118. Liu M, Huang H. Identification and validation of novel C/EBP β -regulated genes in preadipocyte proliferation. *Chin Med J (Engl).* 2010 May 5;123(9):1190–4.

119. Bronicki LM, Jasmin BJ. Emerging complexity of the HuD/ELAV14 gene; implications for neuronal development, function, and dysfunction. *RNA* N Y N. 2013 Aug;19(8):1019–37.

120. Choi KJ, Lee J-H, Kim KS, Kang S, Lee Y-S, Bae S. Identification of ELAVL4 as a modulator of radiation sensitivity in A549 non-small cell lung cancer cells. *Oncol Rep.* 2011 Jul;26(1):55–63.

121. Akizu N, Cantagrel V, Schroth J, Cai N, Vaux K, McCloskey D, et al. AMPD2 regulates GTP synthesis and is mutated in a potentially treatable neurodegenerative

brainstem disorder. *Cell*. 2013 Aug 1;154(3):505–17.

122. Corrêa S, Pizzatti L, Rocher B Du, Mencalha A, Pinto D, Abdelhay E. A comparative proteomic study identified LRPPRC and MCM7 as putative actors in imatinib mesylate cross-resistance in Lucena cell line. *Proteome Sci*. 2012;10:23.

123. Nguyen KT, Holloway MP, Altura RA. The CRM1 nuclear export protein in normal development and disease. *Int J Biochem Mol Biol*. 2012 May 18;3(2):137–51.

124. Yanagiya A, Suyama E, Adachi H, Svitkin YV, Aza-Blanc P, Imataka H, et al. Translational homeostasis via the mRNA cap-binding protein, eIF4E. *Mol Cell*. 2012 Jun 29;46(6):847–58.

125. Yamaguchi S, Ishihara H, Yamada T, Tamura A, Usui M, Tominaga R, et al. ATF4-mediated induction of 4E-BP1 contributes to pancreatic beta cell survival under endoplasmic reticulum stress. *Cell Metab*. 2008 Mar;7(3):269–76.

126. Singh-Jasuja H, Hilf N, Scherer HU, Arnold-Schild D, Rammensee H-G, Toes REM, et al. The heat shock protein gp96: a receptor-targeted cross-priming carrier and activator of dendritic cells. *Cell Stress Chaperones*. 2000 Nov;5(5):462–70.

127. Chandawarkar RY, Wagh MS, Kovalchin JT, Srivastava P. Immune modulation with high-dose heat-shock protein gp96: therapy of murine autoimmune diabetes and encephalomyelitis. *Int Immunol*. 2004 Apr;16(4):615–24.

128. Ochayon DE, Mizrahi M, Shahaf G, Baranovski BM, Lewis EC. Human α 1-Antitrypsin Binds to Heat-Shock Protein gp96 and Protects from Endogenous gp96-Mediated Injury In vivo. *Front Immunol*. 2013;4:320.

129. Zhou P, Teruya-Feldstein J, Lu P, Fleisher M, Olshen A, Comenzo RL. Calreticulin expression in the clonal plasma cells of patients with systemic light-chain (AL-) amyloidosis is associated with response to high-dose melphalan. *Blood*. 2008 Jan 15;111(2):549–57.

130. Bedard K, Szabo E, Michalak M, Opas M. Cellular functions of endoplasmic reticulum chaperones calreticulin, calnexin, and ERp57. *Int Rev Cytol*. 2005;245:91–121.

131. Hebert DN, Molinari M. In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. *Physiol Rev*. 2007 Oct;87(4):1377–408.

132. Rydén A, Faresjö M. Altered immune profile from pre-diabetes to manifestation of type 1 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2013 Apr;100(1):74–84.
133. Lüth S, Lohse AW, Herkel J. Transgenic overproduction of murine 60 kDa heat shock protein in the liver does not prevent type I diabetes in NOD mice. *Diabetologia.* 2006 Mar 18;49(5):1123–4.
134. Bass J, Chiu G, Argon Y, Steiner DF. Folding of insulin receptor monomers is facilitated by the molecular chaperones calnexin and calreticulin and impaired by rapid dimerization. *J Cell Biol.* 1998 May 4;141(3):637–46.
135. Lee EK, Kim W, Tominaga K, Martindale JL, Yang X, Subaran SS, et al. RNA-binding protein HuD controls insulin translation. *Mol Cell.* 2012 Mar 30;45(6):826–35.
136. Højlund K, Yi Z, Lefort N, Langlais P, Bowen B, Levin K, et al. Human ATP synthase beta is phosphorylated at multiple sites and shows abnormal phosphorylation at specific sites in insulin-resistant muscle. *Diabetologia.* 2010 Mar;53(3):541–51.
137. Dowling P, O’Driscoll L, O’Sullivan F, Dowd A, Henry M, Jeppesen PB, et al. Proteomic screening of glucose-responsive and glucose non-responsive MIN-6 beta cells reveals differential expression of proteins involved in protein folding, secretion and oxidative stress. *Proteomics.* 2006 Dec;6(24):6578–87.
138. Yan J, Aldrich RW. BK potassium channel modulation by leucine-rich repeat-containing proteins. *Proc Natl Acad Sci.* 2012 May 15;109(20):7917–22.

EKLER

Etik Kurul Onay Belgesi



T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU
Ankara 1. Bölge Kamu Hastaneleri Birliği Genel Sekreterliği
Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi



HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 06.06.2014
Protokol No. : 2014/29

Proje yürütücüsünün adı soyadı: Doç. Dr. Duygu ÖZEL DEMİRALP
Projenin başlığı : **Wistar Sıçanlarda Adacık Protein Profilinin Neonatal Ve Erişkin Dönemlerde Kıyaslamalı Analizi**
Proje ekibi : Hatice Yıldızhan, Gülbahar Büyük.

Deneyde kullanılacak hayvanın türü ve soyu : Wistar Hannover Rat
Deneyde kullanılacak hayvanın yaş ve ortalama ağırlığı : 8 aylık, 400-500 gr

Adı geçen araştırmannın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere çalışmanın yapılmasında herhangi bir etik sakınca bulunmadığına karar verildi.

(KATILMAZ) Prof. Dr. Tuncay DELİBAŞI (Kurul Başkanı)	Doç. Dr. Osman YÜKSEL (Başkan Vekili)
Doç. Dr. Ekrem YETER (Üye)	Vet. Hek. Başak BOZTOK ÖZGERMEN (Üye)
Ecz. İlhan ÇAYIR (Üye)	Ecz. Mine BARUT (Üye)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı :Hatice YILDIZHAN
Doğum Yeri :MANİSA
Doğum Tarihi :12.09.1988
Medeni Hali :Bekar
Yabancı Dili :İngilizce, Rusça

Eğitim Durumu

Lise :Çorum Anadolu Lisesi (1984-1987)
Lisans :İzmir İleri teknoloji Enstitüsü MBG Bölümü (2007-2012)

İş Tecrübesi

Kurumu	Görevi	Yılları
Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü	Yüksek Lisans	2012-2015

Uluslar Arası Kongrelerden Bildiriler (Tezden Üretilen Yayınlar)

- Ulusal Proteomik Kongresi'n de yer alındı ve poster sunuldu.
- 27. Avrupa Karşılaştırmalı Endokrin Kongresi, 25-29 Ağustos 2014; Kongrede yer alındı ve poster sunuldu
- **Poster Başlığı:** Comparative Proteomic Analysis of Neonatal and Adult Wistar Rats Islet byUsing Bottom-up Strategies

PO
38**Restoring cognitive functions in neurodegenerative disease models**

Van Sinay E, Watteyne J, Van Assche R, Peymen K, Beets I, Depuydt G, Schoofs L, Temmerman L

Functional Genomics and Proteomics, Department of Biology, KU Leuven, Leuven, Belgium

elien.vansinay@bio.kuleuven.be

Neurodegenerative diseases are characterized by a progressive loss of function and death of specific populations of nerve cells in the central nervous system. Because ageing is the primary risk factor for these diseases, their prevalence is expected to rise significantly in the coming decades due to the rapid increase in average life expectancy. As a result, age-associated disorders, amongst which neurodegenerative diseases, will represent a major challenge to the individual patients as well as to our society and healthcare systems.

Cognitive impairment is one of the most devastating symptoms related to neurodegeneration. Memory deficits affect an individual's ability to perform daily tasks and therefore further reduce quality of life. However, little is known about the mechanisms underlying cognitive impairment in neurodegenerative diseases. We believe fundamental insights can be obtained by using the free-living nematode *Caenorhabditis elegans* as a model system. *C. elegans* is capable of both associative and non-associative learning and, like humans, it loses the ability to perform learned behaviours with increasing age. Furthermore, tremendous efforts have been invested in the development of *C. elegans* models of neurodegenerative diseases. These models are a powerful tool for the investigation of the molecular determinants of these debilitating disorders.

We are currently using a Huntington's disease (HD) model, which expresses a range of polyglutamine (polyQ) stretches throughout the nervous system, to search for interesting modifiers of disease-related cognitive impairment. Thereto, we are comparing the associative learning abilities of wild type *C. elegans* with those of the HD model. Known genetic modifiers of neurodegenerative diseases will be tested experimentally for their learning-improving ability. In order to better understand the mechanisms involved, the expression profile and mode of action will be determined for the most interesting targets.

PO
39**Comparative Proteomic Analysis of Neonatal and Adult Wistar Rats Islet by Using Bottom-up Strategies**Hatice Yıldızhan¹, Gülbahar Büyük², Duygu Özel Demiralp³

1,3 Ankara University, Biotechnology Institute, Proteomics Department, Ankara, Turkey 2 Translational Research Center, Diskapı Teaching and Research Hospital, Ankara, Turkey

haticeyldzhan@gmail.com

Diabetes mellitus (DM) is a kind of metabolic diseases mainly characterized by high blood sugar which is mainly caused by islet beta cells dysfunction. Even if there are several therapeutic applications, there is no exact cure but it is known that beta cell mass has significant importance. Beta cell mass expansion during neonatal stage is known as their high replication capacity therefore to explore underlying mechanism for beta cell mass increment during this term has vital importance to get right route for diabetes treatment. In our study, we did comparison analysis between neonatal rat islets and adult islets proteome by using bottom up proteomics strategies. For this purpose, we isolated islets from 5-day aged Wistar rats and 20-week aged adult Wistars. For neonatal rats, islets were isolated by handpicking and for the adults before handpicking, gradient centrifugation was performed. We isolated 23.3 IEQ islets from neonatal and 34,66 IEQ from adults. To see purity of isolation, DTZ staining and to check the islet viability, FDA/PI staining were performed. At the same day of isolation, islets were directly taken to proteomic analysis to detect differentially expressed proteins between neonatal stage and adults. We compared the islets protein profiles by using bottom-up strategies (2D-PAGE, PDQuest analysis, MALDI-TOF). As the first step (2-D PAGE) was performed, 2 groups with 3 replicates were analysed with PDQuest software to detect differentially expressed spots and we got 270 protein spots that were matched in all groups in which 35 protein spots were upregulated in neonatal stage while 33 spots were downregulated. MALDI/TOF was performed to whole differentially expressed spots for protein identification by peptide mass fingerprint (PMF) analysis by using Mascot Software. We identified several proteins that have important role in proliferation, apoptosis, inflammation and main molecular mechanisms of the cell which can be important for the potential targets for diabetes treatment by the sign of beta cell mass. In this stage using bottom-up proteomic strategies is one of the best way to see age-dependent dynamic changes which is a promising way to get peptide based treatment for diabetes mellitus.