

**T.C.
OKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BESLENME VE DİYETETİK ANA BİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS BİTİRME TEZİ**

**STREPTOZOTOSİN İLE OLUŞTURULMUŞ TİP I
DİYABETLİ BETA HÜCRELERİNDE ÇINKO
TAKVİYESİNİN APOPTOZİS VE İNSÜLİN SALGISINA
OLAN ETKİSİ**

Şahin YEŞİLDAĞ

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Türkan KUTLUAY MERDOL**

İSTANBUL, 2015

**T.C.
OKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BESLENME VE DİYETETİK ANA BİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS BİTİRME TEZİ**

**STREPTOZOTOSİN İLE OLUŞTURULMUŞ TIP I
DİYABETLİ BETA HÜCRELERİNDE ÇİNKO
TAKVİYESİNİN APOPTOZİS VE İNSÜLİN SALGISINA
OLAN ETKİSİ**

**Şahin YEŞİLDAĞ
122039017**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Türkan KUTLUAY MERDOL**

İSTANBUL, 2015

T.C
OKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ




Y Ü K S E K L İ S A N S
T E Z O N A Y I

ÖĞRENCİNİN

Adı ve Soyadı : Şahin Yeşilbaş Öğrenci No :122039017
Anabilim/Bilim Dalı : Beslenme ve Diyetetik Tez Savunma Tarihi : 23.06.2015
Danışman : Prof. Dr. Türkan Merdol Tez Savunma Saati :14.00

Tez Konusu : "Streptozotosin İle Oluşturulmuş Tip I Diyabetli Beta Hücrelerinde Çinko Takviyesinin Apoptozis Ve İnsülin Salgısına Olan Etkisi"

TEZ SAVUNMA SINAVI, Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği'nin 33.Maddesi uyarınca yapılmış, sorulan sorulara alınan cevaplar sonunda adayın tezinin **KABULU** 'ne OYBİRLİĞİ / OYÇOKLUĞUYLA karar verilmiştir.

| JÜRİ ÜYESİ | İMZA | KANAATI (KABUL / RED / DÜZELTME) |
|-------------------------|--|-------------------------------------|
| Prof. Dr. Türkan Merdol |  | Kabul |
| Prof. Dr. Mithat Kıyak |  | kabul |
| Doç Dr. Eylem Taşkın |  | Kabul |

| YEDEK JÜRİ ÜYESİ | İMZA | KANAATI (KABUL / RED / DÜZELTME) |
|----------------------------|------|-------------------------------------|
| Yrd. Doç. Dr. Funda Şensoy | | |
| | | |

ÖZET

Dünya genelinde sık görülen diyabet, insülin yetmezliğine bağlı metabolik bir hastalıktır. Bu hastalığın patogeneğinde oksidatif stres en önemli mekanizmadır. Çinko vücudumuzda eser miktardaki bulunan bir elementtir. İnsülin salgılanmasındaki görevi hala tam olarak aydınlatılamamış olsa da özellikle β -hücrelerinde insülin paketlenmesi ve salgılanmasında etkili olduğu bilinmektedir. Çinkonun insülin salgısındaki etki yolu veya yolları gizemini korumaktadır. Çalışmamızın amacı; çinko desteğinin antiapoptotik ve antioksidan özelliği ile insülin sekresyonunu artırıp arttırmadığını araştırmaktır. Çalışmamızda insan β -hücre hattı kullanıldı. Kontrol (K), Çinko (K+Z), Diyabet (D) ve Diyabet + Çinko (D+Z) olmak üzere 4 grup oluşturuldu. Grupların protein izolasyonları yapıldı ve bazı apoptotik proteinlerin analizleri, insülin sekresyon ölçümleri yapıldı. Total oksidan (TOS) ve antioksidan (TAS) ölçümleri yapıldı. TAS ve TOS değerlerinden oksidatif stres indeksleri (OSI) hesaplandı. İmmunofloresan boyamayla insülin ve aktinin dağılımları görüntülendi. Diyabet TOS'u arttırarak OSI'nin artmasına neden oldu. D+Z grubunun TOS'u K ve K+Z'e göre yüksek olduğu gözlemlendi. D grubu; sitokrom-c, P53 ve kaspaz-3 protein miktarında değişiklikler yaparak apoptozise neden oldu. D+Z grubunda ise, sitokrom-c, p53, kaspaz-3 protein miktarlarında düzelme yaparak β -hücre kayıplarını azalttı. D grubunun insülin salınımı kontrole göre çok az iken, D+Z grubunun insülin sekresyonu diyabet grubuna göre yüksek olduğu saptandı. Sonuç olarak diyabet oksidatif strese neden olarak apoptozisle β -hücre kayıplarını arttırarak insülin sekresyonunu azaltır. Diyabetin ardından çinko desteği yapılan β -hücrelerde ise apoptotik proteinlerin azalması ile β -hücre korunumu ile insülin sekresyonunu arttırır.

Anahtar Kelimeler: Diyabet, Çinko takviyesi, Apoptozis, İnsülin sekresyonu

ABSTRACT

THE EFFECTS OF ZINC SUPPLEMENTATION ON ANTIAPOPTOTIC AND INSULIN SECRETION IN β -CELL WITH TYPE-I DIABETES MELLITUS-INDUCED BY STREPTOZOTOCIN

Diabetes mellitus a common disease in the world is an illness related to insulin deficiency. Oxidative stress is the most important mechanism of its pathogenesis. Zinc is one of trace element in the body. Although zinc effect on insulin secretion is still unclear, it may have an important role to insulin packing and secretion. The aim of the study was to investigate whether zinc is able to increase insulin secretion by its antiapoptotic and antioxidants properties or not. The current study was used to human β -cell line. Total 4 groups were created as Control (C), Zinc supplementation (C+Z), Diabetes (D), Diabetes+Zinc (D+Z). Protein was isolated to measure some apoptotic proteins and insulin secretion. Total oxidant and antioxidant status were measured then oxidative stress index (OSI) was calculated by using TOS/TAS. Immunofluorescence imaging was done to determine of insulin and actin distribution at beta cell. Diabetes caused to increase OSI by increasing TOS. The TOS of D+Z group was high to versus both of C and C+Z groups. However, D was initiated to apoptosis by alteration of cytochrome-c, p53, caspase-3 protein levels. D+Z was decrease to loss β -cell by restoration of cytochrome-c, p53 and caspase-3 protein levels. The insulin secretion of D group was lower versus control. But the insulin secretion of D+Z was high compared to diabetic groups. Consequently, diabetes lead to diminish to insulin secretion making to lose β -cell by apoptosis. β -cell at zinc supplementation after diabetes gives rise to elevate to insulin secretion through the protection of β -cell by decreasing apoptotic proteins.

Keywords: Diabetes, Zinc supplementation, Apoptosis, Insulin secretion

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli hocam Sayın Prof. Dr. Türkan Kutluay Merdol teşekkür ederim.

Tezimin hazırlık döneminde bilgi ve tecrübelerinden büyük ölçüde yararlandığım, üzerimde hakkı ödenmeyecek emekleri olan Sayın Doç. Dr. Eylem Taşkın ve Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Başkanı Sayın Yrd. Doç. Dr. Celal Güven'e içtenlikle teşekkür eder, en derin saygılarımı sunarım.

Her zaman ve her koşulda yanımda olan, beni yetiştirip bugünlere getiren, beni ben yapan, fedakâr, hakkı ödenmez sevgili annem Emine Hanım ve tüm aile bireylerime 'de çok teşekkür ederim.

Şahin Yeşildağ


İstanbul, 2015

BEYAN

Bu çalışmanın, kendi tez çalışmam olduğunu, tezde kullanılan bilgileri etik kurallar içinde elde ettiğimi, daha önce üretilmiş olan ve yararlandığım bütün bilgi, fikir ve yorumları akademik kurallar içinde kullandığımı ve kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

3 Temmuz 2015

Şahin Yeşildağ



İÇİNDEKİLER

| | <u>SAYFA NO</u> |
|--|-----------------|
| ÖZET | iii |
| ABSTRACT | iv |
| ÖNSÖZ | v |
| BEYAN | vi |
| İÇİNDEKİLER | vii |
| TABLolar LİSTESİ | x |
| ŞEKİLLER LİSTESİ | xi |
| SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ | xiii |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. Diyabet | 3 |
| 2.1.1. Diyabetin Tarihçesi | 3 |
| 2.1.2. Diyabetin Tanısı | 4 |
| 2.1.3. Diyabetin Sınıflandırılması | 5 |
| 2.1.3.1. Tip 1 Diyabet | 5 |
| 2.1.3.2. Tip 2 Diyabet | 6 |
| 2.1.3.3. Gestasyonel Diyabet | 6 |
| 2.1.3.4. Spesifik Nedenlere Bağlı Diyabet | 7 |
| 2.1.4. Diyabetin Komplikasyonları | 7 |
| 2.1.4.1. Kalp-Damar Hastalığı | 10 |
| 2.1.4.2. Böbrek Hastalığı (Nefropati) | 10 |
| 2.1.4.3. Göz Hastalığı (Retinopati) | 10 |
| 2.1.4.4. Sinir Hasarı (Nöropati) | 10 |
| 2.1.4.5. Diyabetik Ayak | 11 |
| 2.1.5. Diyabetin Epidemiyolojisi | 11 |
| 2.1.6. Tip 1 Diyabet Tedavisi ve Önleme Denemeleri | 11 |
| 2.1.6.1. Pankreatik Beta Hücre Yenilenmesi | 12 |
| 2.1.6.2. Kök Hücre Nakli Tedavisi | 12 |
| 2.1.6.3. Pankreatik Beta Hücre Nakli | 13 |
| 2.2. Çinko | 13 |
| 2.2.1. Çinko Taşınması ve Dengesi | 14 |

| | |
|---|----|
| 2.2.2. Çinko ve İnsülin Sentezi | 15 |
| 2.2.3. Çinko ve Diyabet | 16 |
| 2.2.4. Çinko Gereksinimi | 18 |
| 2.2.5. Çinko Eksikliği | 19 |
| 2.2.6. Çinko Toksisitesi | 20 |
| 2.2.7. Çinkonun Biyoyararlanımına Etki Eden Faktörler | 20 |
| 2.2.8. Çinkonun Besin Kaynakları | 21 |
| 2.3. Reaktif Oksijen Türleri | 22 |
| 2.4. Antioksidanlar | 23 |
| 2.5. Apoptozis (Programlanmış Hücre Ölümü) | 23 |
| 2.6. Apoptozis İlişkili Proteinler | 25 |
| 2.6.1. Beta-Aktin | 25 |
| 2.6.2. Tümör Proton 53 | 25 |
| 2.6.3. P38 MAPK | 25 |
| 2.6.4. Bcl-2 | 26 |
| 2.6.5. Sitokrom-c | 26 |
| 2.6.6. Adenozin 5'-Monofosfat İle Aktive Edilmiş Protein Kinaz .. | 27 |
| 2.6.7. Kaspaz-3 | 28 |
| 2.7. Çinko-ROS-Apoptozis İlişkisi | 29 |
| 2.8. İnsülin Salgılanmasının Düzenlenmesi | 30 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | 33 |
| 3.1. Araştırma Tipi | 33 |
| 3.2. Araştırmada Uygulanan İşlem Basamakları | 33 |
| 3.2.1. Hücre Kültürü | 33 |
| 3.2.2. Deney Gruplarının Oluşturulması | 33 |
| 3.2.3. Beta Hücre Kültüründe Tip 1 Diyabet Modeli | 34 |
| 3.2.4. Hücrelerin Çinko İle Muamele Edilmesi | 34 |
| 3.2.5. Hücrelerin Toplanması | 35 |
| 3.2.6. Hücrelerin Protein Tayini | 35 |
| 3.2.6.1. Örneklerin Protein Miktarının Ölçümü | 35 |
| 3.2.6.2. Western Blot Yöntemiyle Proteinlerin İfade | |
| Düzeylerinin Tayini | 35 |
| 3.2.7. İnsülin Salgısındaki Değişimin Tayini | 36 |

| | |
|--|----|
| 3.2.7.1. Pankreatik β -hücrelerinin glukoz ile insülin salınımının indüklenmesi | 36 |
| 3.2.7.2. İnsülin Hormon Analizi | 37 |
| 3.2.8. Oksidatif Stresin Saptanması | 37 |
| 3.2.8.1. Total Oksidan Seviyenin Ölçülmesi | 37 |
| 3.2.8.2. Total Antioksidan Seviyenin Ölçülmesi | 38 |
| 3.2.8.3. Oksidatif Stres İndeksinin Hesaplanması | 39 |
| 3.2.9. İmmüno Floresan Çift İşaretleme Yöntemiyle Protein İlişkilerinin Belirlenmesi | 39 |
| 3.3. Veri Analizi | 40 |
| 4. BULGULAR | 41 |
| 4.1. β -Hücrelerin Morfolojileri | 41 |
| 4.2. Ayrıştırılan ve Tayini Yapılan Proteinler | 42 |
| 4.2.1. Beta Aktin | 42 |
| 4.2.2. AMPK- α | 43 |
| 4.2.3. Sitokrom-c | 44 |
| 4.2.4. P38 MAPK | 45 |
| 4.2.5. Pro-Kaspaz-3 | 46 |
| 4.2.6. GLUT-2 | 47 |
| 4.2.7. P53 | 48 |
| 4.3. Total Antioksidan Seviye | 49 |
| 4.4. Total Oksidan Seviye | 50 |
| 4.5. Oksidatif Stres İndeksi | 51 |
| 4.6. Pankreatik β -hücrelerdeki insülin Salgısı ve İçeriği | 52 |
| 4.7. İnsülin ve F-aktinin İmmüno Floresan İşaretleme Yöntemiyle Hücrede Dağılımlarının Analizi | 54 |
| 5. TARTIŞMA | 59 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER | 65 |
| KAYNAKÇA | 66 |

TABLolar LİSTESİ

| | <u>SAYFA NO</u> |
|---|-----------------|
| Tablo 1: Diyabetin Tanı Ölçütleri | 4 |
| Tablo 2: Çinko İçin Diyetle Günlük Önerilen İstihkak Değerleri | 18 |
| Tablo 3: Bazı Besinlerin Ortalama Çinko Değerleri | 21 |
| Tablo 4: Çalışmada Oluşturulan Deney Grupları | 33 |
| Tablo 5: Çalışmada Kullanılan Örneklerin Protein Konsantrasyon Değerleri | 35 |
| Tablo 6: Çalışmada Tayini Yapılan Proteinlerin Molekül Ağırlıkları ve Birincil İle İkincil Antikorların Protokolüne Göre Seyreltme Oranı ... | 36 |

ŞEKİLLER LİSTESİ

SAYFA NO

| | |
|---|-----------|
| Şekil 1: Diyabete Bağlı Komplikasyonların Gelişiminde Rol Oynayan En Önemli ve Etkili Olan Etmenler | 8 |
| Şekil 2: Glukoz Homeostatik Yolları İle Diyabete Bağlı Komplikasyonlara Duyarlı Hedef Hücreler Arasındaki Etkileşimler | 9 |
| Şekil 3: Pankreasın β-Hücrelerinde İnsülin Biyosentezi | 15 |
| Şekil 4: İnsülinin Hekzomer Yapısının 3 Katlı Simetri Eksenine Boyunca Görünümü | 16 |
| Şekil 5: ROS Tarafından Düzenlenen Hücresel Sinyal Yolları | 22 |
| Şekil 6: Apoptotik Olayların Şematik Gösterimi | 24 |
| Şekil 7: AMPK Sinyallemesini Aktifleştiren ve İnhibe Edebilen Bazı Sinyal Molekülleri | 28 |
| Şekil 8: Pankreatik β-Hücrelerinden Glukoza Bağlı İnsülin Salgılamaya Olayları | 31 |
| Şekil 9: Pankreatik β-Hücrelerinde Glukoza Bağımlı İnsülin Salgılanması | 32 |
| Şekil 10: İmmünofloresan Çift İşaretlemede Kullanılan Floresan Mikroskopu Sistemi | 40 |
| Şekil 11: Beta Hücrelerinin Mikroskop Altında Görüntüsü | 41 |
| Şekil 12: Beta Aktin'in Protein Ölçümü | 42 |
| Şekil 13: Beta Aktin'in Protein Analizi | 42 |
| Şekil 14: AMPK-A'nın Protein Ölçümü | 43 |
| Şekil 15: AMPK-A'nın Protein Analizi | 43 |
| Şekil 16: Sitokrom-C'nin Protein Ölçümü | 44 |
| Şekil 17: Sitokrom-C'nin Protein Analizi | 44 |
| Şekil 18: P38 AMPK'ın Protein Ölçümü | 45 |
| Şekil 19: P38 AMPK'ın Protein Analizi | 45 |
| Şekil 20: Pro-Kaspaz-3'ün Protein Ölçümü | 46 |
| Şekil 21: Pro-Kaspaz-3'ün Protein Analizi | 46 |
| Şekil 22: GLUT-2'in Protein Ölçümü | 47 |
| Şekil 23: GLUT-2'in Protein Analizi | 47 |
| Şekil 24: P53'ün Protein Ölçümü | 48 |
| Şekil 25: P53'ün Protein Analizi | 48 |

| | |
|---|-----------|
| Şekil 26: Grupların Total Antioksidan Seviyeleri | 49 |
| Şekil 27: Grupların Total Oksidan Seviyeleri | 50 |
| Şekil 28: Grupların Oksidatif Stres İndeksleri | 51 |
| Şekil 29: Deney Gruplarının İnsülin Sekresyonu Analizi | 52 |
| Şekil 30: Deney Gruplarının İnsülin İçeriğinin Analizi | 53 |
| Şekil 31: Kontrol Gruplarının (K) İmmünofloresan İşaretlenmiş Görüntüsü | 55 |
| Şekil 32: Kontrol Gruplarından Çinko Takviyesi Yapılmış Hücrelerin (K+Z) İmmünofloresan İşaretlenmiş Görüntüsü | 56 |
| Şekil 33: Diyabetli Gruplarının (D) İmmünofloresan İşaretlenmiş Görüntüsü | 57 |
| Şekil 34: Diyabet Gruplarından Çinko Takviyesi Yapılmış Hücrelerin (D+Z) İmmünofloresan İşaretlenmiş Görüntüsü | 58 |

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

| | |
|--------------------------------|--|
| ABD | : Amerika Birleşik Devletleri |
| ADA | : American Diabetes Association (Amerikan Diyabet Derneği) |
| ADP | : Adenosine Diphosphate |
| AIDS | : Acquired Immune Deficiency Syndrome |
| AIF | : Apoptozis Teşvik Edici Faktör |
| AL | : Adequate İntake |
| AMP | : Adenosine Monophosphate |
| AMPK | : Adenozin 5'-Monofosfat İle Aktive Edilmiş Protein Kinaz |
| ASCs-MSCs | : Adipoz Kaynaklı Kök Hücreler |
| ASK1 | : Apoptoz Sinyal Ayarlı Kinaz 1 |
| ATM | : Ataksi-Telenjiektazi Mutasyon |
| ATP | : Adenozin Trifosfat |
| BM-MSCs | : Kemik İliği Kaynaklı Kök Hücreler |
| BSA | : Bovine Serum Albümin |
| CaMKKβ | : Ca ²⁺ /Kalmodulin Bağımlı Protein Kinaz Kinaz β |
| CASPASE | : Cysteine Aspartate Specific Prote ASES |
| CAT | : Katalaz |
| CDK4 | : Siklin-Bağımlı Kinaz 4 |
| DCCT | : Diabetes Control and Complications Trial |
| DNA | : Deoksiribonükleik Asit |
| DSÖ | : Dünya Sağlık Örgütü |
| ELISA | : Enzyme-Linked İmmunosorbent Assay |
| FBS | : Fetal Sığır Serumu |
| FFA | : Serbest Yağ Asitleri |
| GAD | : Glutamik Asit Dekarboksilaz |
| GDM | : Gestasyonel Diabetes Mellitus (Gestasyonel Diyabet) |
| GLP-1 | : Glukagon-Benzeri Peptid |
| GLP-1 | : Glukagon Benzeri Peptit-1 |
| GPx | : Glutasyon Peroksidaz |
| GPx1 | : Glutasyon Peroksidaz 1 |
| GSH | : İndergenmiş Glutasyon |
| GST | : Glutasyon-s-Transferaz |

| | |
|-----------------------------------|--|
| H₂O₂ | : Hidrojen Peroksit |
| HBSS | : Hanks' Balanced Salt Solution |
| HGF | : Hepatosit Büyüme Faktörü |
| HIV | : Human Immunodeficiency Virus |
| HO• | : Radikal Hidroksil |
| IA-2 Beta | : İslet Associated-2 Beta |
| IA-2 | : İslet Associated-2 |
| IAA | : İnsülin Autoantibody |
| ICA | : İslet Cell Cytoplasmic Antibody |
| IGF-1 | : İnsulin Benzeri Büyüme Faktörü |
| IGT | : İmpaired Glucose Tolerance |
| IRP | : Demir Düzenleyici Protein |
| KATP | : ATP-duyarlı K ⁺ kanalı |
| LADA | : Latent Autoimmune Diabetes İn Adult |
| LKB1 | : Serin/Treonin Kinaz 11 |
| MAPK | : Mitojen Aktive Edici Protein Kinaz |
| MAPK | : Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz |
| MODY | : Maturity Onset Diabetes Of Youngs |
| MSCs | : Mezankimal Kaynaklı Kök Hücreler |
| MT | : Metallothionin |
| MTF1 | : Metal Regulatory Transcription Factor 1 |
| Ngn 3 | : Nörojenin 3 |
| NGSP | : National Glycohemoglobin Standardization Program |
| nM | : Nanomolar |
| NRF-2 | : NFE2-like 2 |
| O⁻² | : Süperoksit Anyon |
| OGTT | : Oral Glukoz Tolerans Testi |
| OSI | : Oksidatif Stres İndeksini |
| P53 | : Tümör Proton 53 |
| Pdx | : Pankreatik Duodenal Homeobox 1 |
| PI3K | : PI3 Kinaz |
| PP | : Protein Fosfataz |
| PTP | : Protein Tirozin Fosfataz |
| RDA | : Recommended Dietary Allowances |

| | |
|------------------|--|
| RDS | : Respiratuvar Distress Sendromu |
| Ref-1 | : Redoks-Faktör 1 |
| RIPA | : Radio immunoprecipitation Assay |
| RNA | : Ribonükleik Asit |
| RNS | : Reaktif Nitrojen Türevleri |
| ROS | : Reaktif Oksijen Türleri |
| RPMI | : Roswell Park Memorial Institute |
| Shc | : Src Homology 2 Domain-Containing |
| SOD | : Süperoksit Dismutaz |
| SOD1 | : Cu,Zn-Süperoksit Dismutaz 1 |
| STZ | : Streptozotosin |
| TAK1 | : Transforme Edici Büyüme Faktörü-B-Etkinleşen Kinaz 1 |
| TAS | : Total Antioksidan Seviyesi |
| TNF | : Tumor Nekroz Factor |
| TOS | : Total Oksidan Seviyesi |
| TRX | : Tioredoksin |
| TürKomp | : Ulusal Gıda Kompozisyon Veri Tabanı |
| UCBh-MSCs | : Göbek Kordon Kanı Kaynaklı Kök Hücreler |
| VEGF | : Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü |
| ZIP | : Zn-Regulated İron-Regulated Transporter-Like Protein |
| Zn | : Çinko |
| ZnT | : Zinc Transporters |

1. GİRİŞ

Şeker hastalığı olarak da bilinen diyabet 2011 yılında dünya genelinde 346 milyondan fazla kişiyi etkileyen ve her geçen gün bu sayıya milyonlarca kişinin eklendiği önemli bir sağlık sorunudur. Ülkemizde de benzer durum söz konusudur. Dolayısıyla ülke ekonomilerine bu hastalığın maliyeti de her geçen gün artmaktadır.

İnsülin kan şekerinin tamponlanmasında önemli rol oynayan hormonlardan biridir. Tip 1 diyabet, pankreastaki beta adacıklarının harabiyeti sonucu insülin salgılanmasında önemli bir azalmaya neden olur. Hormon salgısındaki bu azalma kan şekerini düşürmede yetersiz kalır. Kan şekerinin sürekli yüksek kalması, zamanla birçok dokunun geri dönüşümsüz harabiyetine yol açar. Dolayısıyla Tip 1 diyabetli hastalarının tedavisinde dışarıdan insülin enjeksiyonu veya beta hücre nakilleri yapılmaktadır. Günlük insülin tedavisi hastaların aşırı kilo alımına neden olması veya insülin direnci gelişimi gibi birçok yan etkilere sahiptir. Beta hücrelerinin insülin salgılama yetisinin tekrardan kazandırılması bu hastalığın neden olduğu patolojilerin azaltılmasına aracılık edebilir. Vericilerden alınan pankreastan elde edilen beta hücrelerin, Tip 1 hastalara nakil edilmesi bu hastalığın tedavisinde kullanılan diğer bir yöntemdir. Fakat henüz hücrelerin izolasyon aşamasında veya naklinden bir kaç gün sonra % 60' ı gibi büyük bir oranda fonksiyon veya hücre kayıplarının görüldüğü belirtilmektedir. Dolayısıyla beta hücre ölümlerine neden olan apoptotik yolak tam olarak aydınlatılabiliirse hücre nakillerinin başarı yüzdesi de arttırılabilir. Diğer bir ifadeyle, toplumda bu kadar çok görülen bu hastalığın tedavisi hala tam olarak bulunamamıştır.

Çinko vücutta önemli fonksiyonlara aracılık eden eser elementlerden biridir. Yapılan deneysel ve insan çalışmaları çinkonun insülin salgısını arttırdığı ve antiapoptotik etkiye sahip olabileceği rapor edilmiştir. Çinkonun bu etkilerinin hangi yollar aracılığıyla yaptığı hala gizemini korumaktadır. Dolayısıyla planlamış olduğumuz bu çalışma bu yolları aydınlatmaya yöneliktir. Çalışmamızın amacı, deneysel diyabet çalışmalarında Tip 1 diyabet modelini oluşturmak için yaygın şekilde kullanılan STZ ile beta hücre harabiyetinden sonra besi yerine çinko desteği sağlanarak hücrelerin olası insülin salgısının artışında hangi aracı veya araçların rol oynadığını aydınlatmaktır. Beta hücrelerindeki oksidatif stres artışı apoptozisi başlatarak hücre kayıplarına neden olur. Buna dayanılarak çinko desteği, metallothionein ve SOD' un miktarlarında yapacağı

değişiklik neticesinde beta hücrelerdeki oksidatif stresin azalmasına, sonuçta apoptotik yolağın baskılanmasına neden olabilir. Bu yolun özellikle azalmış hücre sayısının korunmasına aracılık ederek insülin salgılanmasına katkı sağlayabileceği kanısındayız. Bu bilgiler ışığında hipotezimiz çinko desteğinin antioksidan savunmayı destekleyerek oksidatif stresi azaltmasıyla beta hücre sayısının korunması ve dolayısıyla insülin salgılanmasının artmasına aracılık eder.

Bu çalışma, Tip 1 diyabet hastalığına ucuz, kullanımı kolay alternatif bir tedavi yöntemi ile hem bilime hem de ülke ekonomisine katkı potansiyeline sahip olması açısından önemlidir. Özellikle diyabete bağlı apoptozis ile hücre ölümlerinin ve çinko'nun insülin salgılatıcı mekanizmalarının aydınlatılması, literatürde bu konudaki açığı kapatmaya yönelik bilgiler barındırması da çalışmanın önemini arttırmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diyabet

Şeker hastalığı olarak bilinen diyabet, insülin salgılamasında veya insülinin aktivitesinde ya da her ikisinde birden oluşan bozulmalar sonucunda, kan şekerinin yükselmesi ve karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasındaki anormallikler ile karakterize olan bir hastalıktır (1).

Amerikan Diyabet Derneği'nin (ADA) verilerine göre 2007 yılında diyabetin ülke ekonomisine maliyeti 177 milyar dolar iken, 2012'de bu maliyet 245 milyar dolara ulaştığı rapor edilmektedir (2). Diyabet, küresel büyüyen bir sağlık sorunu ve birçok toplumdaki en önemli ölüm nedenleri arasında yer almaktadır (3). Bu hastalık genellikle retinopati, nöropati, nefropati ve yara iyileşmesinde gerileme dahil olmak üzere birçok organ hasarı ile ilgili bozukluklara sebep olmaktadır (4). Bu bilgilere dayanılarak diyabetin, yaygın ve komplikasyonlu olması nedeniyle toplum sağlığını tehdit eden önemli bir hastalık sorunu olduğunu söyleyebiliriz. Diyabetik hastalarda kan şekerinin kontrolünün sağlanmasıyla hastalığa bağlı gelişen komplikasyonların etkili bir şekilde azaltılabileceği vurgulanmaktadır (5).

2.1.1. Diyabetin Tarihçesi

Diyabete benzer klinik özellikler antik Mısırlılar tarafından 3000 yıl önce tarif edilmiştir. "Diyabet" terimi ilk olarak Aretaeus of Cappadocia (81-133 MS) tarafından ortaya atılmıştır. Mellitus (bal-tatlı) kelimesi, hastaların idrar ve kandaki tatlılığını keşfettikten sonra 1675 yılında Thomas Willis tarafından diyabet kelimesine eklendi. Ancak idrar ve kandaki tatlılığın aşırı şeker varlığından kaynaklandığını ilk olarak 1776 yılında Dobson tarafından doğrulandı. Modern zamanda diyabetin tarihi deneysel tıbbın ortaya çıkmasına rastlamıştır. Diyabet tarihinde önemli bir dönüm noktası da 1857 yılında Claude Bernard'ın karaciğerde glikojenez rolünü anlaşılması ve diyabetin aşırı glikoz üretiminden kaynaklandığı görüşüdür. Diyabet patogenezinde pankreasın rolü 1889 Mering ve Minkowski tarafından keşfedildi. Daha sonra bu keşif 1921 yılında Banting ve Best tarafından insülin izolasyonu ve klinik kullanımı için temel oluşturmaktadır. Tolbutamid ve karbutamid yoğun araştırmalar sonucunda ilk diyabet ilacı olarak, 1955 yılında eczanelerde satılmaya başlatılmıştır (6).

2.1.2. Diyabetin Tanısı

Amerikan Diyabet Derneği'nin diyabet tanısı için aşağıdaki tablo 1'de verilmiş olan maddelere dayanarak tanısal kriterler yayınlamıştır. Buna göre diyabetin tanısı, glikozillenmiş hemoglobin, açlık plazma glukozu veya 75 g'lık oral glukoz yüklemesi sonrası 2. saat plazma glukoz değerine bakılarak değerlendirilebilir (7).

Tablo 1: Diyabetin tanı ölçütleri

| |
|---|
| A1C % \geq 6,5 Bu testte kullanılacak laboratuvar yöntemi; NGSP (National Glycohemoglobin Standardization Program) onaylı olmalı ve DCCT (Diabetes Control and Complications Trial) standartını sağlamalıdır.* |
| veya |
| Açlık Kan Şekeri \geq 126 mg / dL (7,0 mmol / L). Test açlıktan en az 8 saat sonra yapılır. * |
| veya |
| OGTT' ne göre 2. saat plazma glukoz \geq 200 mg / dl (11,1 mmol / L). Testte kullanılacak glikoz yüklü sıvı Dünya Sağlık Örgütü (DSO) tarafından tarif edildiği gibi; su içinde 75 g eşdeğerinde susuz glukoz çözülmüş olmalıdır.* |
| veya |
| Hiperглиsemi veya hiperглиsemik krize bağlı klasik semptomlu hastada (poliüri, polidipsi vb.), rastgele plazma glukoz \geq 200 mg / dL (11,1 mmol / L). |

*Açık hiperглиsemi yokluğunda, sonuçlar tekrar test ile teyit edilmesi gerekir.

“ Tablo 1, 7. kaynaktan uyarlanmıştır (7)”

2.1.3. Diyabetin Sınıflandırılması

Diyabet için doğru sınıflandırma daha doğru ve yeterli tedaviye olanak sağlar(8). Diyabet, aşağıdaki genel kategoriler halinde sınıflandırılabilir (7).

- Tip 1 diyabet (Genellikle β -hücre yıkımına bağlı olarak mutlak insülin eksikliğine yol açar)
- Tip 2 diyabet (İnsülin direnci nedeniyle arka planda ilerleyici bir insülin salgı bozukluğuna yol açar)
- Gestasyonel diyabet (GDM) (Gebeliğin ikinci veya üçüncü trimesterde tanı konulan diyabetir; bu aşık bir diyabeti göstermez)
- Diğer nedenlere bağlı spesifik diyabet tipleri; monojenik diyabet sendromları (yenidoğan diyabet vb.), ekzokrin pankreas hastalıkları kaynaklı (kistik fibroz vb.), ilaç veya kimyasal maddeye bağlı diyabet (HIV / AIDS tedavisinde ya da organ nakli sonrası) olarak gösterilebilir.

2.1.3.1. Tip 1 Diyabet

Langerhans adacıklarında içine mononükleer hücrelerin infiltrasyonu ile azalmış β -hücresi olarak Tip 1 diyabetin histopatolojisi Opie tarafından 1901 yılında tanımlanmıştır (9). Tip 1 diyabet pankreasta bulunan ve insülin hormonu salgılayan beta adacıklarının otoimmünite sonucunda hasarlanması ve/veya apoptotik yollarla beta hücrelerinin sayısının azalması nedeniyle insülin sekresyonunun bozulmasıyla ilişkilidir(10). Tip 1 diyabet otoimmün bir hastalıktır. Bu durum; glutamik asit dekarboksilaz, tirozin fosfataz-IA-2, çinko (Zn^{+2}) taşıyıcısı ve insülin gibi beta hücre antijenlerine karşı hücrel (T hücre) ve humoral (B hücre) bağışıklık sonucu gelişmektedir(11). Tip 1 diyabette immün hasarın belirteçleri olarak, kanda adacık hücre otoantikoru (islet cell cytoplasmic antibody, ICA), insülin otoantikoru (insülin autoantibody, IAA), glutamik asit dekarboksilaz (GAD) antikoru ve tirozin fosfotaza karşı otoantikoru (islet associated-2, IA-2) ve anti-fogrin (islet associated-2 beta, IA-2 beta) antikoru bulunabilir. Son yıllarda yetişkin yaşlarda saptanan tip 1 diyabet olguları da artmaktadır. Erişkin yaşta (genellikle 25 yaşından sonra) görülen tip 1 diyabet formu, 'erişkinde latent otoimmün diyabet' (latent autoimmune diabetes in adult, LADA) olarak adlandırılmaktadır (12).

2.1.3.2. Tip 2 Diyabet

Tüm diyabet olgularının % 90'dan fazlasını oluşturmaktadır ve en yaygın görülen diyabet formudur. Hastalığın temelinde genetik olarak yatkın kişilerde yaşam tarzı ile tetiklenen ve giderek artan insülin direnci ve zamanla azalan insülin salınımı söz konusudur. Tüm dünyada toplumun %5-10'u tip 2 diyabetlidir (12).

Tip 2 diyabet, heterojen bir hastalık özelliği olup insülin salgısı ve insülin duyarlılığında bir bozukluk vardır. Tip 2 diyabet insülin direnci ve bozulmuş glukoz toleransıyla (IGT) başlar ve ilerleyici bir niteliği vardır. İnsülin direnci β -hücre salgılanması azalmadığı sürece tek başına Tip 2 diyabete neden olmaz. Tip 2 diyabet genellikle kas, yağ ve karaciğer seviyesinde insülin direnci eşliğinde β -hücresi işlev bozukluğu olan kişilerde gelişmektedir (13).

2.1.3.3. Gestasyonel Diyabet

Gestasyonel Diyabet (GD), gebelik süreciyle başlamış glukoz intoleransının herhangi bir derecesi olarak tanımlanmıştır. Tüm gebeliklerin yaklaşık % 7'sinde (çalışılan nüfus ve kullanılan tanı testlerine bağlı olarak, % 1-14 arasında değişmektedir) GD görülmekte, bu da yılda 200.000'den fazla olgu anlamına gelmektedir (14).

“GD, genellikle gebeliğin 24. haftasından sonra plasenta hormonlarının insülinin etkilerini bloke etmesine bağlı olarak gelişir. GD tanısı alan anne adaylarında preeklampsi ve erken doğum riski artmıştır. Yenidoğanda ise makrozomi, neonatal hipoglisemi, sarılık, hipokalsemi, polisitemi, respiratuvar distress sendromu (RDS), konjenital malformasyonlar ve ölü doğuma neden olabilir. Gebelik diyabetli bireylerin çoğunda doğumdan sonra glukoz metabolizmasında düzelme görülmekle birlikte bu hastalarda GD'in sonraki gebeliklerde tekrarlama riski yüksektir (yaklaşık %50); ayrıca ileriki yaşamlarında tip 2 diyabet gelişme riski de %70-80'e kadar varmaktadır. Bu sebeple GD tanısı almış kadınların doğum sonrasında diyabeti düzelse bile, prediyabetli olarak kabul edilip diyabetten korunma programlarına alınmaları gereklidir (12).”

2.1.3.4. Spesifik Nedenlere Bağlı Diyabet

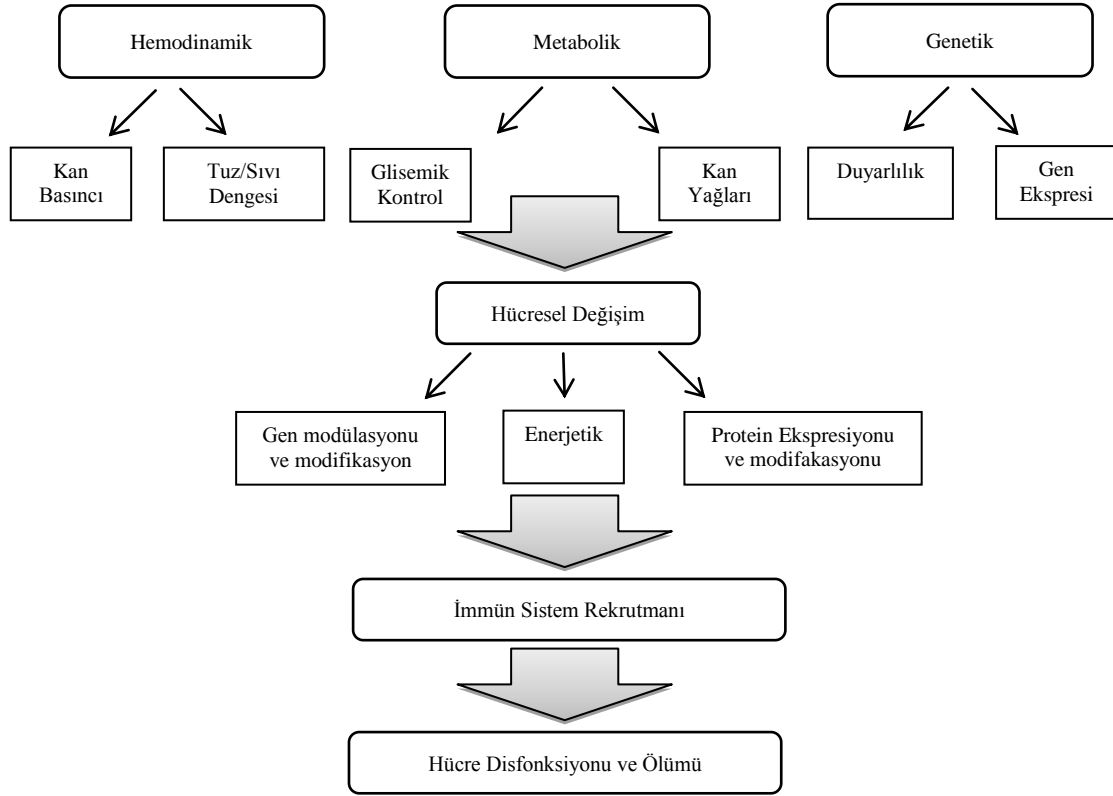
Tip 1, tip 2 ve gestasyonel diyabetten farklı olarak ortaya çıkan, insülin sekresyonu ve glukoz toleransını bozan etmenler diyabete neden olabilir.

“Bunlar β -hücre fonksiyonlarının bozulmasına bağlı ‘gençlerin erişkin başlangıçlı diyabeti (maturity onset diabetes of youngs, MODY) gibi monogenik defektler, insülin etkisinde bozulmaya yol açan ‘tip A insülin direnci sendromu’, Rabson-Mendenhall sendromu veya lipoatrofik diyabet gibi genetik defektler, ekzokrin pankreas hastalıkları (pankreatit, travma, neoplaziler, kistik fibrosis, vb), endokrinopatiler (akromegali, Cushing sendromu, glukagonoma, feokromositoma, hipertiroidizm, somatostatinoma, aldosteronoma), ilaca bağlı diyabet (kortikosteroidler, tiyazid grubu diüretikler, atipik antipsikotikler, vb), infeksiyonlar (konjenital rubella sendromu, sitomegalovirus), immun kaynaklı nadir diyabet formları (Stiff-man sendromu, anti-insülin reseptör antikorlarına bağlı diyabet, vb) ve diyabetle ilişkili bazı genetik sendromlardır (Down sendromu, Turner sendromu vb.) (12).”

2.1.4. Diyabetin Komplikasyonları

Diyabet bireylerin hayatını tehdit eden sağlık problemlerin gelişiminde risk faktörüdür. Sürekli yüksek kalan kan şekeri; kalp ve kan damarlarını, gözleri, böbrek ile sinirleri etkileyerek ciddi hastalıklara neden olabilir. Yüksek gelir düzeyine sahip ülkelerin çoğunda; kardiyovasküler hastalıkların, körlüğün, böbrek yetmezliği ve alt ekstremitte amputasyonlarının önde gelen nedeni diyabettir. Kan glukoz seviyeleri, kan basıncı ve kolesterol düzeylerinin normale yakın tutmak diyabet komplikasyonlarını geciktirir veya önleyebilir. Komplikasyon riskine karşı diyabetli kişiler düzenli olarak izlenmesi gerekir(15). Diyabet bir dizi komplikasyonlar ile ilişkili olup; diyabete bağlı komplikasyonların gelişiminde rol alan doğruluğu kanıtlanmış birçok mekanizma vardır (16).

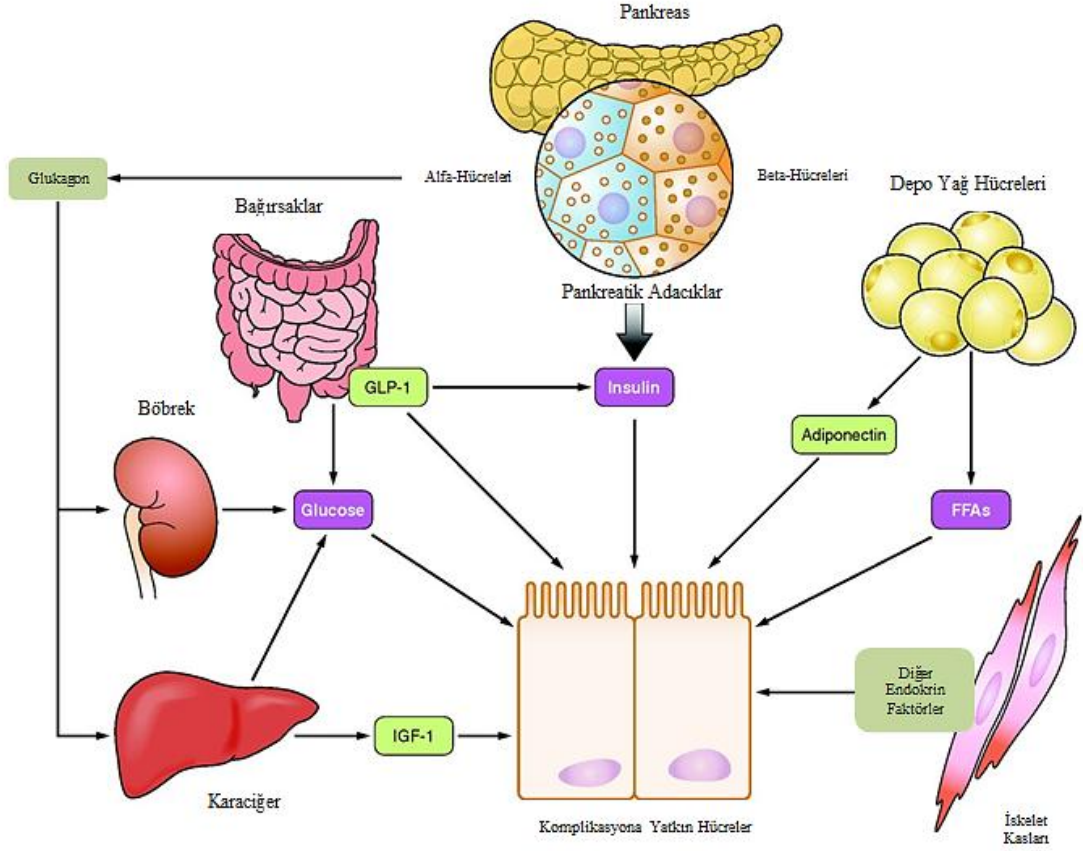
Şekil 1: Diyabete bağlı komplikasyonların gelişiminde rol oynayan en önemli ve etkili olan etmenler



“Şekil 1, 16. Kaynaktan uyarlanmıştır (16)”

Hiperglisemi olarak adlandırılan kronik yüksek kan şekeri tanıda önemli bir biyokimyasal parametredir. Diyabetin vasküler komplikasyon riskini azaltmak için hastalığının seyriinde mümkün olduğunca erken normoglisemi hedefine ulaşarak optimal glisemik kontrolü sağlamak gerekir. Vücutta glikoz anormallikler ile göreceli insülin eksikliği arasındaki uyum, diyabetik komplikasyonların oluşumunda önemli bir belirteçdir. Glikoz metabolizmasına duyarlı önemli hedef hücreler; endotel hücreler, podositler (Bowman kapsülünün epitel hücresi), proksimal tübül hücreler, müller hücreleri (retinada yer alan hücreler), kardiyomyositler (kalp kası hücreleri) ve nöronlar (sinir hücreleri) bulunmaktadır (16).

Şekil 2: Glukoz homeostatik yolları ile diyabete bağlı komplikasyonlara duyarlı hedef hücreler arasındaki etkileşimler



*GLP-1: Glukagon-Benzeri Peptid; IGF-1: İnsulin Benzeri Büyüme Faktörü; FFA: Sserbest Yağ Asitleri

“Şekil 2, 16. kaynaktan uyarlanmıştır (16)”

Diyabete bağlı kronik komplikasyonlar, ince damar hasarına bağlı olanlar “mikrovasküler”, büyük damar hasarlarına bağlı olanlar “makrovasküler” komplikasyonlar olmak üzere iki grupta incelenir. Mikrovasküler komplikasyonları retinopati, nefropati, nöropati; makrovasküler komplikasyonları ise kalp krizi gibi kardiyovasküler hastalıklar, inme ve bacaklardaki yetersiz kan akımı sonucu gelişen hasarlar oluşturur (1).

2.1.4.1. Kalp-Damar Hastalığı

Diyabetik hastalardaki ölüm ve sakatlıkların en yaygın nedeni kardiyovasküler hastalıklardır. Diyabetle birlikte angina, miyokard infarktüsü (kalp krizi), inme, periferik arter hastalığı ve konjestif kalp yetmezliği gibi kardiyovasküler hastalıklar görülür. Diyabetli kişilerde görülen yüksek kan basıncı, yüksek kolesterol, yüksek kan şekeri ve diğer risk faktörleri kardiyovasküler komplikasyonların riskinin artmasına katkıda bulunur (15).

2.1.4.2. Böbrek Hastalığı (Nefropati)

Böbrek hastalığı (nefropati) diyabeti olan bireylerde çok daha sık görülür ve kronik böbrek yetmezliğinin önde gelen nedenlerinden biridir. Diyabet, küçük kan damarlarının hasarına; böbrek fonksiyonunu azalmasına ya da tamamen bozulmasına neden olur. Kan şekeri ve kan basıncı normale yakın seviyelerde korunması büyük ölçüde nefropati riskini azaltabilir (15).

2.1.4.3. Göz Hastalığı (Retinopati)

Diyabetik retinopati; periferik retina, makula, ya da her ikisi etkileyerek şeker hastalığı olan kişilerde görme engelli ve körlüğün önde gelen nedenidir. Retinopati görülme sıklığı diyabetin süresiyle doğru orantılıdır (17). Diyabetli kişilerde görülen sürekli yüksek kan şekeri ve kan basıncı ile kan kolesterol düzeyinin yüksek olması retinopati gelişmesinin temel nedenidir (15).

2.1.4.4. Sinir Hasarı (Nöropati)

Diyabete bağlı aşırı yüksek kan şekeri ve kan basıncı vücuttaki sinirlerde hasara sebep olur. Bu hasar, sindirim ve idrara çıkma, erektil disfonksiyon ve bir dizi başka işlevsel problemlere neden olabilir. En sık etkilenen bölgeler başta ayaklar olmak üzere ekstremitelerdir. Bu alanlardaki sinir hasarı periferik nöropati olarak adlandırılır ve karıncalanma, duyu kaybı ve ağrıya neden olabilir. Özellikle duyu kaybı tehlikelidir; çünkü ciddi enfeksiyonlar ve ülser, diyabetik ayak hastalığı ve büyük amputasyonların gelişmesine neden olur (15).

2.1.4.5. Diyabetik Ayak

Diyabetli kişilerde, sinir ve damar hasarları sonucu bir dizi ayak problemleri gelişir. Bu problemler amputasyon riskini artırır. Çünkü diyabet bireylerde kolayca yara ve enfeksiyon oluşmasına neden olur. Diyabetli bireyler diyabetli olmayanlara göre 25 kat daha fazla amputasyon riski altındadır. İyi yönetim ile amputasyon büyük bir kısmı önlenebilir. Diyabetli kişiler ayaklarını düzenli olarak muayene ettirmesi gerekir (15).

2.1.5. Diyabetin Epidemiyolojisi

Dünya genelinde diyabet, 2011 yılında 346 milyondan fazla kişiyi etkilediği ve 2005-2030 yılları arasında artmaya devam edeceği tahmin ediliyor (18). Ülkemizdeki durum ise, 1998 yılında şeker hastalığının görülme sıklığının %3,2 iken, 12 yıl sonra (2010) bu sıklığın % 13,7'ye yükseldiği gösterilmiştir (19, 20).

2014 yılı itibarı ile dünyada diyabetli sayısının 387 milyon ve bu sayının 2035 yılında 592 Milyona ulaşacağı tahmin ediliyor. Dünyada diyabet için (20-79 yaş) toplam sağlık harcamaları 2014 yılında 612.2 milyar dolar iken 2035 için ön görülen rakam 627.3 milyar dolardır (15).

2.1.6. Tip 1 Diyabet Tedavisi ve Önleme Denemeleri

Tip 1 diyabette insülin takviyesi, hastalığın neden olduğu komplikasyonların önlenmesi ve glukoz dengesinin sağlanabilmesi için gereklidir (11). Tip 1 diyabetli hastalar günlük eksojen insülin enjeksiyonu, sürekli pompa tedavisi veya adacık nakilleri ile normal hayatını sürdürebilir. Bu yöntemler diyabetik hastalarda kan şekerinin kontrolünü optimize eder ve diyabetin neden olacağı komplikasyonların görülme sıklığını azaltır (21). Tip 1 diyabet pankreasta bulunan ve insülin hormonu salgılayan beta adacıklarının otoimmünite sonucunda hasarlanması ve/veya apoptotik yollarla beta hücrelerinin sayısının azalması nedeniyle insülin sekresyonunun bozulmasıyla ilişkilidir. Dolayısıyla pankreatik β -hücrelerinin apoptozisinin önlenmesi ve insülin sekresyonunun artırılması diyabetin tedavisine yönelik en önemli terapötik yaklaşımlardan biridir (10). Tip 1 diyabetin önlenmesine ve tedavisine yönelik yapılan çalışmalara dayanılarak, bu hastalığın önlenilebileceği ya da geciktirilebileceği söylenebilir (21).

2.1.6.1. Pankreatik Beta Hücre Yenilenmesi

Tip 1 diyabetin tedavi yöntemlerinden biri de β -hücrelerinin mitotik çoğalmasına teşvikidir. Genellikle pankreas adacıklarının toplam sayısı yaşam süresi içinde sabit kaldığı kabul edilirken, yaşla birlikte adacık boyutunda artış olur. Ayrıca uzun ömürlü pankreatik β -hücreler mitozla çoğalma yolunu çok fazla kullanmazlar. Öte yandan, bazı deneysel çalışmalarda ise, uygun uyarıların sağlanması koşuluyla β -hücrelerin çoğalma potansiyelinin artabileceği de gösterilmiştir. Fakat çoğalma yeteneğine sahip hücrelerin yüzdesinin toplam beta hücresine oranı oldukça azdır. Yapılan çalışmalarda mitotik çoğalmayı uyarmak için kullanılan faktörleri ya da hormonları iki kategoride toplamak mümkündür. Birinci kategori de, siklin D1 / D2, siklin-bağımlı kinaz 4 (CDK4), nörojenin 3 (Ngn3), glukagon benzeri peptit-1 (GLP-1) ve pankreatik duodenal homeobox 1 (Pdx1) bulunur. Söz konusu faktörlerden, CDK4, GLP-1 ve Ngn3 β -hücresi yenilenmesinde (rejenerasyonunda) etkili olduğu ortaya konulmuştur. İkinci kategoride ise; vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve hepatosit büyüme faktörü (HGF) bulunur. Bu faktörlerin beta hücre yenilenmesini sağlayan intrinsek (doğal) ve ekstrinsek (dışsal) yolların kombinasyonunda önemli olduğu düşünülmektedir (21).

2.1.6.2. Kök Hücre Nakli Tedavisi

Çoğalma kapasitesi ve farklılaşma potansiyeli olan kök hücreler, doku rejenerasyonu için gelecek vaat eden yeni bir tedavi olarak araştırılmaktadır. İnsülin üretebilen kök mezankimal kaynaklı kök hücrelerdir (MSCs). Bunlar arasında; kemik iliği (BM-MSCs), adipoz-kaynaklı (ASCs-MSCs), göbek kordon kanı (UCBh- MSCs), pankreatik ve amniyotik kök hücreler yer alır. Yapılan bir çalışmada, tip 1 diyabetli hastalarda otolog hematopoetik kök hücre nakli ile iyi bir glisemik kontrolün sağlandığı belirtilmektedir. Başka bir çalışmada ise, insan adipoz-kaynaklı MSCs naklinden sonra, hastaların insülin gereksinimlerinin % 30-50 arasında azaldığı gösterilmiştir. Deneysel çalışmalardan elde edilen bu başarılı sonuçlara rağmen, pratikte hastaların tedavisinde kullanımı kısıtlayan bazı faktörler mevcuttur (21).

2.1.6.3. Pankreatik Beta Hücre Nakli

β -hücresi nakilleriyle, günlük düzenli insülin enjeksiyonlarına karşı alternatif bir tedavi yöntemi olarak kullanılabilir. Tip 1 diyabetli hastaların tedavisinde pankreatik beta hücre transplantasyonu önemli bir tedavi yöntemlerinden biridir. Bu tedavi yönteminde vericiden alınan pankreas, enzimatik olarak parçalanır ve beta hücreleri elde edilir. İzolasyondan kısa bir süre sonra veya transplantasyondan sonraki ilk birkaç gün içinde apoptozis içeren birçok faktörden dolayı beta hücrelerinin % 60'ı fonksiyonunu kaybeder. Uzun vadede tedavinin başarılı olabilmesi için, otoimmüitenin azaltılması, immün yanıtın baskılanması ve apoptozisin önlenmesi şarttır (22). Dolayısıyla β -hücre kayıplarının hangi mekanizma/mekanizmalar üzerinden geliştiğinin anlaşılması tedavi sürecinde önemli bir adım olacaktır. Tip 1 diyabetik bazı hastalarda yapılan incelemelerde insan pankreatik beta adacık transplantasyonunun uzun vadede renal ve nöral komplikasyonları azalttığı bildirilmektedir. Bu tedavi ile dışarıdan insülin verilmesine gerek kalmadan hiperglisemi ve hipoglisemi kontrolünde kısmi başarı elde edilmiştir (21).

2.2. Çinko

Çinko'nun önemi ilk olarak 1869 yılında Raulin tarafından bir küf mantarı *Aspergillus niger*'in büyümesi için gerekliliğiyle ortaya konulmuştur. O zamandan beri, çinko mikroorganizmalar, bitki ve hayvan da olmak üzere tüm yaşam türlerinin büyümesi, gelişimi ve farklılaşması için gerekli olduğu anlaşılmıştır. Çinkonun, bir metaloenzim olan karbonik anhidraz II'deki önemi Keilin ve Mann tarafından 1940 yılında keşfedildi (23). Çinkonun insan için önemi ise 1963 yılında belirlenmiştir. Geçen 50 yıl içerisinde hem klinik hem de temel bilimlerde yapılan birçok araştırmalarla çinkonun insan vücudundaki önemi desteklenmiştir (24).

Çinko, demirden sonra vücutta en çok bulunan eser elementtir. En çok karaciğer, pankreas, böbrek, kemik ve kaslarda bulunur. Çinko, hücre içi birincil iyonudur. Hücre sıvısında bol bulunmasına rağmen neredeyse tümü proteinlerin yapısına katılır, daha az konsantrasyonu da serbest iyon hali ile dengelenmektedir (25).

Zn^{+2} DNA/RNA sentezi, hücre bölünmesi, apoptozis gibi olaylarda görevli 300'den fazla proteinin ve 1000'den fazla transkripsiyon faktörü olarak kullanılan eser bir elementtir. İnsan bedeninde toplam 2-4 gr arasında ve plazmada 12-16 μM Zn^{+2}

bulunur (11, 24). Normal koşullarda Zn^{+2} 'nun büyük bir kısmı (yaklaşık 1-2 mg) pankreasta bulunur (22). İnsülin granüllerinde ise yaklaşık 20 mM konsantrasyonunda Zn^{+2} olduğu ve glukozla uyarılan insülin sekresyonundan sonra hücreler arası boşlukta (ekstrasellüler sıvıda) Zn^{+2} konsantrasyonunun 475 μ M olduğu gösterilmiştir. Zn^{+2} 'in fizyolojik konsantrasyonunun ise 15-30 μ M olduğu belirtilmektedir (26, 27).

2.2.1. Çinko Taşınması ve Dengesi

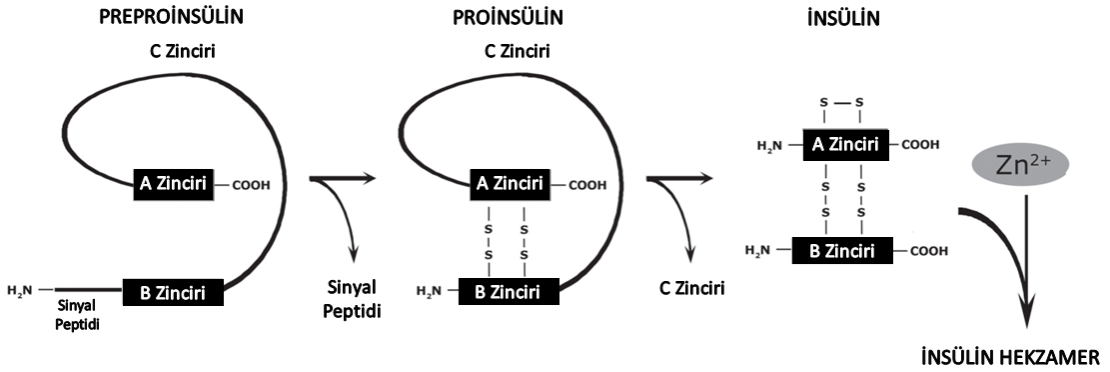
Hücre sitoplazmasında çinko iyonları metalotionin proteinlere bağlı birikmiş olduğu bilinmektedir. Plazmadaki çinko iyonları; albümin (% 52), makroglobulin (% 40) ve aminoasitler (% 8) ile kompleks olarak taşınırlar. Memelilerde spesifik olarak iki çinko taşıyıcı ailesi tespit edilmiştir: bunlardan ilki olan ZIP/SLC39 ailesi çinkoyu sitoplazma içine taşırken diğeri olan ZnT/CDF/SLC30 ailesi ise hücre dışına taşımaktadır. Çinko taşıyıcılarının ekspresyonu hücre içi ve dışı çinko seviyesi, hücrenin tipi ve fonksiyonuna göre çinkoya bağlı transkripsiyon faktörler, özellikle metal düzenleme transkripsiyon faktörü 1 (MTF1) tarafından düzenlenmektedir (28). Hücre içi Zn^{+2} konsantrasyonu sıkı bir şekilde denetlenmektedir (27). Günümüzde ZIP'in 14 üyesi, ZnT'in ise 10 üyesi tanımlanmıştır (22). Çinkonun kandan hücre ve dokulara emilimi çoğunlukla ZIP1 ve ZIP4 çinko taşıyıcıları ile yapılır. Hücre içinde ZIP ve ZnT ailesinin her ikisiyle ($ZnT2$ / SLC30A2, $ZnT4$ / SLC30A4, $ZnT5$ / SLC30A5, $ZnT6$ / SLC30A6, $ZnT7$ / SLC30A7, ZIP /SLC39A7, ZIP8 / SLC39A8) çekirdek veya diğeri hücre bölmelerine doğru, katalitik rol oynadığı yere ya da golgi aygıtı keseciklerine taşınarak depolanır. Çinkonun hücrelerden atılımı çinko dışarı atım taşıyıcısı ZnT1 / SLC30A1 tarafından yapılır (28).

Vücuttaki Zn^{+2} konsantrasyonu metalotionin (MT) gibi Zn^{+2} bağlayıcı ve transporter proteinler ile sıkı bir şekilde denetlenir. MT sıkı bir şekilde Zn^{+2} bağlama yeteğine sahipken diğeri yandan da Zn^{+2} serbestlemesiyle hücrenin redoks durumunu ayarlamaktadır (11). Metalotionin-1A yaygın bir şekilde bulunur ve oksidatif strese karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir. MT-1A Zn^{+2} yakalayıcısı ve Zn^{+2} donörüdür. Bu sayede intrasellüler Zn^{+2} homeostazisin düzenlenmesinde önemlidir. Metalotionin aşırı ifade edilmesi streptozotosin (STZ) kaynaklı beta adacık harabiyetini azalttığı, hiperglisemi oluşumunu geciktirdiği ve beta hücrelerinin sağ kalımını arttırdığı bildirilmektedir (27).

2.2.2. Çinko ve İnsülin Sentezi

Çinkonun insülin salgılanmasındaki önemi β -hücrelerinde altı insülin, iki Zn^{+2} ve bir kalsiyum iyonu içeren bir hegzamerik granülde depolanmasından kaynaklıdır (29). Çinko, kalsiyum iyonlarıyla birlikte, insülin biyosentezi ve depolanmasında önemli rol oynar. İnsülinin biyosentezi, pankreas β -hücreleri içinde öncüsü olan preproinsülinde yapılır. Öncelikle preproinsülinde sinyal dizisinin bölünmesi üzerine oluşan proinsülin golgi'ye nakledilir. Zn^{+2} ve Ca^{+2} zengin depolama/salgı kesecikleri içinde proinsülinin zincirine Zn^{+2} ve Ca^{+2} monte edilerek heksamerik bir yapı olan $(Zn^{+2})_2(Ca^{+2})(Proin)_6$ oluşturulur. Salgı vezikülünde ise tripsin ve karboksipeptidaz-benzeri enzimler tarafından C-peptid proinsülin zincirinden çıkartılır. Böylece $(Zn^{+2})_2(Ca^{+2})(Proin)_6$ yapısı insülin hegzameri olan $(Zn^{+2})_2(Ca^{+2})(In)_6$ yapısına dönüştürülmüş olur. C-peptidin çıkarılması önemli ölçüde hegzamer çözünürlüğünü değiştirir ve $(Zn^{+2})_2(Ca^{+2})(In)_6$ yapısının kristalleşmesine neden olur. İnsülin hegzameri $(Zn^{+2})_2(Ca^{+2})(In)_6$ inaktif olup biyolojik aktivitesi için depolama formunun insülin monomerine dönüştürülmesi gereklidir (30).

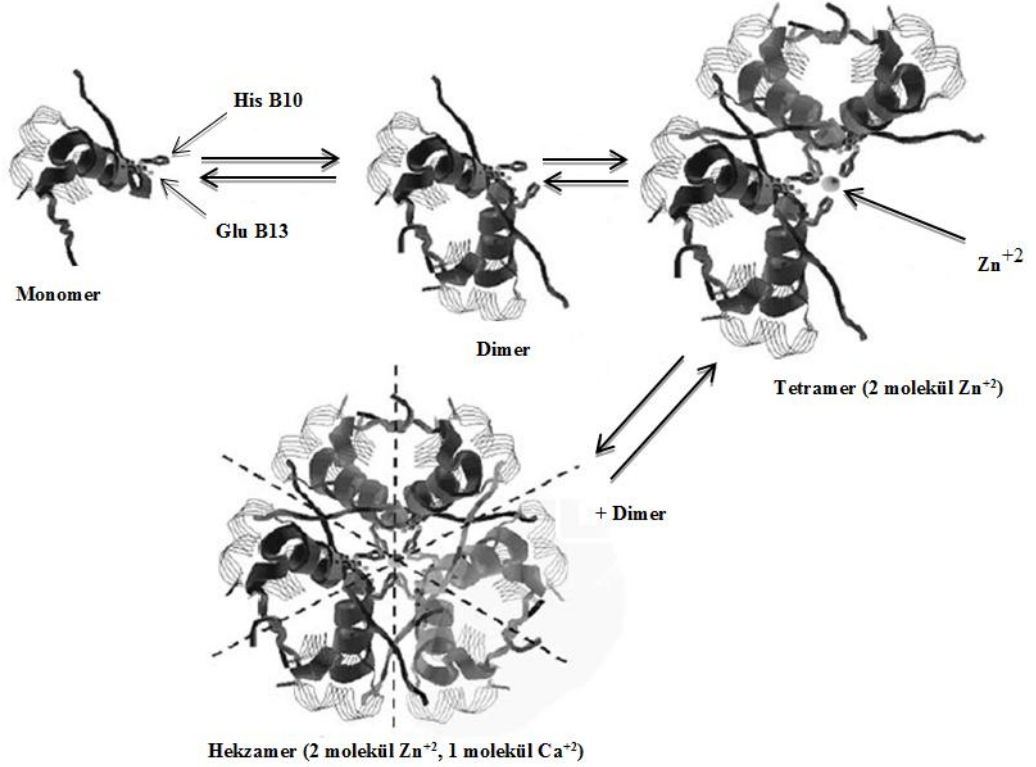
Şekil 3: Pankreasın β -hücrelerinde insülin biyosentezi (31)



“Şekil 3, 31. kaynaktan uyarlanmıştır (31)”

İnsülin hegzomer montaj yolu; iki dimer ile iki çinko iyonunun (Zn^{+2})₂(In)₄ tetramerini verdiği, daha sonra bu tetramerin insülin hegzamerini oluşturmak üzere başka bir dimerik ünitesi ile birleştiği öne sürülür. Monomerik ve dimerik insülinler iki değerli metal iyonları için güçlü bir şelat gösterme özellikleri vardır. İnsülin tetramerinde Zn^{+2} ve Ca^{+2} yerlerinde, her Zn^{+2} yerinde iki His B10 yan zinciri ve her Ca^{+2} yerinde dört Glu B13 yan zincirleri vardır (30).

Şekil 4: İnsülinin hegzomer yapısının 3 katlı simetri eksenini boyunca görünümü



“Şekil 4, 30. kaynaktan uyarlanmıştır (30)”

2.2.3. Çinko ve Diyabet

Zn^{+2} pankreasta insülin sentez, salgı, sinyalinde ve pankreasın sindirim enzimleri sekresyonunda önemlidir. Zn^{+2} insülin etkileşimi hakkında farklı görüşler mevcuttur.

Hayvan çalışmaları Zn^{+2} takviyesinin açlık insülin ve glukoz seviyelerini düzelttiğini göstermiştir. Aynı şekilde in vivo ve in vitro çalışmalar da Zn^{+2} 'un insülin-mimetik ve hipoglisemik etkileri olduğunu göstermiştir (29). Son yıllarda yayınlanmış bir çalışmada ise diyabetli sıçanlara beta hücre transferi yapıldıktan sonra, yüksek çinko diyeti uygulanmasının kan glukoz seviyesinde düzelmeye yaptığı vurgulanmaktadır. Fakat

çinkonun bu olumlu etkisinin mekanizması hala gizemini korumaktadır (32). Başka bir çalışmada Zn^{+2} 'nin etki mekanizmasının direkt olarak insülin reseptörü ya da glukoz transportu veya indirekt olarak insülin yollarından mı olduğu tam olarak bilinmediği belirtilmektedir (22). Diyabetik sıçan ve fare çalışmalarında olduğu gibi, insan çalışmalarında da idrarla Zn^{+2} 'nin kaybedildiği ve bu kaybın dişilerde erkeklerden daha fazla olduğu gösterilmiştir. Bu kaybın nedeni β -adacıklarının harabiyetine bağlı Zn^{+2} 'nin serbestlenmesi sonucudur. STZ ile oluşturulmuş Tip 1 diyabetik sıçanlarda deri altı uygulanan Zn^{+2} , plazma ve pankreasta MT seviyesini arttırarak kan glukoz seviyesini dengelediği gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada Zn^{+2} 'nin insülin reseptör kinaz aktivitesini etkilemediği; fakat Zn^{+2} insülin kaynaklı glukoz transportu ve insülin yolağı aracılığı ile glukozun hücreye transportunu arttırdığı belirtilmektedir (11).

ZnT'in Tip 1 diyabette otoimmün yolakta önemli olabileceği düşünülmektedir (22). Zn^{+2} 'in azalması insülinin düzgün paketlenememesine ve β -hücre hasarının artmasına neden olur. Benzer etki tip 1 diyabette de görülür çünkü β -hücre kaybından dolayı granüllerden Zn^{+2} salınması artar. β -hücrelerinde yüksek miktarlarda ZnT8 bulunur. ZnT8'in insülin içeren sekresyon veziküllerine Zn^{+2} taşınmasını sağlar. Zn^{+2} takviyesiyle ZnT8'in miktarının arttığı gösterilmiştir (27). Sıçan INS-1E hücre hattı kullanılarak yapılan bir çalışmada, Zn^{+2} takviyesinin ZnT-3, -5, -8 taşıyıcılarıyla intrasellüler Zn^{+2} dengesinin sağlanmasıyla insülin salgısının ve β -hücre sağ kalımının arttığı belirtilmektedir. Aynı çalışmada Zn^{+2} konsantrasyonun hücreler tarafından 0,1 mM'e kadar iyi bir şekilde tolere edildiği belirtilmektedir (27). İnsülin ile birlikte salgılanan serbest Zn^{+2} ekstrasellüler matris proteinlerine zayıf bağlandığı için etraftaki β -hücrelerine hemen geri gönderilir. Böylelikle insülin salgılanması için yeterli Zn^{+2} konsantrasyonunun bulunmasını ve β -hücrelerinin serbest Zn^{+2} toksisitesine karşı korunmasını sağlar. Ayrıca yapılan çalışmalarda sadece hücre içindeki çinkonun değil aynı zamanda hücre dışı sıvıda bulunan Zn^{+2} 'de insülin benzeri etkilere sahip olduğu rapor edilmektedir (29).

Zn^{+2} , tirozin fosforilasyonu ve MAPK (mitojen aktive edici protein kinaz)'yı aktive ederek veya fosfotriozin fosfotazı inhibe ederek insülin etkilerini taklit eder. Bu etkilerini 10 nM Zn^{+2} gibi çok düşük konsantrasyonda bile yapabildiği belirtilmektedir (33). İnsülin ve Zn^{+2} beta adacıklarından salgılandıktan sonra kan dolaşımındaki yüksek pH'da Zn^{+2} ve insülin birbirinden ayırmaktadır. Zn^{+2} pankreasta

bulunan alfa hücrelerindeki KATP (ATP-duyarlı K^+ kanalı) kanallarını açarak hiperpolarizasyona neden olmakta ve glukagon salgısını azaltmaktadır. Ayrıca Tip 1 diyabetli hastalarda bazal glukagon seviyesinin yüksek olması insülin- Zn^{+2} alfa hücre fonksiyonlarını düzenlemesindeki eksiklikten ileri gelmektedir (34).

Bu bilgiler çinkonun diyabetli hastalarda kan şekerini dengelemede beta hücrelerinden insülin salgılamasını artışı ve alfa hücrelerinden glukagon salgısının azalması ile ikili etkili olabilecek doğal t rap tik bir aday olabileceğini desteklemektedir.

2.2.4. Çinko Gereksinimi

Sağlıklı yetişkin bir insanın vucudundan günlük olarak dışkı ile 10 mg, idrar yoluyla ise 0.4 mg Zn^{+2} atılır (28). Sağlıklı bireylerin kantitatif olarak tahmini besin alımının planlamasında ve diyet değerlendirilmesinde RDA (Recommended Dietary Allowances) değerleri kullanılmaktadır. Bu değerler ABD’de bulunan Ulusal Bilimler Akademisi Gıda ve Beslenme Kurulu (The National Academy of Sciences Food and Nutrition Board) tarafından yayınlanmıştır. Çinkonun  nerilen günlük tüketim miktarı yaş grubuna göre değişmektedir (35).

Tablo 2: Çinko için diyetle günlük önerilen istihkak değerleri

| Yaş Grubu | Çinko'nun Günlük Önerilen İstihkak Düzeyi (mg/gün) | Çinko'nun Tolere Edilebilir Üst Alım Düzeyi (mg/gün) | |
|--|--|--|----------------------|
| Bebek 0-6 ay 7-12 ay | 2* 3 | Bebek 0-6 ay 7-12 ay | 4 5 |
| Çocuk 1-3 yaş 4-8 yaş | 3 5 | Çocuk 1-3 yaş 4-8 yaş | 7 12 |
| Erkek 9-13 yaş 14-18 yaş 19-30 yaş 31-50 yaş 51-70 yaş 70 üzeri | 8 11 11 11 11 11 | Erkek 9-13 yaş 14-18 yaş 19-70 yaş 70 üzeri | 23 34 40 40 |
| Kadın 9-13 yaş 14-18 yaş 19-30 yaş 31-50 yaş 51-70 yaş 70 üzeri | 8 9 8 8 8 8 | Kadın 9-13 yaş 14-18 yaş 19-70 yaş 70 üzeri | 23 34 40 40 |
| Gebelik ≤18 yaş 19-30 yaş 31-50 yaş | 13 11 11 | Gebelik ≤18 yaş 19-50 yaş | 34 40 |
| Emzirme ≤18 yaş 19-30 yaş 31-50 yaş | 14 12 12 | Emzirme ≤18 yaş 19-50 yaş | 34 40 |

* Yeterli Alım (AL, adequate intake); diğerleri RDA (Recommended Dietary Allowances)

“Tablo 2, 35. kaynaktan uyarlanmıştır (35)”

2.2.5. Çinko Eksikliği

Çinko eksikliği, gastarointestinal, santral sinir sistemi, immün sistem, iskelet, üreme ve deri dahil birçok organ sistemini etkilemektedir (36). Gelişmekte olan ülkelerde, büyüme geriliği, hipogonadizm, bağışıklık bozukluğu ve bilişsel bozukluk olarak neredeyse 2 milyar insanı etkilemektedir (37). Ciddi derecede çinko eksikliğinin belirtileri olarak; bullous pustular dermatit, alopesi, diyare, duygusal bozukluk, kilo kaybı, hücre aracılı bağışıklık bozukluklarına bağlı gelişen enfeksiyonlar, erkeklerde hipogonadizm, nöro-duyusal bozukluklar ve ülserlerin iyileşmesindeki sorunlar gösterilmiştir. Bu durumların tanısı konulmamış ve tedavisi yapılmamış ise sonuçları ölümcül olabilir. İlimli derecede çinko eksikliğinde; büyüme geriliği, adölesan erkeklerde hipogonadizm, kaba cilt, iştahsızlık, zihinsel uyuşukluk, gecikmiş yara

iyileşmesi, hücre-aracılı bağışıklık bozuklukları ve anormal nörosensoryel değişiklikler bulunur (38).

2.2.6. Çinko Toksisitesi

Zn⁺² zehirlenmesi, normal diyet koşulları altında karşılaştığımız bir durum değildir. Akut çinko zehirlenmesinde; mide geriminin azalması, bulantı ve oryantasyon bozukluğu görülür. Zn⁺² seviyesinin 150 mg üzerine çıkmasıyla kusma durumu oluşur. Yüksek Zn⁺² düzeyleri, Zn⁺² eksikliği gibi bağışıklık sistemi baskılanmasına ve gıda alımının azalmasına neden olabilir. Kronik çinko zehirlenmesi; mevcut çinko zehirlenmesi oluşturulmuş tavuklarda tüy pigmentasyon kaybı, yem reddi ve kilo kaybı görülmüştür. Çeşitli türlerde, kemik mineralizasyonun düştüğü, kemik ve eklemlerde oryantasyon bozukluğunun da olduğu rapor edilmiştir (39).

2.2.7. Çinkonun Biyoyararlanımına Etki Eden Faktörler

Çinko emilimini birçok faktör etkilemektedir. Bunun için emilimi arttırıcı ve azaltıcı durumları dikkate almak gerekir. Çinkonun emilimi arttırıcı; pankreastan salgılanan pikolinik asit, vitamin B6 (pikolinik asit salınımını arttırır), sitrat ve glisin, histidin, lizin, sistein, metionin gibi aminoasitler sağlarken; çinkonun emilimini azaltıcı faktörler olarak ise fitik ve okzalik asit, tanenler, selenyum, demir ve kalsiyum vardır (40). İnsan vücudundaki çinko, çoğunlukla enterositlerin apikal yüzeylerine lokal yerleşmiş ZIP4/SLC39A4 olan çinko taşıyıcılarıyla aktif trasport ile duodenum, ileyum ve jejunumdan emilir. Bakır, krom, kalsiyum, manganez ve kadmiyum gibi katyonlar çinko taşıyıcıları için çinko ile rekabet edebileceği için çinko emilimini etkileyebilir (28).

2.2.8. Çinkonun Besin Kaynakları

Çinko, vücut proteinleriyle ilişkili olup proteinden zengin besinler çinko yönünden zengin olduğu söylenebilir. TürKomp verilerine göre besinlerin çinko içerikleri Tablo 3'te gösterilmiştir (41). Besinlerle alınan çinko'nun biyoyararlanımı aynı zamanda alınmış diğer gıda bileşenlerine bağlı olarak değişir. Tahıl ve baklagiller çinkonun nispeten zengin kaynaklar olmasına rağmen bunların biyoyararlanımları içerdikleri fitat nedeniyle sınırlı olduğundan hayvansal kaynaklardan alınan çinkonun emilimi daha iyidir (42).

Tablo 3: Bazı besinlerin ortalama çinko değerleri

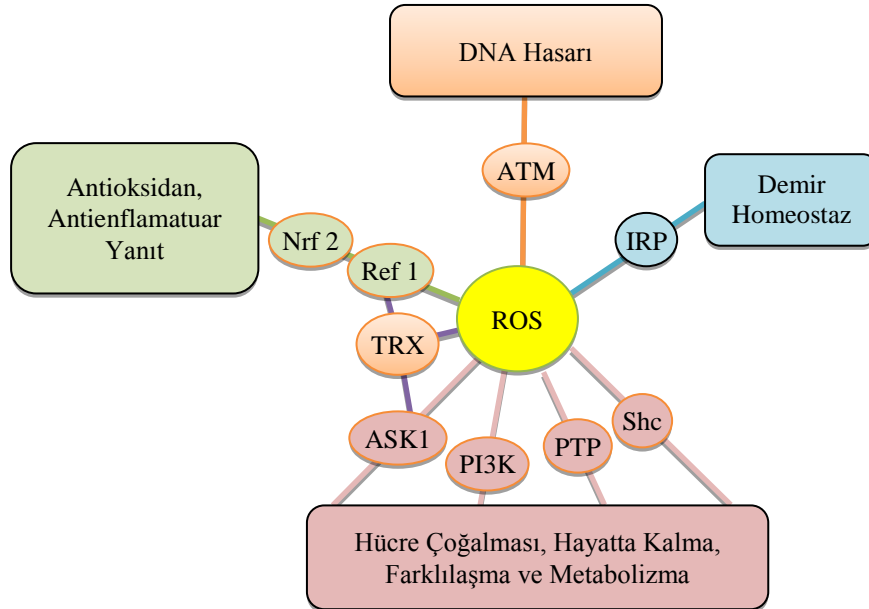
| Besin Adı | Zn (mg/100 gr) | Besin Adı | Zn (mg/100 gr) |
|---------------------------------|-------------------|-----------------------------|-------------------|
| Maya, hamur, kuru | 39,25 | Dermason fasulye, kuru | 2,51 |
| Kabak çekirdeği, kuru | 10,35 | Maydanoz, kuru | 2,26 |
| Ayçiçeği Tohumu, çerezlik | 8,11 | Ekmek, tam buğday unu | 2,19 |
| Buğday unu (tip 650) | 5,93 | İç fındık, kavrulmuş | 2,00 |
| Dana eti, kol | 4,70 | Hamsi | 1,89 |
| Keçi eti, kol | 4,36 | Az yağlı beyaz peynir | 1,87 |
| Börülce, kuru | 4,13 | Piliç eti, but | 1,66 |
| Keten tohumu, kuru | 3,95 | Tam yağlı beyaz peynir | 1,63 |
| Kuzu eti, but | 3,90 | İç antep fıstığı, kavrulmuş | 1,40 |
| Kaşar peyniri, olgunlaştırılmış | 3,84 | Nane, kuru | 1,39 |
| Badem içi, kavrulmuş | 3,74 | Pirinç unu | 1,38 |
| Kırmızı mercimek, kuru | 3,60 | Sofra tuzu, iyotlu | 1,34 |
| Pırasa | 3,47 | Pastörize tam yağlı süt | 1,31 |
| Yer fıstığı, kuru | 3,18 | Yoğurt, probiyotik, sade | 1,29 |
| Koyun eti, but | 3,13 | Tavuk yumurtası, tam | 1,14 |
| Ceviz, iç, kuru | 3,00 | Sade makarna, kuru | 0,95 |
| Buğday, ekmeklik | 2,81 | Siyah zeytin, sele | 0,88 |
| Tavuk yumurtası sarısı | 2,80 | Brokoli | 0,63 |
| Bezelye, kuru | 2,78 | Levrek, yetiştirme | 0,54 |
| Yeşil mercimek, kuru | 2,69 | İnsan sütü | 0,52 |

“Tablo 3, 41. kaynaktan uyarlanmıştır (41)”

2.3. Reaktif Oksijen Türleri

Reaktif oksijen türleri (ROS), hem mitokondriyal oksidatif metabolizma sırasında hem de ksenobiyotikler, sitokinler ve bakteriyel istilaya karşılık hücrel yanıt olarak üretilir. ROS; süperoksit anyon (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve radikal hidroksil ($HO\bullet$) gibi oksijen kısmi indirgenmesi ile oluşan radikal ve radikal olmayan oksijen türlerinden oluşmaktadır. Hücrel ROS, mitokondriyal oksidatif fosforilasyon sürecinde endojen olarak üretilir veya ksenobiyotik bileşikler gibi dışsal kaynaklardan meydana gelir. Oksidatif stres, hücrenin etkili bir antioksidan yanıt kapasitesi üzerindeki aşırı ROS veya oksidanlar nedeniyle oluşan dengesizliği ifade eder. Oksidatif stres, direk veya dolaylı olarak moleküler (nükleik asit, protein ve yağlar) hasara neden olur ve damar tıkanıklığı, diyabet, kanser, nörodejenerasyon, yaşlanma gibi çeşitli hastalık durumlarıyla ilişkilidir. Hücrel olarak ROS algılama ve metabolizması, redoks (indirgeme/oksidasyon) mekanizmasında yer alan birçok protein tarafından sıkı bir şekilde düzenlenir. Bununla birlikte ROS, hücrel süreçleri etkileyen kritik sinyal molekülleriyle etkileşim yolu üzerinden çeşitli sinyal yollarını düzenlemektedir (43).

Şekil 5: ROS tarafından düzenlenen hücrel sinyal yolları



“Şekil 5, 43. kaynaktan uyarlanmıştır (43)”

Hücrenin proliferasyon, metabolizma, farklılaşma ve hayatta kalma süreçlerini; apoptoz sinyal ayarlı kinaz 1 (ASK1), PI3 kinaz (PI3K) protein tirozin fosfataz (PTP), Src homoloji 2 alanını-ihativa eden (Shc) sinyal molekülleri üzerinden etkisini gösterir. Bununla birlikte tioredoksin (TRX), redoks-faktör 1 (Ref-1) ve NFE2-benzer 2 (Nrf-2) ile antioksidan ve anti-enflamatuar yanıtını sağlar. Demir homeostazı için demir düzenleyici protein (IRP), DNA hasar cevabını ise ataksi-telenjiektazi mutasyonu (ATM) gibi kritik sinyal molekül etkileşim yoluyla düzenler.

2.4. Antioksidanlar

Antioksidanlar, hücrenin normal bir savunma mekanizması olarak endojen bulunması yanında yiyeceklerle de ekzojen olarak alınabilirler. Enzimatik antioksidanlar, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon-s-transferaz (GST), glutatyon peroksidaz (GPx) gibi örnekleri içerirken; enzimatik olmayan antioksidanlar, indirgenmiş glutatyon (GSH), ürik asit, karotenoidler, flavonoidler, lipoik asit, vitamin A, C ve E' i içerir (44).

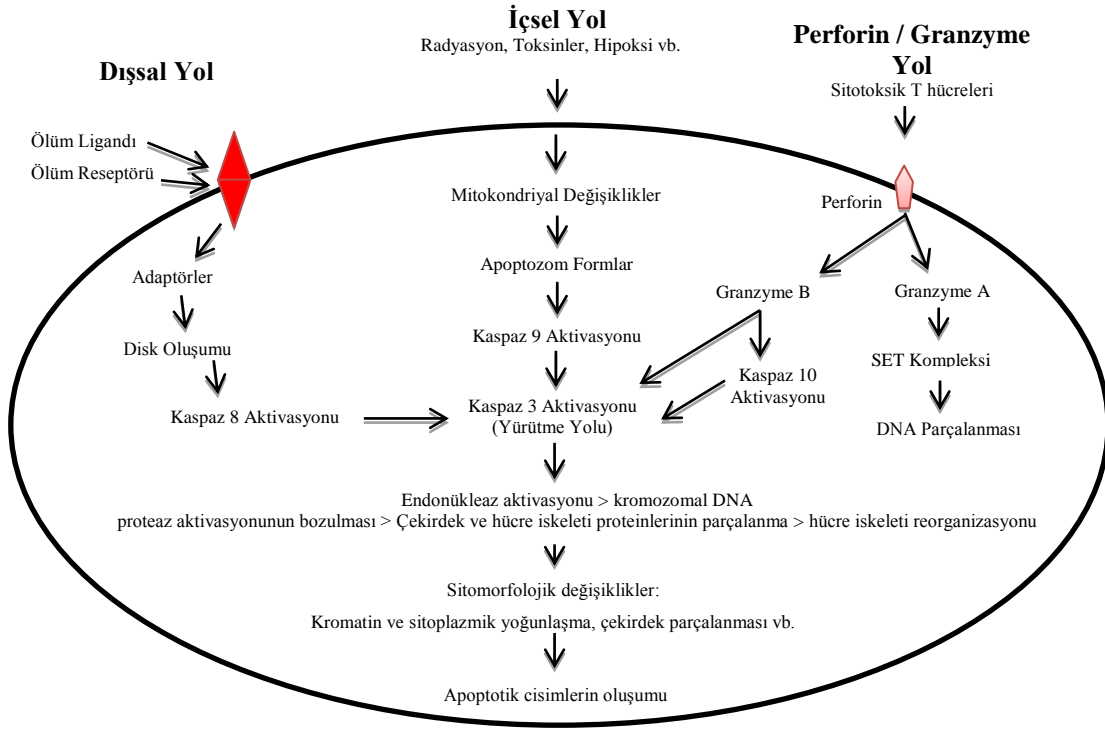
Pankreatik langerhans adacıkları glikoz metabolizmasını ve homeostazını düzenleyen bir ana yapıyı temsil eder. Pankreas adacıkları katalaz, selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz 1 (GPx1) ve Cu,Zn-süperoksit dismutaz 1 (SOD1)'nın aktivitesi düşük seviyede içerir. Adacıkların büyük bir bölümünü temsil eden beta hücreleri insülin sentezi ve salgısını yapar. Karaciğer ile karşılaştırıldığında ise adacıkların; % 1 katalaz, % 2 GPx1 ve % 29 oranında SOD1 faaliyetlerini içerir. β -hücreleri yüksek düzeyde SOD1 enzimini içermesi, çinko metabolizmasının diyabet gibi oksidatif stresin arttığı durumlarda önemini vurgulamaktadır. Dolayısıyla düşük seviyede antioksidan savunması bulunan β -hücreleri oksidatif stres hasarlarına karşı hassastır (45).

2.5. Apoptozis (Programlanmış Hücre Ölümü)

Programlanmış hücre ölümü ya da apoptozis, genel olarak farklı morfolojik özellikleri ve enerji bağımlı biyokimyasal mekanizmaları ile karakterize bir süreçtir. Apoptozis, normal hücre döngüsü, bağışıklık sisteminin uygun gelişimi ve işleyişi, hormon-bağımlı atrofi, embriyonik gelişim ve kimyasal kaynaklı hücre ölümleri dahil çeşitli süreçlerin önemli bir bileşeni olarak kabul edilir. Apoptoz mekanizmaları moleküler olayların enerji bağımlı kaskadını içerir ve son derece karmaşıktır. Bugüne kadar ki araştırmalar “dışsal” ya da ölüm reseptör yolu ve “içsel” veya mitokondrial yol

olarak iki ana apoptotik yol olduğu ortaya konmuştur. Bunlarla birlikte T hücre aracılı sitotoksik ve perforin-granzim-bağımlı hücre ölümünü içeren ek bir yol daha gösterilmiştir (46).

Şekil 6: Apoptotik olayların şematik gösterimi



“Şekil 6, 46. kaynaktan uyarlanmıştır (46)”

Dışsal sinyal yolu kaynaklı apoptozis, hücre zarı üzerindeki reseptör aracılı etkileşimler başlatılır. Bu ölüm reseptörleri, tümör nekroz faktör (TNF) reseptör geni süper ailesinin üyelerini içerir. Hücre zarında reseptörlerin olduğu alan “ölüm alanı” olarak adlandırılır. Bu ölüm alanı, hücre yüzeyinden ölüm sinyalini hücre içi sinyal yollarına iletiminde kritik bir rol oynar. Bugüne kadar, en iyi karakterize edilmiş ligandlar ve karşılık gelen ölüm reseptörleri FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 ve Apo2L/DR5 içerir (46).

İçsel sinyal yolu kaynaklı apoptozis ise kaspaz aktivasyonunu tetikleyen Bcl ailesinin proapoptotik üyelerinin dış mitokondriyal membran geçirgenliği üzerindeki etkilerine bağlıdır. Çok sayıda sitotoksik uyarılar ve pro apoptotik moleküller dış

mitokondriyal membran geçirgenliğini değiştirerek mitokondri üzerinden apoptozisi başlatır. Bu geçirgenlik, Bcl-2 ailesi proteinleri, mitokondriyal lipid ve proteinler tarafından dzenlenir. Dış mitokondriyal membranın bozulması üzerine, normal olarak, i ve dış mitokondriyal membranlar arası alan içinde bulunan; sitokrom c, Smac / DIABLO, Omi / HtrA2, AIF ve endonükleaz G protein grubu serbest bırakılır. Sitozole giren bu apoptojenik proteinler kaspaz aktivasyonunu teşvik ederek ya da kaspaz-bağımsız ölüm yolları ile hücre ölümünü tetikler (47).

2.6. Apoptozis İlişkili Proteinler

2.6.1. Beta-Aktin

Aktin, hücrenel motilite için ana protein olup; hücrenin gelişimi, idamesi ve patogenezi açısından önemlidir. Memelilerde 6 farklı aktin izoformu tanımlanmıştır. Bu izoformlar, α , β , γ ve türevleri halinde gruplandırılmıştır (48). Aktinler, kas kasılması, hücre hareketi, yapışma ve hücre şeklinin korunması dahil olmak üzere çok çeşitli hücre fonksiyonlarında yer alan ökaryotik proteinlerdir. Sitoplazmik aktin izoformları β ve γ olup her yerde ifade edilir ve hücre işleyişi için gereklidirler (49). β -aktin hücrede sitoplazmik hücre iskeleti proteinidir. Hücre içi hareketi ve bununla ilişkili olarak hücre şeklinin değişikliklerinde itici güç, sitokinez, endositoz ve hücre yapışması gibi faaliyetlerde rol alır (50). β -aktin, hücre için elzem olmasından dolayı yaygın olarak hücre kültürleri ve doku ekstrelerinin protein analizlerinde (Western Blot) kontrol proteini olarak kullanılmaktadır (51).

2.6.2. Tümör Proton 53

Tümör proton 53 (P53) tümör baskılayıcı, protein aktivasyonu hücre döngüsünün durmasına veya apoptozisine yol açabilir (52). Tümör baskılayıcı protein P53 önemli bir transkripsiyon faktörüdür. Hücre döngüsü düzenlenmesinde ve hücre çoğalmasının kontrolünde merkezi bir rol oynar. P53'n inaktivasyonu insan karsinogenezinde kilit rol oynadığı kabul edilmektedir (53).

2.6.3. P38 MAPK

Memelilerdeki p38, mitojen ile aktive olan protein kinazlar (MAPK) eşitli hücre streslerine ve inflamatuvar sitokinlere cevap olarak aktive edilir. P38 MAPK ailesinin alfa, beta, gamma ve delta olarak dört yesi vardır. Bu ailelerin aminoasit

dizilimi % 60 oranında birbirine benzer olmasına karşın; ifade kalıpları, substrat özgülükleri ve kimyasal inhibitörlerine hassasiyetleri farklıdır. Vücuttaki p38 MAPK aktivitesi normal bağışıklık ve inflamatuvar yanıt için kritik öneme sahiptir(54). Oksidatif stres ve in vitro ortamda sitokinlere cevap olarak P38'in aktivasyonu pankreatik β -hücre fonksiyon bozukluğunu ve apoptozisini tetiklemektedir(55).

2.6.4. Bcl-2

Apoptozis çeşitli biyolojik olaylarda hücrelerin seçici olarak ortadan kaldırılması için önemli bir fizyolojik süreçtir. Bcl-2 ailesi, apoptotik hücre ölümünün düzenlenmesinde rol oynayan antiapoptotik ve proapoptotik üyelerden oluşan en iyi tanımlanmış protein ailesidir. Bu ailenin Bcl-2 ve Bcl-XL gibi antiapoptotik üyeleri; ya sitokrom-c veya apoptozis teşvik edici faktör (AIF) gibi mitokondriyal apoptojenik faktörlerin salınımını engelleyerek ya da kaspazların (CASPASE=Cysteine Aspartate Specific Prote ASES) ön biçimini ayırma yoluyla apoptozisi önler. Sitokrom-c ve AIF sitoplazmaya salındıktan sonra, direkt olarak apoptotik değişiklere neden olacak bir dizi hücrel proteinleri parçalayacak olan kaspazları aktive eder. Bu ailenin proapoptotik üyelerinden olan Bax ve Bak, mitokondriyal geçirgen porların üzerinden mitokondriyal apoptojenik faktörlerin sitoplazmaya salınımını neticesinde kaspazların aktivasyonu ile apoptozisi başlatır (56).

2.6.5. Sitokrom-c

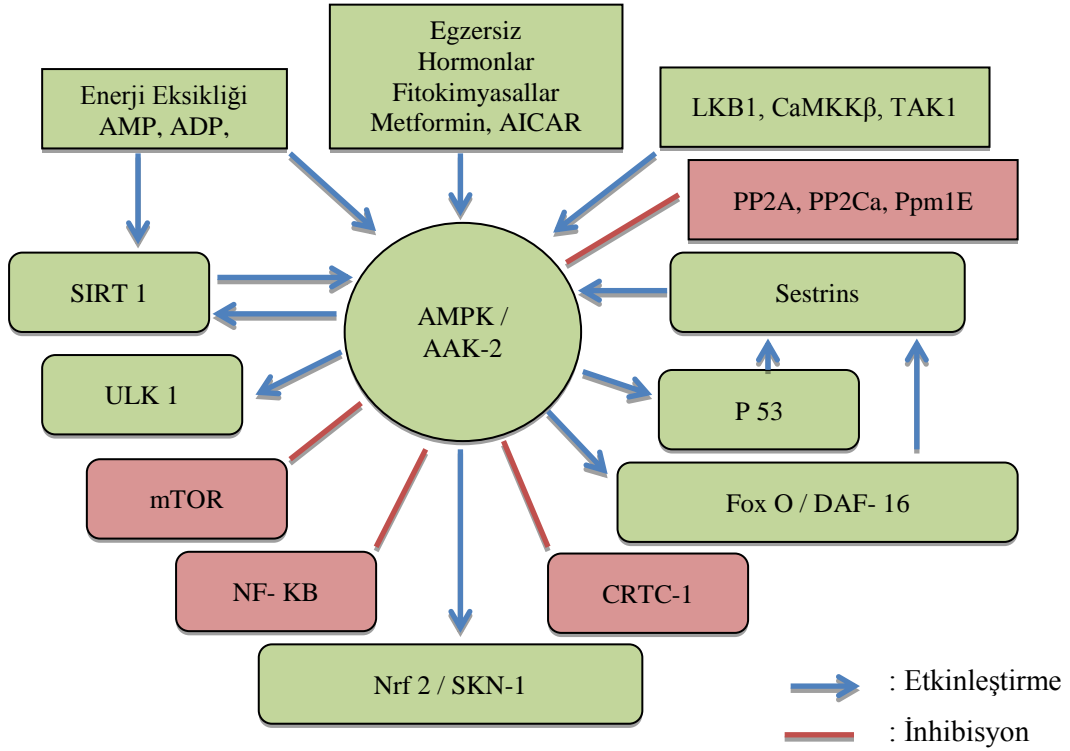
Mitokondri, sitokrom-c ve diğer proapoptotik proteinlerin sitoplazmaya ve nükleusa geçmesini sağlayarak apoptozisin güçlendirilmesinde önemli bir araçtır. Sitokrom-c, Apaf1 ve prokaspaz 9 ile birlikte sitoplazmada apoptozom oluşturularak kaspaz aktivitesini harekete geçirir. Bu da hücreyi apoptozise teşvik eder. Toplam sitokrom-c'nin yaklaşık % 85'i mitokondriyal kristalarda bulunur. Sitokrom-c'nin komple serbestlenmesini kolaylaştırmak için iki adım vardır. İlk adım olarak apoptozisin erken döneminde mitokondriyal kristanın yeniden yapılanması için zarlar arası boşluk içine mitokondriyal kristadan sitokrom-c salınır. İkinci adımda ise mitokondriyal dış zarında Bax/Bak tarafından oluşturulan gözenekler vasıtasıyla sitozole sitokrom-c salınır (57).

2.6.6. Adenozin 5'-Monofosfat İle Aktive Edilmiş Protein Kinaz

Adenozin 5'-monofosfat ile aktive edilmiş protein kinaz (AMPK) aktivasyonu, hepatiklerde yağ asidi oksidasyonu, ketogenezi uyardığı, kolesterol sentezi, lipojenez ve trigliserit sentezini inhibite ettiği; bununla birlikte adiposit lipoliz ve lipogenezi inhibe ettiği; iskelet kasında ise yağ asidi oksidasyonu, glukoz alımını ve pankreatik β -hücreleri tarafından insülin salgılanmasının modülasyonunu uyardığı saptanmıştır (58).

Ökaryot canlılarda hücre ve organizma metabolizması merkezi düzenleyicilerinden biri olan AMPK, hücre içi ATP seviyesi düştüğünde etkinleştirilir. AMPK, daha fazla ATP üretmek için katabolik yolları desteklerken anabolik yolları engeller (59). Memelilerde AMPK, katalitik α alt birimi ve düzenleyici β ve γ alt birimlerinden oluşan serin/treonin protein kinazdır. Katalitik ve düzenleyici alt birimlerinin her ikisi için memeli dokularında farklı eksprese edilen bazı izoformları bir arada bulunmaktadır. Artmış AMP/ADP konsantrasyonu allosterik regülasyon yoluyla AMPK'yı aktive eder. Çeşitli üst kinazlar, örneğin; serin/treonin kinaz 11 (LKB1), Ca^{2+} /kalmodulin bağımlı protein kinaz kinaz β (CaMKK β) ve transforme edici büyüme faktörü- β -etkinleşen kinaz 1 (TAK1); Thr172 katalitik α alt birimini fosforilleyerek AMPK'yı etkinleştirebilir. Buna karşılık aktive edilmiş fosforlu AMPK, protein fosfatazlar (PP) (örneğin PP2A, PP2C α ve Ppm1E) tarafından inaktive edilebilir. Egzersiz ve çeşitli hastalıklar gibi pek çok fizyolojik ve patolojik durumlar AMPK sinyal yolunu stimüle ettiği görülmektedir. Ayrıca, adiponektin, ghrelin ve leptin gibi bazı hormonlar dokuya özel bir şekilde AMPK sinyallemesini ya aktifleştirir ya da inhibe edebilir (60).

Şekil 7: AMPK sinyalleşmesini aktifleştiren ve inhibe edebilen bazı sinyal molekülleri



“Şekil 7, 60. kaynaktan uyarlanmıştır (60)”

2.6.7. Kaspaz-3

Kaspazlar, apoptozu düzenlemede kritik rolleri olan sistein proteazlardır. Kaspaz aktivasyonu ile kinaz, fosfataz ve diğer sinyal molekülleri aktivasyonu ya da inaktivasyonuna bağlı olarak hücre içi sinyal iletimini modüle eder (61). Kaspazlar, embriyonik gelişim ve birçok hastalığın patolojisi için gerekli olan programlanmış hücre ölümü mekanizmalarında görev alır. Apoptotik kaspazlar apoptotik kaskad girdi noktasına bağlı olarak başlatıcı ve infazcılar olarak ikiye ayrılırlar. Başlatıcı kaspazlar belirli bir ölüm yolunu aktive eder ve daha sonrasında ise infazcı kaspazları (kaspaz-3,-7) etkinleştirir (62). Kaspaz-3 aktif ölüm proteazı olup birçok önemli hücrel proteinlerin spesifik bölünmesini katalize eder. Kaspaz-3 hücrenin parçalanması ve apoptotik cisimlerin oluşumu ile ilişkili bazı süreçler için esas teşkil etmektedir (63).

2.7. Çinko-ROS-Apoptozis İlişkisi

Reaktif oksijen ürünleri (ROS) inflamasyon hastalıklarına katılan önemli bir araçtır ve diyabetik hayvan çalışmalarında β -hücre hasarına aracılık ettiği bildirilmektedir. Pankreatik β -hücrelerinin antioksidan savunmasının az olmasından dolayı bu hücreler oksidatif stres hasarına karşı savunmasızdır. İn vitro bir çalışmada β -hücrelerine Zn^{+2} ilavesinin STZ'nin neden olduğu harabiyete karşı koruyucu olduğu belirtilmektedir (64). Oksidatif stres diyabetin patogeneğinde ve komplikasyonlarında önemli rol oynar. Çinkonun aynı zamanda oksidatif stresi de azalttığı belirtilmektedir (11). Zn^{+2} süperoksit dismutaz (SOD) gibi önemli antioksidan enzimlerin yapısal parçasıdır. Diyabete bağlı gelişen Zn^{+2} eksikliği, antioksidan sentezini azaltıp, oksidatif stres oluşumunu artırır (65). Zn^{+2} desteğinin oksidatif stresi ve apoptozisi azaltarak diyabeti azalttığı rapor edilmiştir. Zn^{+2} süperoksit dismutaz (SOD)'ın yapısal bütünlüğünün korunmasında baskın rol oynar. Aynı zamanda ksantin oksidaz aktivitesini inhibe ederek lipid oksidasyonunu da azaltır. Zn^{+2} -metallotionin aracılığıyla çoklu düşük doz STZ kaynaklı immün reaksiyona karşı beta adacıklarını koruduğu da bildirilmektedir (22). Zn^{+2} 'nin antioksidan ve antiapoptik özelliği olduğu gösterilmiştir. Donörlerin plazmadaki Zn^{+2} seviyesi 6,48 mmol/L olduğu (0,5-14,4 mmol/L) belirtilmektedir. Plazma Zn^{+2} seviyesindeki bu geniş değişkenliğin izolasyon sonrası β -hücre fonksiyonunu etkileyebileceğini düşündürmektedir (22). Zn^{+2} 'nin pankreas dokusu üzerindeki antiapoptotik mekanizması hakkında çok fazla bilgiye sahip değiliz. Literatürde sadece bir çalışmada yüksek ve düşük glukoza bağlı pankreas adacıklarındaki apoptozis yolağında çinkonun etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada da çinko takviyesinin MT'nin miktarında artış yapabileceği ve MT'lerin antioksidan özelliklerinin glutatyona göre elli kat daha fazla olduğu iddia edilmektedir. Çinkonun antiapoptotik etkisinin Kas-3, -6 ve -9' u inhibe etmesinden kaynaklandığı rapor edilmiştir (32). Yakın bir zamanda yapılan başka bir çalışmada, Zn^{+2} eksikliğinin karaciğer dokusunda Nrf2'nin ifadesini (ekspresyonunun) azaltarak, Akt ve GSK3 β 'nin inhibisyonu üzerinden hücre ölümüne neden olduğu belirtilmiştir (66). Hipergliseminin (yüksek kan şekeri) böbrek tübül epitelinde oksidatif strese ve inflamasyona neden olarak apoptozisi tetiklediği bildirilmiştir. Apoptozisin sitokrom-c'nin mitokondriden salınması ile Kas-3 Kas-9 aktivasyonu ile yaptığını rapor edilmiştir. Zn^{+2} takviyesi yapılan böbrek tübül epitel hücrelerin de Nrf2' i arttırarak Akt/Erk yolağının inhibisyonu üzerinden antiapoptotik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (67).

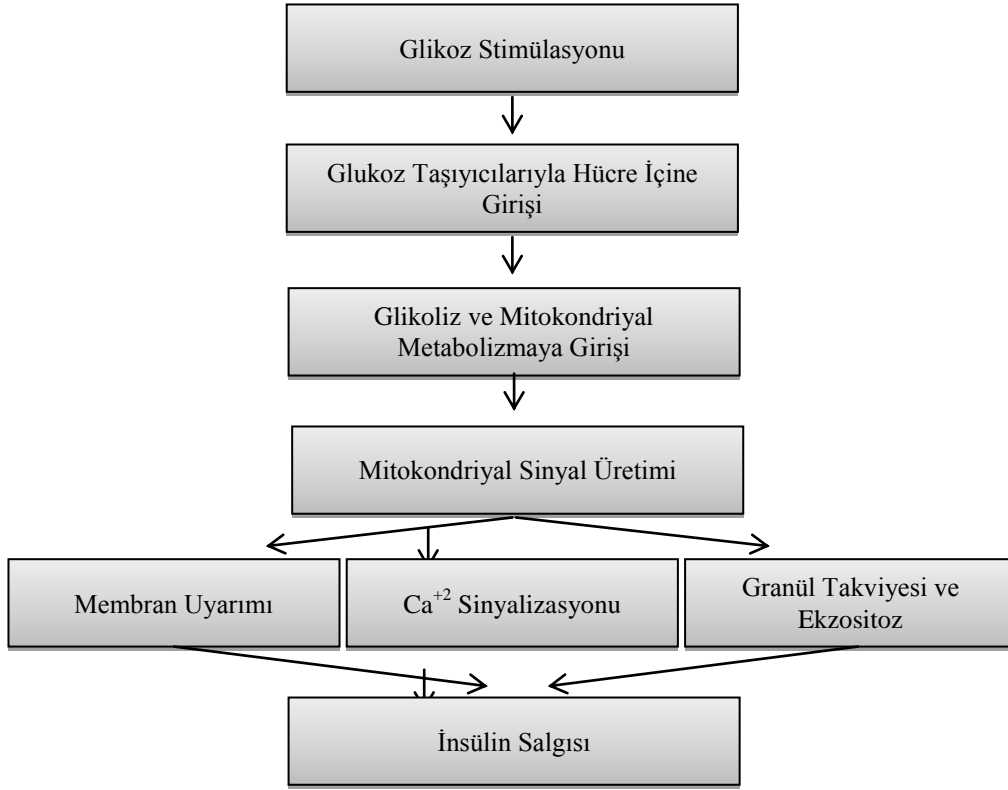
Zn^{+2} eksikliği gelişmekte olan ÷lkelerde yaygındır. Buna bağlı olarak diyabetin gr÷lme sıklığının bu ÷lkelerde çok artacağı tahmin ediliyor. Bu bağlamda ÷lkemiz bu riski taşıyan ÷lkeler arasında yer almaktadır. Zn^{+2} eksikliğinin hem halkımız hem de ÷lkemizde yetişen bitkiler için önemli beslenme problemlerinden biri olduğu rapor edilmiştir (65). Bu bilgiler açık bir şekilde Zn^{+2} 'nin diyabetin tedavisinde alternatif bir ajan olarak kullanılabileceğini d÷ř÷nd÷rmektedir.

2.8. İns÷lin Salgılanmasının D÷zenlenmesi

İns÷lin, normal kan şekerinin korunmasında önemli bir hormondur. β -h÷creleri plazma glukoz konsantrasyonunda meydana gelen değişiklikleri algılar ve bu değişikliklere karşılık gelen miktarda insulin salgılar. β -h÷creleri beslenme durumunu algılamak ÷zere birbirine stratejik damarlarla bağlı olarak adacıklar halinde k÷melenmiştir. Adacıkları çevreleyen ekzokrin bölgelerindeki h÷celere göre 10 kat daha fazla kanlanması sağlayacak kadar yoğun k÷÷k kan damarlarıyla aę şeklinde donatılmıştır. Glikoz, evrimsel olarak bazı hayvan t÷rlerinde insulin salınımı için birincil uyarandır. Kemirgen ve insanlarda, glukoz tarafından uyarılan insulin salgısı protein ve yağ tarafından uyarılana kıyasla çok daha b÷y÷ktür. İnsanlarda 75 g oral glikoz alımı 30 dakika içinde plazma insulin seviyesini bazal seviyeden (20-30 pmol/L) 250-300 pmol/L yükselmesine neden olurken; aynı miktarda yağ veya yağ ile birlikte protein diyeti ise aynı s÷re sonunda plazma insulin d÷zeylerini sırasıyla 50 ve 60 pmol/L artırmaktadır (68).

Pankreatik β -h÷crelerinin glikoza bağımlı insulin salgılama mekanizmasında ilk aşama glikozun girişi ve metabolizmasını kapsarken, ikinci aşamada ise ATP ÷retimine bağlı olarak gelişen dinlenim zar potansiyelinin artması (depolarizasyon) ve nihayetinde insulin salgılanmasını kapsamaktadır (69).

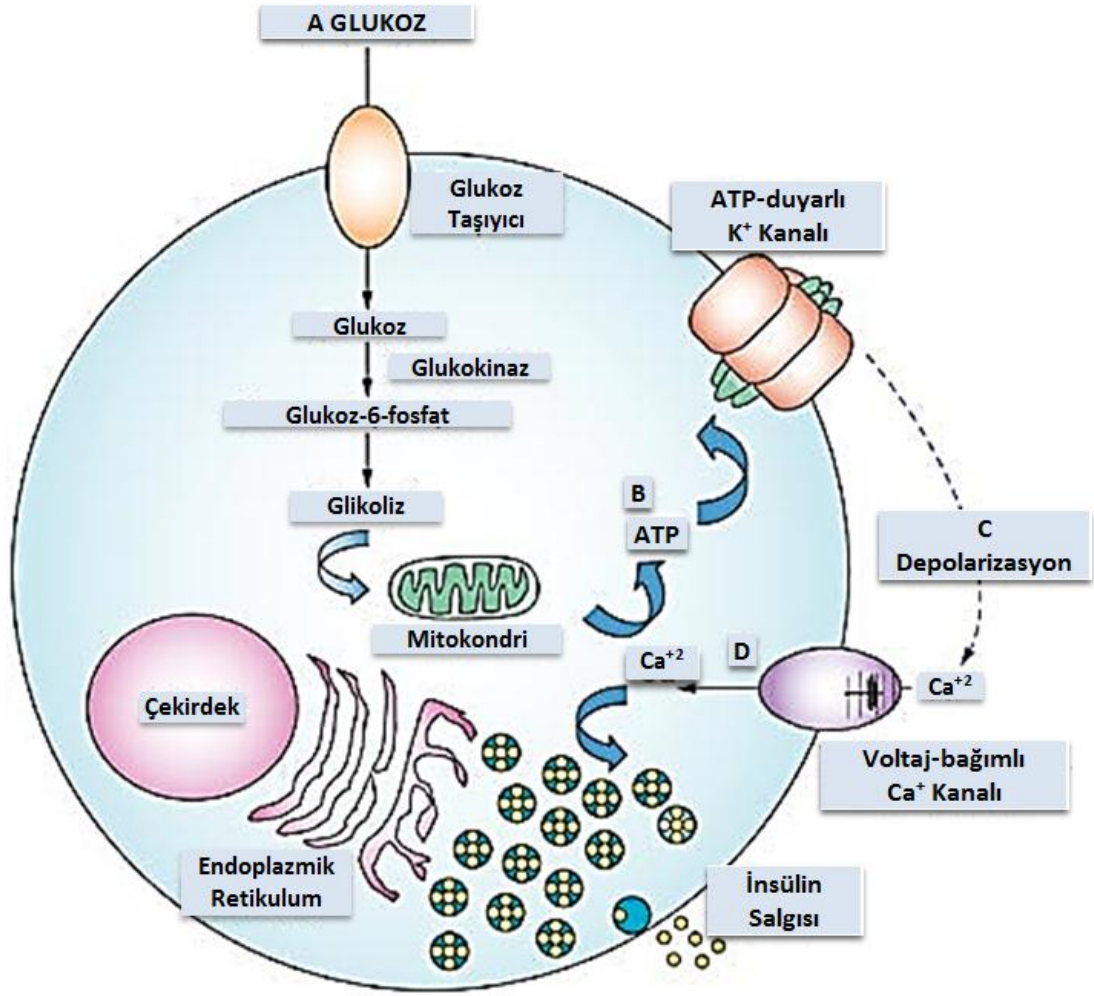
Şekil 8: Pankreatik β -hücrelerinden glukozla bağlı insülin salgılama olayları



“Şekil 8, 69. kaynaktan uyarlanmıştır (69)”

Uyarılmamış (dinlenim) durumdaki β -hücrelerinin dinlenim zar potansiyeli yaklaşık -65 mV civarında olup bu değerde ATP' ye duyarlı potasyum kanalları açıktır. β -hücrelerine glukoz girişi GLUT-2 tarafından gerçekleştirilmektedir. Hücre içine glukoz girişi ve metabolizması sonrasında hücre içi ATP: ADP oranı artarak ATP' ye duyarlı potasyum kanallarının kapanmasına neden olur. Bu durum hücre dışına çıkan potasyum iyon miktarını azaltır bu da hücre zar potansiyeli artmasına yol açar ve hücrenin depolarize olmasına yol açar. Bu etki β -hücre zarında bulunan voltaja duyarlı Ca^{+2} kanallarının (L-tipi) açılmasıyla sonuçlanır. Bu kanalların açılması hücre içine doğru yoğun şekilde Ca^{+2} akışına sebebiyet verir. Beta hücrelerinde sitozolik kalsiyum konsantrasyonunun artması insülin salgılanmasını uyarır (70).

Şekil 9: Pankreatik β -hücrelerinde glukoza bağımlı insülin salgılanması



“Şekil 9, 70. kaynaktan uyarlanmıştır (70)”

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Araştırma Tipi

DeneySEL olan çalışma, hücre kültürü üzerinde T.C. İstanbul Bilim Üniversitesi hücre kültürü laboratuvarında gerçekleştirildi.

3.2. Araştırmada Uygulanan İşlem Basamakları

3.2.1. Hücre Kültürü

Çalışmada insan pankreatik β hücre hattı (General Cell Collection: 1.1B4, 10012801), aseptik hücre kültüründe, %10 fetal sığır serumu (FBS), %1 antibiyotik (100 IU/ml penisilin, 0.1 mg/ml streptomisin) içeren RPMI 1640 besi yerinde (Life Technologies, 21875-034), inkübasyon koşulları 37°C ve %5 karbondioksit olacak şekilde büyütüldü. Hücreler % 80 oranında büyüdüklerinde çalışmaya başlandı.

3.2.2. Deney Gruplarının Oluşturulması

Çinkonun olası etkileri ilgili hipotezimizi test etmek amacıyla Tablo 4'te gösterildiği gibi 4 deney grubu oluşturuldu. Elde edilecek verilerin güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini test etmek amacıyla; her bir deney grubunun uygulaması ve ölçümleri 2 tekrarlı olarak yapıldı.

Tablo 4: Çalışmada oluşturulan deney grupları

| Gruplar | Alt Gruplar | Grupların Simgesi |
|--------------------------|----------------------------|-------------------|
| Kontrol Grupları | Kontrol Grup | K |
| | Çinko Desteği Yapılan Grup | K+Z |
| Diyabetli Gruplar | Kontrol Grup | D |
| | Çinko Desteği Yapılan Grup | D+Z |

3.2.3. Beta Hücre Kültüründe Tip 1 Diyabet Modeli

Çalışmada, tip 1 diyabet oluşturmak için deneylerde en yaygın olarak kullanılan streptozotosin (STZ) modeli kullanıldı.

Streptozotosin, 2-deoksi-2- (3- (metil-3-nitrosoureido)-D-glukopiranoz yapısındadır. STZ, pankreatik β -hücrelerini hasarlayarak tip 1 diyabet oluşturur. Hücre kültürü üzerindeki deneysel çalışmalarda 0-30 mM dozları arasında STZ uygulanmıştır. STZ'nin β -hücrelerindeki sitotoksik etkisi ise iki saat içerisinde meydana geldiği bildirilmektedir (71, 72).

Çalışmadaki diyabetli grupları oluşturmak için; 4 saat süreyle 20 mM dozda STZ kullanıldı. STZ uygulaması esnasında sonuçları etkileyebilecek diğer faktörleri ortadan kaldırmak amacıyla bütün gruplara aynı işlem (besi yeri değişimi ve yıkama) yapıldı. STZ uygulaması için öncelikle grupların eski besi yeri boşaltılıp, HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) (1X), liquid) (Life Technologies, 14175-053) ile 3'er defa yıkandı. Daha sonra diyabet oluşturulmak istenen grupların besi yeri 20 mM STZ (Sigma-Aldrich, S0130) içerecek şekilde hazırlanmış olan besi yeri ile yenilenirken; diğer gruplarınkisi ise normal besi yeri kullanılarak yenilendi. Hücreler 4 saat süresince 37°C ve %5 karbondioksit koşullarında inkübe edilir.

3.2.4. Hücrelerin Çinko İle Muamele Edilmesi

Beta hücrelerinin 0,1 mM Zn^{+2} konsantrasyonunun iyi bir şekilde tolere ettiğini belirtilmektedir. Deneysel çalışmalarda hücrelerin çinko ile muamelesi 0,1 mM (100 μ M) düzeyinde ve 24 saat süreyle $ZnCl_2$ inkübasyon yapılmaktadır (27).

Çalışmamızda $ZnCl_2$ (Fisher, 389451000) takviyesi besi yerine ilave edilerek uygulandı. STZ uygulamasının hemen ardından bütün gruplar HBSS ile 3'er defa yıkandı. Kontrol ve diyabetli grupların her birinin alt gruplarından birisine 0,1 mM $ZnCl_2$ içeren besi yeri ile yenilenirken; diğer kalanlarına normal besi yeri ile yenilendi. Bu işlem sonrasında hücreler 24 saat süresince 37°C ve %5 karbondioksit koşullarında inkübe edildi.

3.2.5. Hücrelerin Toplanması

Çinko takviyesinin 24 saat ardından deney grupların yer aldığı flasklar buz üzerine alındı ve HBSS ile 3'er defa yıkandı. Hücrelerin protein izolasyonu için; RIPA tamponuyla (Radio immunoprecipitation Assay; Santa Cruz Biotechnology, sc-24948) muamele edildi. Daha sonra hücre spatulası kullanılarak üzerinde çoğaldıkları yüzeyden mekanik olarak kazınıp, mikro pipet ile ependorf tüplerine alındı. Örnekler 13000 rpm'de 4⁰C'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant mikro pipet yardımıyla tüplere eşit miktarda paylaştırıldı ve ölçüm yapılana kadar -20 ⁰C'de saklandı.

3.2.6. Hücrelerin Protein Tayini

3.2.6.1. Örneklerin Protein Miktarının Ölçümü

Western Blot Yöntemindeki dikey jel sistemine eşit miktarda protein yüklemesini yapabilmek için örneklerin protein konsantrasyonu Qubit fluorometer (Invitrogen, Q32857) ile ölçüldü. Bunun için öncelikle kite ait standartlar kullanılarak fluorometre kalibre edildi. Daha sonra her bir gruptan 1 µl numune alınıp, standartlarla kıyaslanarak gruplardaki protein konsantrasyonları saptandı.

Tablo 5: Çalışmada kullanılan örneklerin protein konsantrasyon değerleri

| Grup | Protein Miktarı (µg/µL) |
|--------------------------------------|-------------------------|
| Kontrol Grup | 13,16 |
| Çinko Desteği Yapılan Grup | 13,76 |
| Diyabetik Kontrol Grup | 12,48 |
| Diyabetik Çinko Desteği Yapılan Grup | 9,08 |

3.2.6.2. Western Blot Yöntemiyle Proteinlerin İfade Düzeylerinin Tayini

50 µg'lık protein numeleri jeldeki (%10'luk akrilamid jel) kuyucuklarına yüklendi. Jelin birinci ve altıncı kuyucuğuna 5'er µl markır (Bio-Rad, 161-0374) yüklemesi yapıldı. Yükleme yapıldıktan sonra proteinler jel elektroforezi'nde (Invitrogen) 130 volt altında bir saat boyunca yürütüldü. Jel elektroforezi'nde yürütülen proteinler iBlot cihazı (Invitrogen, IB1001EU) yardımıyla PVDF membrana transfer edildi. Membran, %5' lik yağsız süt tozlu PBS-T (PBS-Tween 20) solüsyona alındı ve

membranla antikorlar arasındaki nonspesifik bağlanmaları en aza indirmek için orbital karıştırıcı yardımıyla oda sıcaklığında 1 saat bloklandı. Proteinlerin tanımlanması için her bir birincil antikor protokolüne göre %5' lik yağsız süt tozlu PBS-T solüsyonunda seyreltildi. Membranlar bu solüsyonla +4 °C'de bir gece orbital çalkayıcı yardımıyla inkübe edildi. Daha sonra membranlara ikincil antikorların uygulanması için PBS-T ile 10'ar dakika üç kez yıkandı. İkincil antikorlar (anti-rabbit ve anti-mouse) protokolüne göre %5' lik yağsız süt tozlu PBS-T solüsyonunda seyreltildi. Membranlar bu solüsyonla da oda sıcaklığında 1 saat orbital çalkayıcı yardımıyla inkübe edildi. Membranlar 10'ar dakika olmak üzere üç kez buffer ile yıkandı. Alkale fosfat (BCIP/NBT; Invitrogen, WP20001) ile görüntüleme yapıldı.

Tablo 6: Çalışmada tayini yapılan proteinlerin molekül ağırlıkları ve birincil ile ikincil antikorların protokolüne göre seyreltme oranı

| Proteinler | Molekül Ağırlıkları (kDA) | Birincil Antikorlar | İkincil Antikorlar | |
|------------------------------------|---------------------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| | | Seyreltme Oranı | Türü | Seyreltme Oranı |
| Sit c (abcam, ab76237) | 15 | 1000 ⁻¹ | Rabit | 6000 ⁻¹ |
| p38 MAPK (CST, 9212S) | 43 | 1000 ⁻¹ | Rabit | 6000 ⁻¹ |
| P53 (Thermo Scientific, MA5-12557) | 55 | 100 ⁻¹ | Mouse | 2000 ⁻¹ |
| β-aktin (CST, 3700) | 45 | 1000 ⁻¹ | Mouse | 2000 ⁻¹ |
| AMPK α (abcam, ab32047) | 65 | 2500 ⁻¹ | Rabit | 6000 ⁻¹ |
| Pro-Kaspaz-3 (milipore, 04-440) | 35 | 1000-1 | Rabit | 6000-1 |
| GLUT 2 (abcam, ab95256) | 57 | 1000 ⁻¹ | Rabit | 6000 ⁻¹ |

* CST: Cell Signaling Technology

3.2.7. İnsülin Salgısındaki Değişimin Tayini

3.2.7.1. Pankreatik β-hücrelerinin glukoz ile insülin salınımının indüklenmesi

Çinko ve STZ ile muamele edilen hücrelerde insülin salınımını belirlemek için hücreler glukoz tolerans testine tabii tutulmuştur. Bunun için hücrelerin bulunduğu besi yeri 24 saat sonunda % 0,5 fetal serum albumini / 1,1 mM glukoz içeren Krebs-Ringer/bikarbonat-HEPES tamponu ile 40 dakika inkübe edilmiştir. Ardından medyum uzaklaştırılarak % 0,5 fetal serum albumini / 1,1 mM; 8,4 mM; 16,7 mM glukoz içeren Krebs-Ringer/bikarbonat-HEPES tamponu eklenerek 60 dakika daha inkübe edilmiştir. Ardından supernatant toplanarak insülin hormon analizine (insülin sekresyonu) kadar -40 °C'de saklanmıştır.

Hücresel insülin hormon içeriği ise asit alkol ekstraktları ile belirlenmiştir. Buna göre glukoz ile insülin salınımı sonrasında hücreler asit-alkol ile pipetlenerek patlatılmış ve elde edilen lizat 3000 rpm'de 5 dakika 4°C'de santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant toplanarak insülin hormon analizine (insülin içeriği) kadar -40 °C' de saklandı.

3.2.7.2. İnsülin Hormon Analizi

Deney sonunda bütün grupların insülin hormon değerleri sandviç ELISA yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Sandviç ELISA için Nunc yüksek afiniteli 96-well plak kullanıldı. 2,5 µg/ml anti-Insulin + Proinsulin antikoru [D6C4] (Abcam, ab8304) içeren karbonat/bikarbonat kaplama tamponu ile plaklar gece boyunca 4 °C'de kaplandı. Ardından PBS-T ile yıkanan kuyular %1 BSA (Bovine Serum Albümin) içeren PBS ile doyuruldu. PBS-T ile tekrar yıkanan kuyulara kör, standart ve örnekler eklenerek gece boyunca 4 °C'de inkübasyona bırakıldı. PBS-T ile yıkanan kuyular 1:1000 oranında % 1 BSA içeren PBS ile sulandırılmış mouse monoklonal [D3E7] Insulin + Proinsulin (HRP) (Abcam, ab28063) ile 2 saat inkübe edildi. PBS-T ile yıkama sonrasında HRP substratı olan TMB ELISA Substrate (Highest Sensitivity; ab171522) ile 30 dakika renk geliştirilmiştir. Reaksiyon 1 N H₂SO₄ solüsyonu ile durduruldu. Örnekler Mikroquant Mikroplate Spektrofotometre ile 450 nm dalga boyunda okundu. Elde edilen standart eğriye göre örnek değerleri belirlendi (73, 74).

3.2.8. Oksidatif Stresin Saptanması

Bütün gruplardaki deney sonunda elde edilen örneklerde total oksidan/antioksidan seviyesi spektrofotometrik (ELISA) yöntemi kullanılarak ölçüldü. ELISA için 96 oyuklu plaka kullanıldı. Total oksidan seviyesi (TOS; Rel Assay Diagnostic, RL0024), total antioksidan seviyesi (TAS; Rel Assay Diagnostic, RL0017) ölçümü için her gruptan toplam sekiz adet numune alındı.

3.2.8.1. Total Oksidan Seviyenin Ölçülmesi

Bu kitin total oksidan seviyesini ölçme prensibi; örneklerde bulunan oksidanların demir iyon şelasyon kompleksini ferrik (Fe⁺³) iyonuna oksitlemesine bağlıdır. Bu reaksiyonu, reaksiyon ortamı içinde bol miktarda bulunan arttırıcı moleküller tarafından sürdürülür. Sonuç olarak demir iyonu asidik ortam içinde kromojen renkli bir kompleks yapar ve bu renk yoğunluğu, örnek içindeki mevcut oksitleyici moleküllerinin

toplam miktarına bağlıdır. Sonuçlar litre başına mikromolar hidrojen peroksit eşdeğeri cinsinden ifade edilir ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv./L}$). Çalışmada kör, standart ve örneklerden 17,5 μL alındı ve üzerine 250 μL “reagent” 1 eklendi. 530 nm dalga boyuna ayarlanmış ELISA cihazında (BioTek μQuant Microplate Spectrophotometer) başlangıç absorbansı (A1) okundu. Daha sonra 12,5 μL “reagent” 2 ilave edildi. Oda sıcaklığında 10 dakika bekledikten sonra 530 nm’de son absorbans (A2) okundu. Sonuçlar aşağıdaki denkleme göre hesaplandı ve $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv. /L}$ olarak ifade edildi.

Sonuç: (Abs Örnek / Abs Standart 2) X 20 (Standart 2 Değeri)

Abs Örnek: (Örnek Absorbansı A2 - Örnek Absorbansı A1)

Abs Standart 2: (Standart 2 Absorbansı A2 - Standart 2 Absorbansı A1)

Standart 2 Değeri: 20 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv. /L}$

3.2.8.2. Total Antioksidan Seviyenin Ölçülmesi

Total antioksidan durumunu ölçme prensibi ise; örneklerde bulunan antioksidanlar koyu mavi-yeşil renkli ABTS radikalini renksiz ABTS formuna indirgemesine dayanır. 660 nm’de absorbans değişikliği örneğin toplam antioksidan seviyesi ile ilişkilidir. Sonuçlar litre başına mikromolar Trolox eşdeğeri cinsinden ifade edilir ($\mu\text{mol Trolox Eq/L}$). Çalışmada kör, standart ve örneklerden 15 μL alındı ve üzerine 250 μL “reagent” 1 eklendi. 660 nm dalga boyuna ayarlanmış ELISA cihazında (BioTek μQuant Microplate Spectrophotometer) başlangıç absorbansı (A1) okundu. Daha sonra 37,5 μL “reagent” 2 ilave edildi. Oda sıcaklığında 10 dakika bekledikten sonra 660 nm’de son absorbans (A2) okundu. Sonuçlar aşağıdaki denkleme göre hesaplandı ve $\text{mmol Trolox Equiv. /L}$ olarak ifade edildi.

Sonuç: $\frac{(\text{Abs Standart 1} - (\text{Abs Örnek}))}{(\text{Abs Standart 1}) - (\text{Abs Standart 2})}$

(Abs Standart 1) – (Abs Standart 2)

Abs Standart 1: (Standart 1 Absorbansı A2 - Standart 1 Absorbansı A1)

*Standart 1 için deiyonize su kullanıldı.

Abs Standart 2: (Standart 2 Absorbansı A2 - Standart 2 Absorbansı A1)

Abs Örnek: (Örnek Absorbansı A2 - Örnek Absorbansı A1)

3.2.8.3. Oksidatif Stres İndeksinin Hesaplanması

Elde edilen TOS'un TAS'a oranı oksidatif stres indeksi (OSI) olarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{OSI (arbitrary unit)} : \frac{\text{TOS } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/L})}{\text{TAS } (\mu\text{mol Trolox Eq/L})}$$

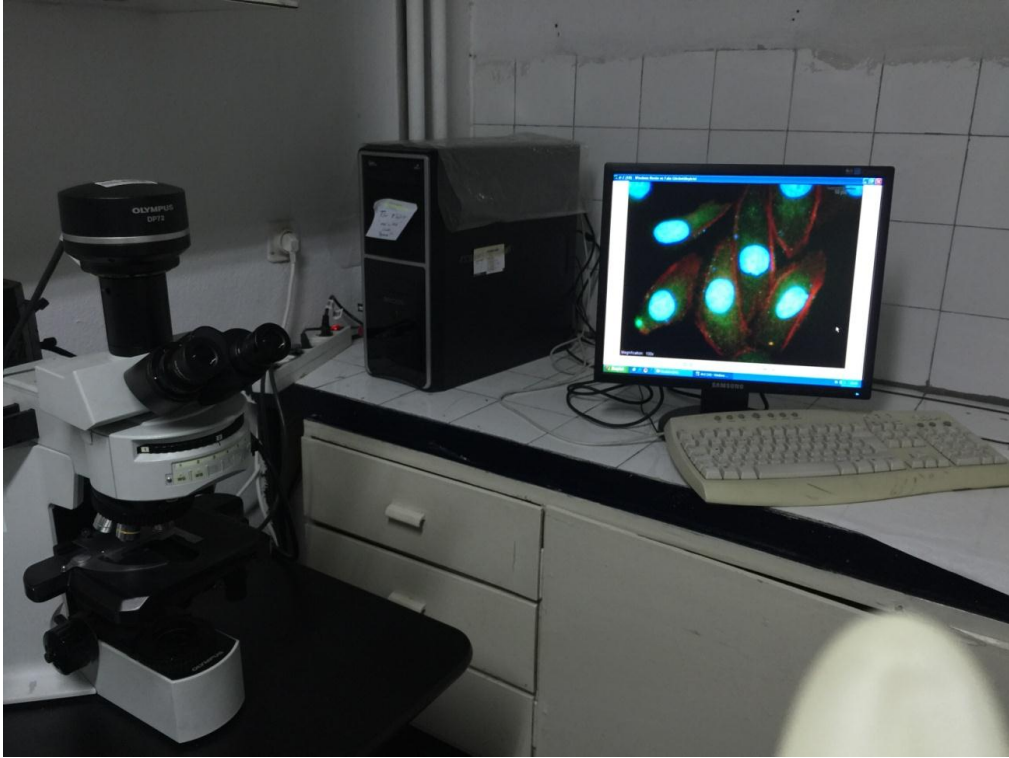
3.2.9. İmmünofloresan Çift İşaretleme Yöntemiyle Protein İlişkilerinin Belirlenmesi

Özel antikolar kullanılarak yapılan immünolojik yöntemler (immünofloresan, immünositokimya, immünohistokimya) proteinlerin hücre ve organel içindeki dağılımlarının belirlenmesinde yaygın kullanılan metotlardan biridir. Özellikle farklı dalga boyundaki antikolar kullanılarak yapılan çift işaretleme yöntemleri ilişkili olan/olduğu düşünülen proteinlerin hücre içinde dağılımı ve birlikteki lokalizasyonunun belirlenmesi açısından önemli bilgiler vermektedir. İnsülin vezikülleri pankreatik β - hücrelerden ekzositoz ile salınır. Ekzositozda kargo teslimatında hücre iskeleti elemanlarından F-aktin önemlidir. Hücrelerdeki hedef proteinlerde (F-aktin, insülin) immünofloresan olarak çift işaretleme yapıldı. Çift boyama tekniği ile Zn^{+2} 'nin insülin salgılanmasındaki önerdiğimiz mekanizmalarda görev yapan proteinlerin (insülin, aktin) hücredeki dağılımları (lokalizasyonları) belirlendi.

Öncelikle cover sliplerde üzerinde deney grupları oluşturuldu. Ardından PBS tamponu ile 3 kez yıkandı, ilaç ve çinko kalıntıları uzaklaştırıldı. % 2 paraformaldehid içinde 10 dakika fikse edildi. PBS tamponu ile 3 kez yıkandı. % 0.1 Triton-X100/ %20 BSA içeren PBS içinde oda sıcaklığında 1 saat hücreler bloklandı. Birincil antikolar olan F-aktin 1/500 oranında, İnsülin 1/500 oranında % 0.1 Triton-X100/ %2 BSA içeren PBS içerisinde seyreltilip hazırlandı. Daha sonra hücreler bu solüsyonla gece boyunca 4 °C'de inkübe edildi. Birinci antikor kalıntılarını uzaklaştırılması amacıyla PBS ile 3 kez yıkama işlemi yapıldı. Anti rabbit olan ikincil antikor 1/2000 oranında % 0.1 Triton-X100/ % 2 BSA içeren PBS içerisinde seyreltilip hazırlandı. Sonra hücreler bu solüsyonla da 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Yine PBS tamponu ile 3 kez yıkılarak ikinci antikor kalıntıları uzaklaştırıldı. Çekirdek boyaması için 0.1 mg/ml konsantrasyondaki DAPI ile oda sıcaklığında 10 dakika boyama işlemi yapıldı. Son kez PBS tamponu ile 3 kez yıkandı. Cover sliplerin hücrenin olduğu yüzey alta bakacak

şekilde katma medyumunu içeren lam üzerine ters bir şekilde kapatıldı. Kuruduktan sonra cover sliplerin etrafları cila (oje) ile çevrilerek hücrelerin kuruması önlenerek incelenene kadar korunması sağlandı. Mikroskopta farklı büyüklükteki objektiflerden her birinde 10 adet olacak şekilde fotoğraf çekimi yapıldı.

Şekil 10: İmmünofloresan çift işaretlemede yönteminde kullanılan floresan mikroskobu sistemi



3.3. Veri Analizi

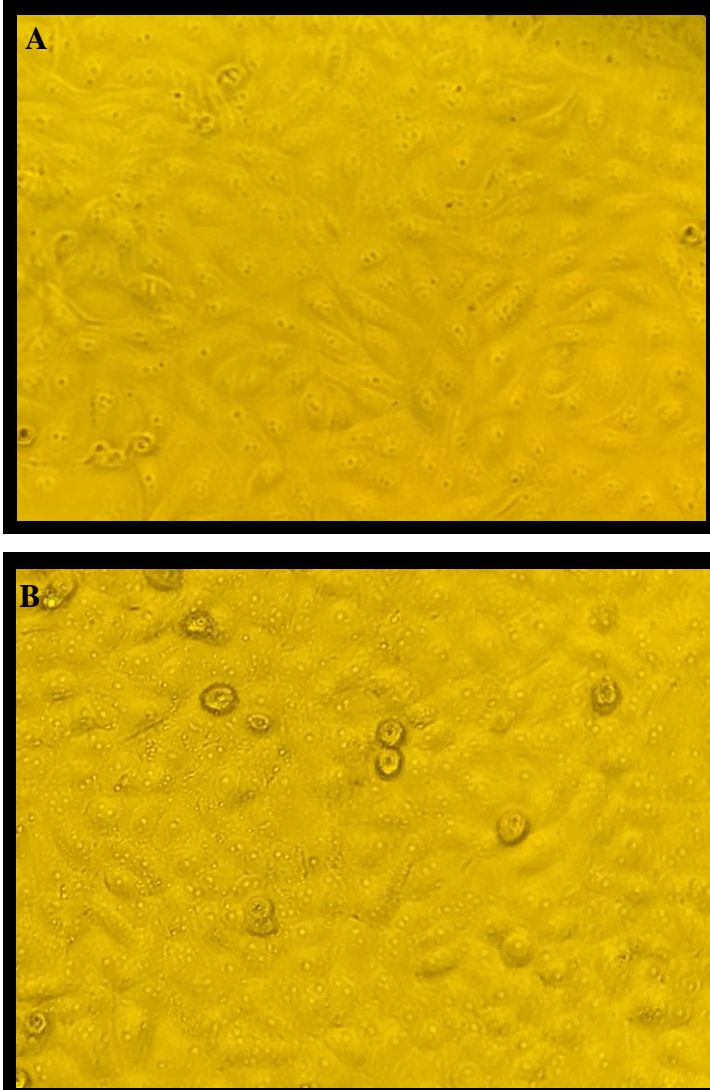
Western blot yöntemiyle elde edilen membran görüntülerinin bant profilleri ImageJ programı ile analiz edildi. İstatistiksel hesaplamalar, Excell ve SPSS 21 programları kullanılarak yapıldı. Verilerin dağılımı Kolmogorov-Smirnov ve Levene testleriyle saptandı. İki'den fazla grubun ortalamaları arasındaki farkın anlamlılık değerlendirilmesinde; normal dağılım koşullarında, tek yönlü ANOVA ve ardından post hoc test olarak, Tukey testi kullanıldı. Normal dağılıma uygunluğun saptanmadığı koşullarda ise Kruskal Wallis ANOVA ve ardından da Mann-Whitney U testi kullanıldı. İstatistik olarak anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. β -Hücrelerin Morfolojileri

Çalışmada, diyabette çinko desteğinin insülin salgılanmasına ve antiapoptotik etki mekanizmalarını araştırmak üzere insan β -hücre hattı kullanılmıştır. Şekil 11-A' da normal β -hücrelerin mikroskopik görüntüsü bulunmaktadır. Şekilden de anlaşılacağı gibi hücre sınırları düzenli, düzgün yerleşime sahiptir. Şekil 11-B' de STZ ile diyabet oluşturulmuş β -hücreler görülmektedir. Diyabetli β -hücrelerin hatları keskinliğini kaybetmiş, oval görünümlü ve kabarık hücre formuna sahiptir. Bu görüntünün elde edilmesi amaçlanan diyabetik hücrelerin oluşturulduğunun kanıtıdır. Bu aşamadan sonra, diyabet ve/veya normal, sağlıklı hücrelere çinko takviyesi 24 saat olacak şekilde deney grupları oluşturuldu.

Şekil 11: Beta hücrelerinin mikroskop altında görüntüsü

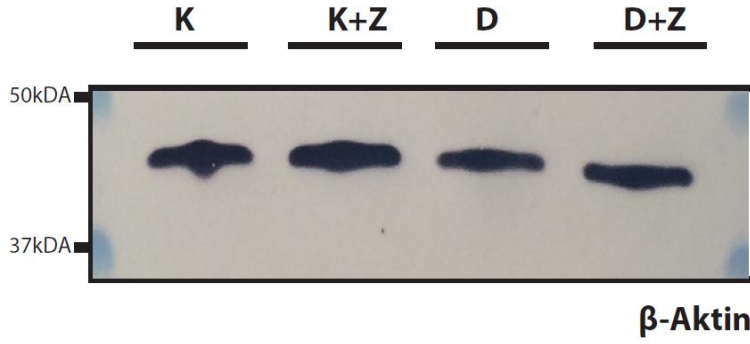


4.2. Ayrıştırılan ve Tayini Yapılan Proteinler

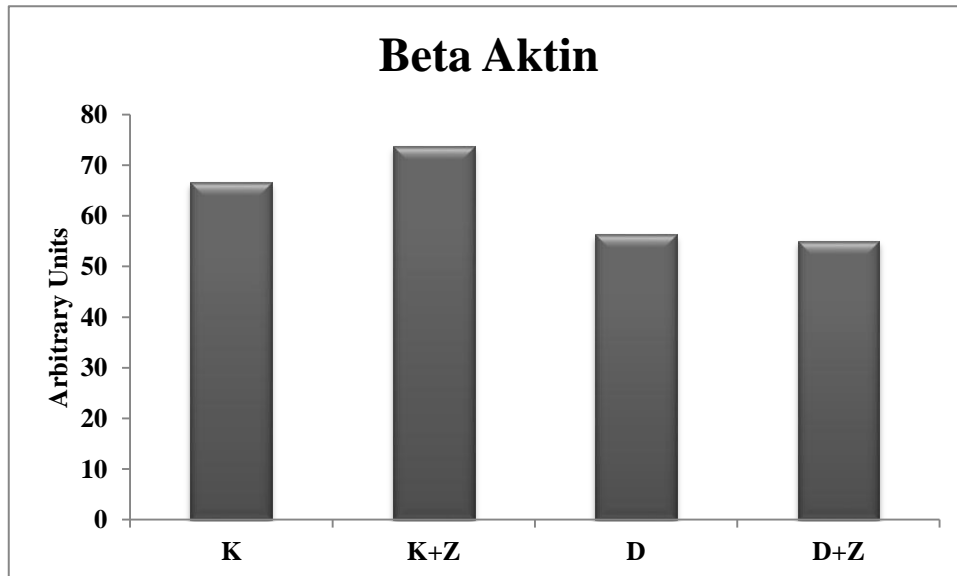
4.2.1. Beta Aktin

Hücrelerde hastalık koşullarında dahi seviyesi değişmeyeceği kabul edilen, hücrelerde elzem işler yapan bazı proteinler bulunur. Bunlar, Western blot yönteminde jellerle yüklenen protein miktarlarını orantılama için kullanılan kontrol proteinleridir. Bu proteinlerden biri de β -aktindir ve bu çalışmada kullanılmıştır. Yapılmış olan bütün western blot ölçümlerinde AMPK, P38 gibi hedef proteinler öncelikle her grubun β -aktini ile orantılanmıştır. Bu orantılamanın mantığı, jellere yüklenen her bir protein miktarı, β -aktin miktarı ile orantılıdır. Her bir kuyucuğa 50 μ L protein yüklenmesine rağmen, pipetleme hatalarından kaynaklanan bu değişimler nötralize edilmiş olur. Bu sayede gruplar arasında homojen bir ölçüm sağlanmış olur.

Şekil 12: Beta Aktin'in protein ölçümü



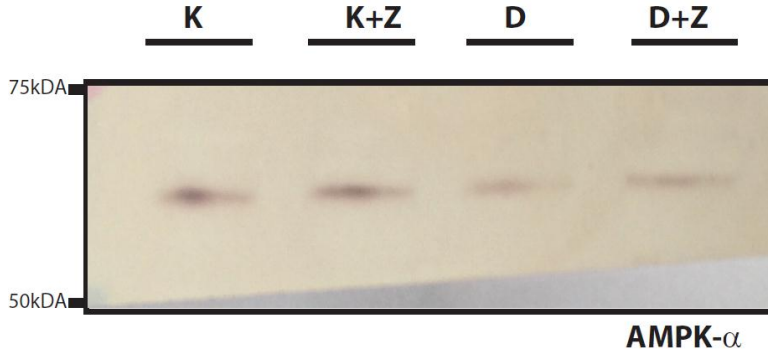
Şekil 13: Beta Aktin'in protein analizi



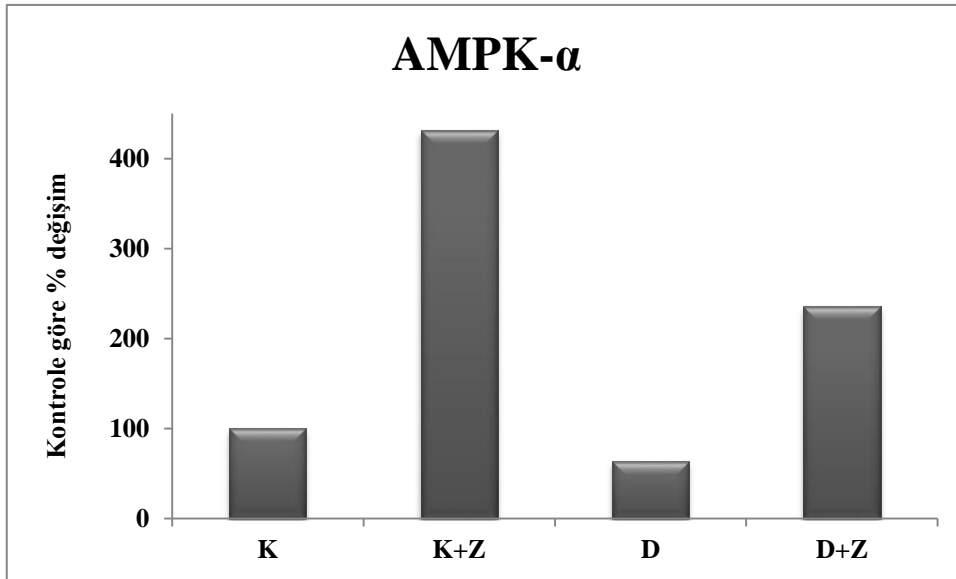
4.2.2. AMPK- α

AMPK- α hücre enerji dengesinin korunmasında en önemli proteinlerden biridir. Dolayısıyla, hücrelerin hem sağ kalımı hem de ölüm yolları ile yakından ilişkili bir proteindir. Apoptozis olayında enerji gereksinim duyan aktif bir kaskad olduğu için AMPK- α protein seviyesindeki değişimlere bakıldı. Çalışmada, sadece çinko verilen grupta (K) kontrol grubuna göre yaklaşık %330'luk bir artış saptandı. Sadece diyabet yapılan grupta (D) ise kontrol grubuna göre %37'lik bir azalma saptandı. Diyabet oluşturulduktan sonra 24 saat çinko desteği yapılan β -hücrelerde (D+Z) ise diyabet grubuna göre %273; kontrol grubuna göre %135'lik bir artış saptandı.

Şekil 14: AMPK- α 'nın protein ölçümü



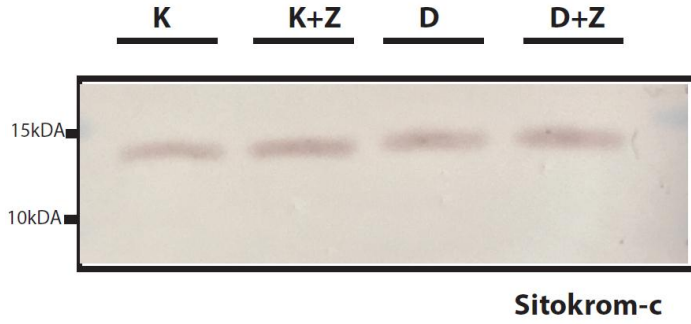
Şekil 15: AMPK- α 'nın protein analizi



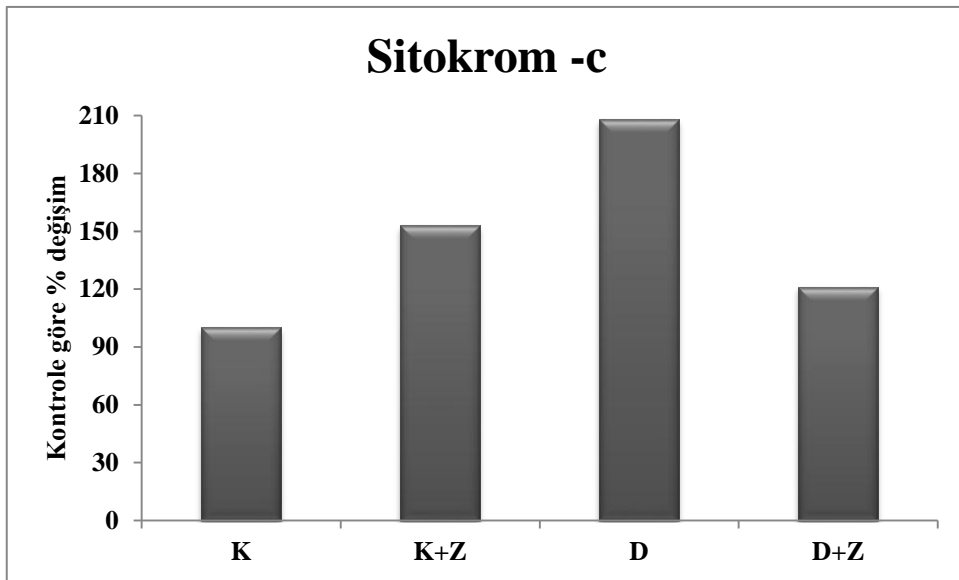
4.2.3. Sitokrom-c

Sitokrom-c, apoptotik yolağın başlatılmasında en önemli düzenleyici proteinlerinden biridir. Dolayısıyla, sitokrom-c'nin protein seviyesi ölçümleri yapıldı. Çalışmada, sadece çinko verilen grupta (K) kontrol grubuna göre yaklaşık %53'lük bir artış saptandı. Sadece diyabet yapılan grupta (D) ise kontrol grubuna göre %108'lik bir artış saptandı. Diyabet oluşturulduktan sonra 24 saat çinko desteği yapılan β -hücrelerde (D+Z) ise sadece diyabet yapılan gruba göre 42'lik bir azalma; kontrol grubuna göre %21'lik artış saptandı.

Şekil 16: Sitokrom-c'nin protein ölçümü



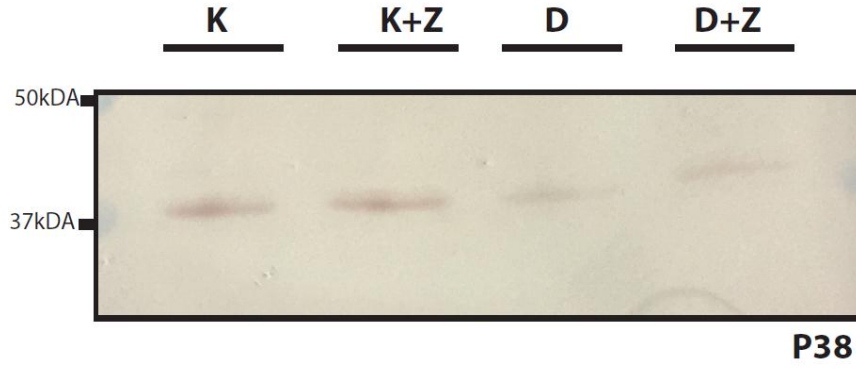
Şekil 17: Sitokrom-c'nin protein analizi



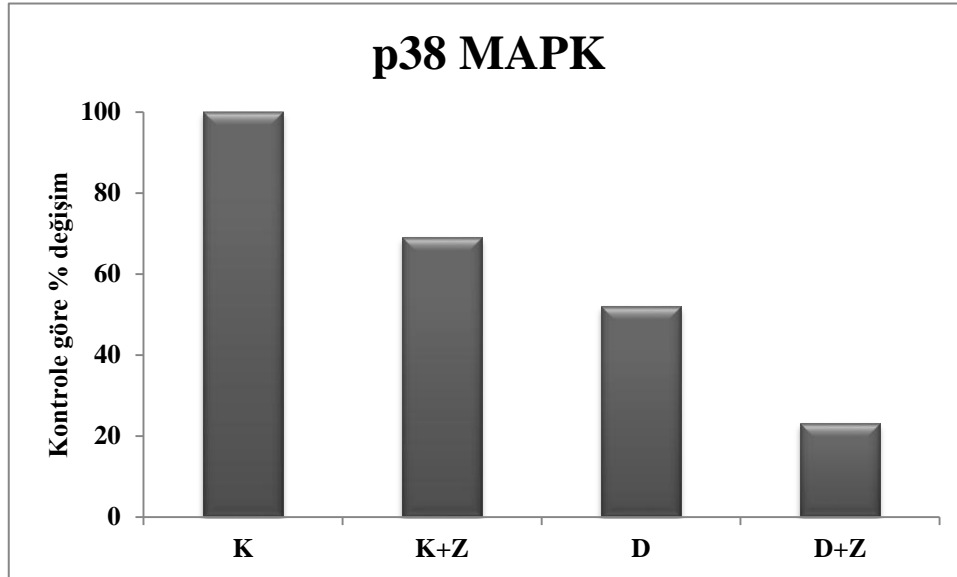
4.2.4. P38 MAPK

Apoptotik yolakta önemli rol oynayan proteinlerden biri de P38'dir. Bu gerekçeyle P38'in protein seviyesi ölçümü de yapıldı. Çalışmada, sadece çinko verilen grupta (K) kontrol grubuna göre yaklaşık %31'lik bir azalma saptandı. Sadece diyabet yapılan grupta (D) ise kontrol grubuna göre %48'lik bir azalma saptandı. Diyabet oluşturulduktan sonra 24 saat çinko desteği yapılan β -hücrelerde (D+Z) ise sadece diyabet yapılan gruba göre 56'lük bir azalma; kontrol grubuna göre %77'lik azalma saptandı.

Şekil 18: P38 MAPK'ın protein ölçümü



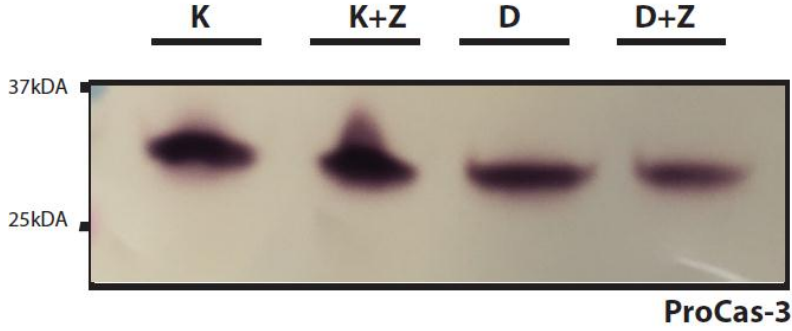
Şekil 19: P38 AMPK'ın protein analizi



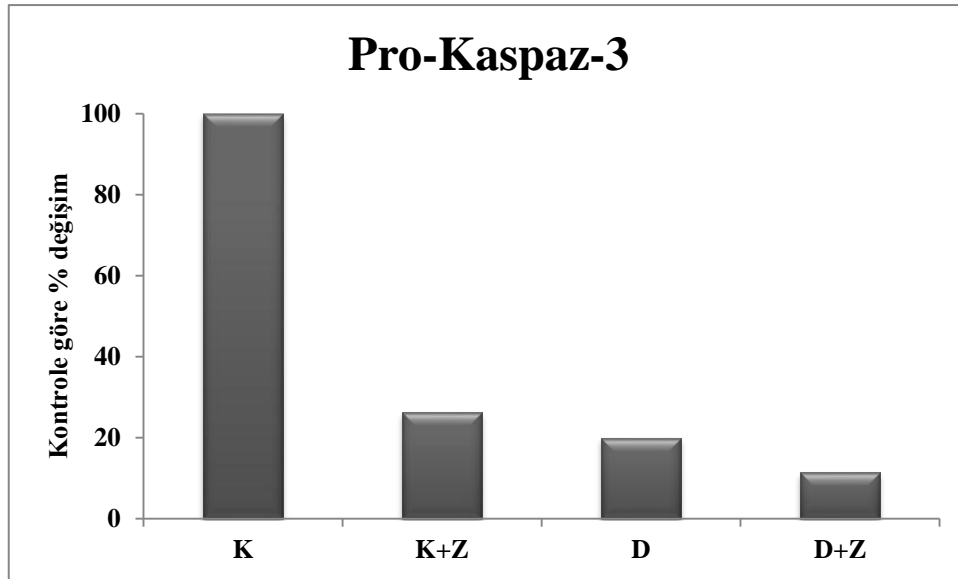
4.2.5. Pro-Kaspaz-3

Hem intrinsik hem de ekstrinsik apoptotik yolların buluşma noktası prokaspaz-3'ün aktifleştirilmesidir. Dolayısıyla çalışmada aktif kaspaz-3'ün öncüsü olan Pro-Kaspaz-3'ün protein ifadesi de ölçülmüştür. Çalışmada, sadece çinko verilen grupta (K) kontrol grubuna göre yaklaşık %74'lük bir azalma saptandı. Sadece diyabet yapılan grupta (D) ise kontrol grubuna göre %81'lik bir azalma saptandı. Diyabet oluşturulduktan sonra 24 saat çinko desteği yapılan β -hücrelerde (D+Z) ise sadece diyabet yapılan gruba göre 42'lik bir azalma; kontrol grubuna göre %89'luk azalma saptandı.

Şekil 20: Pro-Kaspaz-3'ün protein ölçümü



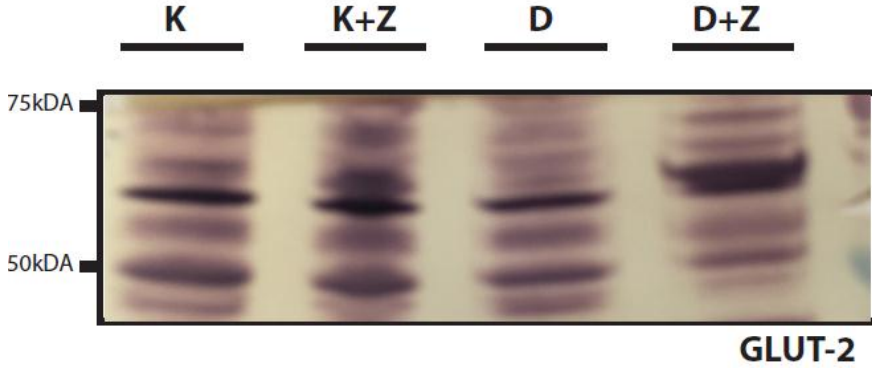
Şekil 21: Pro-Kaspaz-3'ün protein analizi



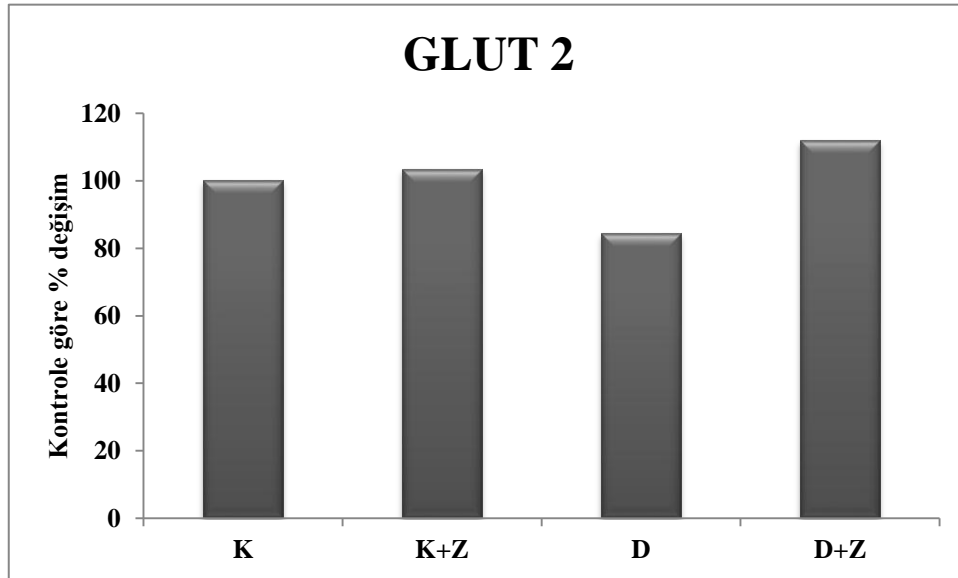
4.2.6. GLUT-2

Pankreatik β -hücrelere glukoz girişi insüliniden bağımsız taşıyım olan GLUT-2 aracılığıyla olmaktadır. Dolayısıyla bu çalışmada GLUT-2 proteinin ifadesi de ölçülmüştür. Çalışmada, sadece çinko verilen grupta (K) kontrol grubuna göre yaklaşık %3'lük bir artış saptandı. Sadece diyabet yapılan grupta (D) ise kontrol grubuna göre %16'lık bir azalma saptandı. Diyabet oluşturulduktan sonra 24 saat çinko desteği yapılan β -hücrelerde (D+Z) ise diyabet grubuna göre %33; kontrol grubuna göre %12'lik bir artış saptandı.

şekil 22: GLUT-2'in protein ölçümü



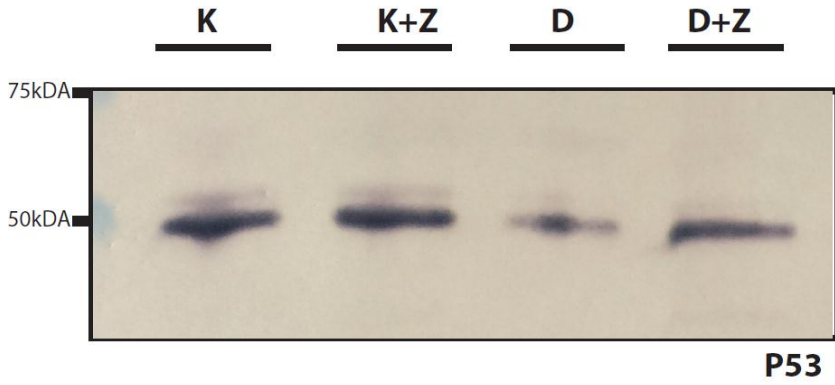
şekil 23: GLUT-2'in protein analizi



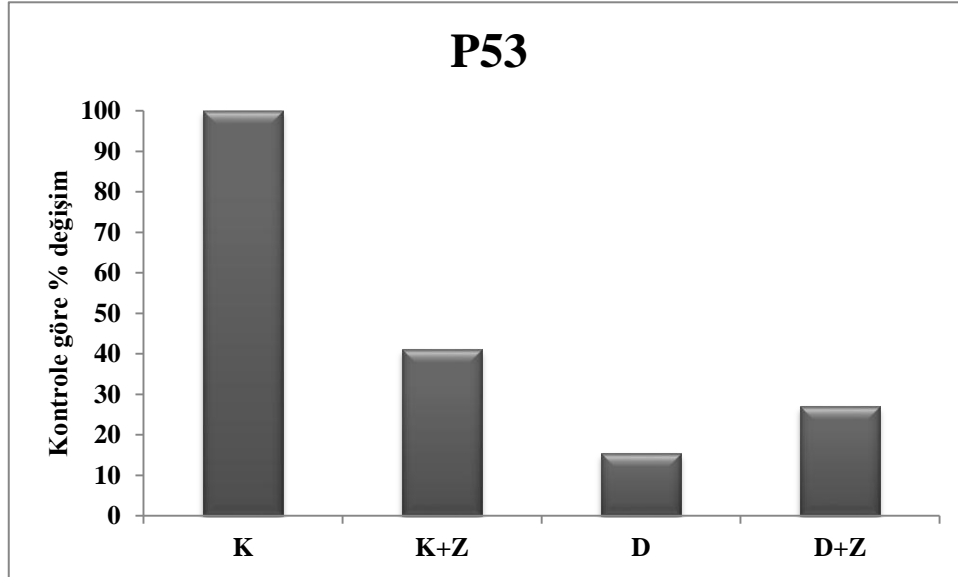
4.2.7. P53

P53 proteini yine hücrenin sağkalımında önemli olan proteinlerden bir tanesidir. Çalışmada, sadece çinko verilen grupta (K) kontrol grubuna göre yaklaşık %59'luk bir azalma saptandı. Sadece diyabet yapılan grupta (D) ise kontrol grubuna göre %85'lik bir azalma saptandı. Diyabet oluşturulduktan sonra 24 saat çinko desteği yapılan β -hücrelerde (D+Z) ise sadece diyabet yapılan gruba göre 73'lük bir artış; kontrol grubuna göre %74'lük azalma saptandı.

Şekil 24: P53'ün protein ölçümü



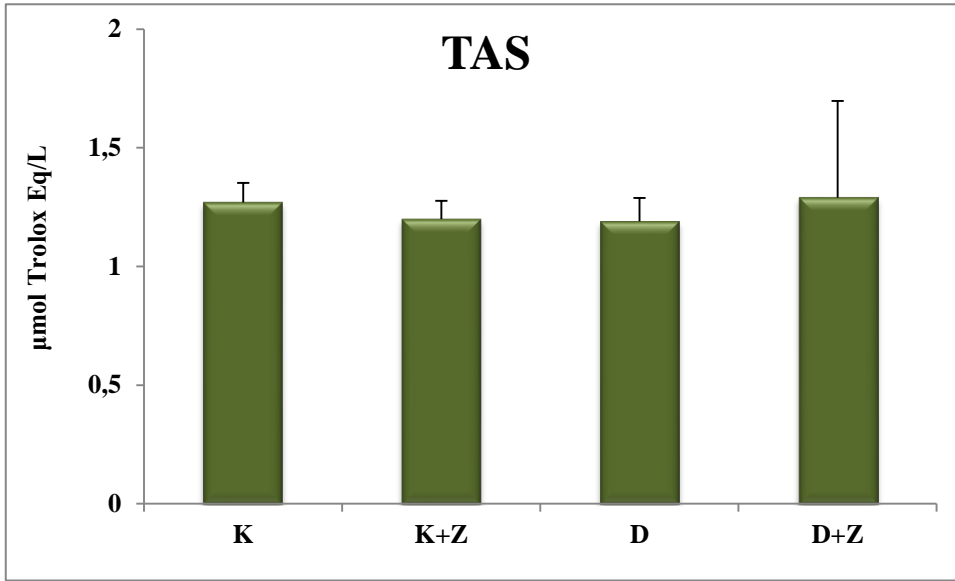
Şekil 25: P53'ün protein analizi



4.3. Total Antioksidan Seviye

Çinkonun SOD gibi antioksidan enzim yapısına katılmasından dolayı çalışmada antioksidan türüne bakılmaksızın total antioksidan ölçümü yapıldı. Genel anlamda gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Fakat D+Z grubunda anlamlı olmamakla birlikte TAS değerinde artış eğilimi gözlemlendi.

Şekil 26: Grupların total antioksidan seviyeleri

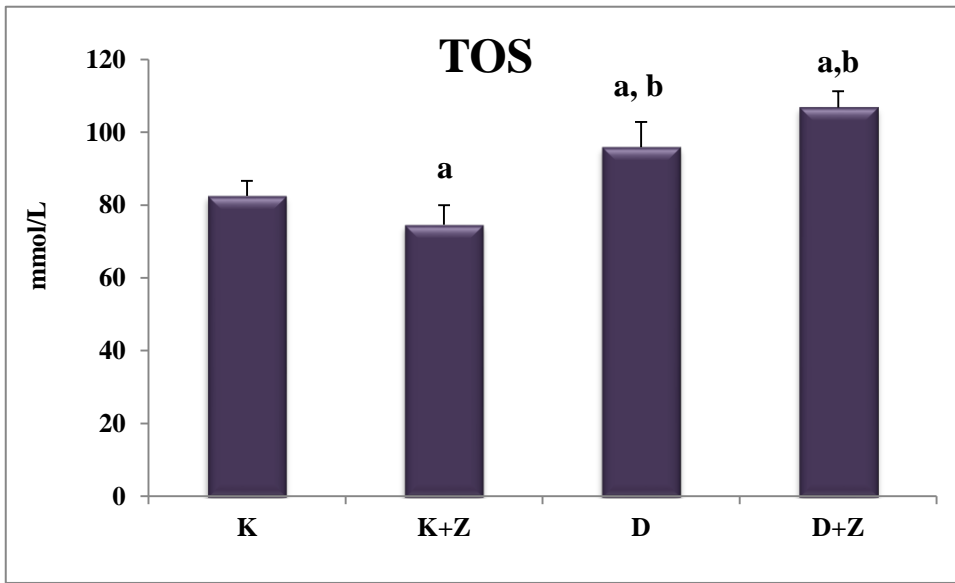


TAS: Total antioksidan seviye, K: Kontrol grubu; K+Z: Sadece 24 saat çinko desteği yapılan grup; D: STZ ile diyabet oluşturulan grup; D+Z: Diyabet oluşturulduktan sonra 24 saat çinko desteği yapılan grup. Tüm veriler ort + SD olarak gösterilmiştir.

4.4. Total Oksidan Seviye

Grupların total oksidan durumları da ölçüldü. Sadece çinko desteği yapılan grubun (K+Z) kontrol gruba göre TOS değeri istatistiksel anlamda azaldı ($p<0,05$). Diyabet grubunun TOS değeri hem kontrol hem de çinko desteği yapılan gruplara göre istatistiksel anlamda yüksektir ($p<0,05$). Diyabet oluşturulduktan sonra 24 saat çinko desteği yapılan grubun TOS değeri de yine kontrol ve sadece çinko gruplarına göre istatistiksel anlamda yüksekti ($p<0,05$).

Şekil 27: Grupların total oksidan seviyeleri

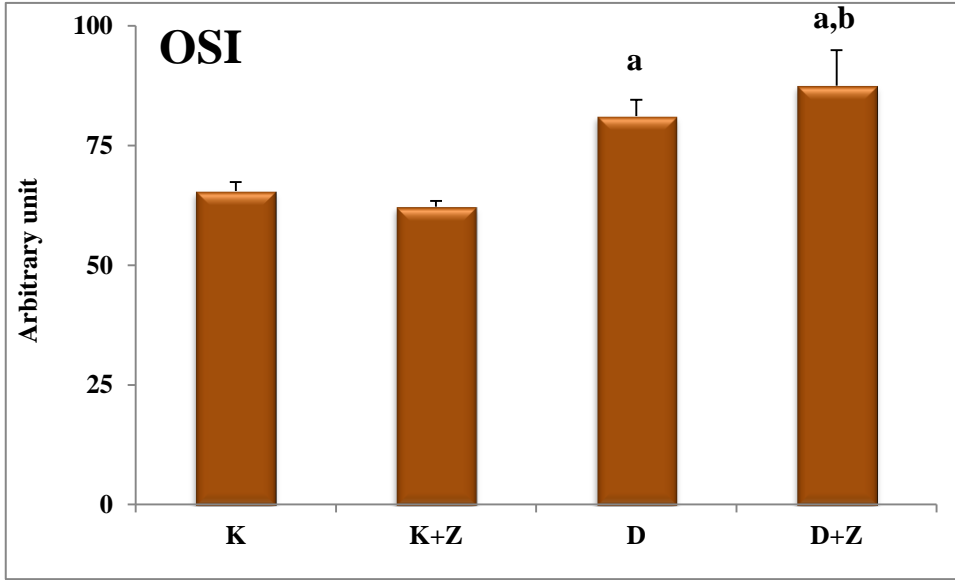


TOS: Total oksidan seviye, K: Kontrol grubu; K+Z: Sadece 24 saat çinko desteği yapılan grup; D: STZ ile diyabet oluşturulan grup; D+Z: Diyabet oluşturulduktan sonra 24 saat çinko desteği yapılan grup. a: K' e göre $p<0,05$; b: K+Z' e göre $p<0,05$. Tüm veriler ort+ SD olarak gösterilmiştir.

4.5. Oksidatif Stres İndeksi

TOS' un TAS' a oranı OSI olarak kullanılmaktadır. K+Z grubunun OSI değeri K grubuna göre azalma eğiliminde olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı değildir. D grubunun OSI değeri TOS değerinin artışına bağlı olarak K grubuna göre istatistiksel anlamda yüksekti ($p<0,05$). D+Z grubunun OSI değeri TOS değerinin artması ile hem K hem de K+Z grubuna göre istatistiksel olarak yüksekti. Bu sonuçlara göre, 100 μM konsantrasyonda ki 24 saatlik çinko desteği diyabetin neden olduğu oksidatif stresi azaltmada yetersiz olduğu sonucuna varılmaktadır.

Şekil 28: Grupların oksidatif stres indeksleri

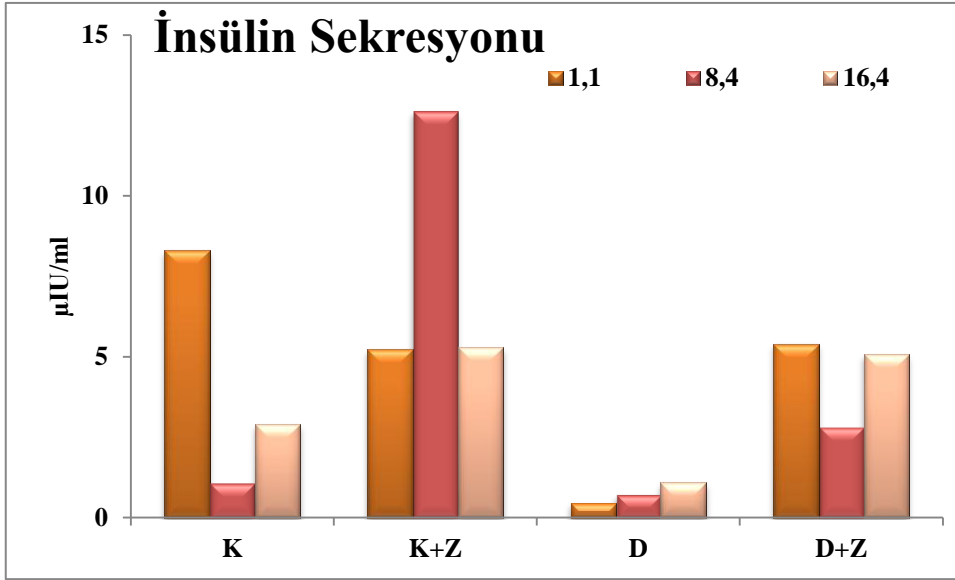


OSI: oksidatif stres indeksi, K: Kontrol grubu; K+Z: Sadece 24 saat çinko desteği yapılan grup; D: STZ ile diyabet oluşturulan grup; D+Z: Diyabet oluşturulduktan sonra 24 saat çinko desteği yapılan grup. a: K' e göre $p<0,05$; b: K+Z' e göre $p<0,05$. Tüm veriler ort+ SD olarak gösterilmiştir.

4.6. Pankreatik β -hücrelerdeki insülin Salgısı ve İçeriği

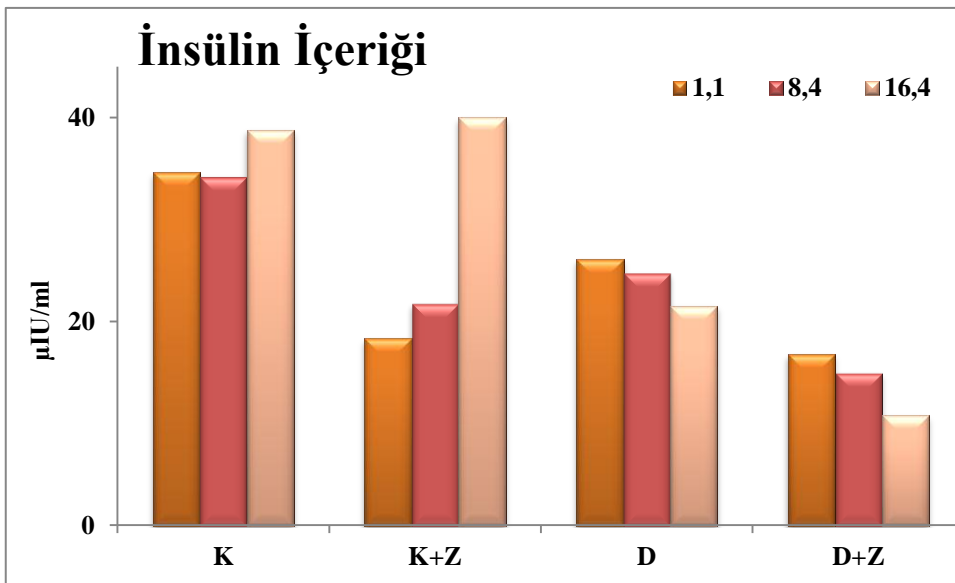
İnsülin salınımı açlık, normal ve hiperglisemi koşullarında ölçülmüştür. Ölçüm çift tekrarlı yapıldı. Açlık kan şekeri koşullunda (1,1 mM glukoz) K grubunda 8,31; D grubunda 0,46; K+Z grubunda 5,22 ve D+Z ise 5,4 μ IU/ml değerindedir. Normal kan şekeri koşulunda (8,4 mM glukoz) ise K 1,09; D grubu 0,74; K+Z grubu 12,64 ve D+Z grubunda ise 2,84 μ IU/ml değerindedir. Son olarak hiperglisemik koşulda (16,4 mM glukoz) ise K grubu 2,9; D grubu 1,09; K+Z grubu 5,3 ve D+Z ise 5,08 μ IU/ml değerindedir.

Şekil 29: Deney gruplarının insülin sekresyonu analizi



Ayrıca çalışmada pankreatik β -hücrelerdeki insülin içerikleri de ölçülmüştür. Yine açlık, normal ve hiperglisemi koşullarında ölçüm yapılmıştır. 1,1 mM yani açlık kan şekeri koşulunda K grubunda 34,6; D grubunda 26,12; K+Z grubunda 18,33 ve D+Z grubunda 16,75 μ IU/ml değerindedir. Normal kan şekeri koşulu olan 8,4 mM'da K grubu 34,17; D grubu 24,76; K+Z grubu 21,79 ve D+Z grubunda 14,99 μ IU/ml değerindedir. Hiperglisemi koşulu olan 16,4 mM'da K grubunda 38,8; D grubunda 21,52; K+Z grubunda 40,03; D+Z grubunda 10,74 μ IU/ml değerinde insülin içeriğe sahiptir.

Şekil 30: Deney gruplarının insülin içeriğinin analizi



4.4. İnsülin ve F-aktinin İmmunofloresan İşaretleme Yöntemiyle Hücrede Dağılımlarının Analizi

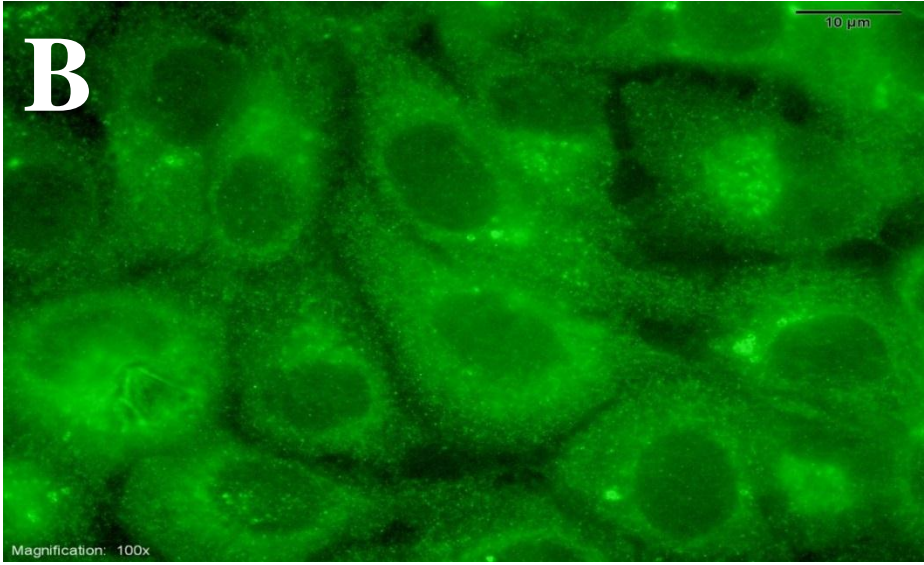
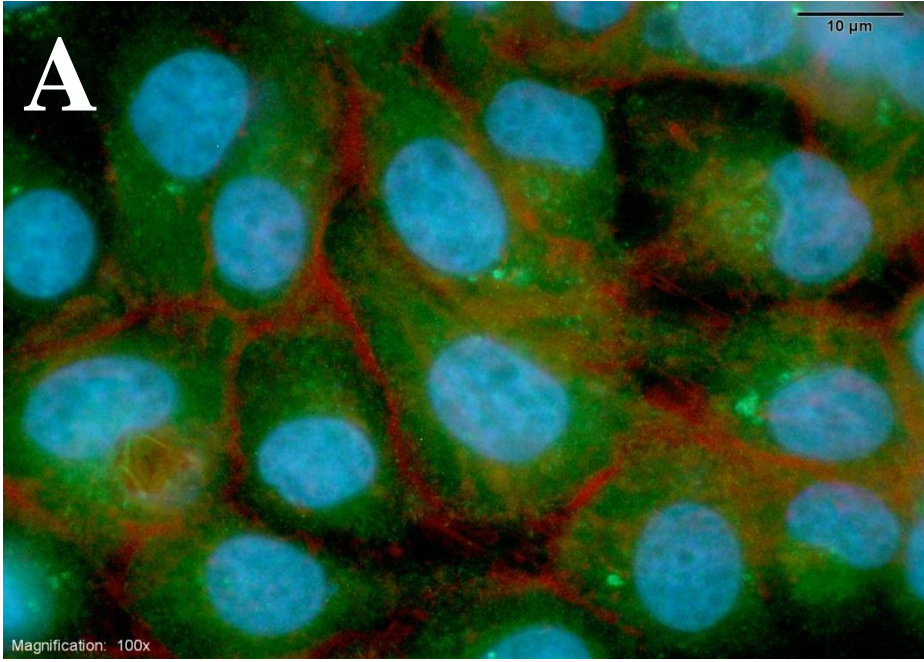
Şekil 31 A ve B’de kontrol grubundan elde edilen işaretlemelede, F-aktin ve insülin veziküllerinin yakın komşulukları dikkat çekicidir. F-aktinler özellikle hücre sonlarında, hücrenin şeklini korumaya yönelik yerleşime sahip iken, insülin çekirdeğin etrafında daha yoğun yerleşime sahip olduğu anlaşılmaktadır.

Şekil 32 A ve B’de sadece çinko desteği yapılan hücrelerdeki işaretlemede, kontrol grubu verilerine yakın bir sonuç olduğu ve insülinin işaretlenmesinin arttığı anlaşılmaktadır.

Şekil 33 A ve B’de diyabet grubunda ise hücre şeklinin değiştiği, aktin iskeletinin bozulduğu ve bariz bir şekilde insülin işaretlenmesinin azaldığı görülmektedir.

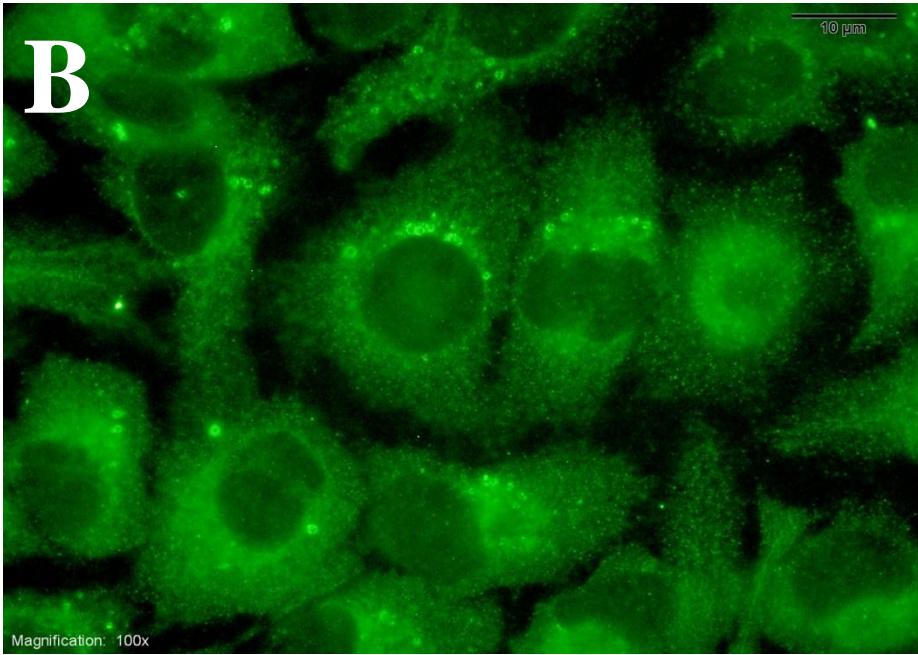
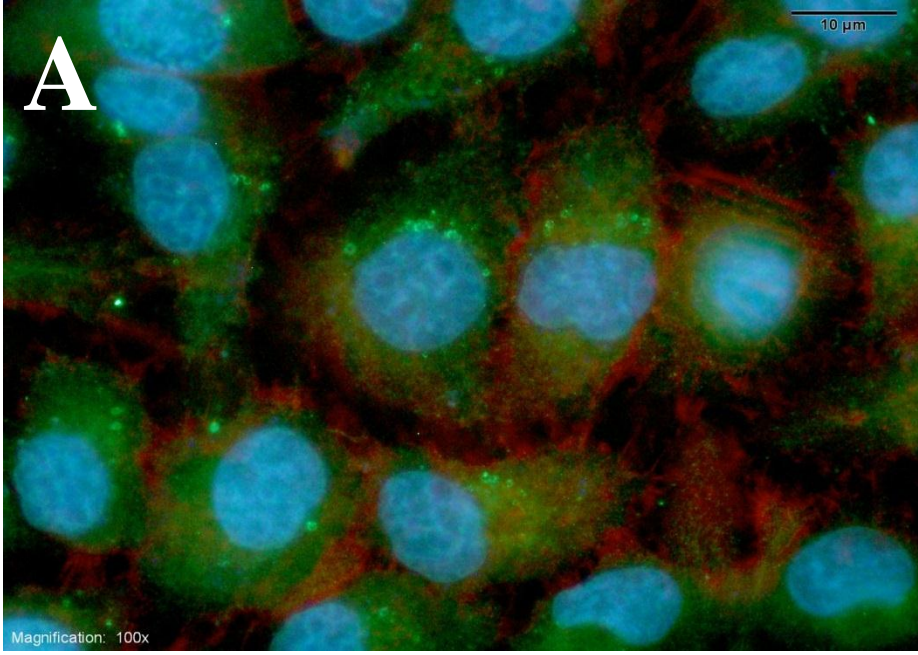
Şekil 34 A ve B’de diyabet oluşturulduktan sonra yirmi dört saat çinko desteği yapılan hücrelerde ise, hücre morfolojilerinin düzeldiği, F-aktin yerleşimlerinin ve insülinin salınımının diyabete göre daha iyi düzeyde olduğu gözlenmektedir.

Şekil 31: Kontrol gruplarının (K) immünofloresan işaretlenmiş görüntüsü



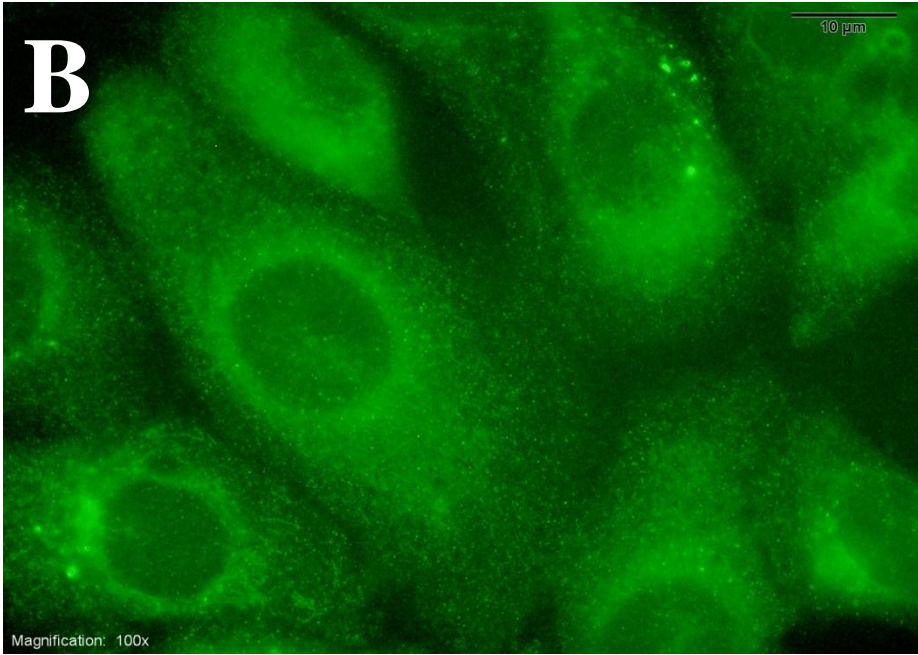
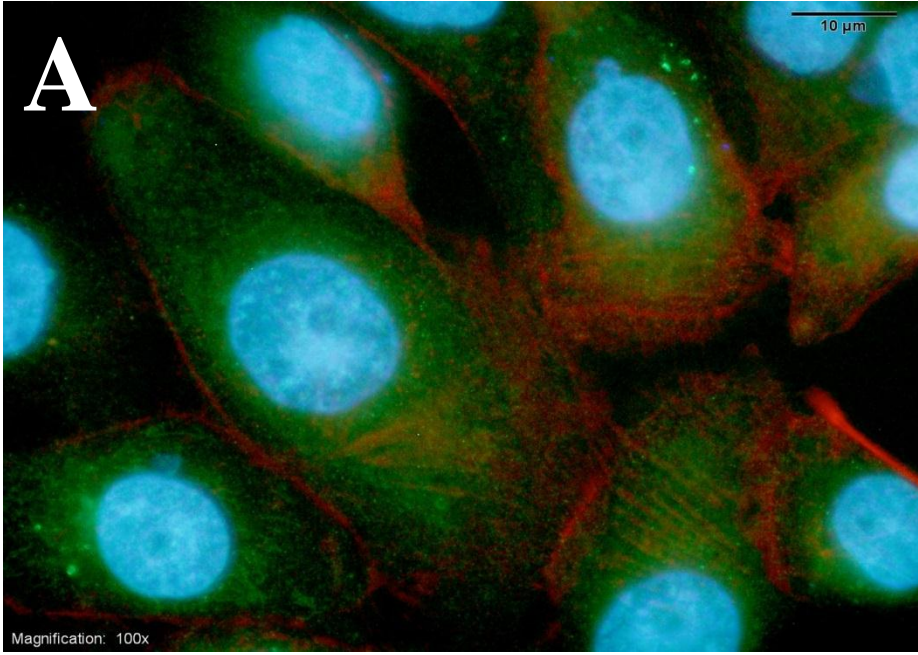
Kontrol grubuna ait pankreatik insan B hücrelerinde insülin salınımı ve F-Aktin iskeletinin immünofloresan işaretlenmeleri (x100). Kırmızı renk: 595 nm dalga boyunda boyanan F-aktin, Yeşil renk: 495 nm boyunda insülin salınımını, Mavi renk: Çekirdeği göstermektedir. A: F-aktin ve insülin salınımının birlikte olduğu bölgeler (turuncu renk), B: Sadece insülin salınımı göstermektedir.

Şekil 32: Kontrol gruplarından çinko takviyesi yapılmış hücrelerin (K+Z) immüno Floresan işaretlenmiş görüntüsü



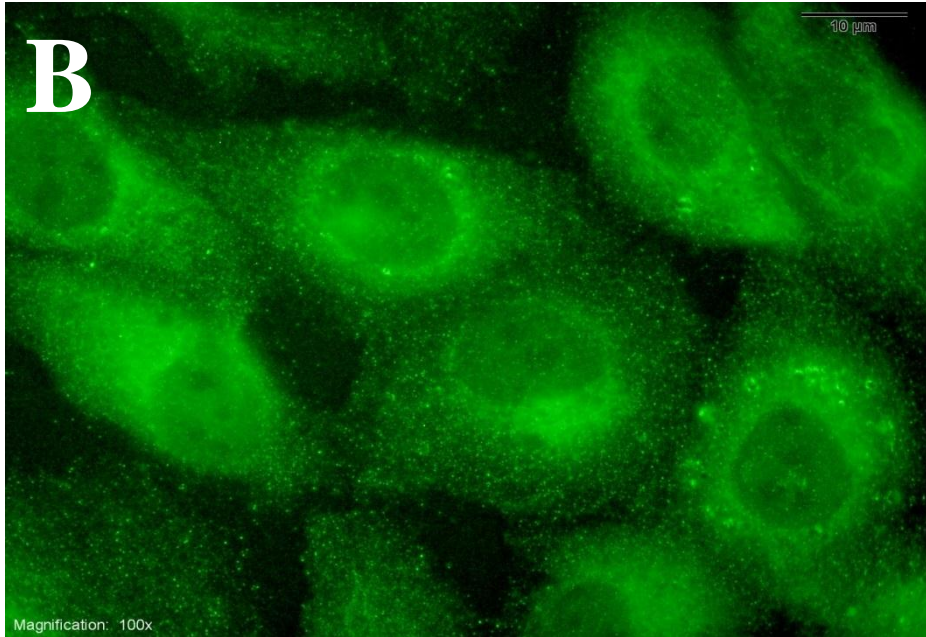
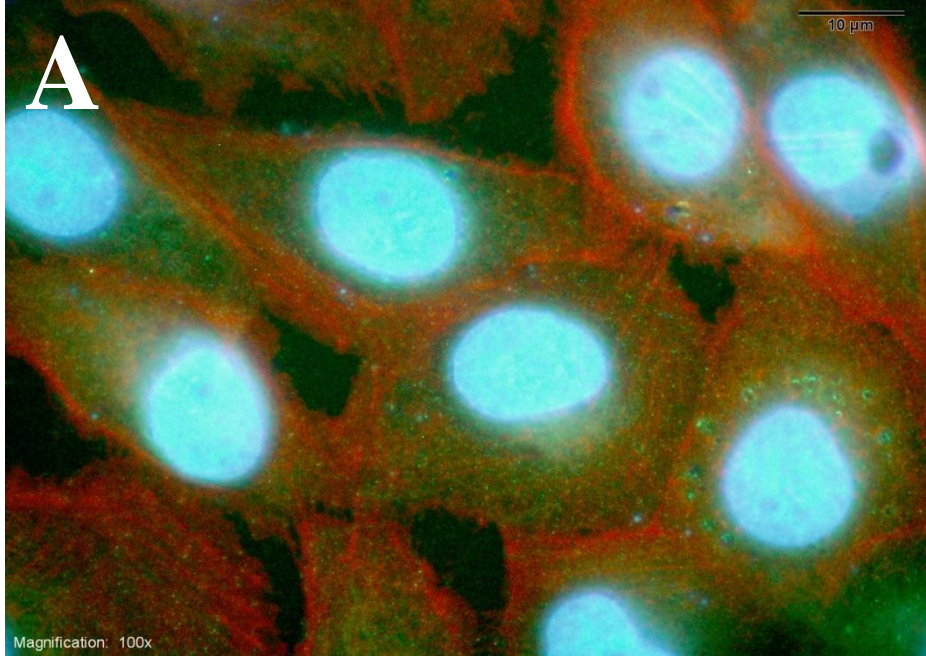
Çinko grubuna ait pankreatik insan B hücrelerinde insülin salınımı ve F-Aktin iskeletinin immüno Floresan işaretlenmeleri (x100). Kırmızı renk: 595 nm dalga boyunda boyanan F-aktin, Yeşil renk: 495 nm boyunda insülin salınımını, Mavi renk: Çekirdeği göstermektedir. A: F-aktin ve insülin salınımının birlikte olduğu bölgeler (turuncu renk), B: Sadece insülin salınımı göstermektedir.

Şekil 33: Diyabetli gruplarının (D) immünofloresan işaretlenmiş görüntüsü



Diyabet grubuna ait pankreatik insan B hücrelerinde insülin salınımı ve F-Aktin iskeletinin immünofloresan işaretlenmeleri (x100). Kırmızı renk: 595 nm dalga boyunda boyanan F-aktin, Yeşil renk: 495 nm boyunda insülin salınımını, Mavi renk: Çekirdeği göstermektedir. A: F-aktin ve insülin salınımının birlikte olduğu bölgeler (turuncu renk), B: Sadece insülin salınımı göstermektedir.

Şekil 34: Diyabet gruplarından çinko takviyesi yapılmış hücrelerin (D+Z) immüno Floresan işaretlenmiş görüntüsü



Diyabet ile çinko grubuna ait pankreatik insan B hücrelerinde insülin salınımı (A) ve F-Aktin iskeletinin (B) immüno Floresan işaretlenmeleri (x100). Kırmızı renk: 595 nm dalga boyunda boyanan F-aktin, Yeşil renk: 495 nm boyunda insülin salınımını, Mavi renk: Çekirdeği göstermektedir. A: F-aktin ve insülin salınımının birlikte olduğu bölgeler (turuncu renk), B: Sadece insülin salınımı göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda elde ettiğimiz verilere göre diyabet, β -hücrelerinde mitokondrial geçirgenliği arttırarak sitokrom-c'nin mitokondriden sitoplazmaya geçmesine neden olmakta ve kaspaz-3' ün aktive edilerek apoptozisi uyarmaktadır; diyabet sonrası çinko desteği ise mitokondri geçirgenliğini azaltarak sitokrom-c' nin sitoplazmaya geçmesini engellemektedir, bu da apoptozis uyarıcı faktörün azalmasını sağlayarak apoptozisi önlemektedir.

β -hücrelerinin yıkımında önemli olan bazı faktörler vardır. İlk olarak aktive sitotoksik T lenfositleri pankreas adacıklarına göç eder ve insülin üreten hücelere saldırır. Bu yanıt sırasında IFN-g, TNF-a ve IL-1 gibi çeşitli sitokinler lokal olarak salınırlar. İnflamatuar hücelerden salgılanan bu sitokinler insulün sekresyonunu inhibe eden reaktif oksijen türevleri (ROS) ve reaktif nitrojen türevleri (RNS) gibi zararlı faktörlerin oluşumuna yol açarlar ki ROS ve RNS tip 1 diyabetin patogeneğinde önemli rol oynamaktadır. Serbest oksijen ve nitrojen radikalleri mitokondrial ve sitozolik proteinleri inaktive edip oksidatif fosforilasyonu azaltarak glikolizi azaltır ve nihayetinde β -hücelerde ATP düzeyi azalarak insülin salgısı engellenmiş olur. Aynı zamanda ortaya çıkan mitokondriyal hasar beta hücelerinin ölümüne yol açarak insulün bağımlı tip 1 diyabete neden olur (75). ROS, düşük seviyelerde ikinci haberci olarak hücre içi sinyal yollarının aktivasyonu için gereklidir. Aşırı miktarda ROS sadece β -hücelerine zarar vermekle kalmaz aynı zamanda inflamasyon süreci ve inflamasyonun artışında da aktif olarak katılır. Artmış ROS, mitokondride Ca^{+2} kanalların açılmasına izin vererek sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonunda artış meydana gelir. Bu durum ise antioksidan sistemi deprese eder (76). Diyabette artmış serbest radikaller; lipidler, proteinler ve nükleik asitlerle etkileşerek membran bütünlüğünün kaybına, proteinlerde yapısal veya fonksiyonel değişikliklere yol açmaktadır. Organizmada bu zararlı radikallerin etkisiyle başa çıkabilmek için; mitokondrial süperoksit dismutaz (SOD), sitoplazmik Cu/ZnSOD, katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), tiyoredoksin/tiyoredoksin reduktaz (Trx/TrxR) sistemi gibi çeşitli enzimatik antioksidan sistemlerine sahiptir (77). β -hüceleri %1 katalaz, %2 GPx1, %29 SOD aktivitesi içermektedir. Bu nedenle β -hüceleri daha düşük antioksidan düzeye sahip olup oksidatif strese daha yatkındır (78). Zn^{+2} , NADPH oksidazın inhibitörü ve Cu,Zn-SOD' un integral metalidir (79).

Diyabette serbest radikal oluşumu artmakta ve radikal bağlayıcı sistemlerde azalma meydana gelmektedir, bu da diyabetiklerin antioksidanlara daha çok ihtiyaç göstermektedir. Özellikle pankreatik β -hücrelerin antioksidan savunmasının az olduğu hatırlandığında çinko desteği gibi antioksidan savunmaya katkı sağlayabilecek moleküllerin önemi diyabetik komplikasyonların azaltılmasındaki önemini arttırmaktadır. Çalışmamızda da total oksidan ve antioksidan durum tayini yapılmış, bu iki veri kullanılarak oksidatif stres hesaplanmıştır. Daha önceki çalışmaların bulgularına benzer olarak diyabet β -hücrelerinde oksidatif stresi arttırmıştır. Bu artış oksidan maddelerdeki artıştan kaynaklanmaktadır. Çinko desteği antioksidan savunmada artış yaptığı fakat istatistiksel anlamda değildi. Bu farklılığın nedeninin çalışmamızda total antioksidan miktarın tayiniyle ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz. Çünkü Zn^{+2} , Cu,Zn-SOD'un yapısında katıldığı için SOD'un miktarında yaptığı/yapabileceği katkı total antioksidan savunmada ölçümünde göreceli olarak yetersiz kalmış olabilir. Bu gerekçeyle Cu,Zn-SOD miktarının ölçümünü yapılması daha uygun olacağı kanısındayız. Ayrıca ROS'un, proteinler, DNA ve diğer hayati moleküllerle hücre için zararlı reaksiyona girebileceği ve bu da hücrenin sağ kalımını tehdit edebileceği unutulmamalıdır. Sonuç olarak hücre içi ROS kaspaz aktivasyonu ve nükleer parçalanma gibi apoptotik olayların daha fazla ortaya çıkması için çok önemli sinyal molekülleridir (80). Bu bilgiler diyabette oksidatif stresin önlenmesinin önemini vurgulamaktadır. Karaciğer ve pankreas yağ ve karbonhidrat metabolizmasında önemli olan iki organdır ve MT bu organlarda oksidatif strese bağlı olarak arttığı belirtilmektedir. Pankreasta çinko ve MT konsantrasyonlarının oldukça yüksek olduğu bilinmektedir. Çinko iyonları varlığında, insülin ile hegzomerik yapı oluşturur. MT'nin STZ ile diyabet oluşturulmuş hayvanlarda ve hücrelerde oksidatif strese karşı koruyucu olduğu rapor edilmiştir. Dahası, MT'nin özellikle pankreasta oksidatif stresi önleyerek DNA hasarını azalttığı belirtilmektedir (81). Zn^{+2} 'nin pankreas dokusu üzerindeki antiapoptotik mekanizması hakkında çok fazla bilgiye sahip değiliz. Bir çalışmada çinko takviyesinin MT'nin miktarında artış yapabileceği ve MT'lerin antioksidan özelliklerinin glutatyona göre elli kat daha fazla olduğu iddia edilmektedir. Çinkonun antiapoptotik etkisinin Kas-3, -6 ve -9' u inhibe etmesinden kaynaklandığı rapor edilmiştir (32).

Bcl-2 ailesi, dış mitokondriyal membran permeabilitesini ve sitokrom-c'nin salınmasını kontrol ederek apoptozisi düzenler. Anti apoptotik Bcl-2 proteinleri ortak hücre ölüm yolları içinde apoptozisin kritik düzenleyicisidir. İnsan premonosit hücre kültüründe yapılan bir çalışmada, hidrojen peroksit ile başlatılan apoptozis'in 1 mM Zn^{+2} takviyesinin Bcl-2/Bax oranını arttırdığı ve sonuçta aktif kaspaz-3'ün inhibisyonuna ve apoptotik hücre sayısının azalmasına yol açtığı bildirilmektedir (82). Kaspaz-3 apoptozisde önemli bir enzimdir. İnsan promiyelositik lösemi hücre hattı olan HL-60 ile yapılan bir çalışmada, 100 μ M ve üzerindeki Zn^{+2} takviyesinin kaspaz-3 oluşumunu inhibe ettiğini bildirilmektedir (83). Zn^{+2} kaspaz-3 ve -8' i güçlü bir şekilde aktive ederken, kaspaz-9'u zayıf bir şekilde aktive eder (82). Hiperglisemik koşullar altında pankreatik β -hücrelerde metabolik strese, glikoz-bağımlı insülin sekresyonunun bozulmasına ve hücre kaybına maruz kaldığına dair deliller giderek artmaktadır. Pankreatik β -hücre kayıplarında endoplazmik retikulum (ER) ve oksidatif stresin önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Bu iki stres birlikte proapoptotik kaspazlardan 2, 3, 6' ın aktivasyonu, sitokrom-c' nin salınması ve mitokondriyal membran potansiyelinin azalmasına neden olan mitokondriyal fonksiyon bozukluğunu tetikler. Fakat hiperglisemik koşullarda kaspaz aktivasyonu ve bu kaspazlarla ilişkili degradasyon substrat proteinleri hakkında bilgilerimiz hala sınırlı düzeydedir (84). İnsan ve sıçan β -hücre hatları kullanılarak yapılan bir çalışmada, hiperglisemik koşul altında endoplazmik retikulum (ER) stresinin kaspaz-3 aktivasyonuna neden olduğu rapor edilmiştir (85).

Çalışmamızda elde ettiğimiz verilere göre diyabet, β -hücrelerindeki GLUT-2 protein seviyesini azaltarak insülin salınımını azalmasına neden olmaktadır; çinko desteği diyabetin neden olduğu GLUT-2 protein ifadesini onararak insülin salınımını da düzeltmektedir. Diyabet aynı zamanda β -hücrelerde hücrenin sağ kalım yolları ile yakından ilişkili olan P53 ve AMPK protein ifadelerini azaltır; diyabetin ardından çinko desteği ise P53 ve AMPK proteinlerinin ifadelerini artırır. Bu bulgulara dayanılarak; diyabetin β -hücrelerinin apoptozis ile ölümlerini artırırken, insülin sekresyonunu azaltmakta, fakat çinko desteğinin hücrenin sağ kalımını sağlayacak şekilde apoptozisini azaltmakta ve insülin sekresyonunu arttırmaktadır.

Hücre içi AMP/ATP seviyesi yükseldiğinde, AMPK yolağı ATP oluşumunu arttırarak tekrardan hücre homeostazisinin restore edilmesini sağlar. AMPK iki kompleks tarafından aktive edilir. Karaciğer kinaz B1 (LKB1) normal dinlenme koşullarında, CaMKKB egzersiz ve stres koşullarında AMPK' nin aktivasyonundan sorumludur. Kalsiyum kalmodulin kinaz-II, AMPK' i hücre içi kalsiyum konsantrasyonundaki değişikliklere yanıt olarak aktive eder (86). AMPK, proapoptotik (p53 proteini, BAX, p38 MAPK) ya da anti apoptotik yollar ile ilişkilidir (87). Çinko; hücre sağ kalımında önemli bir faktördür. Örneğin Cu-Zn-SOD gibi serbest radikal yakalayıcılarının yapısında Zn^{+2} bulunur. Zn^{+2} ayrıca protein kinaz-C, kalsiyum kalmodulin kinaz-II, TrkB, Ras ve MAP kinaz, NF-kB gibi birçok protein kinaz ile ilişkili olduğu vurgulanmaktadır. Zn^{+2} proapoptotik rol oynayan NFkB' nin aktivasyonunu inhibe ettiği rapor edilmiştir (88). Hipergliseminin endotel hücrelerde hasar yaptığı ve apoptozisi başlattığı da bildirilmiştir. Yapılan birçok çalışmada, endotel hücrelerinde yüksek glikozun NF-kB sinyal yolağı apoptozisi uyardığı ve oksidatif strese neden olduğu sonucuna varılmıştır. Çinko parmak proteini olan A20'nin endotel hücrelerinde koruyucu olduğu belirtilmektedir. A20'nin koruyucu bu etkilerinin NF-KB sinyal yolağını bloke etmesi aracılığıyla olduğu savunulmaktadır. NF-KB yolağının hiperglisemik koşullarda endotel hücrelerindeki hasarda ve apoptozis de önemli rol oynadığı belirtilmektedir. Sonuçta, A20'nin apoptotik hücre sayısını azalttığı da belirtilmektedir (89). Yakın bir zamanda yapılan bir çalışmada ise, Zn^{+2} 'nun hiperglisemide apoptozisi inhibe ettiği ve bu inhibisyonda indirekt antioksidan etki ve kaspaz-3 ve -8'in inhibisyonu ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (90).

Tümör baskılayıcı gen veya p53, büyüyen tümörleri yok ederek ve birçok hücre faaliyetlerini düzenleyerek hücrede önemli koruyucu işlevleri vardır. Ne zaman ki p53 geni değişime uğrarsa, hücreler kontrolsüz büyür ve kanserleşmeye doğru ilerler. Normal fizyolojik koşullar altında düşük miktardaki p53 ROS oluşumunu baskılamak; yüksek miktardaki p53, hücrel strese bağlı olarak ROS oluşumunu arttırır. ROS apoptozis başlatıcısıdır ve p53' ün muhtemelen apoptozisi ROS aracılığıyla başlattığı ve bu süreçte PUMA ve Bax proteinlerinin ifadelerini arttırdığı düşünülmektedir (91). Kaspaz-3' ün aktivasyonu, insanlarda kalp yetmezliğinde meydana gelen apoptozis de gösterilmiştir (92). Ayrıca bu apoptozis'in p53 ile ilişkili olabileceği de belirtilmektedir (93) (94). Zn^{+2} , tirozin fosforilasyonu ve MAPK (mitojen aktive edici protein kinaz)'yı aktive ederek veya fosfotriozin fosfotazı inhibe ederek insülin etkilerini taklit eder (33).

Bir çalışmada artmış oksidatif stresin p38 MAPK ve p53 proteinlerinin diyabetik testiste arttığı ve bu artışın Zn^{+2} eksikliği durumunda daha da kötüleştiği belirtilmektedir. Ayrıca ER stresinde hücre ölümlerinde artış yaptığı, fakat çinko eksikliğinin bu artışlara etkisiz kaldığı da rapor edilmektedir. Sonuç olarak diyabetin veya kronik çinko eksikliğinin mitokondri ile ilişkili apoptotik hücre ölümlerini p38 MAPK ve p53 sinyalleri ile uyardığı vurgulanmaktadır (95). Zn^{+2} , p53 proteinin yapısını değiştirir ve bu proteinin DNA' a bağlanmasını azaltır. Dolayısıyla intraselüler Zn^{+2} p53'ün aktivite ve stabilitesini düzenler. Tümör supresyon proteini olan p53, hücresel stres yanıtında, özellikle apoptotik yolun (Bcl-2 ve Bax) kontrolünde merkezi rol oynar (82). P53 ve Bcl-2 protein ailesi içsel yolda önemli rol oynarken, kaspazlar (KAS) her iki apoptotik sinyal yolakta rol alır (96).

İnsülin, glukoz homeostazının sürdürülmesi, dokuların gelişimi ve büyüme için gerekli olan türe özgü hormondur. İnsülin pankreasın langerhans adacıklarındaki β -hücreleri tarafından sentezlenir. Kan glukozu ya da aminoasit konsantrasyonu arttığında salgılanır (77). Yapılan bir çalışmada yüksek doz glikoza maruz bırakılan (HG; 20 mM) β -hücrelere düşük doza maruz (LG; 2,5 mM) bırakılan β -hücrelere göre insülin salgısı anlamlı düzeyde artmıştır. Bu hücreleri 24 saat yüksek doz glikoza maruz bırakılması durumunda LG insülin salgısı artma gösterirken, HG grupta insülin salgısının azaldığı bildirilmiştir (84). Bir çalışmada diyabetli sıçanlara beta hücre transferi yapıldıktan sonra, yüksek çinko diyeti uygulanmasının kan glukoz seviyesinde düzelmeye yaptığı vurgulanmaktadır. Fakat çinkonun bu olumlu etkisinin mekanizması hala gizemini korumaktadır (32). Çinko taşıyıcıları ile yapılmış çalışmalarda insülin sekresyonunda çinkonun önemini göstermektedir. Bunlardan biri olan ZnT3 geni susturulmuş sıçan pankreatik β -hücre hattı ile yapılan bir çalışmada, insülin sekresyonunun azaldığı rapor edilmiştir. ZnT8 geninin susturulması (knock-down edilmesi), yüksek glikoz koşullu altında apoptosisi uyardığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada, ZnT8 geninin susturulmasıyla birlikte artmış insülin sekresyonu (yüksek glikoz etkisi) β hücre metabolizmasını bozabildiği ve sonuçta hücre ölümlerinin arttığı da gösterilmiştir (97). Çinko taşıyıcısı olan ZnT-8'in de pankreatik β -hücrelerinde çinko homeostazisi önemli olduğu belirtilmektedir (98). Diğer çinko taşıyıcı proteinlerinden biri de MT-1A'dır ve bu protein çinko ve redoks metabolizması arasında bağlantıda önemlidir. Çinko iyonları insülin sinyalini ve redoks olaylarını düzenler. Dolayısıyla çinko ve MT birlikte diyabet ve kalp hastalığı gibi diyabetik komplikasyonların gelişimine neden olan oksidatif strese karşı

hücrelerin korunmasını sağlar (98). Farelerde yapılan bir çalışmada, çinko desteğinin kalpte antioksidan etkiye sahip olan MT'in aktivasyonu ile diyabetik kardiyomiyopati oluşumunu önlediği rapor edilmiştir (99).

İnsülin ve çinko iyonlarının, glikoz alımı ve lipogeneze güçlü uyarıcı etkileri vardır. Çinko eksikliği olan hayvanların insüline daha az duyarlı oldukları bildirilmektedir. Serum olmayan besi yerinde kültüre edilmiş memeli hücrelerde, çinkonun insülinin etkilerini taklit edebildiği rapor edilmiştir. Çinkonun etkileri intraselülerdir çünkü çinko insülin reseptörünün fosforilasyon durumunu artırır. Dahası, insülin sinyal yolağındaki proteinlerin fosforilasyonunu da artırır. Çinkonun bu etkisini protein trozin fosfotaz-1B'nin inhibisyonu aracılığıyla yaptığı öne sürülmektedir. Trozin fosfotaz-1B insülin reseptörünün fosforilasyon durmunu kontrol eden ana fosfotazdır. Bu da çinkonun insülinomimetik etkilerinden sorumlu yolağıdır. Hem diyabetik hayvanlarda hem de insanlarda yapılan birçok çalışmada, çinko desteğinin antidiyabetojenik özellikleri rapor edilmiştir (98). Bu bilgiler diyabette çinko desteğinin daha az insülin ihtiyacı ile kan şekerini dengeleyebileceklerinin sinyalini vermektedir.

Bu bulgular çalışmamızdaki hem insülinin hücrelerdeki immünofloresan boyamaları ile hem de insülin sekresyon ve içeriği ölçümleri ile uyumludur. İmmünofloresan sonuçlarımız insülinin ve aktinin diyabetin etkisi ile azaldığını göstermektedir. Özellikle aktin iskeletinin insülin ekzositozunda önemli bir bileşendir. Çinko desteği hem insülin hem de aktin iskeletini destekleyerek insülin salgısının artırır. Bu bulgular netice diyabette çinko eksikliğinin önlenmesinin hastalığın etkilerini önlenmesi açısından önemini göstermektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçları maddeler halinde özetleyecek olursak;

1. Oksidatif stres diyabetin oluşmasında önemlidir.
2. Yirmi dört saatlik 100 µM çinko desteği oksidatif stresin azaltılmasında yetersiz kalmıştır. Çinkonun yüksek konsantrasyonda toksik olabileceği düşünüldüğünde en azından bu konsantrasyonda diyabetin etkilerine karşı kısmi olarak yararlı bir etki meydana getirdi.
3. Diyabetle birlikte sitokrom-c ve kaspaz-3 gibi protein ifadelerinin artması; p53, AMPK ve p38 MAPK' ların protein ifadelerinin azalması ile apoptozise bağlı beta hücre kayıplarına sebep olmaktadır.
4. Çinko desteği sitokrom-c, kaspaz-3, AMPK, p38 MAPK, p53' ün protein miktarlarının kontrole doğru yaklaşmasını sağlayarak apoptotik yolların baskılanmasına ve sağ kalan beta hücre sayılarının korunmasına neden olmaktadır.
5. Diyabet sonuç olarak; insülin sekresyonunun azalmasına ve bu da diyabetik komplikasyonların artmasına neden olmaktadır.
6. Çinko desteği başta apoptotik yolların baskılanması ile var olan hücre sayısının korunmasına neden olarak insülin salgılanmasına katkı sağladığı gibi özellikle insülin paketlenmesi ve salgılanmasındaki rolü aracılığıyla insülin sekresyonunu arttırmıştır.

Elde ettiğimiz bulgular özellikle çinkonun diyabetli hastalarda kan şekerini dengelemede beta hücrelerinden insülin salgılanmasını artışı ve alfa hücrelerinden glukagon salgısının azalması ile ikili etkili olabilecek doğal tıbbi bir aday olabileceğini desteklemektedir. Bu çalışma, Tip-1 diyabet hastalığına ucuz, kullanımı kolay alternatif bir tedavi yöntemi ile hem bilime hem de ülke ekonomisine katkı potansiyeline sahip olması açısından önemlidir. Özellikle diyabete bağlı apoptozis ile hücre ölümlerinin ve çinko'nun insülin salgılatıcı mekanizmalarının aydınlatılması, literatürde bu konudaki açığı kapatmaya yönelik bilgiler barındırması da çalışmanın önemini arttırmaktadır. Diyabetik deney hayvan ve insanlarda çinko desteğinin insülin salgılanmasına etkilerini araştıran çalışmaların yapılması bu konunun aydınlatılması için önerilmektedir.

KAYNAKÇA

1. Alphan ME. “Diabetes Mellitus ve Beslenme Tedavisi”, Alphan ME. Hastalıklarda Beslenme Tedavisi, 1. baskı, Hatipoğlu Yayınları, Ankara, 2013:415-507.
2. American Diabetes A. “Economic costs of diabetes in the U.S. in 2012” *Diabetes care*, 2013, 36(4):1033-46.
3. Gispen WH, Biessels GJ. “Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus” *Trends in neurosciences*, 2000, 23(11):542-9.
4. DCCT. “Effect of intensive diabetes treatment on the development and progression of long-term complications in adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus: Diabetes Control and Complications Trial. Diabetes Control and Complications Trial Research Group”, *The Journal of pediatrics*, 1994, 125(2):177-88.
5. 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 : the journal of the American Medical Association*, 1999, 281(21):2005-12.
6. Ahmed AM. “History of diabetes mellitus”, *Saudi medical journal*, 2002, 23(4):373-8.
7. American Diabetes A. “2. Classification and Diagnosis of Diabetes”, *Diabetes care*, 2015, 38(1):8-16.
8. Maraschin Jde F, Murussi N, Witter V, Silveiro SP. “Diabetes mellitus classification”, *Arquivos brasileiros de cardiologia*, 2010, 95(2):40-6.
9. Kawasaki E. “Type 1 diabetes and autoimmunity”, *Clinical pediatric endocrinology : case reports and clinical investigations : official journal of the Japanese Society for Pediatric Endocrinology*, 2014, 23(4):99-105.

10. Zhang Y, Ren C, Lu G, Mu Z, Cui W, Gao H, et al. "Anti-diabetic effect of mulberry leaf polysaccharide by inhibiting pancreatic islet cell apoptosis and ameliorating insulin secretory capacity in diabetic rats", *International immunopharmacology*, 2014, 22(1):248-57.
11. Jansen J, Karges W, Rink L. "Zinc and diabetes--clinical links and molecular mechanisms", *The Journal of nutritional biochemistry*, 2009, 20(6):399-417.
12. T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. "Türkiye Diyabet Programı 2015-2020", Ankara, 816, 2014. <http://beslenme.gov.tr/content/files/diyabet/turkiyedyabetprogrami.pdf> Erişim: 01 Haziran 2015.
13. Nyenwe EA, Jerkins TW, Umpierrez GE, Kitabchi AE. "Management of type 2 diabetes: evolving strategies for the treatment of patients with type 2 diabetes", *Metabolism: clinical and experimental*, 2011, 60(1):1-23.
14. American Diabetes A. "Diagnosis and classification of diabetes mellitus", *Diabetes care*, 2010, 33 (1):62-9.
15. International Diabetes F. "IDF Diyabet Atlası", 2013, http://www.idf.org/sites/default/files/EN_6E_Atlas_Full_0.pdf Erişim: 01 Haziran 2015.
16. Forbes JM, Cooper ME. "Mechanisms of diabetic complications", *Physiological reviews*, 2013, 93(1):137-88.
17. Cade WT. "Diabetes-related microvascular and macrovascular diseases in the physical therapy setting", *Physical therapy*, 2008, 88(11):1322-35.
18. Vashum KP, McEvoy M, Milton AH, Islam MR, Hancock S, Attia J. "Is serum zinc associated with pancreatic beta cell function and insulin sensitivity in pre-diabetic and normal individuals? Findings from the Hunter Community Study", *PloS one*, 2014, 9(1): 83944.

19. Satman I, Yilmaz T, Sengul A, Salman S, Salman F, Uygur S, et al. "Population-based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: results of the turkish diabetes epidemiology study (TURDEP) ", *Diabetes care*, 2002, 25(9):1551-6.
20. Türkiye Sağlıklı Beslenme ve Hareketli Hayat Programı T.C. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü 773, Ankara, 2011. http://beslenme.gov.tr/content/files/home/turkiye_obezite_sismanlik_ile_mucadele_ve_kontrolprogrami_2010_2014.pdf Erişim: 01 Haziran 2015.
21. Szablewski L. "Role of immune system in type 1 diabetes mellitus pathogenesis" *International immunopharmacology*, 2014, 22(1):182-91.
22. Bosco MD, Mohanasundaram DM, Drogemuller CJ, Lang CJ, Zalewski PD, Coates PT. "Zinc and zinc transporter regulation in pancreatic islets and the potential role of zinc in islet transplantation", *The review of diabetic studies : RDS*, 2010,7(4):263-74.
23. McCall KA, Huang C, Fierke CA. "Function and mechanism of zinc metalloenzymes", *The Journal of nutrition*, 2000, 130(5):1437S-46S.
24. Prasad AS. "Impact of the discovery of human zinc deficiency on health", *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements*, 2014, 28(4):357-63.
25. Gallerher ML. "Intake: The Nutrients and Their Metabolism", Mahan LK, Escott-Stump S, Raymond JL, Krause MV. *Krause's food & the nutrition care process*, 13th edition, Saunders, United States, 2011: 54-128.
26. Lubag AJ, De Leon-Rodriguez LM, Burgess SC, Sherry AD. "Noninvasive MRI of beta-cell function using a Zn²⁺-responsive contrast agent", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(45):18400-5.
27. Nygaard SB, Larsen A, Knuhtsen A, Rungby J, Smidt K. "Effects of zinc supplementation and zinc chelation on in vitro beta-cell function in INS-1E cells", *BMC research notes*, 2014, 7:84.

28. Tyszka-Czochara M, Grzywacz A, Gdula-Argasinska J, Librowski T, Wilinski B, Opoka W. "The role of zinc in the pathogenesis and treatment of central nervous system (CNS) diseases. Implications of zinc homeostasis for proper CNS function", *Acta poloniae pharmaceutica*, 2014, 71(3):369-77.
29. Jayawardena R, Ranasinghe P, Galappathy P, Malkanthi R, Constantine G, Katulanda P. "Effects of zinc supplementation on diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis", *Diabetology & metabolic syndrome*, 2012, 4(1):13.
30. Dunn MF. "Zinc-ligand interactions modulate assembly and stability of the insulin hexamer -- a review", *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 2005,18(4):295-303.
31. Skelin M, Rupnik M, Cencic A. "Pancreatic beta cell lines and their applications in diabetes mellitus research", *Altex*, 2010, 27(2):105-13.
32. Duprez J, Roma LP, Close AF, Jonas JC. "Protective antioxidant and antiapoptotic effects of ZnCl₂ in rat pancreatic islets cultured in low and high glucose concentrations", *PLoS One*, 2012, 7(10):46831.
33. Maret W. "Crosstalk of the group IIa and IIb metals calcium and zinc in cellular signaling", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(22):12325-7.
34. Slucca M, Harmon JS, Oseid EA, Bryan J, Robertson RP. "ATP-sensitive K⁺ channel mediates the zinc switch-off signal for glucagon response during glucose deprivation", *Diabetes*, 2010, 59(1):128-34.
35. Trumbo P, Yates AA, Schlicker S, Poos M. "Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc", *J Am Diet Assoc*, 2001, 101(3):294-301.
36. Tuerk MJ, Fazel N. "Zinc deficiency", *Current opinion in gastroenterology*, 2009, 25(2):136-43.
37. Prasad AS. "Impact of the discovery of human zinc deficiency on health", *Journal of the American College of Nutrition*, 2009, 28(3):257-65.

38. Prasad AS. "Discovery of human zinc deficiency: 50 years later", *J Trace Elem Med Bio*, 2012, 26(2-3):66-9.
39. Haschek WM, Rousseaux CG, Wallig MA, Bolon B, Ochoa R, Mahler BW. *Haschek and Rousseaux's handbook of toxicologic pathology*, Academic Press, United States, 2013: xxxvi, 2963.
40. Salgueiro MJ, Zubillaga M, Lysionek A, Sarabia MI, Caro R, De Paoli T, et al. "Zinc as an essential micronutrient: A review", *Nutr Res*, 2000, 20(5):737-55.
41. TÜBİTAK. "TürKomp, Ulusal Gıda Kompozisyon Veri Tabanı, versiyon 1.0 TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi Gıda Enstitüsü", Gebze / Kocaeli, 2014. www.turkomp.gov.tr Erişim: 01 Haziran 2015.
42. Caballero B, Allen L, Prentice A. *Encyclopedia of human nutrition*. 2nd ed, Amsterdam, Elsevier Academic Press, London, 2005: 2152-2167.
43. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. "Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling", *Cellular signalling*, 2012, 24(5):981-90.
44. Oyenihı AB, Ayeleso AO, Mukwevho E, Masola B. "Antioxidant Strategies in the Management of Diabetic Neuropathy", *BioMed research international*, 2015, 2015:515042.
45. Lei XG, Vatamaniuk MZ. "Two tales of antioxidant enzymes on beta cells and diabetes", *Antioxidants & redox signaling*, 2011, 4(3):489-503.
46. Elmore S. "Apoptosis: a review of programmed cell death", *Toxicologic pathology*, 2007, 35(4):495-516.
47. Fulda S, Debatin KM. "Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy", *Oncogene*, 2006, 25(34):4798-811.
48. Artman L, Dormoy-Raclet V, von Roretz C, Gallouzi IE. "Planning your every move: the role of beta-actin and its post-transcriptional regulation in cell motility", *Seminars in cell & developmental biology*, 2014, 34:33-43.

49. Simiczyjew A, Mazur AJ, Popow-Wozniak A, Malicka-Blaszkiewicz M, Nowak D. "Effect of overexpression of beta- and gamma-actin isoforms on actin cytoskeleton organization and migration of human colon cancer cells", *Histochemistry and cell biology*, 2014, 142(3):307-22.
50. Hu P, Wu S, Hernandez N. "A role for beta-actin in RNA polymerase III transcription", *Genes & development*, 2004, 18(24):3010-5.
51. Zhang R, Yang D, Zhou C, Cheng K, Liu Z, Chen L, et al. "Beta-actin as a loading control for plasma-based Western blot analysis of major depressive disorder patients", *Analytical biochemistry*, 2012, 427(2):116-20.
52. Yin Y, Stephen CW, Luciani MG, Fahraeus R. "p53 Stability and activity is regulated by Mdm2-mediated induction of alternative p53 translation products", *Nature cell biology*, 2002, 4(6):462-7.
53. Batinac T, Gruber F, Lipozencic J, Zamolo-Koncar G, Stasic A, Brajac I. "Protein p53--structure, function, and possible therapeutic implications", *Acta dermatovenerologica Croatica : ADC*, 2003, 11(4):225-30.
54. Cuenda A, Rousseau S. "p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases", *Biochimica et biophysica acta*, 2007, 1773(8):1358-75.
55. Sumara G, Formentini I, Collins S, Sumara I, Windak R, Bodenmiller B, et al. "Regulation of PKD by the MAPK p38delta in insulin secretion and glucose homeostasis", *Cell*, 2009, 136(2):235-48.
56. Tsujimoto Y. "Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms", *Genes Cells*, 1998, 3(11):697-707.
57. Yang RF, Zhao GW, Liang ST, Zhang Y, Sun LH, Chen HZ, et al. "Mitofilin regulates cytochrome c release during apoptosis by controlling mitochondrial cristae remodeling", *Biochemical and biophysical research communications*, 2012, 428(1):93-8.

58. Winder WW, Hardie DG. "AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes", *The American journal of physiology*, 1999, 277(1):1-10.
59. Mihaylova MM, Shaw RJ. "The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism", *Nature cell biology*, 2011, 13(9):1016-23.
60. Salminen A, Kaarniranta K. "AMP-activated protein kinase (AMPK) controls the aging process via an integrated signaling network", *Ageing research reviews*, 2012, 11(2):230-41.
61. Boland K, Flanagan L, Prehn JH. "Paracrine control of tissue regeneration and cell proliferation by Caspase-3", *Cell death & disease*, 2013, 4:725.
62. Boatright KM, Salvesen GS. "Mechanisms of caspase activation", *Current opinion in cell biology*, 2003, 15(6):725-31.
63. Porter AG, Janicke RU. "Emerging roles of caspase-3 in apoptosis", *Cell death and differentiation*, 1999, 6(2):99-104.
64. Ohly P, Dohle C, Abel J, Seissler J, Gleichmann H. "Zinc sulphate induces metallothionein in pancreatic islets of mice and protects against diabetes induced by multiple low doses of streptozotocin", *Diabetologia*, 2000, 43(8):1020-30.
65. Cakmak I, Kalayci M, Ekiz H, Braun HJ, Kilinc Y, Yilmaz A. "Zinc deficiency as a practical problem in plant and human nutrition in Turkey: A NATO-science for stability project", *Field Crop Res*, 1999, 60(1-2):175-88.
66. Zhang C, Lu X, Tan Y, Li B, Miao X, Jin L, et al. "Diabetes-induced hepatic pathogenic damage, inflammation, oxidative stress, and insulin resistance was exacerbated in zinc deficient mouse model", *PLoS One*, 2012, 7(12):49257.
67. Zhang X, Zhao Y, Chu Q, Wang ZY, Li H, Chi ZH. "Zinc modulates high glucose-induced apoptosis by suppressing oxidative stress in renal tubular epithelial cells", *Biol Trace Elem Res*, 2014, 158(2):259-67.

68. Fu Z, Gilbert ER, Liu D. "Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes", *Current diabetes reviews*, 2013, 9(1):25-53.
69. MacDonald PE, Joseph JW, Rorsman P. "Glucose-sensing mechanisms in pancreatic beta-cells", *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*, 2005, 360(1464):2211-25.
70. De Leon DD, Stanley CA. "Mechanisms of Disease: advances in diagnosis and treatment of hyperinsulinism in neonates", *Nature clinical practice Endocrinology & metabolism*, 2007, 3(1):57-68.
71. Szkudelski T. "The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas", *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 2001, 50(6):537-46.
72. Eleazu CO, Eleazu KC, Chukwuma S, Essien UN. "Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans", *Journal of diabetes and metabolic disorders*, 2013,12(1):60.
73. Jimenez-Gonzalez M, Jaques F, Rodriguez S, Porciuncula A, Principe RM, Abizanda G, et al. "Cardiotrophin 1 protects beta cells from apoptosis and prevents streptozotocin-induced diabetes in a mouse model", *Diabetologia*, 2013, 56(4):838-46.
74. Rakatzi I, Mueller H, Ritzeler O, Tennagels N, Eckel J. "Adiponectin counteracts cytokine- and fatty acid-induced apoptosis in the pancreatic beta-cell line INS-1", *Diabetologia*, 2004, 47(2):249-58.
75. Wolf G, Aumann N, Michalska M, Bast A, Sonnemann J, Beck JF, et al. "Peroxiredoxin III protects pancreatic ss cells from apoptosis", *The Journal of endocrinology*, 2010, 207(2):163-75.
76. Zhang C, Pan T, Salesse C, Zhang D, Miao L, Wang L, et al. "Reversible Ca(2+) switch of an engineered allosteric antioxidant selenoenzyme", *Angewandte Chemie*, 2014, 53(49):13536-9.

77. Rains JL, Jain SK. "Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes", *Free radical biology & medicine*, 2011, 50(5):567-75.
78. Zhou J, Huang K, Lei XG. "Selenium and diabetes--evidence from animal studies", *Free radical biology & medicine*, 2013, 65:1548-56.
79. Jomova K, Valko M. "Advances in metal-induced oxidative stress and human disease", *Toxicology*, 2011, 283(2-3):65-87.
80. Azevedo MM, Almeida B, Ludovico P, Cassio F. "Metal stress induces programmed cell death in aquatic fungi", *Aquatic toxicology*, 2009, 92(4):264-70.
81. Higashimoto M, Isoyama N, Ishibashi S, Inoue M, Takiguchi M, Suzuki S, et al. "Tissue-dependent preventive effect of metallothionein against DNA damage in dyslipidemic mice under repeated stresses of fasting or restraint", *Life sciences*, 2009, 84(18):569-75.
82. Formigari A, Gregianin E, Irato P. "The effect of zinc and the role of p53 in copper-induced cellular stress responses", *Journal of applied toxicology : JAT*, 2013, 33(7):527-36.
83. Aiuchi T, Mihara S, Nakaya M, Masuda Y, Nakajo S, Nakaya K. "Zinc ions prevent processing of caspase-3 during apoptosis induced by geranylgeraniol in HL-60 cells", *Journal of biochemistry*, 1998,124(2):300-3.
84. Khadija S, Veluthakal R, Sidarala V, Kowluru A. "Glucotoxic and diabetic conditions induce caspase 6-mediated degradation of nuclear lamin A in human islets, rodent islets and INS-1 832/13 cells", *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 2014, 19(12):1691-701.
85. Syeda K, Mohammed AM, Arora DK, Kowluru A. "Glucotoxic conditions induce endoplasmic reticulum stress to cause caspase 3 mediated lamin B degradation in pancreatic beta-cells: protection by nifedipine", *Biochemical pharmacology*, 2013, 86(9):1338-46.
86. Ahn YJ, Kim H, Lim H, Lee M, Kang Y, Moon S, et al. "AMP-activated protein kinase: implications on ischemic diseases", *BMB reports*, 2012, 45(9):489-95.

87. Heidrich F, Schotola H, Popov AF, Sohns C, Schuenemann J, Friedrich M, et al. "AMPK - Activated Protein Kinase and its Role in Energy Metabolism of the Heart", *Current cardiology reviews*, 2010, 6(4):337-42.
88. Li YV. "Zinc and insulin in pancreatic beta-cells, *Endocrine*, 2014, 45(2):178-89.
89. Hou CL, Zhang W, Wei Y, Mi JH, Li L, Zhou ZH, et al. "Zinc finger protein A20 overexpression inhibits monocyte homing and protects endothelial cells from injury induced by high glucose", *Genetics and molecular research : GMR*, 2011, 10(2):1050-9.
90. Zhang X, Liang D, Guo B, Yang L, Wang L, Ma J. "Zinc inhibits high glucose-induced apoptosis in peritoneal mesothelial cells", *Biological trace element research*, 2012, 150(1-3):424-32.
91. Vurusaner B, Poli G, Basaga H. "Tumor suppressor genes and ROS: complex networks of interactions", *Free radical biology & medicine*, 2012,52(1):7-18.
92. Narula J, Pandey P, Arbustini E, Haider N, Narula N, Kolodgie FD, et al. "Apoptosis in heart failure: release of cytochrome c from mitochondria and activation of caspase-3 in human cardiomyopathy", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(14):8144-9.
93. Nithipongvanitch R, Ittarat W, Velez JM, Zhao R, St Clair DK, Oberley TD. "Evidence for p53 as guardian of the cardiomyocyte mitochondrial genome following acute adriamycin treatment", *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 2007, 55(6):629-39.
94. Nithipongvanitch R, Ittarat W, Cole MP, Tangpong J, Clair DK, Oberley TD. "Mitochondrial and nuclear p53 localization in cardiomyocytes: redox modulation by doxorubicin (Adriamycin)? ", *Antioxidants & redox signaling*, 2007, 9(7):1001-8.
95. Zhao Y, Tan Y, Dai J, Li B, Guo L, Cui J, et al. "Exacerbation of diabetes-induced testicular apoptosis by zinc deficiency is most likely associated with oxidative stress, p38 MAPK activation, and p53 activation in mice", *Toxicology letters*, 2011, 200(1-2):100-6.

96. Zhang YW, Shi J, Li YJ, Wei L. “Cardiomyocyte death in doxorubicin-induced cardiotoxicity”, *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 2009, 57(6):435-45.
97. Petersen AB, Smidt K, Magnusson NE, Moore F, Egefjord L, Rungby J. “siRNA-mediated knock-down of ZnT3 and ZnT8 affects production and secretion of insulin and apoptosis in INS-1E cells”, *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 2011, 119(2):93-102.
98. Thirumoorthy N, Shyam Sunder A, Manisenthil Kumar K, Senthil Kumar M, Ganesh G, Chatterjee M. “A review of metallothionein isoforms and their role in pathophysiology”, *World journal of surgical oncology*, 2011, 9:54.
99. Wang J, Song Y, Elsherif L, Song Z, Zhou G, Prabhu SD, et al. “Cardiac metallothionein induction plays the major role in the prevention of diabetic cardiomyopathy by zinc supplementation”, *Circulation*, 2006, 113(4):544-54.