

T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**PANKREATİK BETA HÜCRELERİNDE (INS-1)
4-HİDROKSİNONENAL' İN ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRES,
APOPTOZİS, İNSULİN SALIVERİLMESİ VE DETOKSİFİKASYON
ENZİMLERİ ÜZERİNE OLASI ETKİLERİ**

DOKTORA TEZİ

Ahmet CUMAOĞLU

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Aysel ARICIOĞLU

ANKARA

Aralık 2011

T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**PANKREATİK BETA HÜCRELERİNDE (INS-1)
4-HİDROKSİNONENAL' İN ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRES,
APOPTOZİS, İNSULİN SALIVERİLMESİ VE DETOKSİFİKASYON
ENZİMLERİ ÜZERİNE OLASI ETKİLERİ**

DOKTORA TEZİ

Ahmet CUMAOĞLU

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Aysel ARICIOĞLU

Bu tez, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
01/2010-52 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA

Aralık 2011

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı Doktora Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 21/12/2011

İmza

Ünvanı Adı ve Soyadı
Prof.Dr. HaticePAŞAOĞLU
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza

Ünvanı Adı ve Soyadı
Prof.Dr. Aysel ARICIOĞLU
Gazi Üniversitesi

İmza

Ünvanı Adı ve Soyadı
Prof.Dr. Nurten TÜRKÖZKAN
Gazi Üniversitesi

İmza

Ünvanı Adı ve Soyadı
Prof. Dr. Deniz ERBAŞ
Gazi Üniversitesi

İmza

Ünvanı Adı ve Soyadı
Prof.Dr. Aşlıhan AVCI
Ankara Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	
İçindekiler	I
Şekiller ve Grafikler	IV
Tablolar	VII
Semboller, Kısaltmalar	VIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Diyabet ve pankreatik beta hücresi	5
2.1.1. Pankreatik beta hüclerlerinin fizyolojisi	5
2.1.2. Insulin sentezi salgılanması ve fonksiyonu	6
2.1.3. Diyabet ve beta hücre apoptozisi	9
2.2. Endoplazmik retikulum stres	12
2.2.1. IRE1 sinyal yolu	15
2.2.2. PERK sinyal yolu	17
2.2.3. ATF6 sinyal yolu	19
2.3 Endoplazmik retikulum stres ve apoptozis	20
2.3.1. PERK/eIF2/ATF4/CHOP apoptozis sinyal yolağı	21
2.3.2. IRE1/JNK apoptozis sinyal yolağı	22
2.3.3. Kaspaz 12 apoptozis sinyal yolu	22
2.4. ER stres ve pankreatik beta hücresi	23
2.5. 4-hidroksinonenal	25
2.5.1. 4-hidroksi-2-nonenal ve ER stres	30
2.5.2. 4-hidroksinonenal ve apoptozis	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM	36
3.1. Deneylerde kullanılan cihazlar	36
3.2 Deneyler	37
3.2.1. 4-Hidroksinonenal'in sitotoksik etkisinin MTT ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) deneyi ile ölçümü	37

3.2.2. 4-Hidroksinonenal' in insulin saliverilmesi üzerine etkisinin ELISA yöntemi ile ölçümü	38
3.2.3. 4-Hidroksinonenal' in detoksifikasyon enzimleri, endoplazmik retikulum stres ve apoptozisle ilişkili proteinler üzerine etkisinin western blot yöntemi ile ölçümü	38
3.2.3.1. Western blot yönteminde kullanılan reaktifler	40
3.2.3.2. Western blot yönteminde kullanılan primer ve sekonder antikorların dilüsyonları	41
3.3. İstatistiksel analiz yöntemleri	41
4. BULGULAR	42
4.1. 4-hidroksinonenal' in konsatrasyon ve zamana bağlı sitotoksik etkisi	42
4.2. 4-hidroksinonenal' in insulin saliverilmesi üzerine etkisi	44
4.3. 4-hidroksinonenal' in detoksifikasyonunda görevli enzimlerin protein ifadenme düzeyleri	45
4.3.1. 4-hidroksinonenal' in AKR1B1 protein ifadenme düzeyleri üzerine etkisi	45
4.3.2. 4-hidroksinonenal' in GST-Yα protein ifadenme düzeyleri üzerine etkisi	46
4.4. 4-hidroksinonenal' in endoplazmik retikulum stres ve apoptozisle ilişkili proteinlerin ifadenme düzeyleri üzerine etkisi	47
4.4.1. 4-hidroksinonenal' in PERK ve p-PERK (Thr 981) protein ifadenme düzeyleri üzerine etkisi	47
4.4.2. 4-hidroksinonenal' in IRE1α protein ifadenme düzeyleri üzerine etkisi	49
4.4.3. 4-hidroksinonenal' in p-JNK2 (c-Jun N-terminal kinaz1) ve p-JNK1 (c-Jun N-terminal kinaz2) protein ifadenme düzeyleri üzerine etkisi	50
4.4.4. 4-hidroksinonenal' in JNK2 (c-Jun N-terminal kinaz1) ve JNK1 (c-Jun N-terminal kinaz2) protein ifadenme	

düzeyleri üzerine etkisi	51
4.4.5. 4-hidroksinonenal' in Kaspaz 12 protein ifadenme düzeyleri üzerine etkisi	52
4.4.6. 4-hidroksinonenal' in GADD 153 (CHOP) protein ifadenme düzeyleri üzerine etkisi	53
4.5. Apoptosis ile ilişkili proteinlerin ifadenme düzeyleri	54
4.5.1. 4-hidroksinonenal' in pro Kaspaz 9 ve aktif Kaspaz 9 protein ifadenme düzeyleri üzerine etkisi	54
4.5.2. 4-hidroksinonenal' in pro Kaspaz 3 ve aktif Kaspaz 3 protein ifadenme düzeyleri üzerine etkisi	55
5. TARTIŞMA	57
6. SONUÇ	67
7. ÖZET	69
8. SUMMARY	71
9. KAYNAKLAR	73
10. EKLER	89
11. ÖZGEÇMİŞ	90

ŞEKİL ve GRAFİKLER

Şekil 1: İnsan ve kemirgen pankreasının adacık hücreleri ve genel dağılımı	6
Şekil 2: Endoplazmik stresi uyaranlar ve endoplazmik retikulumdaki etkisi	13
Şekil 3: IRE1 sinyal yolu	16
Şekil 4: PERK sinyal yolu	18
Şekil 5: ATF6 sinyal yolu	19
Şekil 6: ER stresin uyardığı apoptozis yolları	21
Şekil 7: Pankreatik beta hücresi reaktif oksijen türleri ve ER stres	25
Şekil 8: 4-hidroksinonenal' in proteinlerin amino asit yan zircirleri ile reaksiyonları	28
Şekil 9: 4-hidroksinonenal' in biyotransformasyonunu gösteren reaksiyonlar (A) 4-hidroksinonenal' in ADH2 ile oksidasyonu, (B) 4-hidroksinonenal' in kendiliğinden veya GST aracılı glutatyon ile konjugasyonu, (C) 4-hidroksinonenal' in enzimatik indirgenmesi ile 4-dihidroksi-2-nonene dönüşümü, (D) Alkenal/one oksidoredüktaz tarafından 4-hidroksinonenal de C=C bağının indirgenmesi, (E) Aldoz redüktaz tarafında GSH-HNE' nin indirgenmesi, (F) Kendiliğinden hemiasetal oluşumu, (G) Kendiliğinden laktol oluşumu, (H) 4-hidroksinonenal' in indirgenmesi	29
Şekil 10: 4-hidroksinonenal ve ER stres ilişkisi	30
Şekil 11: 4-hidroksinonenal ve apoptozis ilişkisi	32
Grafik 1: 60 dakika 4-hidroksinonenal uygulanan sıçan pankreatik beta hücrelerinde (INS-1) hücre canlılığı *p<0.05 vs. Kontrol	42
Grafik 2: 120 dakika 4-hidroksinonenal uygulanan sıçan pankreatik beta hücrelerinde hücre canlılığı *p<0.05 vs. Kontrol	43

Grafik 3: 180 dakika 4-hidroksinonenal uygulanan sıçan pankreatik beta hücrelerinde hücre canlılığı *p<0.05 vs. Kontrol.	43
Grafik 4: 2.8 mmol/L glukoz içeren besi yerine maruz bırakılan hücrelerde bazal insulin saliverilmesi üzerine 4-hidroksinonenal' in etkisi *p<0.05 vs. Kontrol (0)	44
Grafik 5: 16.7 mmol/L glukoz içeren besi yerine maruz bırakılan hücrelerde indüklenmiş insulin saliverilmesi üzerine 4-hidroksinonenal' in etkisi *p<0.05 vs. Kontrol (0)	45
Grafik 6: INS-1 hücrelerinde 4-hidroksinonenal' in AKR1B1 protein ifadenme düzeyleri üzerine etkisi *p<0.05 vs. Kontrol (0)	46
Grafik 7: INS-1 hücrelerinde 4-hidroksinonenal' in GST-Yα protein ifadenme düzeyleri üzerine etkisi *p<0.05 vs. Kontrol (0)	47
Grafik 8: INS-1 hücrelerinde 4-hidroksinonenal' in PERK ve p-PERK protein ifadenme düzeyleri üzerine etkisi *p<0.05 vs. Kontrol (0)	48
Grafik 9: INS-1 hücrelerinde 4-hidroksinonenal' in IRE1-α protein ifadenme düzeyleri üzerine etkisi *p<0.05 vs. Kontrol (0)	49
Grafik 10: INS-1 hücrelerinde 4-hidroksinonenal' in JNK fosforilasyonu üzerine etkisi *p<0.05 vs. Kontrol (0)	50
Grafik 11: INS-1 hücrelerinde 4-hidroksinonenal' in JNK2 ve JNK1 protein ifadenme düzeyleri üzerine etkisi *p<0.05 vs. Kontrol (0)	51
Grafik 12: INS-1 hücrelerinde 4-hidroksinonenal' in Kaspaz 12 protein ifadenme düzeyleri üzerine etkisi *p<0.05 vs. Kontrol (0)	52
Grafik 13: INS-1 hücrelerinde 4 hidroksinonenal' in	

GADD 153 (CHOP) protein ifadenleme düzeyleri üzerine etkisi *p< 0.05 vs. Kontrol (0)	54
Grafik 14: INS-1 hücrelerinde 4-hidroksinonenal' in pro kaspaz 9 ve aktif kaspaz 9 protein ifadenleme düzeyleri üzerine etkisi. p<0.05 vs. Kontrol (0)	55
Grafik 15: INS-1 hücrelerinde 4-hidroksinonenal'in prokaspaz 3 ve aktif kaspaz 3 protein ifadenleme düzeyleri üzerine etkisi. * p<0,05 vs. Kontrol (0)	56

TABLÖLAR

Tablo 1: % 5 Paketleyici jel için kullunılan reaktifler ve miktarları	38
Tablo 2: % 12 ayırıcı jel için kullunılan reaktifler ve miktarları	38
Tablo 3: Western blot yönteminde kullanılan antikorlar ve dilisyonları	39

SEMBOLLER ve KISALTMALAR

ADH	: Aldehit dehidrogenaz
AKR	: Aldoz redüktaz
AP 1	: Aktivatör protein 1
APS	: Amonyum persülfat
ASK1	: Apoptozis sinyali düzenleyen kinaz 1
ATF3	: Aktive edici transkripsiyon faktörü 3
ATF4	: Aktive edici transkripsiyon faktörü 4
ATF6	: Aktive edici transkripsiyon faktörü 6
Bak	: Bcl-2 ilişkili antagonist/öldürücü protein
Bax	: Bcl-2 ilişkili X proteini
Bcl-2	: B hücreli lenfoma geni 2
CHOP	: ([C/EBP (CCAAT/enhancer-bağlanan protein)-homolog protein])
EDEM1	: Endoplazmik retikulum degradasyonu hızlandırıcı alfa mannozidaz benzeri 1
EDEM2	: Endoplazmik retikulum degradasyonu hızlandırıcı alfa mannozidaz benzeri 2
EDEM3	: Endoplazmik retikulum degradasyonu hızlandırıcı alfa mannozidaz benzeri 3
EGFR	: Endotelial büyüme faktör reseptörü
eIF2a	: Ökaryotik translasyon başlama faktörü 2 α subünitesi
ER	: Endoplazmik retikulum
ERAD	: Endoplazmik retikulumla ilişkili protein degradasyonu
Erk 1/2	: Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz
Ero1	: Endoplazmik retikulum oksidoredüktin 1
GLUT-2	: Tip 2 glukoz transport proteini
Grb2	: Büyüme faktör reseptöre bağlanan protein 2
GRP78	: Glukozla düzenlenen protein 78
GRP94	: Glukozla düzenlenen protein 94

GST	: Glutatyon-S-transferaz
HNE	: 4-hidroksinonenal
HRD1	: Hipoksi sorumlu domain 1
Hsp70	: Isı şok protein 70
IFN-γ	: interferon-gama
IL-1β	: interlökin-1β
IP10	: İnterferon gama ile uyarılan protein 10
IRE1	: inositol-gerektiren enzyim 1
Ire1p/Ern1p	: ER transmembran protein kinaz/endoribonükleaz
IRS-1	: İnsulin reseptör substrat 1
JNK	: JUN N-terminal kinaz
MAP	: Mitojenle aktive olan protein
MCP-1	: Monosit kemoatraktan protein 1
mRNA	: Haberci RNA
MRP2	: Çoklu ilaç direnci ile ilişkili protein 2
MTT	: (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
nNOS	: nöronal Nitrik Oksit Sentaz
PC1	: Prohormon konvertaz-1
PC2	: Prohormon konvertaz-2
PCH	: Karboksipeptidaz H
PERK	: Çift zincirli RNA bağımlı protein kinaz benzeri-ER kinaz
PP1	: Protein fosfataz 1
PPAR	: Peroksizom prolifer edici aktif reseptör
Prx6	: Peroksiredoksin 6
SDS	: Sodyum dedosilsülfat
SRP	: Signal recognition particle
TEMED	: Tetrametiletildiamid
TNF-α	: Tümör nekrozis faktör-α
TRAF2	: Tümör nekrozis faktör reseptörü ile ilişkili faktör 2
XBP-1	: X-kutusunda bağlanan protein 1

1. GİRİŞ

Diabetes mellitus iskelet kası, karaciğer ve yağ dokusu gibi periferel dokularda insulin direncinin artması ve insulin salıverilmesinden sorumlu pankreatik beta hücrelerinin fonksiyon bozukluğu ile karakterize endokrin ve metabolik bir hastalıktır.

Pankreatik beta hücrelerinde fonksiyon bozukluğuna bağılı insulin salıverilmesinde ki azalma, hiperglisemiye artırarak diyabetin retinopati, nöropati, nefropati, kardiyomiyopati gibi sekonder komplikasyonlarının gelişimine neden olmaktadır.

Kronik hiperglisemi birçok dokuda ve pankreatik beta hücrelerinde serbest radikal üretimini artırarak oksidatif stresi tetiklemektedir. Serbest radikaller lipitler, proteinler ve nükleik asitler gibi biyomoleküllerin oksidasyonuna neden olmaktadır.

Serbest radikallerin oluşturduğu hasarlar arasında en önemlilerinden olan lipit peroksidasyonu, membran yapısında yer alan çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest radikallere maruz kalması sonucu gerçekleşen enzimatik olmayan reaksiyonlar dizisidir. Lipit peroksidasyonunda okside olan çoklu doymamış yağ asitlerinin fragmentasyonu sonucu 4-hidroksinonenal (HNE), 4-oksononenal ve akrolein gibi α,β -doymamış reaktif aldehytler oluşur.

4-hidroksinonenal hücrede fizyolojik konsantrasyonda birçok enzimatik reaksiyonun aktivasyonunda veya inaktivasyonunda, bazı membran kanal proteinlerin düzenlenmesinde, hücre içi sinyal iletiminde görevli ikincil haberci olarak tanımlanır. Örneğin 4-hidroksinonenal glutatyon sentezinde görevli γ -glutamilsistein sentetazın aktivasyonuna

neden olarak hücre içi glutatyon düzeylerinin artışına neden olur. Böylece hücre oksidatif strese adaptasyonu sağlar.

Aynı zamanda 4-hidroksinonenal güçlü elektrofilik karakterde olup hücresel proteinlerin sistein, lizin ve histidin gibi güçlü nükleofilik amino asitlerine bağlanarak hücrede protein modifikasyonlarına neden olur. Hücresel proteinlerin 4-hidroksinonenal tarafından modifikasyonu sonucu hücre sinyal iletiminin bozulması, hücresel enzimlerin inhibisyonu ve mitokondriyal fonksiyon bozuklukları diyabet, aterosklerozis, Alzheimer gibi bir çok hastalığın patogenezinde oldukça önemlidir.

4-hidroksinonenal üç önemli metabolik yolla detoksifiye edilir. Bu enzimatik sistemler tüm hücrelerde olmasa da aldoz redüktaz (AKR) 4-hidroksi-2-nonenal' in 2-ene-1,4-diol' e indirgenmesini sağlar. Aldehit dehidrogenaz (ADH) 4-hidroksi-2-nonenal' in 4-hidroksi-2-nonenoik aside oksidasyonunu sağlar. Glutatyon-S-transferaz (GST) ise 4-hidroksi-2-nonenal ile glutatyonun konjugasyonunu katalizleyerek detoksifikasyonunda görev alır.

Detoksifikasyonda görevli enzimlerde fonksiyon bozuklukları veya artmış oksidatif stres, 4-hidroksinonenal' in amino asitlere konjugasyonunu artırarak proteinlerde hatalı katlanmaya neden olur. Hatalı katlanmış proteinler stoplazmada birikerek endoplazmik retikulumda (ER) hatalı katlanmış proteinlere duyarlı stres sensör proteinlerinin uyarılmasını sağlar. Böylece hasarın şiddetine bağlı olarak ya hücre hatalı proteinleri proteozomlarda ortadan kaldırma yoluna gider veya endoplazmik retikulum aracılı sinyal kaskadını başlatarak hücrenin apoptoize yönelmesini sağlar. Bu durum 4-hidroksinonenal' in en iyi bilinen sitotoksik etkilerinden biridir.

Hatalı katlanmış proteinlerin artan hücre içi konsatrasyonları endoplazmik retikulum aracılı stresi uyararak, endoplazmik retikulum membranında bulunan stres cevap proteinlerinin aktivasyonuna neden olur. ATF6 (Aktive edici transkripsiyon faktörü 6), IRE1 (inositol-gerektiren enzyime 1) ve PERK (Çift zincirli RNA bağımlı protein kinaz benzeri-ER kinaz) başlıca endoplazmik retikulum stres cevap proteinleridir.

Tip 2 transmembran proteini olarak bilinen ATF6'nın aktivasyonu bu proteinin endoplazmik retikulum membranından koparak nükleusa transferini sağlar. Böylece ATF6, aktif bir transkripsiyon faktörü olarak davranarak endoplazmik retikulum şaperonlarının ve protein katlanmasında görevli proteinlerin gen ürünlerinin transkripsiyonunu artırır. ATF6 aynı zamanda endoplazmik retikulum biyogenezini ve endoplazmik retikulum aracılı proteozomal degradasyon sistemini de hızlandırır. ATF6'nın aktivasyonu aynı zamanda CHOP ([C/EBP (CCAAT/enhancer-bağlanan protein)-homolog protein]) protein ifadenme düzeylerini artırarak hücrede apoptozisi başlatır.

Hatalı katlanmış proteinlerin artmış stoplazmik düzeyleri tip 1 transmembran proteini olan PERK'in dimerizasyonuna ve otofosforilasyonuna neden olur. Böylece aktif olan protein eIF2a (eucaryotic translation initiation factor 2, a subunit)nin fosforilasyonuna neden olur. Fosforillenmiş eIF2a ise hücrede protein sentezinin azaltılmasını sağlar. Bununla birlikte fosforile olmuş PERK transkripsiyon faktörü ATF4 (activating transcription factor 4)ün hücre içi ifadenme düzeylerini artırır. Yavaşlatılmış protein sentezine rağmen ATF4 oksidatif stresle mücadelede etkin rol oynar ve amino asit metabolizmasında etkin proteinlerin ifadenme düzeylerini artırır. PERK'in kısa süreli aktivasyonu hücrenin hayatta kalmasını desteklerken kronik aktivasyonu ise hücrenin apoptozis ile ölümünde etkindir. PERK'in kronik aktivasyonu ATF4 aracılı CHOP protein düzeylerini artırır. CHOP proteinin artmış düzeyleri Bcl-2

gibi apoptozisi baskılayan proteinlerin seviyelerini azaltarak hücrenin apoptozise yönelmesini kolaylaştırır.

Hatalı katlanmış proteinlerin stoplazmada birikimine cevaben endoplazmik retikulum zarında IRE1 in dimerizasyonunu takiben otofosforilasyonu gerçekleşir. Böylece aktif hale gelen IRE1 bir transkripsiyon faktörü olan XBP-1 (X-kutusunda bağlanan protein 1) in hücre içi düzeylerinin artışına neden olur. XBP-1, hatalı katlanmış proteinlere bağlanarak endoplazmik retikulum lümenine taşınmada etkili proteinlerin sentezini artırır. Böylece endoplazmik retikulum lümenine alınan hatalı katlanmış proteinler endoplazmik retikulumda yer alan proteozomal sisteme yönlendirilerek ortadan kaldırılır. Bu süreç hücrenin hayatta kalabilme mücadelesinde etkindir. Diğer yandan IRE1' in uzun süreli aktivasyonu JNK (JUN N-terminal kinase) nın aktivasyonuna neden olur. JNK aktivasyonu apoptozisin uyarılmasında oldukça etkilidir.

Aynı zamanda endoplazmik retikulum lümeninde biriken hatalı katlanmış proteinler endoplazmik retikulum zarında yer alan Bak/Bax kanal protein sistemini aktive ederek Ca^{2+} nin stoplazmaya pompalanmasını sağlar. Böylece artan stozolik kalsiyum düzeyleri kalpain aracılı prokaspaz-12' nin aktivasyonuna neden olarak kaspaz kaskadı başlatır ve hücreyi apoptozise yönlendirir. Stoplazmada artan kalsiyum düzeyleri mitokondri aracılı apoptozisi de tetikler. Mitokondriden stokrom c nin stoplazmaya saliverilmesi artar buna bağlı kaspaz-9 ve kaspaz-3' ün aktivasyonu sağlanır.

Bu çalışmada; lipid peroksidasyonunda ara ürün olan ve çeşitli doku veya hücrelerde toksik etkisi bilinen 4-hidroksinonenal in pankreatik beta hücrelerinde hücre canlılığı, insulin saliverilmesi, detoksifikasyonunda etkili olabilecek proteinler ve endoplazmik retikulum stres cevap proteinleri ifadenme düzeyleri üzerine etkilerini araştırdık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diyabet ve pankreatik beta hücresi

2.1.1. Pankreatik beta hüclerlerinin fizyolojisi

Pankreatik beta hücreleri, pankreasın langerhans adacıklarında bulunan endokrin hücrelerdir. Langerhans adacıkları insan pankreasının kuyruk kısmında yer alır ve tüm pankreas ağırlığının % 1-2' sini oluşturur ¹. Beta hücresi içeren adacıklar yaygın damar ve sinir ağı ile kaplıdır. Sağlıklı insan pankreası yaklaşık olarak 10⁶ adacık içerir, her bir adacıkda ise yaklaşık 2000 beta hücresi yer alır ². (Şekil 1)

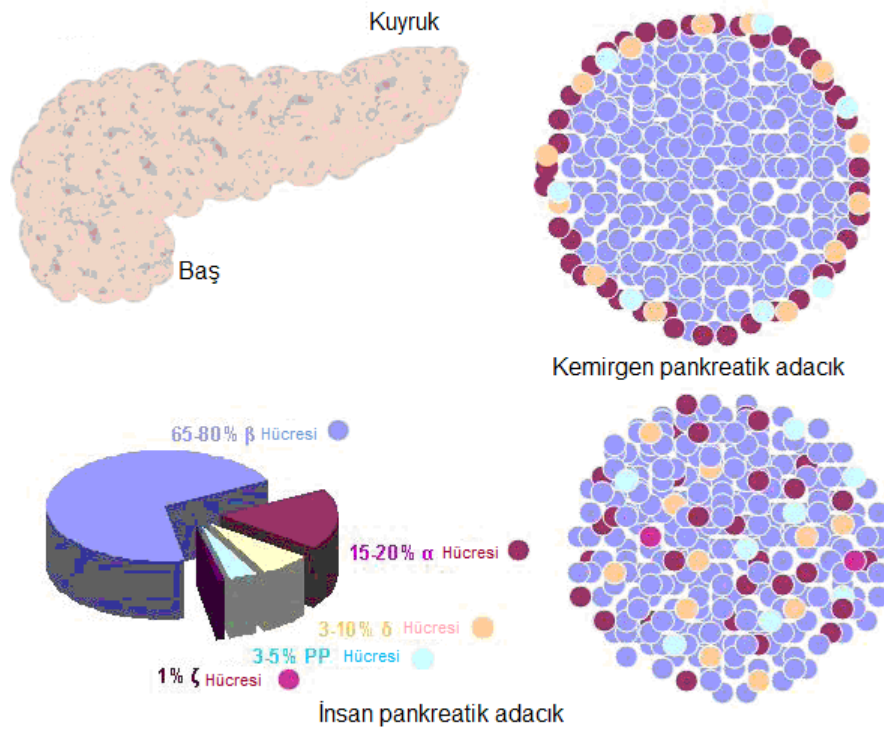
İnsan pankreasında adacık hücrelerinin % 65-80' i beta hücrelidir. Bu hücreler artan kan glukozu veya diğer besin maddelerine cevaben insulin salgılanmasından sorumludur ³. Bu hücreler insulin dışında ayrıca C-peptin ve amilin salgılar. C-peptit pro-insulinden olgun insuline dönüşümde oluşan yan üründür ve özellikle tip 2 diyabetin komplikasyonları arasında yer alan nefropatinin engellenmesinde önemli role sahiptir. Diyabetik hayvan modellerinde C-peptin' in glomerular filtrasyon hızını artırttığı ve fibrozisi gerilettiği gösterilmiştir ⁴.

Amilin insulin ile aynı anda (1:100,amilin/insulin) salgılanır. Amilin alfa hücrelerinden glukagon salgılanmasını baskılar ve böylece glukoz metabolizmasını düzenler. Bununla birlikte amilin, dolaşımdaki glukoz emilimini geciktirir, besin tüketimini sınırlar ve sindirim enzimlerini baskılar ⁵.

Alfa hücreleri pankreatik adacıkların % 15-20' sini oluşturur. Bu hücreler salgıladıkları glukagon hormonu ile karaciğer ve iskelet kasında glikojen yıkımını artırarak glukozon dolaşım sisteminde artışını sağlar. Böylece kan şekerini yükseltir.

Somatostatin delta hücrelerinden salgılanır. Bu hücreler pankreatik adacıkların % 3-10' unu oluşturur.

Adacıklarda varolan diğer hücreler ise pankreatik polipeptit salgılayan hücreler ve grelin üreten epsilon hücreleridir³.



Şekil 1: İnsan ve kemirgen pankreasının adacık hücreleri ve genel dağılımı²

2.1.2. İnsulin sentezi salgılanması ve fonksiyonu

İnsulin iki disülfid köprüsü ile birbirine bağlı iki polipeptitten oluşur. Pankreatik beta hücrelerinde var olan transkriptin % 10-15' ini insulin mRNA' sı oluşturur. İnsulin' in düşük kan glukoz konsantrasyonlarında translasyonu çok azdır⁶.

İnsulin proteini preproinsulin formunda sentezlenir. Glukoz insulin' in translasyona başlama ve uzama evrelerini hızlandırır. İnsulin mRNA' sı stoplazmadan granüllü endoplazmik retikuluma geçer bununla birlikte SRP (Signal recognition particle) proteininin reseptöründen ayrılmasını sağlar ^{7, 8}.

Preproinsulin N-terminal bölgede taşıdığı hidrofobik bölge ile kolaylıkla endoplazmik retikulum zarını geçer ve translasyon sonrası değişimlere katılır. Endoplazmik retikulum lümeninde preproinsulinden sinyal dizisi proteolitik olarak kesilir ve proinsulin oluşur. Proinsulinde disülfid bağları kurulduktan sonra golgiye taşınır[9]. Proinsulin golgide iki endoproteaz PC1 (prohormon konvertaz-1), PC2 (prohormon konvertaz-2) ve bir ekzopeptitaz PCH (Karboksipeptidaz H) aktivitesi sonucu olgun insulin ve C-peptit' e dönüşür. Bu değişim asidik ve kalsiyumca zengin ortamda gerçekleşir. Ayrıca karboksipeptidaz H' in aktivitesi çinkoya bağımlıdır ^{10, 11}. Glukoz bu değişimi PC1 ve PC2 sentezini etkileyerek düzenler ¹². İnsulin daha sonra salgı granüllerine alınarak stoplazmada bekletilir. Her bir pankreatik beta hücresi yaklaşık 10000-13000 salgı granülü içerir, her bir salgı granülü ise yaklaşık 10^6 insulin molekülü, düşük moleküler ağırlıklı bileşikler, ATP, çinko gibi metal iyonları içerir. Salgı granüllerindeki çinkonun çoğu hekzamerik insulin oluşumu ile ilişkilendirilir ¹³.

Beta hücreleri glukozu duyarlı hücrelerdir. Dolaşımda artmış glukoz hızla beta hücre zarını tip 2 glukoz transport proteini (GLUT-2) aracılığı ile geçer ¹⁴. Glukoz stoplazmada glukokinaz ile hızlıca fosforillendikten sonra glikoliz ve devamında respiratuvar döngüye katılarak ATP üretir. Artmış ATP/ADP oranı beta hücre zarında ATP ye duyarlı potasyum kanallarının kapanmasına neden olur. Bu durumda hücrede depolarizasyon gerçekleşir ve voltaja duyarlı kalsiyum kanalları açılır ve hücre içi kalsiyum düzeyleri artar. Artan kalsiyum düzeyleri ise

insulin' in salgı granüllerinden ekzositozunu uyarır ¹⁵. Açlık durumunda salgılanan insulin miktarı 2 pmol/kg/dakika iken beslenmeden sonra bu seviye 5-10 kat artar ¹⁶.

Beta hücrelerinden glukozla uyarılmış insulin salgılanması glukozun hücre içersine alınması, metabolizması ve kalsiyum aracılı insulin ekzositozu ile koordine edilir. Bu koordinasyon GLUT2 ve Rab3 gibi çeşitli genlerin değişimine bağlı tip 2 diyabette bozulmuştur ve bu durumda diyabetin en önemli karakteristiğidir ¹⁷.

İnsulin amino asit dizisi her ne kar türler arasında farklılık gösterse de ana segment türler arasında korunmuştur ve bu da insulin' in üç boyutlu yapısının türler arasında benzerliği sağlamaktadır.

İnsulin glukoz metabolizmasını düzenlediği gibi protein ve yağ metabolizmasını da düzenler. Kaslar, karaciğer ve yağ dokusunda glukozon depolanması veya kullanılmasını düzenler.

İnsulin hücrede reseptörüne bağlandığı zaman hem reseptörün otofosforilasyonuna hemde insulin reseptör substrat-1 (IRS-1) proteininin fosforillenmesine neden olur. IRS-1 daha sonra Grb2 benzeri adaptör proteine bağlanarak fosfoinozitol-3-kinazı aktive eder. Fosfoinozitol-3-kinaz sinyali diğer moleküllere ileterek glukozun hücre içersine alınımını artırır, diğer anabolik yolların aktivasyonu ile birlikte artan glukozon hücre içersinde depolanmasını uyarır. İnsulin glukoz' un hücre içersine alınımını GLUT-4' ün stoplazmik veziküllerden zara transportunu artırarak sağlar. GLUT-4 özellikle kas ve yağ dokusunda glukozun hücre içersine girişinden sorumludur ¹⁸.

İnsulin' in plazmada yarılanma ömrü yaklaşık 6 dakikadır. İnsulin' in çoğu karaciğer ve böbreklerde insulin proteazlar tarafından

parçalanarak inaaktif edilirken hücreye internalizasyonunda inaktivasyonunda etkili mekanizmadır ¹⁹.

2.1.3. Diyabet ve beta hücre apoptozisi

Hücre ölümü esasen nadiren nekrozis veya aktif olarak apoptozis ile gerçekleşir. Vücutta genelde enfeksiyon, farklılaşma ve hasarlı hücrelerin ortadan kaldırılmasında kullanılan temel mekanizma apoptozisdir. Pankreatik beta hücreleri diyabetin patogenezinde etkili bir çok ajanın proapoptotik etkilerine karşı oldukça duyarlıdır ²⁰.

Yeni tip 1 diyabet tanısı almış hastalardan alınan pankreas örneklerinde yapılan histopatolojik çalışma sonucu beta hücrelerinde % 70-80 kayıp olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte daha önceki çalışmalarda elde edilen verilere göre pankreatik beta hücreleri otoimmün atakta hedef hücrelerdir ve hücre kaybında etken mekanizma apoptozisdir. Tip 1 diyabet oluşturulmuş hayvan modellerinde insulitis' in (Langerhans adacıklarının infiltrasyonu) erken evresinde çoğunlukla makrofajların ve ayrıca +CD4, +CD8 lenfositler, doğal öldürücü hücreler ve B lenfositler gibi diğer immün hücrelerin adacıklara infiltrasyonu gösterilmiştir. İmmün hücrelerden pankreatik beta hücrelerine salgılanan temel sitokinler interleukin-1 β (IL-1 β), interferon- γ (IFN- γ), tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) olarak tanımlanmıştır ²¹. Bu sitokinlerin yüksek dozlarda pankreatik beta hücreleri için proapoptotik olduğu bilirse de, ilginç olarak beta hücrelerinin de bunlara benzer IL-1 β , monosit kemotaktan protein 1 (MCP-1), IFN- γ , IP10, TNF- α gibi sitokinleri ürettiği ve salgıladığı gösterilmiştir ^{22, 23}. Beta hücre apoptozisinde bu sitokinlerin yanında aktif makrofaj ve T lenfositler salgılanan nitrik oksit ve reaktif oksijen radikallerinin etkili olduğu vurgulanmıştır. Tüm bu bilgiler ışığında beta hücrelerinde apoptozisi hangi mekanizmanın başlattığı hala tartışma konusudur. Her ne kadar perforin, FasL, IL-1 β , IFN- γ ve nitrik oksit beta hücre kaybında etkili olsa da bu

moleküllerin sinyal yollarının baskılanması hala beta hücre kaybını yeterince engelleyememiştir.

Tip 2 diyabet beta hücrelerinde fonksiyon bozukluğu ve insulin direnci ile karakterizedir. Obezite ve insulin direnci tip 2 diyabetin nedenleri arasında iki major faktördür. Son yapılan çalışmaların sonuçlarına göre hiperglisemi beta hücre kaybında önemli etkindir. Yakın zamanda tip 2 diyabet tanısı almış hastalardan alınan biyopsi örneklerinde beta hücrelerinde % 25-50 kayıp gözlenirken daha ileri evre tip 2 diyabetiklerde bu kayıp % 65' e yakın gözlemlenmiştir. Buna göre geç evre tip 2 diyabetin patogeneğinde beta hücre kaybı major etkindir ²⁴. Burada artmış beta hücre ölümü veya bozulmuş proliferasyon kapasitesi beta hücre kaybında etken mekanizmalar olabilir. Otopside elde edilmiş tip 2 diyabetik insan pankreas dokularında hücre kaybında etken mekanizmanın apoptozis olduğu gösterilmiştir. Her ne kadar tip 2 diyabette beta hücre apoptozisinde hangi temel sinyal yolunun aktif olduğu tam olarak bilinmese de, beta hücrelerinin uzun süreli yüksek glukoz, lipid ve toksik oligomerlere maruziyeti, amiloyid polipeptit, reaktif oksijen radikalleri, endoplazmik retikulum stres ve proinflamatuvar sitokinler gibi birçok faktörün etkin olabileceği vurgulanmaktadır ²⁵.

Düşük doz glukoz konsantrasyonlarının kültüre edilmiş insan pankreas hücrelerinde proliferasyonu artırdığı gözlemlenmişken kronik yüksek doz glukoz uygulamasının apoptozisi artırdığı gösterilmiştir. İlginç olarak apoptozis genel olarak proliferatif beta hücrelerinde gözlemlenmiş bu da beta hücrelerinin proliferasyon anında apoptozise hassasiyetini göstermektedir. Yüksek glukoz konsantrasyonları pankreatik beta hücrelerinde glukozun metabolizmasını dolayısıyla oksidatif fosforilasyonunu artırır, bu durum mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna bağlı reaktif oksijen radikallerinin artışına neden olur. Beta hücreleri reaktif

oksijen türlerinin artışına karşın oldukça zayıf enzimatik antioksidan savunma sistemine sahiptir.

Reaktif oksijen radikallerinin beta hücrelerinde artışı NFkB ve JNK gibi strese duyarlı çeşitli metabolik yolları aktive eder. Düşük doz IL-1 β beta hücre proliferasyonunu aktive ederken kronik yüksek dozlarda NFkB, JNK ve belki de diğer strese duyarlı mekanizmaların aktivasyonuna neden olur ²⁶. Tüm bunlara ek olarak endoplazmik retikulum stres pankreatik beta hücrelerinde JNK yolu, aktive edici transkripsiyon faktörü 3 (ATF3) ve B hücresi lenfofa geni 2 (Bcl-2) ailesinin proapoptotik üyelerinin aktivasyonuna neden olarak hücrede apoptozis' in ilerleyişini sağlar ²⁷.

Tip 2 diyabette görülen bir diğer normal dışı durum artmış plazma lipid değerleridir. Rat pankreatik beta hücrelerinin 48 saat boyunca 2 mmol/L yağ asidine maruz bırakılması hücrede oksidatif stresi oldukça artırmıştır. Artmış yağ asidi konsantrasyonunun beta hücrelerinde hücre apoptozisini tam olarak hangi mekanizma ile ilerlettiği bilinmese de endoplazmik retikulum stres aktive ettiği, JNK aktivasyonuna neden olduğu, reaktif oksijen türlerini artırdığı ve mitojenle aktive olan protein (MAP) kinaz yolunu aktive ettiği gösterilmiştir ²⁸.

NFkB aktivasyonu, endoplazmik retikulum stres ve diğer mekanizmalar tip 2 diyabetin patogenezinde etkin apoptozis' in ilerleyişinde etkin yollardır.

Yüksek doz lipid konsantrasyonlarının pankreatik beta hücrelerinde toksik etkisinin yanında hücre apoptozisinde bir diğer etken mekanizma da artan reaktif oksijen radikallerinin etkisi ile gerçekleşen lipid peroksidasyonu sonucu oluşan toksik aldehitlerin etkileridir. Bununla birlikte daha önceki çalışmalarda sitokinlerinde pankreatik beta hücrelerinde lipid peroksidasyonunu artırdığı gösterilmiştir ²⁹. Lipid

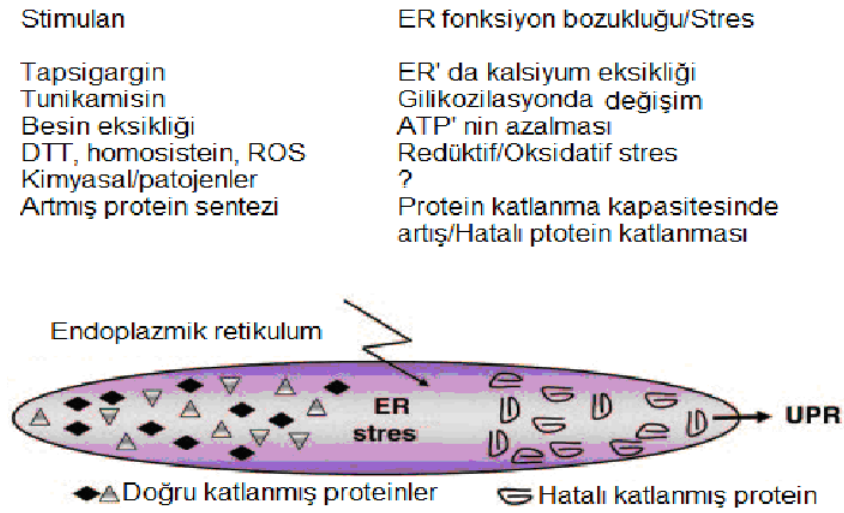
peroksidasyonu sonucu oluşan 4-hidroksinonenal, akrolein ve malondialdehit gibi toksik aldehyitlerinde beta hücre apoptozisinde etkili olabileceği düşünölmektedir ve bu alanda hızla çalışmalar gerçekleştirilmektedir. 4-hidroksinonenal' in beta hücrelerinde toksik etkilesi, bu aldehyit' in beta hücrelerinde glutasyon tüketimine neden olarak hücre ölümlünü artırması ile gösterilmiştir ³⁰.

Böylece apoptotik beta hücre kaybının gerek tip 1 gerekse tip 2 diyabetin patogeneğinde ve ilerleyişinde etkili olduğu bilinmektedir. Burada beta hücre kaybının önlenmesi tedaviye yönelik oldukça anlam ifade etmektedir.

2.2. Endoplazmik retikulum stres

Ökaryotik hücreler çoğu zaman membran ağı veya membran labirentine benzetilen endoplazmik retikulum (ER) sistemine sahiptir ve bu sistem hücrelerin çekirdeğine oldukça yakındır. ER, ökaryotik hücrelerde sentezlenen tüm proteinlerin yaklaşık üçte birinin sentezinden sorumludur. Ayrıca proteinlerin oksidatif katlanmaları, hücre zarı, organel zarları ve diğer hücre kompartmanlarına gönderilmek üzere proteinlerin translasyon sonrası değişimi ER da gerçekleşir. Kalsiyum ve redoks hemostazında bozulma, ksenobiyotik aldehyitlerin artmış düzeyleri, salgı proteinlerinin sentezindeki artış, hatalı katlanmış proteinlerin birikimi, glukoz yoksunluğu, artmış glikozilasyon, gibi birçok stres faktörü hatalı veya katlanmasını tamamlayamamış proteinlerin ER lümeninde birikmesine neden olur.(Şekil:2) Bu durum hücreler için ciddi tehdit oluşturur. Artmış hatalı proteinler ER da sinyal yollarını uyararak birçok diğer sinyal proteinlerinin transkripsiyonel veya translasyonel aktivasyonlarına neden olurlar. ER da ki bu değişim katlanamamış veya hatalı katlanmış proteinlere karşı cevaptır (Unfold protein response; UPR) ^{31, 32}. UPR' un gerçekleşmesinde önemli proteinlerin mekanizması 1990' ların başında

Saccharomyces cerevisiae de yapılan çalışmalarla açıklanmaya başlandı. UPR sinyalinde ve hücrenin hayatta kalmasında etkin ER transmembran protein kinaz/endoribonükleaz (Ire1p/Ern1p) proteini tanımlandı ve UPR sinyali başlatabileceği ortaya konuldu^{33, 34}. Bundan sonraki çalışmalarda bu sinyal yolunun tüm ökaryotlarda korunmuş olduğu gösterilmiş bu çalışmalar paralelinde UPR sinyalin oluşumunda etkin diğer proteinlerde tanımlanmaya başlamıştır.



Şekil 2: Endoplazmik stresi uyaranlar ve endoplazmik retikulumdaki etkisi³¹

Mayalarda tanımlanmış Ire1p sinyal molekülüne karşılık memelilerde inozitole ihtiyaç duyan protein (IRE1α) ve IRE1β olmak üzere iki izoform tanımlanmıştır^{35, 36}. IRE1 proteini ER lümene bakan kısımda N-terminal ER strese hassas domain, transmembran domain ve sitoplazmaya bakan yüzeyde C-terminal endoribonükleaz domain içerir^{34, 37}.

IRE1 proteinine ilave olarak ökaryotlarda UPR sinyali başlatan çift zincirli RNA ile aktive edilen protein kinaz benzeri ER kinaz (PERK) ve faal transkripsiyon faktör 6 (ATF6) olmak üzere iki protein daha tanımlanmıştır.

PERK; ER lümenine bakan kısımda strese duyarlı domain, luminal domain ve stoplazmaya bakan kısımda ökaryotik translasyona başlama faktörü 2 alfayı (eIF2 α) fosforilleyebilen domain içerir³⁸.

ATF 6; ER lümenine bakan kısımda C-terminal strese duyarlı domain, sitoplazma da ise N-terminal lizin fermuar içeren ve bir transkripsiyon faktörü gibi davranan proteindir³⁹. İlk zamanlar asıl anlaşılmayan mekanizma artmış hatalı protein katlanmasına karşı ER zarında bulunan bu üç mekanizmanın nasıl harekete geçtiğidir.

Peptit bağımlı ATPaz olarak tanımlanmış GRP78 bu üç mekanizmanın harekete geçirilmesinde etkin rol alır. Isı şok protein 70 ailesine mensup GRP78 stres olmayan koşullarda her üç sinyal molekülüne bağlıdır ve bağlı durumda IRE1, PERK ve ATF6'nın aktivasyonunu engeller. Stres durumunda GRP78'in IRE1 ve PERK'den ayrılması bu proteinlerin dimerizasyon/oligomerizasyonu ve otofosforillenmesine neden olarak aktivasyonlarını sağlar^{40, 41}.

GRP78'in ATF6'dan ayrılması ise ATF6'nın golgiye transferini, golgide kesildikten sonra ise ATF6'nın sitoplazmik domaininin çekirdeğe geçerek transkripsiyonu başlatmasını sağlar.

ER'un bir diğer görevi de hatalı proteinlerin parçalanarak uzaklaştırılmasını sağlamaktır. Bu olaya endoplazmik retikulumla ilişkili protein degradasyonu (ERAD) denir. ER lümeni içerdiği şaperonlar ve protein katlanmasında görevli diğer proteinlerle birlikte oldukça proteini fazla (> 100 mg/ml) bir ortamdır. Artan hatalı katlanmış protein düzeyleri hücre fonksiyonlarını tehdit eder düzeye geldiğinde ER lümeninde bir takım değişimler başlatılır. Bu değişimler hatalı proteinlerle birlikte şaperonların sekestresyonu, enerji kaybı veya ATP tüketimi, redüktan maddelerin tüketimi ve reaktif oksijen radikallerinin oluşumu olarak

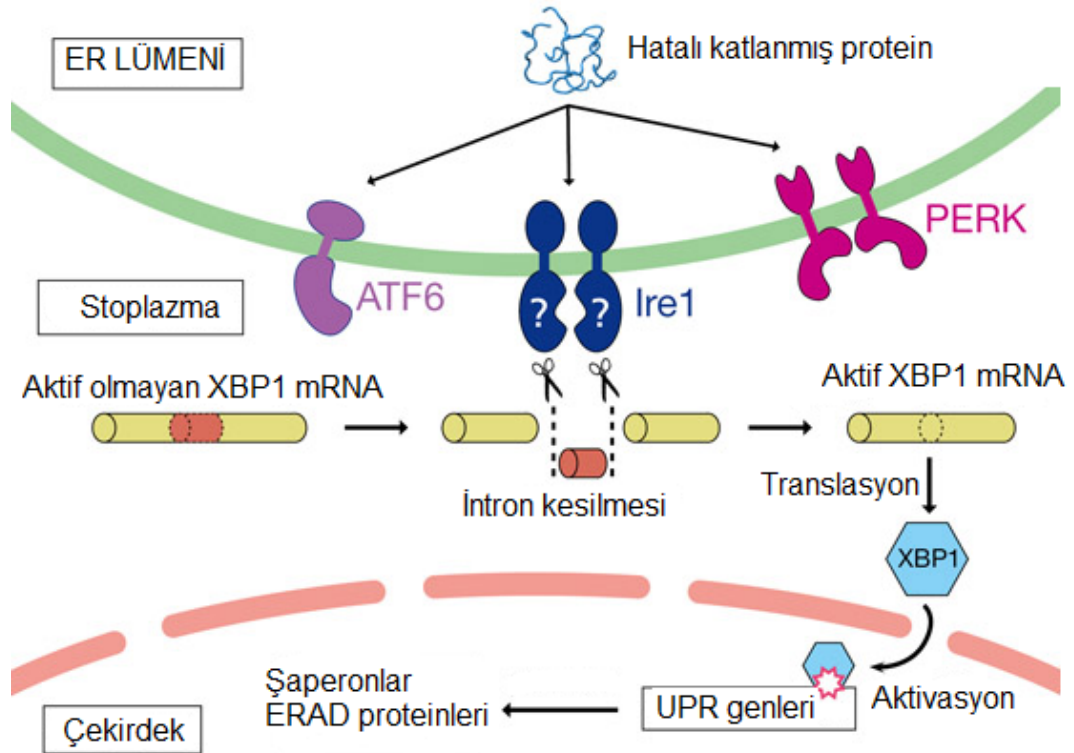
sıralandırılabilir. Burada ER hatalı proteinlerin kanal proteinleri aracılığı ile stoplazmaya gönderilerek ubikutinlenmesini sağlar. Ubikutinlenmiş bu proteinler proteozomlarda yıkılarak hücrenin hayatta kalması sağlanır. ER den sitoplazmaya gönderilen proteinler bazen agregatlar oluştursa da bu agregatlar otofaji ile ortadan kaldırılır. Burada ilginç olan son zamanlarda yapılan çalışma sonuçlarıdır ki, hipergliseminin *invivo* ve *in vitro* çalışmalarda protein agregasyonunu artırdığı ve bu agregasyonunda otofaji bağımlı sistem tarafından temizlenebildiğidir ^{42, 43}.

2.2.1. IRE1 sinyal yolu

Biyokimyasal çalışmaların sonuçlarına göre hücrede stres olmadığı durumda IRE1' in luminal domain' inin GRP78 ile sitokiyometrik kompleks oluşturmuş halde olduğu gösterilmiştir. UPR stres olduğu durumda GRP78 IRE1 den ayrılarak bu proteinin aktivasyonunu uyarır. Aktivasyon IRE1' in oligomerizasyonu ve otofosforilasyonu ile gerçekleşir ⁴⁴. (Şekil 3)

IRE1' in otofosforilasyonu bu proteinin sitoplazmik tarafa bakan yüzeyde endoribonükleaz aktivitesini uyarak X-kutusunda bağlanan protein1' in aktif olmayan mRNA' sından 26 baz çifti kesilip çıkarılmasını sağlar. Böylece olgunlaşmamış halde aktif olmayan XBP1' in translasyona girebilir hale gelmesini sağlar. XBP1 proteini aynı zamanda bir transkripsiyon faktörüdür ⁴⁵. Böylece sitoplazmada hızlıca protein sentezi yapılan XBP1 çekirdek zarını geçerek UPR nin gerçekleştirilmesinde görevli şaperonların, protein katlanmasında görevli enzimlerin, endoplazmik retikulum aracılı protein degradasyonu mekanizmasında görevli EDEM1, EDEM2, EDEM3, Derlin1, Derlin2, Derlin3 ve HRD1 in transkripsiyonunu aktive eder ³². Böylece hatalı hatalı katlanmış proteinlerin ortadan kaldırılmasına veya tamir edilmesine yönelik kullanılacak proteinlerin transkripsiyonu uyarılmış olur.

IRE1' in XBP1 dışında diğer mRNA ları farklı mekanizmalarla substrat olarak kullanıldığı gösterilmiştir. Örneğin; ER lümenine katlanmak üzere transfer edilecek mRNA ları parçalayarak ER stres anında ER lümeninde protein birikmesini engeller. Farmakolojik olarak ER den kalsiyum saliverilmesi artırılarak oluşturulan ER stres de beta hücrelerinde insulin mRNA düzeylerinin azaldığı IRE1 endoribonükleaz aktivitesi ile olabileceği vurgulanmıştır^{32, 46}.



Şekil 3: IRE1 sinyal yolu⁴⁴

IRE1' in hatalı katlanmış protein cevabına karşı uyarılması kronik dozlara ulaştığı zaman, IRE1 diğer sinyal yollarını aktive ederek hücrenin apoptozisinde etkili olur.

2.2.2. PERK sinyal yolu

ER strese acil cevap, protein sentezinin yavaşlatılması ve ER lümeninde protein birikiminin engellenmesidir. Bu işlem hızlıca PERK' in sitoplazmaya bakan kısmında yer alan ökaryotik translasyona başlama faktörü 2 α ' nın fosforillenmesini sağlayan kinaz domain' in uyarılması ile başlatılır. PERK, ER zarında bulunan transmembran proteinidir ve stres olmayan durumlarda GRP78 ile bağlı aktif olmayan formda bulunur. UPR durumunda aktif GRP78 ayrılarak PERK aktif hale geçer ⁴⁷.

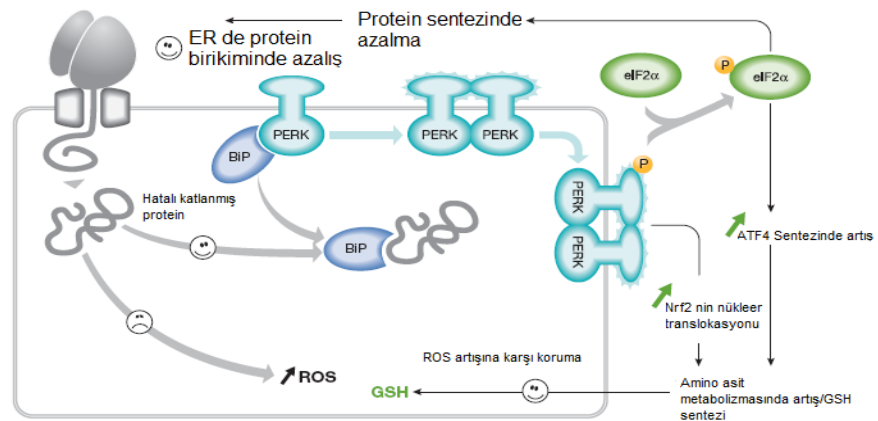
eIF2a metiyonil-tRNA' nın translasyon kompleksinde yer alan ribozoma yönlendirilmesinden sorumludur. GTP bağlı eIF2a aktif durumdadır ve GTP ni GDP ye dönüşümü ile aktif olmayan forma dönüşür. eIF2a' nin aktif olmayan formunda aktif forma dönüşmesi için guanin nükleotidi değiştirici faktör olan eIF2B gereklidir ⁴⁸.

eIF2a' nın fosforilasyonu eIF2B' nin guanin nükleotit değiştirici aktivitesini baskılar ve böylece protein sentezi yavaşlatılır. eIF2a nin fosforillenme bölgesindeki mutasyonlar bu proteinin PERK tarafından fosforillenmesine karşı hassasiyetini azaltmıştır. Bu mutasyonlarda biri fosforillenme bölgesindeki 51. serin aminoasidinin alanine dönüşümü ile oluşturulmuştur ⁴⁹. Homozigot eIF2a^{S51A} doğan farelerde beta hücre hasarı veya eksikliği gözlemlendiği ve bu farelerin 24 saat içerisinde öldüğü rapor edilmiştir. Buna karşın heterozigot doğan farelerin normal görüldüğü ancak aşırı besin alımına karşı hassas oldukları gözlemlenmiştir. Heterozigot farelerin yüksek yağ içerikli diyetle beslendikleri zaman obeziteye eğilimleri olduğu bu durumda enerji metabolizması ile bağlantılı olduğu açıklanmıştır. Bu hayvanlarda bozulmuş glukoz metabolizması, hiperinsulinemi ve hiperleptinemi gözlenmiştir. İzole edilen adacık hücrelerinde ise artmış artmış bazal insulin düzeylerine karşın azalmış glukoz ile uyarılan insulin salgılanması gözlemlenmiştir. Sonuç

olarak yüksek yağ içeren diyet bu hayvanlarda ER stresi artırarak ER lümeninde hatalı katlanmış proinsulin düzeylerini artırmıştır. Burada eIF2α'nın beta hücrelerinin hayatta kalması gerekliliği gösterilmiştir⁵⁰.

Diğer yandan UPR de PERK' in protein sentezini azaltıcı etkisine karşın aktif transkripsiyon faktörü 4 (ATF4) ün protein sentezini artırdığı bilinmektedir. Ayrıca PERK diğer bir transkripsiyon faktörü olan NF-E2 ile ilişkili faktör 2' nin aktivasyonunu sağlar. PERK tarafından uyarılan her iki transkripsiyon faktörü de amino asit metabolizmasını hızlandırarak glutatyon sentezini artırır. İlginç olarak PERK eksik hücrelerde bazı peroksitlerin özellikle de hidrojen peroksit' in ER stres boyunca boyunca biriktiği gözlemlenmiştir. Diğer yandan ATF4 eksik hücrelerin ise sadece glutatyonla desteklenmiş besi yerinde hayatta kalabildikleri gösterilmiştir⁵¹. (Şekil 4)

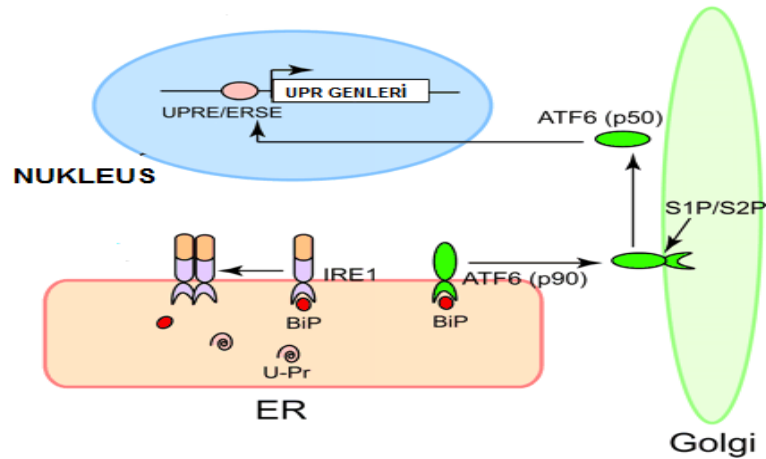
UPR ile uyarılan PERK hücrenin hayatta kalmasını sağlamak için hücrede protein sentezini azaltarak ER lümeninde hatalı katlanmış proteinlerin birikimini engellerken aynı zamanda hatalı katlanan proteinlerin birikiminden kaynaklanan oksidatif stresi azaltmaya çalışır fakat uzun süreli aktivasyonunda ise hücrede ER aracılı apoptozis' in başlatılmasını sağlar.



Şekil 4: PERK sinyal yolu⁵¹.

2.2.3. ATF6 sinyal yolu

Bir transkripsiyon faktörü olan ATF6 hatalı protein katlanmasına karşı ER de stres sinyalini başlatan bir diğer proteindir[39]. ATF6 tamamı 670 amino asit dizisine sahip, 370-380 amino asit lösün fermuar içeren N-terminal stoplazmik domain, 21 amino asit transmembran domain ve 270 amino asit strese hassas lümenal domain içerir. UPR durumunda ATF6' nın N-terminal domaini kesilerek ayrılır ve hücre çekirdeğine geçerek transkripsiyonu uyarır. ATF6 nın lümenal domaini UPR streste uyarıldığı zaman ATF6 ER zarından ayrılarak golgiye taşınır. Golgide ATF6, SP1 ve SP2 proteaz enzimleri tarafından proteolitik kesildikten sonra lösün fermuar içeren aktif stoplazmik domain hücre çekirdeğine geçer. ATF6 hücre çekirdeğinde hatalı proteinlerin tamirinde görev alacak GRP78, GRP94 ve kalneksin proteinlerinin sentezini artırır. Uzun süreli UPR de ATF6 C/EBP homolog protein' in (CHOP) transkripsiyonunu artırarak hücre apoptozisine neden olur⁵². (Şekil 5)



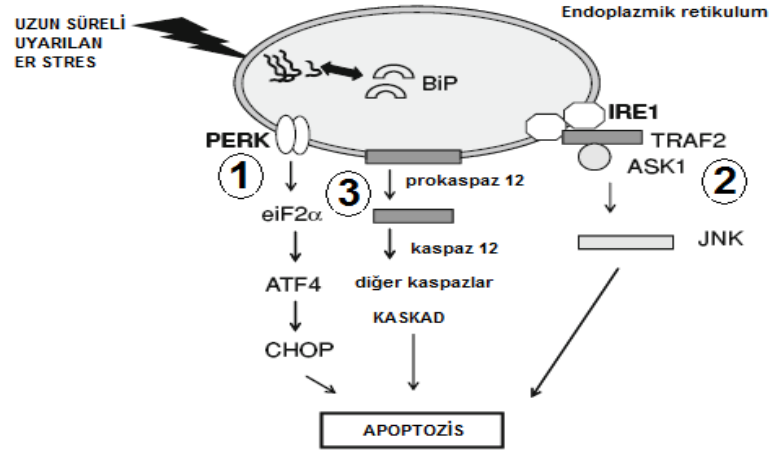
Şekil 5: ATF6 sinyal yolu⁵²

2.3 Endoplazmik retikulum stres ve apoptozis

ER' nin uzun süreli stres normal hücresel fonksiyonların gerekliliği için var olan UPR' yi yetersiz kılar. Bu durumda hücre hızlıca apoptozise yönelir. Apoptozis ile hücre/doku kaybı birçok hastalığın kendini göstermesinde etken mekanizmadır. ER stresle uyarılan apoptotik hücre ölümü iskemik hasarlar, kalp hastalıkları, bazı nörodejeneratif hastalıklar, diyabet ve bipolar hastalıklarla ilişkilendirilmiştir ⁵³.

Apoptozis oldukça karmaşık ve enerji bağımlı bir mekanizmadır. Apoptozis için tanımlanmış iki temel yol vardır. Birincisi hücre zarındaki reseptörlere bağlanan ligandlar tarafından uyarılan dışsal apoptozis, ikincisi ise içsel var olan mitokondriyal apoptozisdir. Radyasyon, toksinler, hipoksi, hipertermi, bazı enfeksiyonlar ve serbest radikaller içsel var olan mitokondriyal apoptozisin uyarılmasında oldukça etkilidir ⁵⁴.

ER membranında yer alan strese duyarlı proteinler direkt apoptozise neden olmasa da diğer proteinleri uyararak apoptotik kaskadı başlatırlar. ER stresin uzun süreli uyarılmasında üç temel mekanizma ile apoptozis kaskadı ilerletilir. Birincisi PERK/eIF2/ATF4 sinyal yolunun uyardığı CHOP proapoptotik yolak, ikincisi IRE1 UPR sinyal yolunun uyardığı apoptozis sinyali düzenleyen kinaz 1 (ASK1)/c-Jun NH2-terminal kinaz (JNK), üçüncü yol ise ER de bulunan kaspaz 12 nin ilerlettiği kaskad sinyal yoludur ⁵⁵.(Şekil 6)



Şekil 6: ER stresin uyardığı apoptozis yolları ⁵⁵

2.3.1. PERK/eIF2/ATF4/CHOP apoptozis sinyal yolağı.

PERK hücrede ER strese cevaben ökaryotik translasyona başlama faktörü 2' nin a alt ünitesini fosforilleyip, protein sentezini azaltarak hücrenin strese adaptasyonunu ve hayatta kalmasını sağlar. Uzun süren ER streste PERK/eIF2 transkripsiyon faktörü ATF4' ün uyarılmasına ve CHOP' un transkripsiyonunun artışına neden olur. CHOP aynı zamanda hücrede DNA hasarındaki artışa bağlı uyarılır. CHOP proapoptotik sinyali, Bcl-2 ailesinin Bax ve Bad gibi proapoptotik proteinlerinin hücrede düzeylerinin artırılması ve bu proteinlerin mitokondriye translokasyonu ile sağlanır ^{56, 57}.

eIF2a nın fosforilasyonu strese cevabın ayarlanmasında oldukça önemlidir. ATF4' ün uyarılmasına bağlı artan CHOP düzeyleri GADD34 proteininin aktivasyonuna neden olur. GADD34; protein fosfataz 1' in (PP1) kofaktörüdür ve eIF2a' nı defosforilasyonuna neden olarak protein sentezini artırır ⁵⁸. Daha önceki çalışmalar GADD34/PP1

Kompleksi ve eIF2a fosforilasyonunu engelleyen selektif inhibitörler ER aracılı apoptozisi engellediği gösterilmiştir ⁵⁹.

2.3.2. IRE1/JNK apoptozis sinyal yolağı.

IRE1, c-jun N-terminal kinaz yolunu aktive ederek hücrede apoptozisi başlatır. IRE1 aynı zamanda PERK/CHOP sinyal yolunun uyarılmasını da sağlar ⁶⁰.

IRE1' in sitoplazmik bileşeni tümör nekrozis faktör reseptörü ile ilişkili faktör 2 (TRAF2) ve JNK' nın fosforillenerek aktif olmasını sağlayan ASK1 ile kompleks halindedir. ASK1, ER stres aracılı apoptoziste proapoptotik sinyalin devamından sorumludur ⁶¹.

JNK fosforillenerek aktive edildiği zaman Bcl-2 ailesi proteinlerini fosforilleyerek aktivitelerini düzenler. Bax ve Bad proteinlerini aktive ederek apoptozisi ilerletir. Bu duruma ek olarak ER stres anında Bax ve Bad proteinlerinin direkt IRE1 proteinine bağlı olduğu, bu durum da UPR ile apoptozis arasında ilişki veya bağlantı olabileceği fikrini pekiştirmektedir ⁶².

Diğer yandan TRAF2' nin kaspaz 12 aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir ⁶³. CHOP ve JNK' nın aktivasyonu, Bcl-2 proteinlerinin düzenlenmesine dolayısıyla Bak/Bad ve kaspaz aracılı apoptozise neden olması esastır.

2.3.3. Kaspaz 12 apoptozis sinyal yolu

Hücrede stres olmadığı koşullarda prokaspaz 12 ER zarında aktif olmayan formda bulunur. Hücrede stres anında kalsiyum bağımlı kalpain kaspaz 12' nin kesilerek aktif forma dönüşümünü sağlar. Aktif

kaspaz 12 sitoplazmaya geçerek prokaspaz 9' un sitokrom c ye gerek olmaksızın aktivasyonunu sağlar. Böylece kaspaz 9 aracılı kaspaz 3'ün de aktivasyonu sağlanır. Bu durumda ayrıca JNK yoluda aktive edilebilir. Kalpain' in ayrıca Bax proteinlerinin proapoptotik aktivitesini de artırdığı gösterilmiştir ^{64, 65}.

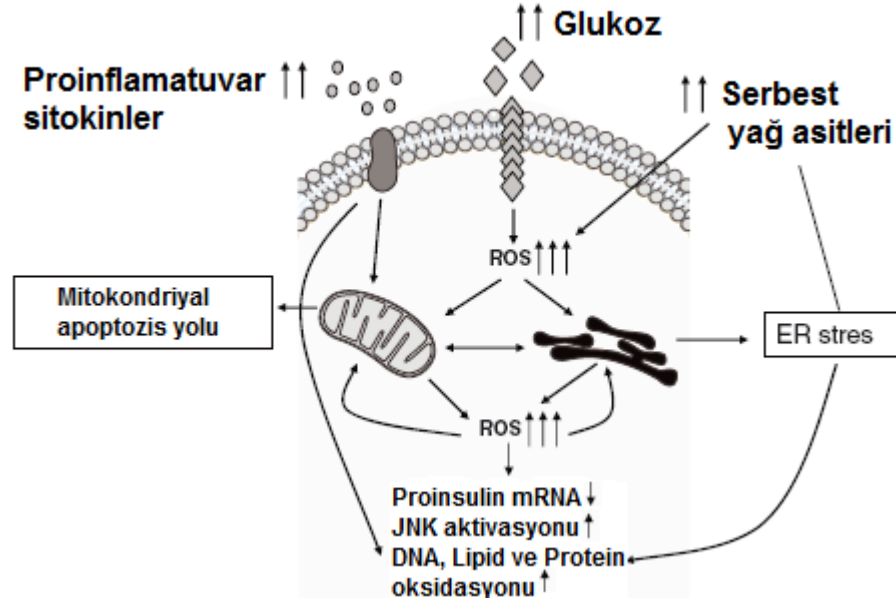
Ayrıca ATF6' nın da kaspaz 12' yi aktive ettiği gösterilmiştir ⁶⁶. ATF6 ayrıca kronik ER streste CHOP aktivasyonuna neden olarak hücre apoptozis' ine katkıda bulunur ⁶⁷.

2.4. ER stres ve pankreatik beta hücresi

Pankreatik beta hücrelerinde metabolik işleyişin fizyolojik düzenlenmesinde oksidatif stres ve ER stres oldukça öneme sahiptir. Beta hücrelerinde IRE1a' nın aktivasyonu ve PERK/eIFa' nın baskılanması, yüksek glukoz konsantrasyonlarında proinsulin biyosentezi için geçiş sürecidir. Bu süreç hiperglisemi ile daha uzun sürede geçilirse beta hücrelerinde fonksiyon bozukluğu veya apoptozise neden olabilir. Aynı zamanda kronik glukoz uygulaması pankreatik beta hücrelerinde IRE1' in sitoplazmik endoribonükleaz aktivitesini uyararak proinsulin' in parçalanmasını sağlamıştır ⁶⁸. Ayrıca kronik glukoz uygulamasının pankreatik beta hücrelerinde JNK aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir ⁶⁹. Yine beta hücrelerinde hiperglisemik ortamın PERK aktivasyonuna bağlı CHOP ve ATF3 düzeylerini artırdığı gösterilmiştir ⁷⁰. Buna ilave olarak tip 2 diyabetik hastalardan alınan pankreas örneklerinde yapılan histopatolojik çalışmalarda aynı belirteçlerin seviyelerinin arttığı gösterilmiştir ⁷¹. Diyabetik db/db farelerin pankreatik adacık hücrelerinde artmış CHOP ekspresyonu, PERK aktivasyonu, artmış eIF2a fosforilasyonu ve ATF4 düzeyleri gösterilmiş ve PERK sinyal yolunun diyabetik sürecin gelişiminde etkili olabileceği vurgulanmıştır ⁷². Hatalı veya doğru katlanmamış protein cevabı çoğu zaman beta hücrelerinde

apoptozise karşı koruyucu mekanizmadır. Diğer yandan beta hücrelerinde UPR ile mTOR sinyal yolu arasındaki ilişkinin gösterilmiş ve bu yolun proinsulin sentezinde etkili olduğu vurgulanmıştır. Daha önceki çalışmalarda mTORC1' in beta hücrelerinde ve farklı diğer dokularda besinlere karşı cevabı kontrol ettiği gösterilmiştir. Glukoz, palmitat ile uyarılan beta hücre hasarına katkıda bulunmuştur. Bu çalışmada mTOR UPR genlerinin aktivasyonunu sağlayarak beta hücrelerini korumuştur. Diğer yandan glukolipotoksisite beta hücrelerinde ER stres ve apoptozisin uyarılmasına katkıda bulunmuştur. Dolayısıyla beta hücrelerinin hayatta kalması veya apoptozise gitmesi bu yollar arasındaki dengeye bağlıdır ⁶⁹.

Son çalışmalar oksidatif stres ve ER stres arasında ki ilişkiyi açıklamaya yöneliktir. Artmış reaktif oksijen radikalleri oksidatif stres' in göstergesi olup ER stresini uyarmaktadır (Şekil 7). Reaktif oksijen radikalleri ve nitrik oksit düzeyleri beta hücre homeostazında oldukça önemlidir. Glukolipotoksisite oluşturulmuş hücrelerde nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS) aktivitesi ve nitrik oksit üretiminde artış saptanmıştır. Diğer yandan NOS inhibisyonunun beta hücre apoptozisini artırdığı gösterilmiştir. Bu bulgu ER stres ile oksidatif stres arasındaki karmaşık etkileşimi göstermektedir. Bu duruma karşın UPR de reaktif oksijen radikallerinin üretildiği bilinmektedir çoğu zaman UPR ye bağlı artan radikal düzeyleri hücre apoptozisinin uyarılmasında etkili olmuştur ⁷³. ER de yer alan Ero1 ve PDT gibi oksidoredüktazlar tiyol disülfid değişim reaksiyonlarında reaktif oksijen radikallerinin üretimine neden olurlar ⁷⁴. Burada reaktif radikallerin üretiminin azaltılması veya üretilen radikallerin antioksidanlar tarafından temizlenmesi beta hücrelerinin hayatta kalmasına katkıda bulunmak için geliştirilecek tedavi yaklaşımı olabilir.



Şekil 7: Pankreatik beta hücresi reaktif oksijen türleri ve ER stres⁷⁵

2.5. 4-hidroksinonenal

Oksidatif stres, serbest radikallerin neden olduğu oksidasyona karşı hassas, hücre zarındaki çoklu doymamış yağ asitleri, proteinler ve nükleik asitler gibi biyomakromoleküllerin yapısında değişime neden olarak hücrelerde hasar oluşturur. Oksidatif stresin en belirgin etkilerinden biride lipit peroksidasyonudur.

Serbest radikaller çoklu doymamış yağ asitlerinden bis-akrilik hidrojen atomunu çıkararak konjuge pentadienil radikalini oluşturur. Böylece lipit peroksidasyonunun zincirleme reaksiyonu başlatılmış olur. Pentaenil radikali hızlıca oksijenle reaksiyona girerek dienil peroksil radikalini oluşturur. Burada peroksil radikali herhangi bir antioksidanla temizlenmez ise, komşu lipit molekülünden hidrojen koparıp kendi yapısına bağlayarak kendisi lipit hidroperokside dönüşürken komşu lipitde zincirleme lipit peroksidasyonu reaksiyonlarını başlatır. Doymamış

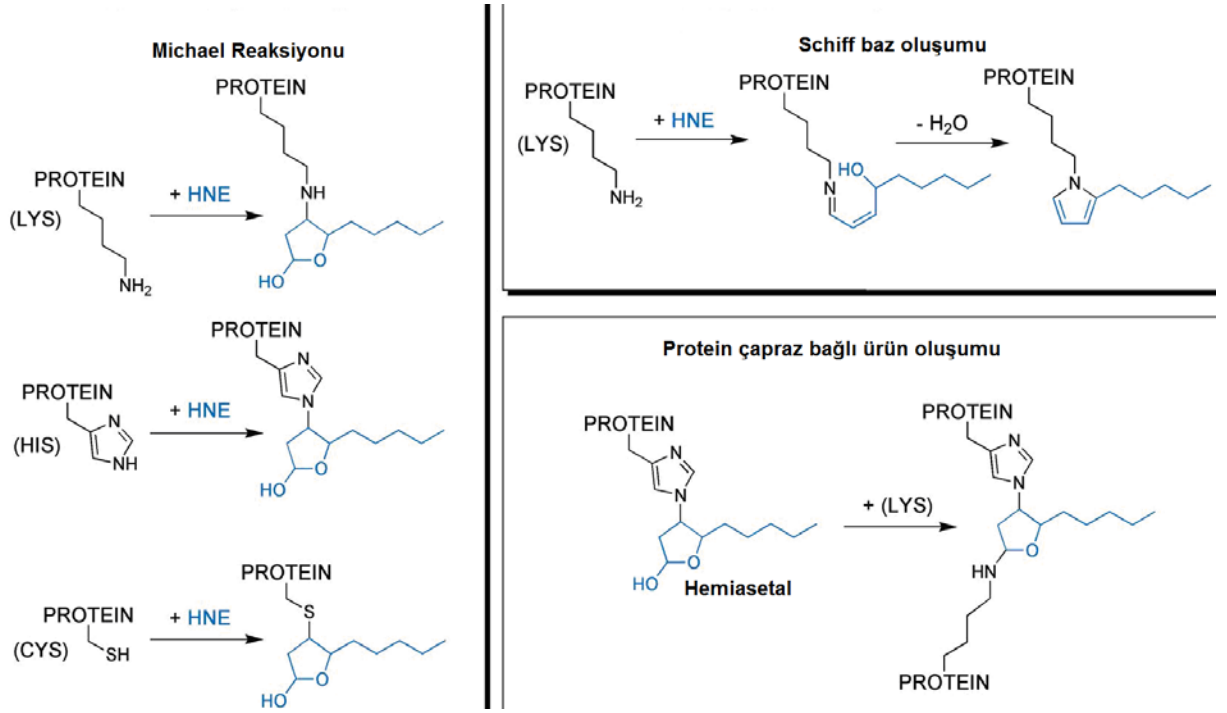
yadıdaki lipid hidroperoksit molekülleri lipid alkoksil radikallerinin üretimine katkıda bulunur. Lipit alkoksil radikalleri okside lipidlerin fragmentasyonuna neden olarak malondialdehit, akrolein, 4-hidroksinonenal, 4-okso-2-nonenal, 2-hidroksialkenaller, enaller gibi toksik ve elektrofilik α - β doymamış aldehytlerin oluşumuna neden olur^{76, 77}. Oksidatif metabolizma sonucu oluşan bu elektrofiller genelde patofizyolojik, toksik ve karsinojenik etkilidirler. Elektrofillerin kimyasal toksikolojisi ise hücre içi nükleofillere kovalent bağlanarak kendini gösterir⁷⁸.

Daha önceki yapılan çalışma sonuçlarına göre lipid aldehytlerinin düşük bazal düzeylerde (μ M) sentezlendiği ve bu seviyelerde sinyal iletiminde görev alabileceği vurgulanmıştır. Ancak uzun süreli oksidatif stres altında kontrol edilemeyen düzeyde artan toksik aldehytler biyolojik moleküllerde istenmeyen modifikasyonlara neden olarak birçok hastalığın başlamasına etken olabilir. 4-hidroksinonenal nükleofilik yapıda olan nükleik asitlerin baz yapılarına bağlanarak çeşitli moleküler değişimlere neden olarak genotoksik etki gösterir. 4-hidroksinonenal' in proteinlere bağlanarak yapı değişimlerine neden olur⁸⁰. (Şekil 8)

4-hidroksinonenal proteinlerin yan zincirinde var olan nükleofilik amino asitlerle reaksiyona girerek stabil ürünler oluşturur. Bu ürünler Michael reaksiyonu ürünleri, schiff baz ürünleri çapraz bağlı protein ürünleri ve glutatyon konjugatları olarak sayılabilir. 4-hidroksinonenal nükleofilik proteinlere bağlanarak bu proteinlerin hatalı katlanmasına ve hasarlı proteinlerin oluşumuna neden olur. 4-hidroksinonenal yapısındaki α - β doymamış karbonil grupları ile nükleofillerle oldukça kolay 1,2- ve 1,4-Michael reaksiyonuna girer. 1,2- Michael reaksiyonu proteinlerin yan zincir amino asitlerinin primer amin grubu ile karbonil grubu arasında reaksiyonla gerçekleşir ve karbonilamin ara ürünü su kaybederek schiff baz ürünlerini oluşturur. Schiff baz oluşumu asidik ortamda gelişir. 4-hidroksinonenal' in

sulu çözeltilerde 1,4- Michael ürünleri baskın iken organik çözelti içersinde schiff baz ürünlerinin varlığı bilinmekte bu durumda schiff baz oluşumunun genelde protein' in hidrofobik mikro çevresinde oluşabileceği fikrini desteklemektedir. Ayrıca amin grupları ile aldehit grupları arasında reaksiyon sonucu hidroksinonenal' in pirol grupları ile oluşturduğu çapraz bağlı ürünleri ortaya çıkar. 1,4- Michael reaksiyonu aldehit' in C3 karbonu ile nükleofil arasında gerçekleşir. Böylece nükleofillerin toksik aldehit yapıya eklenmesi gerçekleşir. Bu arada proton hidroksinonenalde karbon=karbon (C=C) çift bağ içeren yapıya katılır. Başlangıç ürünü enolattır. Bu ürün hızla taotomerizm göstererek keto forma dönüşür. Bu değişim C2 karbanion protonlenması ile devam eder. Burada 1,4- Michael reaksiyonu genelde proteinlerin sistein, histidin ve lizin amino asitleri hidroksinonenal arasında gerçekleşir. 4-hidroksialkenallerin Michael reaksiyonu sonucu C=C (C2=C3) oluşumu içermez. 4-hidroksil grubunun aldehit ile reaksiyonu sonucu hızla siklik hemiasetal (laktol) oluşumu gözlenir. Sulu çözeltilerde glutatyon ile konjugat ürünleri % 95 laktol ürünlerine dönüşümü sağlar. Aldehit grubu ile amin grubu arasındaki reaksiyon sonucu çapraz bağlı proteinlerin açığa çıktığı da bilinmektedir.

Protein amino asit yan zincirlerinin 4-hidroksinonenal ile reaksiyonunda sistein>histidin>lizin şeklinde reaktiviteleri bilinmektedir. Bu da tiyol gruplarının hidroksinonenal' e karşı reaktivitesinin yüksek olduğunu gösterir. 4-hidroksinonenal ile glutatyon arasındaki reaksiyonun hız sabiti pH:7.4 de $1.3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Bu da hidroksinonenal' in fizyolojik glutatyon konsantrasyonu varlığında (5 mM), 2 dakika yarı ömrünün olabileceğini gösterir. Böylece sulu ortamda hidroksinonenal' in çoğunun tiyol-bağlı olabileceğinin anlaşılması sağlanır. Ayrıca hidroksinonenal' in tiyol konjugatı oldukça az stabiliteye sahiptir. Buna karşın histidin-hidroksinonenal konjugatı sistein ve lizin konjugatına göre daha stabildir ⁷⁸.



Şekil 8: 4-hidroksinonenal' in proteinlerin amino asit yan zincirleri ile reaksiyonları⁸⁰

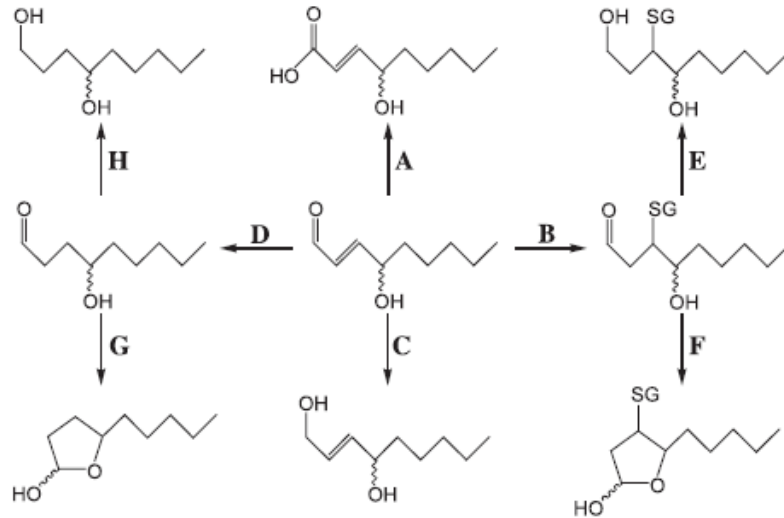
4-hidroksinonenal hücrede enzimatik reaksiyonlar sonucu oksido/redüksiyona uğrayarak veya glutatyonla konjugat oluşturarak hücrede daha az toksik veya reaktivitesi çok daha düşük ürünlere dönüştürülerek detoksifiye edilmeye çalışılır ⁷⁸. (Şekil 9) 4-hidroksinonenal mitokondriyal aldehit dehidrogenaz (ADH2) tarafından NAD-bağımlı oksidasyon ile 4-hidroksinon-2-enoik asit' e dönüştürülür. Bu ürün Michael reaksiyonuna katılamaz ve 4-hidroksinonenal' e göre reaktivitesi oldukça düşüktür. Ayrıca 4- hidroksinonenal birkaç enzim tarafından indirgenerek daha düşük reaktiviteye sahip ürünlere dönüştürülür. Aldehit redüktaz (AKR1A1), aldoz redüktaz (AKR1B1) ve AKR1C alt enzim ailesi enzimleri NADPH-bağımlı indirgenme reaksiyonu ile 4-hidroksinonenal' in aktif olmayan 1,4-dihidroksi-2-nonene formuna dönüşümünü sağlar.

Glutatyon 4-hidroksinonenal ile Michael reaksiyonuna girer ve bu reaksiyon glutatyon-S-transferaz tarafından katalizlenir. 4-

hidroksinonenal' in glutatyonla enzimatik olmayan reaksiyonuna kıyasla, glutatyon-S-transferaz bu reaksiyonu yaklaşık 600 kat hızlandırır.

Son yıllarda yapılan çalışmalara göre 4-hidroksinonenal' in yapısındaki C=C bağı alkenal/one oksidoredüktaz tarafından indirgenerek 4-hidroksinonanal' e dönüştürülür. 4- hidroksinonanal ise hızla laktol formuna dönüşür ve böylece serbest aldehit grubu kapatılmış olur.

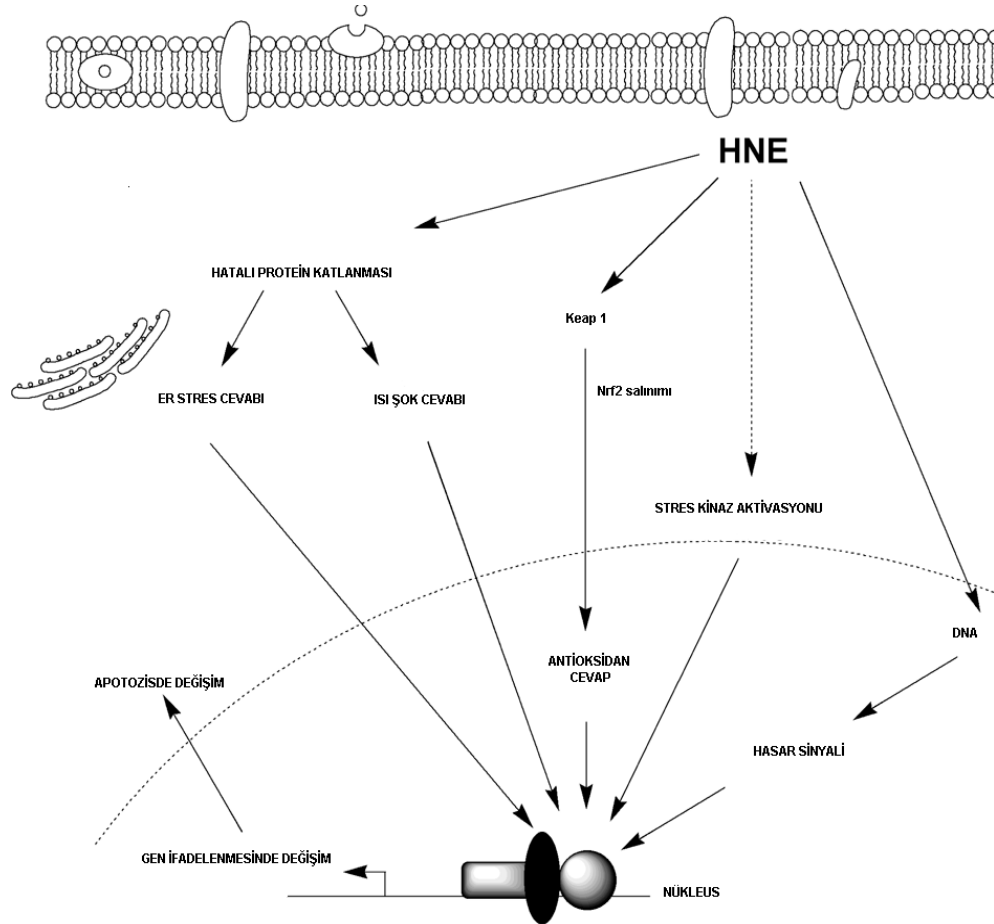
Bir diğer önemli nokta son yıllarda yapılan çalışmalar hücrede 4-hidroksinonenal' in çoğunun glutatyon konjugatı şeklinde saf dışı bırakıldığını göstermektedir. Böylece 4-hidroksinonenal-HNE konjugatı da MRP2 ve RLIP76 gibi hücre zarı transport proteini ile hücre dışına atılarak uzaklaştırılır ⁷⁹.



Şekil 9: 4-hidroksinonenal' in biyotransformasyonunu gösteren reaksiyonlar (A) 4-hidroksinonenal' in ADH2 ile oksidasyonu, (B) 4-hidroksinonenal' in kendiliğinden veya GST aracılı glutatyon ile konjugasyonu, (C) 4-hidroksinonenal' in enzimatik indirgenmesi ile 4-dihidroksi-2-nonenal dönüşümü, (D) Alkenal/one oksidoredüktaz tarafından 4-hidroksinonenal de C=C bağının indirgenmesi, (E) Aldoz redüktaz tarafında GSH-HNE' nin indirgenmesi, (F) Kendiliğinden hemiasetal oluşumu, (G) Kendiliğinden laktol oluşumu, (H) 4-hidroksinonenal' in indirgenmesi ⁷⁸

2.5.1. 4-hidroksi-2-nonenal ve ER stres

4-hidroksinonenal hücrede protein hasarını ve hatalı katlanmasını artırarak ER stresi başlatabilir^[80]. (Şekil 10)



Şekil 10: 4-hidroksinonenal ve ER stres ilişkisi⁸⁰

4-hidroksinonenal' in ER stres üzerine etkisi ile ilgili çok fazlaca çalışma olmasa da, West ve arkadaşları RKO kolorektal karsinoma hücrelerinde 4-hidroksinonenal' in protein hasarına bağlı ER stresi uyardığını göstermişlerdir. Burada hipotez olarak 4-hidroksinonenal' in hücre içi redoks dengesini değiştirdiği, bu değişimle birlikte protein hasarı geliştiği ve bu değişimin ER stres de dahil olmak üzere birkaç hücre içi sinyal yolunu uyardığı fikri ortaya atılmıştır. Aynı çalışmada 60 μ M 4-hidroksinonenal uygulamasının hücrelerde gen ifadenmesi üzerine etkisi mikro array çalışması ile ölçülmüştür⁸⁰.

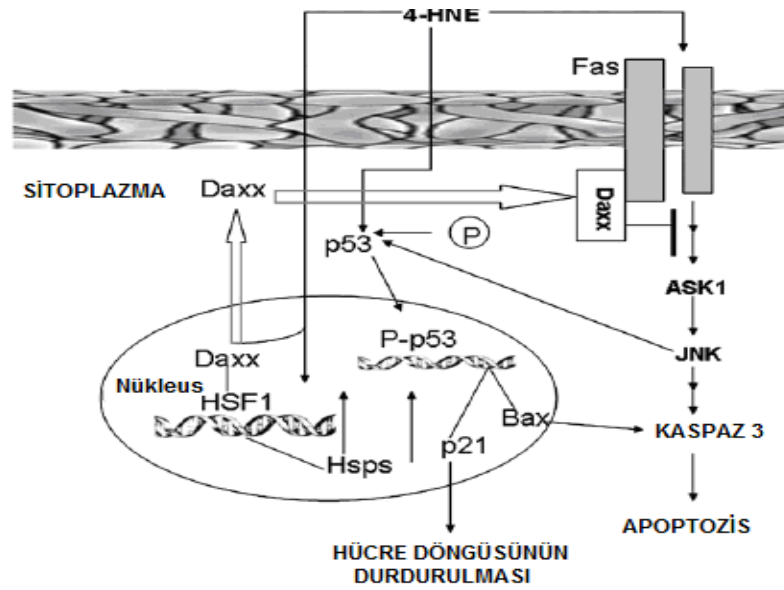
Diğer bir çalışmada alkolik karaciğer hasarı oluşturulan sıçanlarda lipit peroksidasyonu sonucu oluşan 4-hidroksinonenal' in ısı şok protein 70 (Hsp70), Hsp90, Erk 1/2, Prx6 gibi hücresel proteinlere etki etmiş, bu proteinlerin hasarı hücrede, ATPaz protein katlanması ve aktivitesinde bozulma, hatalı disülfid köprüsü oluşmuş proteinlerin tamirinde fonksiyon bozuklukları, karaciğer hücrelerinin yenilenmesinde etkin Erk 1/2 proteininde baskılanmaya neden olmuştur. Aynı çalışmada Hsp70 ve Hsp90 proteinlerindeki değişimin ER stresi başlatabileceği fikri ortaya atılmıştır ⁸¹.

HMEC-1 insan epitelyal hücreleri ile yapılan aterosklerozis modellemesinde 4-hidroksinonenal 20 µM konsantrasyonda hücrelerde ER stres proteinlerini uyarmış, Ire1α ve eIF2α' nın fosforilasyonunu artırmıştır. Burada kullanılan 4-hidroksinonenal konsantrasyonu düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonu sonucu oluşan 4-hidroksinonenal konsantrasyonu ile aynıdır. Aynı çalışmada 4-hidroksinonenal hücresel proteinlerin serbest amino grupları ve tiyol gruplarında değişime neden olarak protein hasarı oluşturmuştur ⁸².

Keith ve arkadaşları çalışmalarında vasküler düz kas ve umbilikal epitelyum hücrelerinde 4-hidroksinonenal' in ER stresi uyardığı ve UPR de görevli proteinlerin fosforilasyonunu artırdığı gösterilmiştir. Toksik aldehytlerin kalp dokusunda protein hasarına bağlı ER stresi artırdığı, bu durumda kardiyak iskemi-reperfüzyonun patogenezinde etkili olabileceği fikri aynı çalışmada ortaya atılmıştır ⁸³.

2.5.2. 4-hidroksinonenal ve apoptozis

1980 lerin başınsa 4-hidroksinonenal' in hücre büyümesi ve farklılaşması üzerine etkileri yayınlanırken, daha sonraki çalışmalarda 4-hidroksinonenal' in apoptotik etkisi, hücre büyümesi ve farklılaşması üzerine etkilerine ilave edildi ⁸⁴. 4-hidroksinonenal fizyolojik konsantrasyonlarda hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde, çeşitli metabolik yolların aktivasyonunda, ve bazı genlerin ifadelene değişimine neden olarak hücre içi sinyal molekülü olarak davranır. Ancak fizyolojik doz aşımında hücrelerde toksiktir ve apoptozisin başlatılmasında ve ilerleyişinde etkilidir (Şekil 11).



Şekil 11: 4-hidroksinonenal ve apoptozis ilişkisi ⁸⁴

4-hidroksinonenal' in doz bağımlı tüm vücuttaki etkisi tam olarak açık değildir. Çünkü çalışmalar genellikle hücre kültürü deneyleri ile sınırlı kalmıştır. Sağlıklı insan plazmasında 0.3-0.7 μ M 4-hidroksinonenal ölçülmüştür. Ancak oksidatif stres durumunda bu seviye 10 kat kadar artmıştır ⁸⁵.

4-hidroksinonenal hücrede membran reseptör proteinleri ile ilişkilidir. 4-hidroksinonenal hücre zarında endotelial büyüme faktörü (EGFR) trozin kinaz domain' ine bağlanarak EGFR-Sch-ERK kaskadınının aktivasyonunu engeller. Aynı zamanda 4-hidroksinonenal hücre içi glutatyon deposunun tüketilmesine neden olarak proapoptotik sinyali başlatır. Bu sinyal Fas bağımsız kaspaz 8, kaspaz 9 ve kaspaz 3 proteinlerinin aktivasyonu ile sağlanır. 4-hidroksinonenal hücrede kapsaz kaskadını başlatırken aynı zamanda anti-apoptotik proteinlerinde baskılanmasına neden olur. 4-hidroksinonenal sadece hücre membran reseptörleri ile ilişkili değildir aynı zamanda apoptozisin düzenlenmesinde ve ilerleyişinde görev alan diğer proteinlerle de ilişkilidir ⁸⁶.

4-hidroksinonenal yüksek konsantrasyonlarda hücre farklılaşması ve apoptozisde etkili olmuştur. Kimi zaman bu etkisini, adenilat siklaz, JNK, protein kinaz C, ve kaspaz 3 ile ilgili sinyal yollarını etkileyerek gerçekleştirmiştir. Bununla birlikte düşük dozlar da aortik düz kas hücreleri ve eritroblastoid lösemi hücrelerinde proliferasyonu artırmıştır. Bu durumda 4-hidroksinonenal için oldukça dar fizyolojik konsantrasyon değeri belirlenmiş ve bu değer aşıldığı zaman hücre farklılaşması ve apoptozisin gerçekleştiği vurgulanmıştır. Düşük dozlarda proliferasyonu artırıcı etkisi 4-hidroksinonenal' in glutatyon-S-transferaz tarafından toksik etkisinin bertaraf edilerek gerçekleştiği savunulmuştur ⁸⁷.

K562 (insan miyeloid lösemi) hücrelerinde 1-10 μ M konsantrasyonda 4-hidroksinonenal hücre büyümesi ve farklılaşmasını baskılamıştır. Yine aynı doz 4-hidroksinonenal uygulaması HL 60 (promiyositik lösemi) hücrelerinde hücre proliferasyonunu baskılamıştır. 4-hidroksinonenal' in bu etkisi hücre tipine bağlı olarak değişkendir ⁸⁸.

4-hidroksinonenal'in etkisinin bertaraf edilmesi çoğunlukla glutatyon-S-transferaz aktivitesine bağlıdır. Hücrede GST aktivitesi veya

HNE-GSH konjugatının hücre dışına atılmasında etken hücre zarı transport proteinleri baskılandığında hücrede 4-hidroksinonenal' in apoptozise neden olduğu gösterilmiştir ⁸⁹.

4-hidroksinonenal kortikal nöronlarda aktivatör protein 1' in DNA ya bağlanmasını artırarak apoptozisi hızlandırmıştır. Aynı çalışmada 4-hidroksinonenal JNK fosforolasyonunda artış, kalsiyumun mitokondriye girişinin baskılanmasına bağlı membran potansiyelinde bozulma ve kaspaz aktivasyonuna neden olmuştur. Burada 4-hidroksinonenal transkripsiyon düzeyinde değişime neden olarak hücre ölümünü etkilemiştir. Böylece gerek sağlıklı gerekse nörodejeneratif hücrelerde 4-hidroksinonenal' in apoptozis üzerine etkisi hücre içi düzeyine bağlıdır ⁹⁰.

4-hidroksinonenal 10 µM dozda insan lenfoblastik lösemi hücrelerinde apoptozisi uyarırken ilginç olarak sağlıklı lökositlerde apoptozis ancak 15 kat yüksek konsantrasyonda apoptozisi uyarmıştır. Burada 4-hidroksinonenal kaspaz 2, kaspaz 3 ve kaspaz 8 aktivasyonuna bağlı olarak apoptozisi uyarmıştır. Kaspaz 2 başlangıçta yer alan kaspazdır, gerek direkt gerekse kaspaz 8 aracılı kaspaz 3' ün uyarılmasında etkili proteindir ⁹¹.

Diğer yandan hücrede apoptozisin uyarılması c-myc ifadenmesinin artışıyla, bazı hücreler de ise azalışına bağlıdır. 4-hidroksinonenal lenfoblastik hücrelerde c-myc ifadenmesini azaltmıştır. Aynı çalışmada kaspaz kaskadı başlamış ve hücreler apoptozise yönelmiştir. Bu da 4-hidroksinonenal' in c-myc aracılı pro-apoptotik etkisini ortaya koymuştur. Aynı konsantrasyonda 4-hidroksinonenal' in monositlerde apoptozise neden olmadığı gösterilmiştir. Böylece 4-hidroksinonenal' in lösemide kemoteröpatik olarak kullanılabileceği fikri ortaya atılmıştır. 4-hidroksinonenal ayrıca HL 60 hücrelerinde c-myc ve c-myb genlerinde değişime neden olarak bu hücrelerde hücre döngüsünü

yavaşlatmıştır. Ayrıca hücre döngüsü ile ilişkili proteinler siklin, siklin bağımlı kinaz ve kinazların inhibitörleri 4- hidroksinonenal' den etkilenmiştir. 4-hidroksinonenal birçok tümör hücre hattında hücre bölünmesini engellemiş ve apoptozisi artırmıştır⁹².

Osteosarkoma hücrelerinde 24 saat içersinde sitokrom c salınımını artırmış ve kaspaz kaskadını uyararak apoptozise neden olmuştur⁹³.

PPAR-B/δ reseptör süper ailesinin ligandları birçok hücrede apoptozise neden olur. 4-hidroksinonenal PPAR-B/δ reseptör ligandlarına benzer etki göstermiştir⁹⁴.

4-hidroksinonenal mitojen ile aktive edilen protein kinaz sistemini uyararak aktivatör protein 1 ' in (AP 1) DNA ya bağlanmasını uyarır. Aynı zamanda 4-hidroksinonenal JNK sinyal yolu ile de AP1' in uyarılmasını sağlar⁹⁵.

4-hidroksinonenal' in apoptozis üzerine etkisi çoğunlukla tümör hücreleri üzerinde çalışılmışken sağlıklı hücrelerle çalışmalar her geçen gün artmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim dalı araştırma laboratuvarı ve hücre kültürü çalışmaları için Tıbbi Farmakoloji laboratuvarının imkanları kullanılarak tamamlanmıştır. Çalışma Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (01/2010-52) tarafından desteklenmiştir.

Çalışmada kullanılan rat pankreatik beta hücre (INS-1) hattı İsviçre Geneva Üniversitesi Tıp Fakültesi Hücre fizyolojisi ve metabolizması laboratuvarından (Pierre Maechler PhD.) gönderilmiştir.

Hücreler 37 °C sıcaklıkta, % 5 karbondioksit içeren steril inkübatörde kültüre edildi. Hücreler; 30 dakika 55 °C sıcaklıkta ısıl işlemle inaktive edilmiş % 10 fetal sığır serum (Gibco, Invitrogen), 100 U/mL penisilin (Gibco, Invitrogen), 100 µg/mL streptomisin (Gibco, Invitrogen), 2 mM glutamin (Gibco, Invitrogen), 1 mM sodyum pürivat (Gibco, Invitrogen), 10 mM HEPES (Gibco, Invitrogen), 50 µM 2-merkaptoetanol (Sigma Aldrich) içeren RPMI-1640 (Gibco, Invitrogen) besiyerinde kültüre edildi. Hücreler 25 cm² kültür kabında kültüre edildi ve 0.25% Trypsin/EDTA (Gibco, Invitrogen) yardımıyla kültür kabı tabanından koparılıp bir başka kültür kabına pasajlandı. Tüm deneyler pasaj numarası 54-60 arası hücrelerde tamamlandı.

3.1. Deneylerde kullanılan cihazlar

Hermle z 323 K soğutmalı santrifüj

Edmund Bühler KL-2 çalkalayıcı

Bandelin sonopuls sonikatör

Biorad protean tetra cell elektroforez tankı

Biorad protean tetra blotting modülü

Biorad powerpac universal güç kaynağı

Sanyo karbondioksitli inkübatör

Nüve steril kabin
Molecular devices M3 mikrolaka okuyucu
Biotek ELX 50 mikrolaka yıkayıcı
Sanyo -80 °C derin dondurucu
Vorteks (Heidolf Reax 200)
pH metre (Jenway)
Hassas terazi (Schimadzu, Libror, AEG 220)

3.2 Deneyler

3.2.1. 4-Hidroksinonenal'in sitotoksik etkisinin MTT ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) deneyi ile ölçümü

MTT deneyi canlı hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri sonucu sarı renkli ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)' in indirgenerek mor formazan kristaline dönüştürülmesi prensibine dayanır. 4-hidroksinonenal'in sitotoksik etkisi Janjic ve arkadaşlarının tarif ettiği yöntemle göre ölçüldü. 96 kuyucuklu kültür kabına kuyucuk başına 30.000 hücre 200 µl RPMI-1640 besiyeri içerisinde ekildi. Hücrelerin kültür kabı tabanına tutunmaları için 24 saat karbondioksitli steril etüvde inkübe edildi. 24 saat sonunda kuyucuklardaki besi yeri atıldı ve 0, 1, 5, 10, 25, 50 µmol/L konsantrasyonlarda 4-hidroksinonenal içeren besiyeri eklendi. 4-hidroksinonenal içeren besi yeri (Fenol kırmızısı içermeyen RPMI-1640) ile hücreler 1 saat inkübe edildi. 1 saat sonunda 4-hidroksinonenal içeren besi yeri atıldı ve fenol kırmızısı içermeyen taze besiyeri (4-hidroksinonenal içermeyen) eklendi. Taze besi yeri eklendikten hemen sonra 10 µl MTT solüsyonu (5 mg/ml distile suda çözüldü.) kuyucuklara pipetlendi ve 4 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda oluşan formazan kristalleri besiyeri atıldıktan sonra 100 µl dimetilsülfoksit eklenerek çözünür hale getirildi. Kuyucuklarda oluşan mor rengin optik yoğunluğu 570 nm de mikrolaka okuyucuda ölçüldü ⁹⁶.

3.2.2. 4-Hidroksinonenal' in insulin saliverilmesi üzerine etkisinin ELISA yöntemi ile ölçümü

24 kuyucuklu kültür kabına kuyucuk başına 500.000 hücre 200 µl RPMI-1640 besiyeri içersinde ekildi. Hücrelerin kültür kabı tabanına tutunmaları için 24 saat karbondioksitli steril etüvde inkübe edildi. 24 saat sonunda kuyucuklardaki besi yeri atıldı ve 0, 1, 25, 50 µmol/L konsantrasyonlarda 4-hidroksinonenal içeren steril KREBS solüsyonu (115 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 1.2 mM MgCl₂, 1.2 mM NaH₂PO₄, 1.2 mM Na₂SO₄, 2.5 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃, pH 7.4) eklendi. 4-hidroksinonenal içeren KREBS solüsyonu ile hücreler 1 saat inkübe edildi. 1 saat sonunda 4-hidroksinonenal içeren KREBS solüsyonu kuyucuklardan atıldı ve yerine bazal insulin saliverilmesi için 2.8 mmol/L glukoz içeren, indüklenmiş insulin saliverilmesini sağlamak için ise 16.7 mmol/L glukoz içeren KREBS solüyonları kuyucuklara eklendi ve 2 saat insulin saliverilmesi için inkübe edildi. Süre sonunda üst sıvılar toplandı. 100 kat KREBS solüsyonunda dilue edilen üst sıvılarda insulin düzeyleri ELISA kiti (Millipore Insulin ELISA kit) kullanılarak ölçüldü.

3.2.3. 4-Hidroksinonenal' in detoksifikasyon enzimleri, endoplazmik retikulum stres ve apoptozisle ilişkili proteinler üzerine etkisinin Western blot yöntemi ile ölçümü

Pankreatik beta hücreleri, 2.000.000 hücre 25 cm² hücre kültür kabına 5 ml RPMI-1640 besiyeri içersinde ekildi. Hücrelerin kültür kabı tabanına tutunmaları için 24 saat karbondioksitli steril etüvde inkübe edildi. 24 saat sonunda kültür kaplarındaki besi yeri atıldı ve 0, 1, 25, 50 µmol/L konsantrasyonlarda 4-hidroksinonenal içeren besiyeri eklendi. 4-hidroksinonenal içeren besi yeri (Fenol kırmızısı içermeyen RPMI-1640) ile hücreler 1 saat inkübe edildi. 1 saat sonunda besi yeri atıldı ve protein izolasyonu için kültür kabına 500 ml proteaz inhibitör (Santa cruz tablet)

karışımı ve protein fosfataz inhibitörü (Roche tablet, USA) karışımı içeren hücre lizis solüsyonu eklendi. Lizis tamponu ile hücreler kazıyıcı yardımı ile toplandı. 5 dakika buz üzerinde bekletilen hücreler 20 saniye sonike edildikten sonra 10000 rpm +4 °C de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatanda BCA (Bisinkoninik asit, Pierce) protein tayin kiti kullanılarak protein miktarı ölçüldü.

Protein örnekleri yükleme tamponu içersinde 5 dakika kaynatıldıktan sonra kuyucuklarda 35 µg protein olacak şekilde % 5 paketleyici, % 12 ayırıcı sodyum dedosil sülfat içeren poliakrilamid jele yüklenerek 200 volt da yaklaşık 60-75 dk elektroforez edildi. Elektroforez ile moleküler ağırlıklarına göre ayrılan proteinler 90 dakika 200 mAmp sabit akıma tabi tutulup % 20 metanol içeren transfer tampon içersinde PVDF (0.22 µm Poliviniliden florid) membrana transfer edildi.

Membran bloklama solüsyonu ile 1 saat çalkalayıcıda inkübe edildi. Süt tozu ile bloklama işlemi tamamlanan membran 3 kez 10 dakika TBST ile yıkandıktan sonra 10 ml primer antikor ile gece boyu +4 °C de inkübasyona bırakıldı.

Primer antikorla immün işaretlenen membranlar 3 kez TBST ile yıkandıktan sonra 2 saat oda sıcaklığında 10 ml HRP (Horse radish peroksidaz) işaretli sekonder antikorla inkübasyona bırakıldı.

Sekonder işaretlemeden sonra membran 2 kez TBST 1 kez TBS ile yıkandıktan sonra 10 ml ECL (Kemiluminesans reaktif) içersine atıldı ve membrandan gelen sinyaller mavi tabanlı X-ray filme yakılıp developer ve fiksatif çözeltilerinde banyo edilerek görünür hale getirildi.

3.2.3.1. Western blot yönteminde kullanılan reaktifler

Hücre lizis solüsyonu: 50mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 1% NP40, 0.25% Na-deoksikolat

3X Yükleme tamponu: 2.4 ml 1M Tris-HCl, 3 ml % 20 SDS, 3 ml Gliserol, 1.6 ml β -merkaptoetanol, 0.006 Bromofenol mavisi toplam hacim 10 ml olacak şekilde hazırlandı.

%5 lük paketleyici jel: Distile su, % 30 Akrilamid/bisakrilamid karışımı (29/1), 1 M Tris HCl pH:6.8, % 10 Sodyum dedosil sülfat (SDS), % 10 Amonyum persülfat (APS), TEMED (Tetrametiletildiamid) Tablo 1.

Tablo 1: % 5 Paketleyici jel için kullunılan reaktifler ve miktarları

% 5 Paketleyici Jel	Toplam 4 ml	Toplam 5 ml	Toplam 6 ml
Distile su	2.7 ml	3.4 ml	4.1 ml
% 30 Akrilamid karışımı	0.67 ml	0.83 ml	1 ml
1.0 M Tris-HCl pH:6.8	0.5 ml	0.63 ml	0.75 ml
% 10 SDS	0.04 ml	0.05 ml	0.06 ml
% 10 APS	0.04 ml	0.05 ml	0.06 ml
TEMED	0.004 ml	0.005 ml	0.006 ml

%12 lik ayırıcı jel: Distile su, % 30 Akrilamid/bisakrilamid karışımı (29/1), 1.5 M Tris HCl pH:8.8, % 10 Sodyum dedosil sülfat, % 10 Amonyum persülfat, TEMED (Tetrametiletildiamid) Tablo 2.

Tablo 2: % 12 ayırıcı jel için kullunılan reaktifler ve miktarları

% 12 Ayırıcı Jel	Toplam 10 ml	Toplam 15 ml	Toplam 20 ml
Distile su	3.3 ml	5 ml	6.6 ml
% 30 Akrilamid karışımı	4 ml	6 ml	8 ml
1.5 M Tris-HCl pH:8.8	2.5 ml	3.8 ml	5 ml
% 10 SDS	0.1 ml	0.15 ml	0.2 ml
% 10 APS	0.1 ml	0.15 ml	0.2 ml
TEMED	0.004 ml	0.006 ml	0.008 ml

Elektroforez yürütme tamponu: 30 gr Tris baz, 144 gr Glisin, 10 gr Sodyum dedosil sülfat tartılıp pH: 8.3 ayarlandıktan sonra 1 litreye distile su ile tamamlandı.

Transfer tamponu: Sodyum dedosil sülfat içermeyen, %20 metanol içeren elektroforez yürütme tamponu

TBS: 50 mM Tris, 150 mM NaCl pH: 7.4

TBST: % 0.1 Tween 20 içeren TBS

Bloklama solüsyonu: % 3 yağsız süt tozu (Pierce) içeren TBST

3.2.3.2. Western blot yönteminde kullanılan primer ve sekonder antikorların dilüsyonları

Hücrelerde protein ifadenme düzeyleri ölçülürken western blot yönteminde kullanılan antikorlar ve dilisyonları Tablo 3' de verilmiştir.

Tablo 3: Western blot yönteminde kullanılan antikorlar ve dilisyonları

Antikor	Dilüsyon	Marka	Sekonder antikor	Dilüsyon	Marka
AKR1B1	1:1000	Novus Biological	Anti-Rabbit	1:1000	Cell signaling
GST Ya	1:1000	Abnova	Anti-Mause	1:1000	Cell signaling
IRE-1 α	1:100	Santa cruz	Anti-Rabbit	1:5000	Santa cruz
p-JNK	1:100	Santa cruz	Anti-Goat	1:5000	Santa cruz
JNK	1:200	Santa cruz	Anti-Mause	1:1000	Cell signaling
CHOP	1:200	Santa cruz	Anti-Mause	1:1000	Cell signaling
Kaspaz 12	1:500	Santa cruz	Anti-Rabbit	1:5000	Santa cruz
B-Tubilin	1:1000	Santa cruz	Anti-Rabbit	1:5000	Santa cruz
Kaspaz 9	2 μ g/ml	Stressgen	Anti-Rabbit	1:1000	Cell signaling
Kaspaz 3	1:1000	Stressgen	Anti-Rabbit	1:1000	Cell signaling

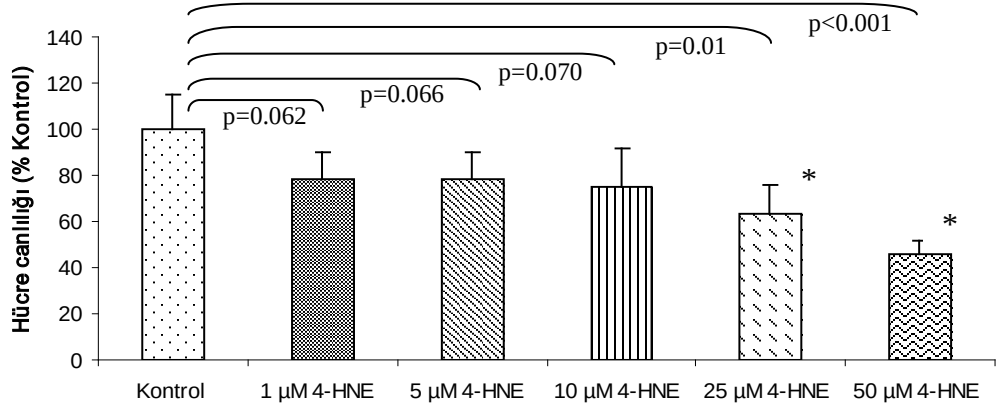
3.3. İstatistiksel analiz yöntemleri

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi SigmaStat 3,5 istatistik paket programı ile yapılmıştır. Değerlendirmede unpaired Student's *t* testi kullanılmıştır. İstatistiksel olarak $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir. X-ray filmde elde edilen protein band yoğunlukları Image J programı kullanılarak ölçüldü.

4. BULGULAR

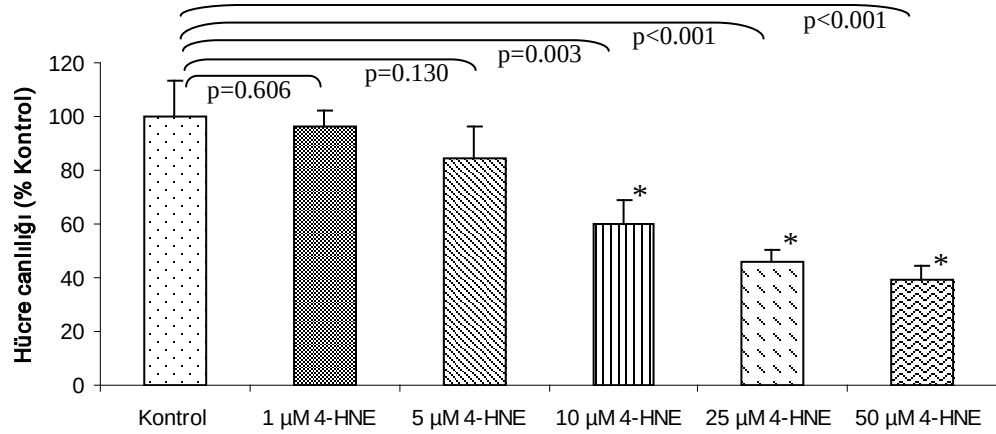
4.1. 4-hidroksinonenal' in konsantrasyon ve zamana bağılı sitotoksik etkisi

Sıçan pankreatik beta hücreleri (INS-1) 4-hidroksinonenal' in değişen dozlarına (0, 1, 5, 10, 25, 50 $\mu\text{mol/L}$) 60 dakika maruz bırakıldı. 4-hidroksinonenal' in 60 dakika sonunda hücre canlılığı üzerine etkisi kontrol grubu (Besi yerinde 4-hidroksinonenal içermeyen hücreler) ile kıyaslandığında 25 $\mu\text{mol/L}$ ve 50 $\mu\text{mol/L}$ 4-hidroksinonenal uygulanan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır (Grafik 1).



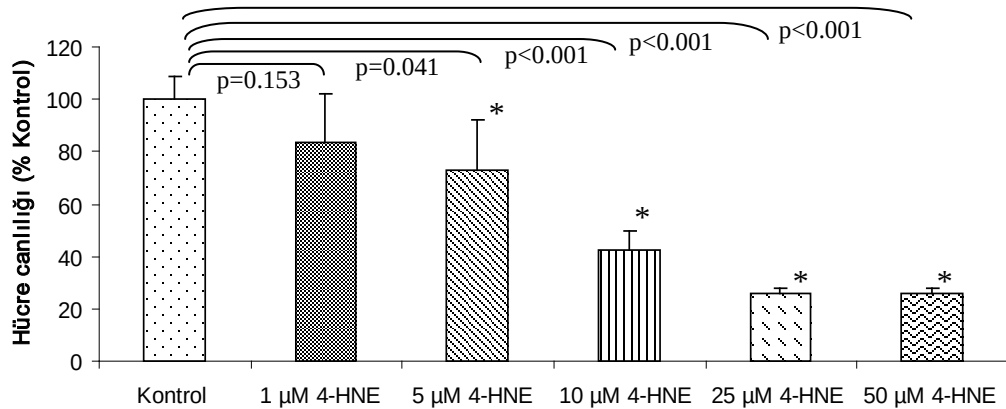
Grafik 1: 60 dakika 4-hidroksinonenal uygulanan sıçan pankreatik beta hücrelerinde (INS-1) hücre canlılığı * $p<0.05$ vs. Kontrol.

Sıçan pankreatik beta hücreleri (INS-1) 4-hidroksinonenal' in değişen dozlarına (0, 1, 5, 10, 25, 50 $\mu\text{mol/L}$) 120 dakika maruz bırakıldı. 4- hidroksinonenal' in 120 dakika sonunda hücre canlılığı üzerine etkisi kontrol grubu (Besi yerinde 4-hidroksinonenal içermeyen hücreler) ile kıyaslandığında 10 $\mu\text{mol/L}$, 25 $\mu\text{mol/L}$ ve 50 $\mu\text{mol/L}$ 4-hidroksinonenal uygulanan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır (Grafik 2).



Grafik 2: 120 dakika 4-hidroksinonenal uygulanan sıçan pankreatik beta hücrelerinde hücre canlılığı *p<0.05 vs. Kontrol.

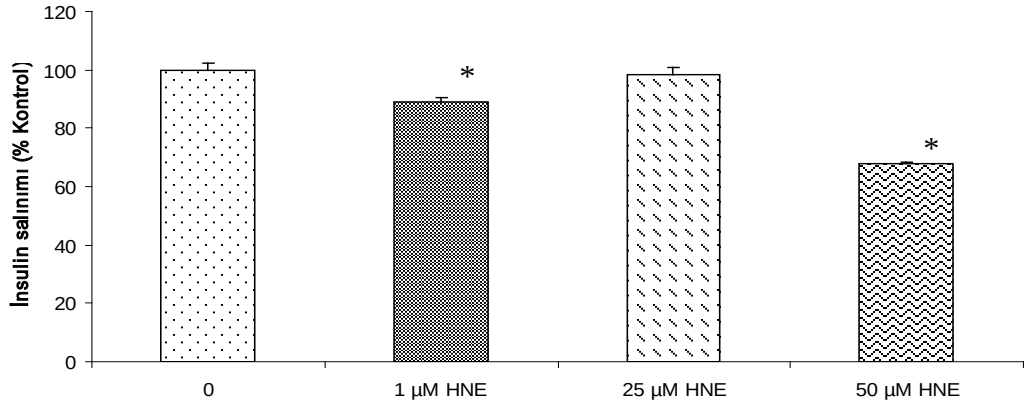
Sıçan pankreatik beta hücreleri (INS-1) 4-hidroksinonenal' in değişen dozlarına (0, 1, 5, 10, 25, 50 µmol/L) 180 dakika maruz bırakıldı. 4- hidroksinonenal' in 180 dakika sonunda hücre canlılığı üzerine etkisi kontrol grubu (Besi yerinde 4-hidroksinonenal içermeyen hücreler) ile kıyaslandığında 5 µmol/L, 10 µmol/L, 25 µmol/L ve 50 µmol/L 4-hidroksinonenal uygulanan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır (Grafik 3).



Grafik 3: 180 dakika 4-hidroksinonenal uygulanan sıçan pankreatik beta hücrelerinde hücre canlılığı *p<0.05 vs. Kontrol.

4.2. 4-hidroksinonenal' in insulin saliverilmesi üzerine etkisi

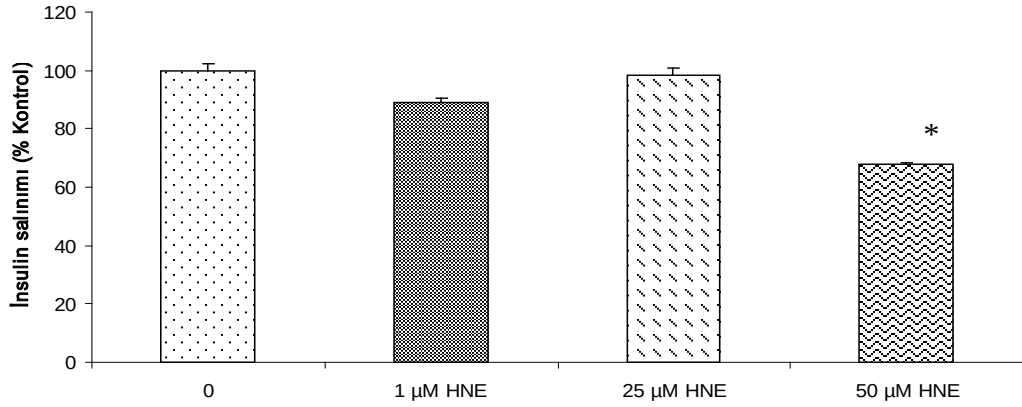
Sıçan pankreatik beta hücreleri (INS-1) 4-hidroksinonenal' in toksik ve/veya toksik olmayan dozlarına (0, 1, 25, 50 $\mu\text{mol/L}$) 60 dakika maruz bırakıldı. 4- hidroksinonenal' in 60 dakika sonunda bazal (2.8 mmol/L glukoz içeren besi yerine maruz bırakılan hücreler) insulin saliverilmesi üzerine etkisi kontrol grubu (Besi yerinde 4-hidroksinonenal içermeyen hücreler) ile kıyaslandığında 1 $\mu\text{mol/L}$ ($p=0.002$) ve 50 $\mu\text{mol/L}$ ($p<0.001$) 4-hidroksinonenal uygulanan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır (Grafik 4). Bununla birlikte 25 $\mu\text{mol/L}$ ($p=0.418$) 4-hidroksinonenal uygulanan hücrelerde basal insulin salınımı değişmemiştir.



Grafik 4: 2.8 mmol/L glukoz içeren besi yerine maruz bırakılan hücrelerde bazal insulin saliverilmesi üzerine 4-hidroksinonenal' in etkisi * $p<0.05$ vs. Kontrol (0)

4- hidroksinonenal' in 60 dakika sonunda indüklenmiş (16.7 mmol/L glukoz içeren besi yerine maruz bırakılan hücreler) insulin saliverilmesi üzerine etkisi kontrol grubu (Besi yerinde 4-hidroksinonenal içermeyen hücreler) ile kıyaslandığında 50 $\mu\text{mol/L}$ ($p<0.001$) 4-hidroksinonenal uygulanan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır (Grafik 5). Bununla birlikte 1 $\mu\text{mol/L}$ ($p=0.738$) ve 25 $\mu\text{mol/L}$

($p=0.079$) 4-hidroksinonenal uygulanan hücrelerde indüklenmiş insulin salınımı değişmemiştir.



Grafik 5: 16.7 mmol/L glukoz içeren besi yerine maruz bırakılan hücrelerde indüklenmiş insulin salıverilmesi üzerine 4-hidroksinonenal' in etkisi * $p<0.05$ vs. Kontrol (0)

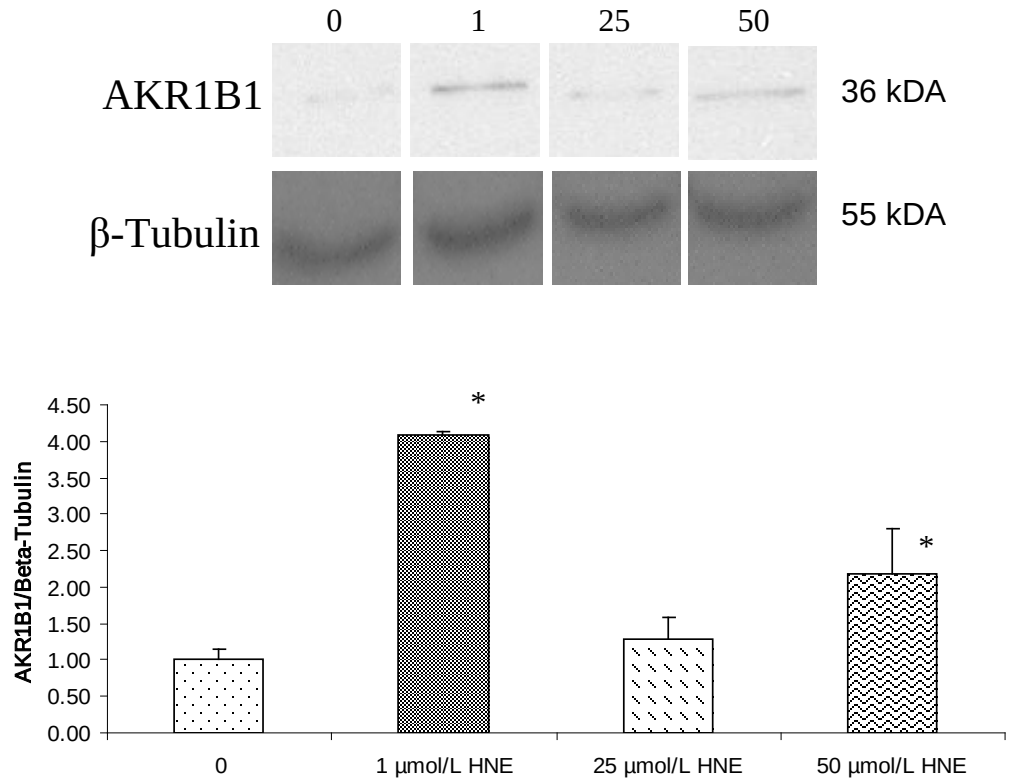
4.3. 4-hidroksinonenal' in detoksifikasyonunda görevli enzimlerin protein ifadelenme düzeyleri

Sıçan pankreatik beta hücreleri (INS-1) 4-hidroksinonenal' in toksik ve/veya toksik olmayan dozlarına (0, 1, 25, 50 µmol/L) 60 dakika maruz bırakıldı. Süre sonunda elde edilen hücre lizatında Aldoz Redüktaz 1B1 (AKR1B1) ve Glutasyon-S-Transferaz-Yα (GST-Yα) enzimlerinin protein ifadelenmeleri western blot yöntemi ile analiz edildi. Hedef protein ifadelenme düzeyleri Beta-Tubulin ifadelenme düzeyleri ile normalize edildi.

4.3.1. 4-hidroksinonenal' in AKR1B1 protein ifadelenme düzeyleri üzerine etkisi

Kontrol grubu (Besi yerinde 4-hidroksinonenal içermeyen hücreler) ile kıyaslandığında 1 µmol/L (Kontrol grubu hücrelere kıyasla 4.09 kat artış, $p<0.001$) ve 50 µmol/L (Kontrol grubu hücrelere kıyasla 2.18 kat artış, $p=0.032$) 4-hidroksinonenal uygulanan hücrelerde AKR1B1 düzeyleri anlamlı derecede artmıştır. Bununla birlikte 25 µmol/L (Kontrol grubu

hücrelere kıyasla 1.29 kat artış, $p=0.196$) 4-hidroksinonenal uygulaması AKR1B1 düzeyini artırırken bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir Grafik 6.

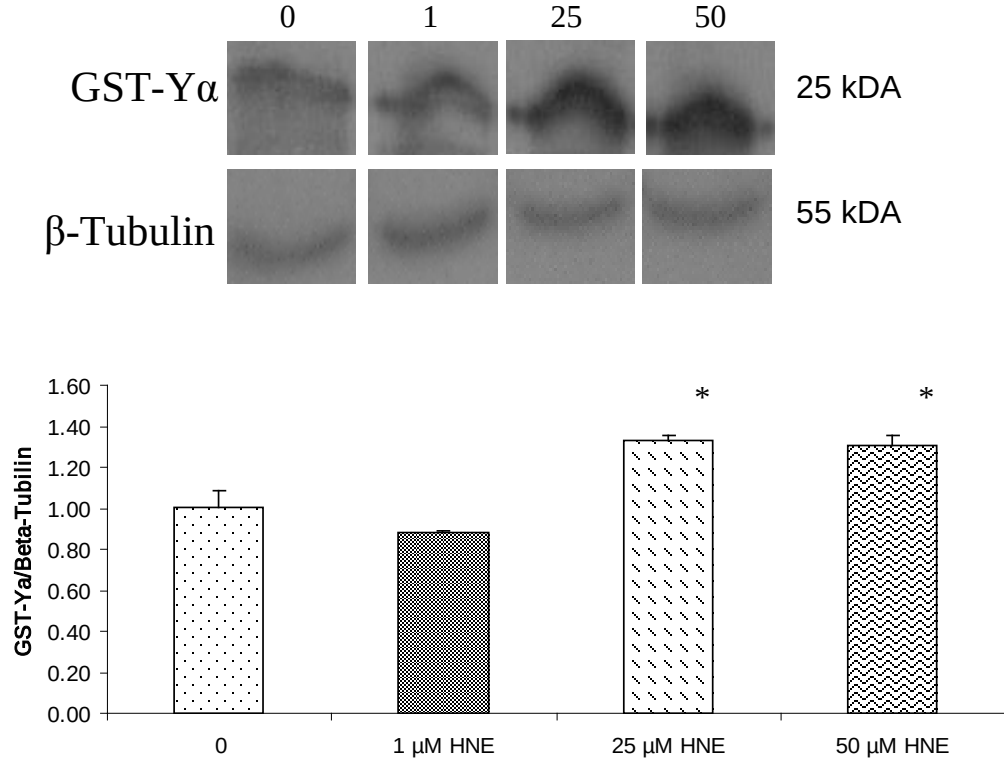


Grafik 6: INS-1 hücrelerinde 4-hidroksinonenal' in AKR1B1 protein ifadenme düzeyleri üzerine etkisi * $p<0.05$ vs. Kontrol (0)

4.3.2. 4-hidroksinonenal' in GST-Y α protein ifadenme düzeyleri üzerine etkisi

Kontrol grubu (Besi yerinde 4-hidroksinonenal içermeyen hücreler) ile kıyaslandığında 25 $\mu\text{mol/L}$ (Kontrol grubu hücrelere kıyasla 1.33 kat artış, $p=0.003$) ve 50 $\mu\text{mol/L}$ (Kontrol grubu hücrelere kıyasla 1.31 kat artış, $p=0.006$) 4-hidroksinonenal uygulanan hücrelerde GST-Y α düzeyleri anlamlı derecede artmıştır. Bununla birlikte 1 $\mu\text{mol/L}$ (Kontrol grubu hücrelere kıyasla 0.89 kat azalış, $p=0.092$) 4-hidroksinonenal uygulaması

GST-Y α düzeyini artırırken bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir
Grafik 7.



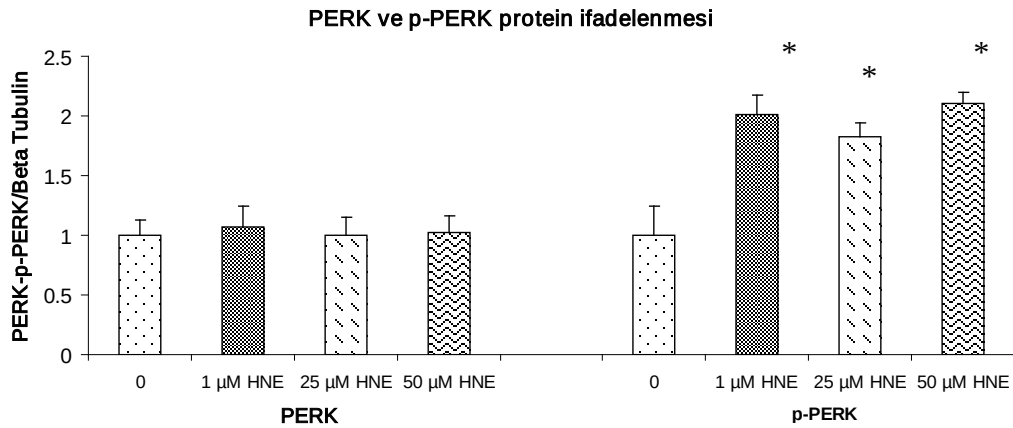
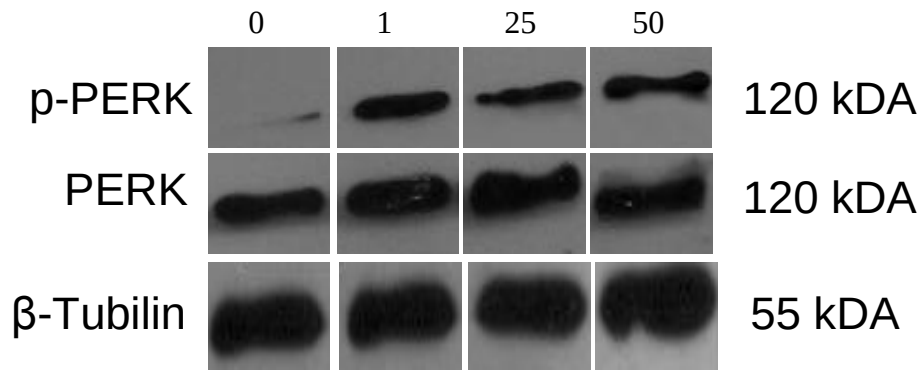
Grafik 7: INS-1 hücrelerinde 4-hidroksinonenal' in GST-Y α protein ifadenme düzeyleri üzerine etkisi *p<0.05 vs. Kontrol (0)

4.4. 4-hidroksinonenal' in endoplazmik retikulum stres ve apoptozisle ilişkili proteinlerin ifadenme düzeyleri üzerine etkisi

4.4.1. 4-hidroksinonenal' in PERK ve p-PERK (Thr 981) protein ifadenme düzeyleri üzerine etkisi

Kontrol grubu (Besi yerinde 4-hidroksinonenal içermeyen hücreler) ile kıyaslandığında 1 μ mol/L (Kontrol grubu hücelere kıyasla 1.07 kat artış, p=0.614), 25 μ mol/L (Kontrol grubu hücelere kıyasla değişmemiş, p=1) ve 50 μ mol/L (Kontrol grubu hücelere kıyasla 1.02 kat artış, p=0.865) 4-hidroksinonenal uygulanan hücelerde PERK protein

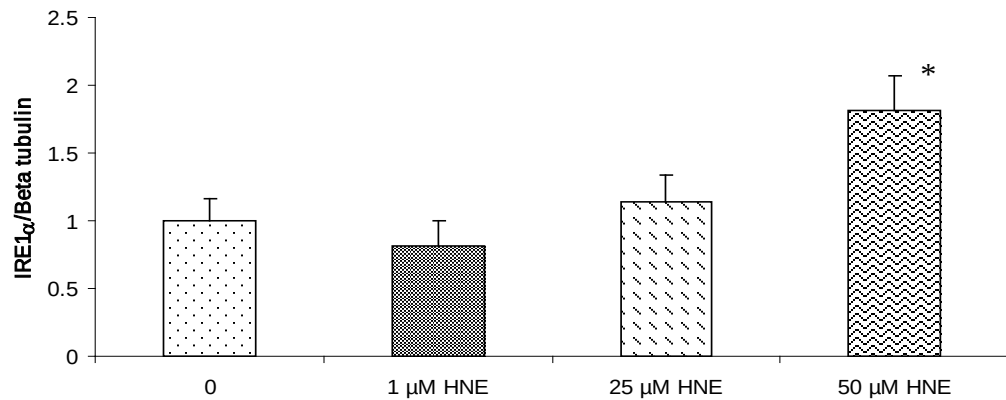
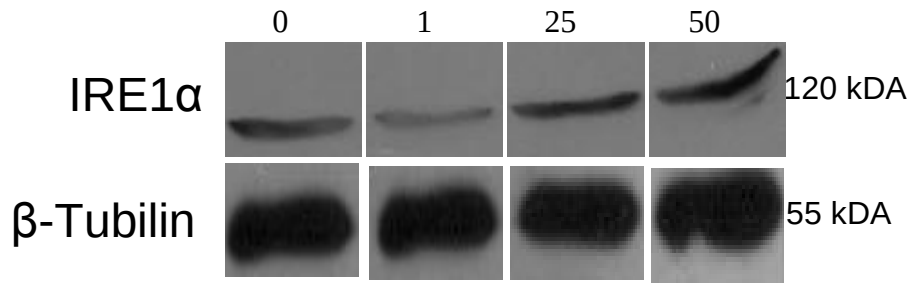
ifadelenme düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı değişim göstermemiştir. Bununla birlikte kontrol grubu (Besi yerinde 4-hidroksinonenal içermeyen hücreler) ile kıyaslandığında 1 $\mu\text{mol/L}$ (Kontrol grubu hücrelere kıyasla 2.01 kat artış, $p=0.004$), 25 $\mu\text{mol/L}$ (Kontrol grubu hücrelere kıyasla 1.82 kat artış, $p=0.006$) ve 50 $\mu\text{mol/L}$ (Kontrol grubu hücrelere kıyasla 2.1 kat artış, $p=0.002$) 4-hidroksinonenal uygulanan hücrelerde PERK fosforilasyonu istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır. Grafik 8



Grafik 8: INS-1 hücrelerinde 4-hidroksinonenal' in PERK ve p-PERK protein ifadelenme düzeyleri üzerine etkisi * $p<0.05$ vs. Kontrol (0)

4.4.2. 4-hidroksinonenal' in IRE1α protein ifadelenme düzeyleri üzerine etkisi

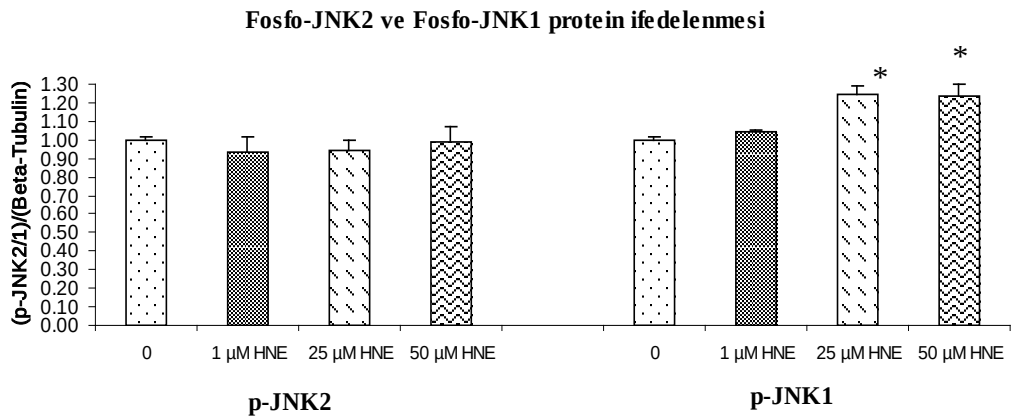
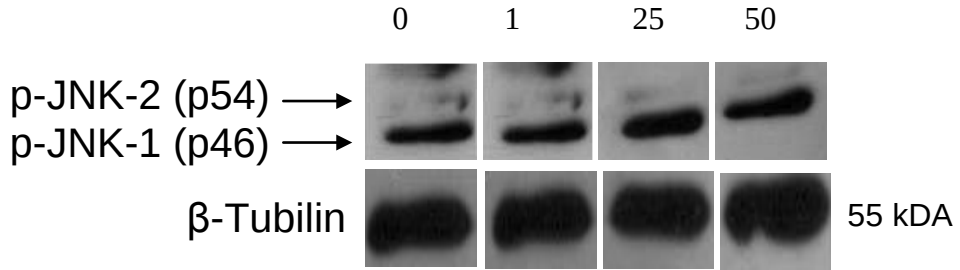
Kontrol grubu (Besi yerinde 4-hidroksinonenal içermeyen hücreler) ile kıyaslandığında 50 µmol/L (Kontrol grubu hücrelere kıyasla 1.82 kat artış, $p=0.009$) 4-hidroksinonenal uygulanan hücrelerde IRE1α düzeyleri anlamlı derecede artmıştır. Bununla birlikte 1 µmol/L (Kontrol grubu hücrelere kıyasla 0.81 kat azalış, $p=0.255$) ve 25 µmol/L (Kontrol grubu hücrelere kıyasla 1.14 kat artış, $p=0.408$) 4-hidroksinonenal uygulaması IRE1α düzeyini değiştirirken bu değişim istatistiksel olarak anlamlı değildir Grafik 9.



Grafik 9: INS-1 hücrelerinde 4-hidroksinonenal' in IRE1-α protein ifadelenme düzeyleri üzerine etkisi * $p<0.05$ vs. Kontrol (0)

4.4.3. 4-hidroksinonenal' in p-JNK2 (c-Jun N-terminal kinaz1) ve p-JNK1 (c-Jun N-terminal kinaz2) protein ifadelenme düzeyleri üzerine etkisi

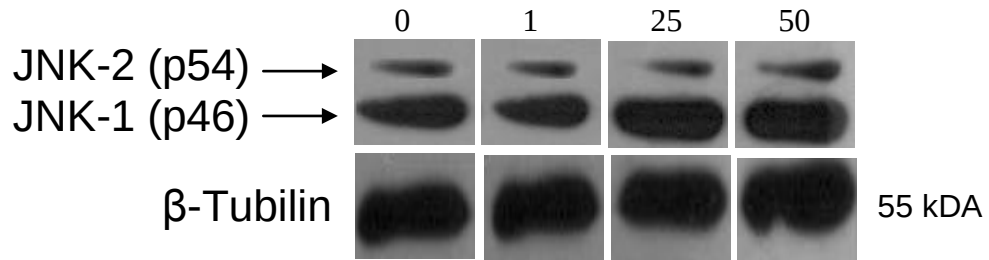
Kontrol grubu (Besi yerinde 4-hidroksinonenal içermeyen hücreler) ile kıyaslandığında 1 $\mu\text{mol/L}$ (Kontrol grubu hücrelere kıyasla 0.94 kat artış, $p=0.276$), 25 $\mu\text{mol/L}$ (Kontrol grubu hücrelere kıyasla 0.94 kat artış, $p=0.176$) ve 50 $\mu\text{mol/L}$ (Kontrol grubu hücrelere kıyasla 0.99 kat artış, $p=0.884$) 4-hidroksinonenal uygulanan hücrelerde p-JNK2 düzeyleri anlamlı derecede değişmemiştir Şekil-10. Kontrol grubu (Besi yerinde 4-hidroksinonenal içermeyen hücreler) ile kıyaslandığında 25 $\mu\text{mol/L}$ (Kontrol grubu hücrelere kıyasla 1.25 kat artış, $p<0.01$) ve 50 $\mu\text{mol/L}$ (Kontrol grubu hücrelere kıyasla 1.24 kat artış, $p<0.01$) 4-hidroksinonenal uygulanan hücrelerde p-JNK1 düzeyleri anlamlı derecede artmıştır. Bununla birlikte 1 $\mu\text{mol/L}$ (Kontrol grubu hücrelere kıyasla 1.04 kat azalış, $p=0.070$) 4-hidroksinonenal uygulaması p-JNK1 düzeyini artırırken bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir Grafik 10.

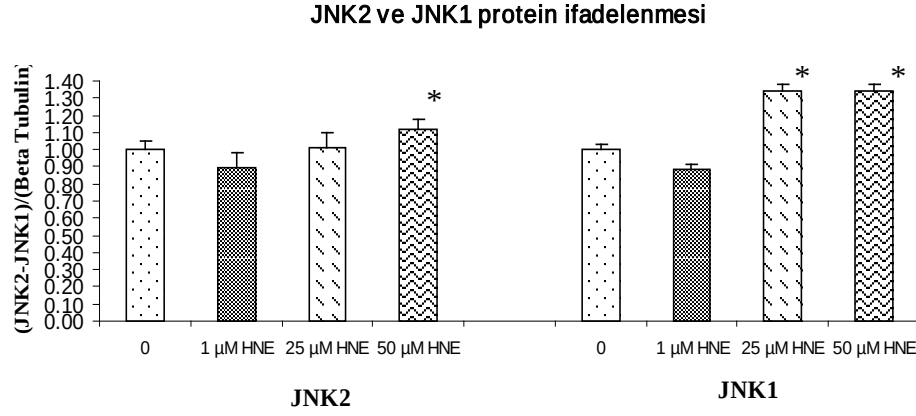


Grafik 10: INS-1 hücrelerinde 4-hidroksinonenal' in JNK fosforilasyonu üzerine etkisi *p<0.05 vs. Kontrol (0)

4.4.4. 4-hidroksinonenal' in JNK2 (c-Jun N-terminal kinaz1) ve JNK1 (c-Jun N-terminal kinaz2) protein ifadelenme düzeyleri üzerine etkisi

Kontrol grubu (Besi yerinde 4-hidroksinonenal içermeyen hücreler) ile kıyaslandığında 50 µmol/L (Kontrol grubu hücrelere kıyasla 1.12 kat artış, p=0.042) 4-hidroksinonenal uygulanan hücrelerde JNK2 düzeyleri anlamlı derecede artmıştır. Bununla birlikte 1 µmol/L (Kontrol grubu hücrelere kıyasla 0.89 kat azalış, p=0.138) ve 1 µmol/L (Kontrol grubu hücrelere kıyasla 1.01 kat artış, p=0.875) 4-hidroksinonenal uygulaması JNK2 düzeyini değiştirmemiştir Şekil-11. Kontrol grubu (Besi yerinde 4-hidroksinonenal içermeyen hücreler) ile kıyaslandığında 1 µmol/L (Kontrol grubu hücrelere kıyasla 0.89 kat artış, p=0.019) 4-hidroksinonenal uygulanan hücrelerde JNK1 düzeyleri anlamlı derecede azalmıştır. Bununla birlikte 25 µmol/L (Kontrol grubu hücrelere kıyasla 1.34 kat artış, p<0.01) ve 50 µmol/L (Kontrol grubu hücrelere kıyasla 1.35 kat artış, p<0.01) 4-hidroksinonenal uygulaması JNK2 düzeyini anlamlı derecede artırmıştır Grafik 11.

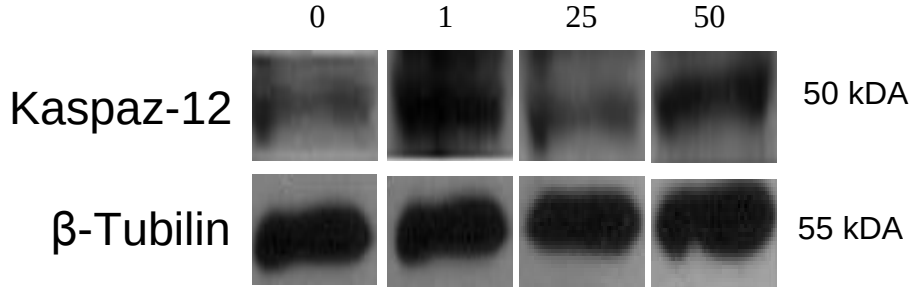


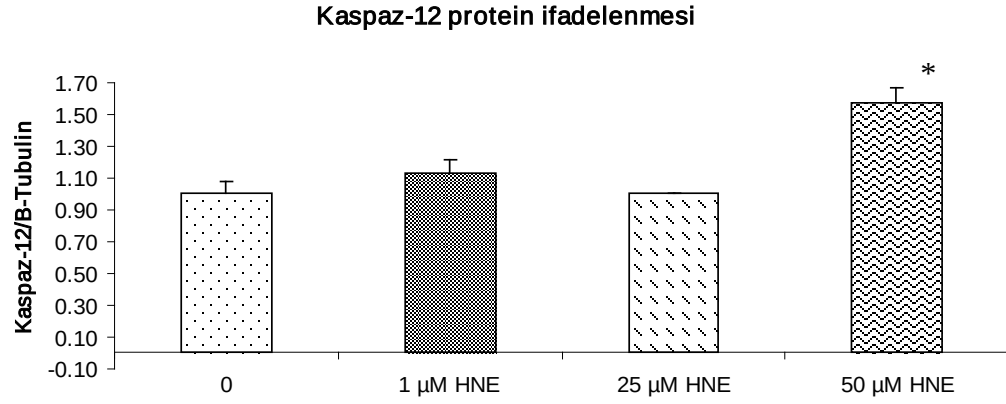


Grafik 11: INS-1 hücrelerinde 4-hidroksinonenal' in JNK2 ve JNK1 protein ifadenme düzeyleri üzerine etkisi *p<0.05 vs. Kontrol (0)

4.4.5. 4-hidroksinonenal' in Kaspaz 12 protein ifadenme düzeyleri üzerine etkisi

Kontrol grubu (Besi yerinde 4-hidroksinonenal içermeyen hücreler) ile kıyaslandığında 50 μmol/L (Kontrol grubu hücrelere kıyasla 1.57 kat artış, $p < 0.001$) 4-hidroksinonenal uygulanan hücrelerde Kaspaz 12 düzeyleri anlamlı derecede artmıştır. Bununla birlikte 1 μmol/L (Kontrol grubu hücrelere kıyasla 1.13 kat artış, $p = 135$) ve 25 μmol/L (Kontrol grubu hücrelere kıyasla 1.01 kat artış, $p = 839$) 4-hidroksinonenal uygulaması Kaspaz 12 düzeyini anlamlı derecede değiştirmemiştir Grafik 12.

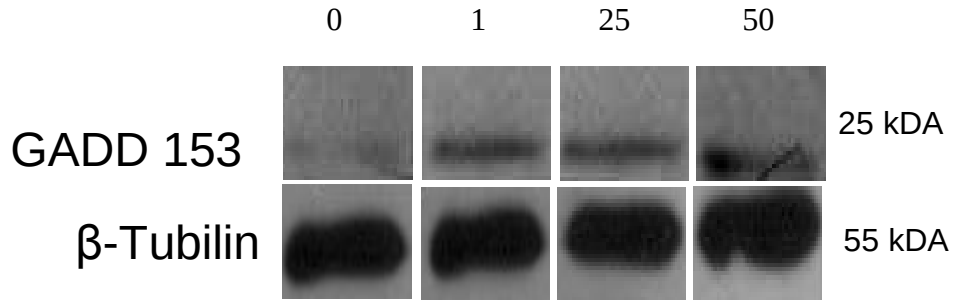


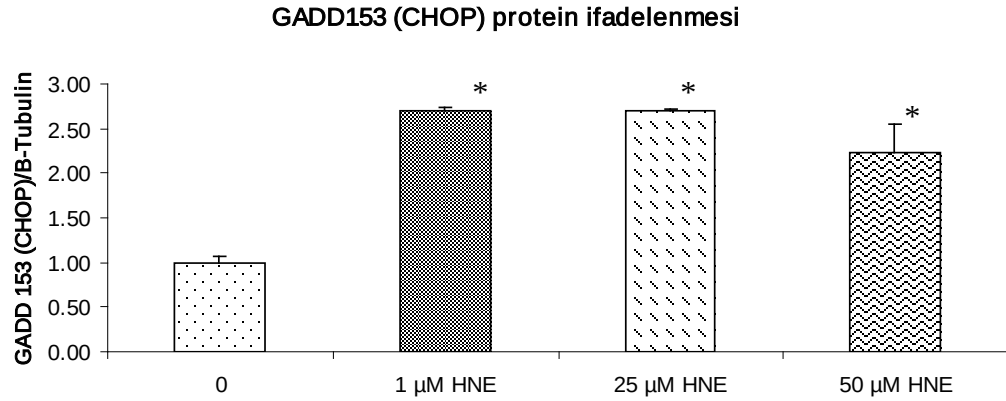


Grafik 12: INS-1 hücrelerinde 4-hidroksinonenal' in Kaspaz 12 protein ifadenme düzeyleri üzerine etkisi *p<0.05 vs. Kontrol (0)

4.4.6. 4-hidroksinonenal' in GADD 153 (CHOP) protein ifadenme düzeyleri üzerine etkisi

Kontrol grubu (Besi yerinde 4-hidroksinonenal içermeyen hücreler) ile kıyaslandığında 1 μmol/L (Kontrol grubu hücrelere kıyasla 2.71 kat artış, p<0.001), 25 μmol/L (Kontrol grubu hücrelere kıyasla 2.70 kat artış, p<0.001) ve 50 μmol/L (Kontrol grubu hücrelere kıyasla 2.22 kat artış, p<0.001) 4-hidroksinonenal uygulanan hücrelerde GADD 153 (CHOP) düzeyleri anlamlı derecede artmıştır Grafik 13.





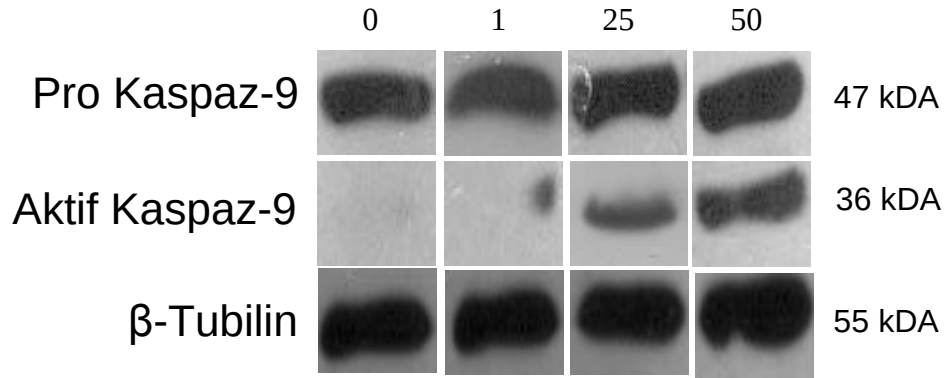
Grafik 13: INS-1 hücrelerinde 4 hidroksinonenal' in GADD 153 (CHOP) protein ifadenlenme düzeyleri üzerine etkisi *p< 0.05 vs. Kontrol (0)

4.5. Apoptozis ile ilişkili proteinlerin ifadenlenme düzeyleri

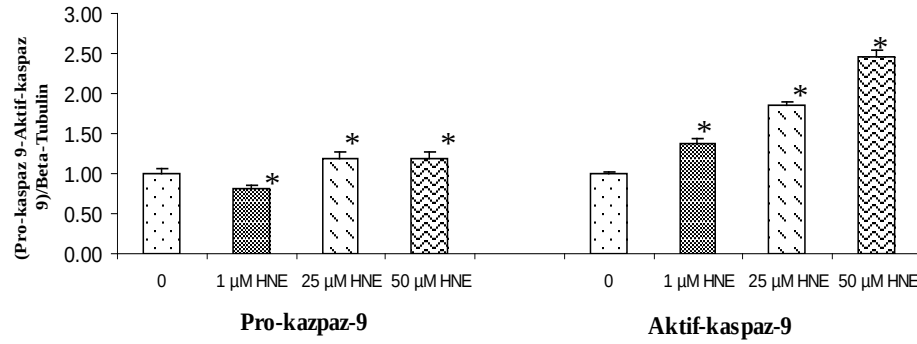
4.5.1. 4-hidroksinonenal' in pro Kaspaz 9 ve aktif Kaspaz 9 protein ifadenlenme düzeyleri üzerine etkisi

Kontrol grubu (Besi yerinde 4-hidroksinonenal içermeyen hücreler) ile kıyaslandığında 1 µmol/L (Kontrol grubu hücrelere kıyasla 0.82 kat azalış, p=0.012), 25 µmol/L (Kontrol grubu hücrelere kıyasla 1,19 kat artış, p=0.030) ve 50 µmol/L (Kontrol grubu hücrelere kıyasla 1,20 kat artış, p=0.026) 4-hidroksinonenal uygulanan hücrelerde pro kaspaz 9 protein ifadenlenme düzeyleri anlamlı derecede değişmiştir Grafik 14.

Kontrol grubu (Besi yerinde 4-hidroksinonenal içermeyen hücreler) ile kıyaslandığında 1 µmol/L (Kontrol grubu hücrelere kıyasla 1,37 kat artış, p<0.001), 25 µmol/L (Kontrol grubu hücrelere kıyasla 1,85 kat artış, p<0.001) ve 50 µmol/L (Kontrol grubu hücrelere kıyasla 2,46 kat artış, p<0.001) 4-hidroksinonenal uygulanan hücrelerde aktif kaspaz 9 protein ifadenlenme düzeyleri anlamlı derecede artmıştır Grafik 14.



Pro-kaspaz-9 ve Aktif-kaspaz-9 protein ifadenmesi

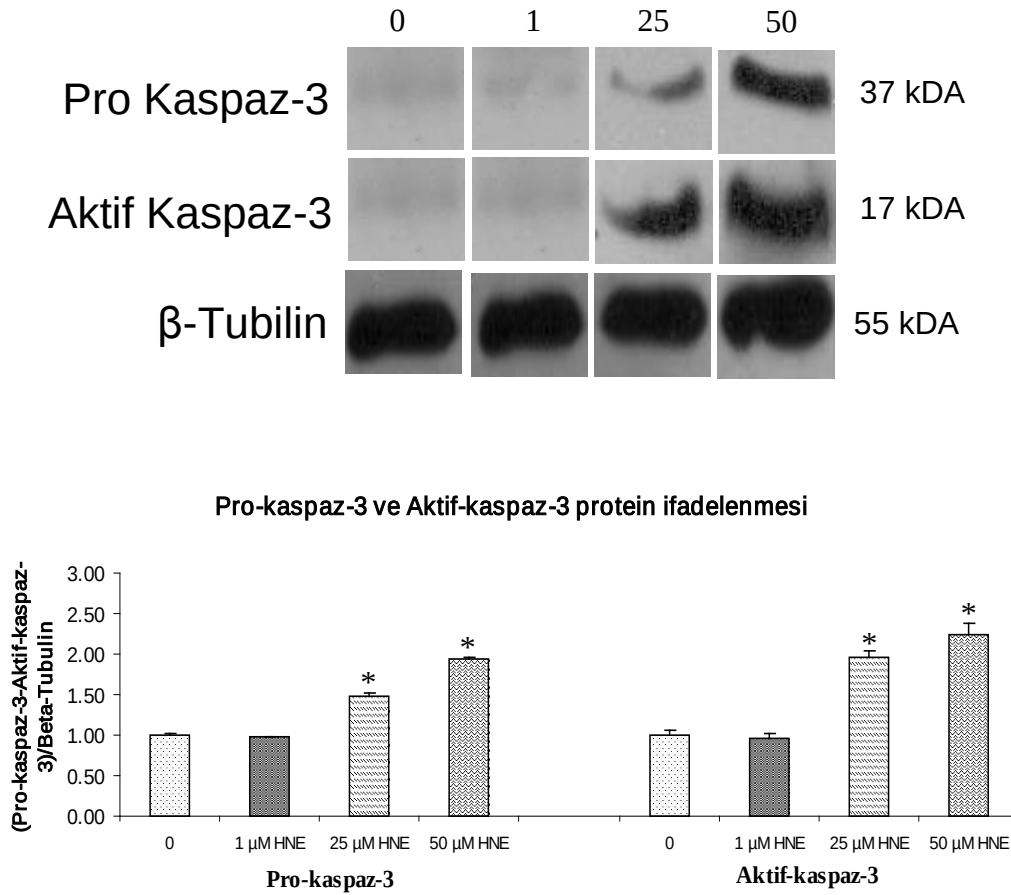


Grafik 14: INS-1 hücrelerinde 4-hidroksinonenal' in pro kaspaz 9 ve aktif kaspaz 9 protein ifadenme düzeyleri üzerine etkisi. $p<0.05$ vs. Kontrol (0)

4.5.2. 4-hidroksinonenal' in pro Kaspaz 3 ve aktif Kaspaz 3 protein ifadenme düzeyleri üzerine etkisi

Kontrol grubu (Besi yerinde 4-hidroksinonenal içermeyen hücreler) ile kıyaslandığında 1 μmol/L (Kontrol grubu hücrelere kıyasla 0.98 kat azalış, $p=0,335$) 4-hidroksinonenal uygulanan hücrelerde pro Kaspaz 3 düzeyleri anlamlı düzeyde değişmemiştir. Bununla birlikte 25 μmol/L (Kontrol grubu hücrelere kıyasla 1,49 kat artış, $p<0.001$) ve 50 μmol/L (Kontrol grubu hücrelere kıyasla 1,94 kat artış, $p<0.001$) 4-hidroksinonenal uygulanan hücrelerde pro kaspaz 3 protein ifadenme düzeyleri anlamlı derecede artmıştır Grafik 15.

Kontrol grubu (Besi yerinde 4-hidroksinonenal içermeyen hücreler) ile kıyaslandığında 1 $\mu\text{mol/L}$ (Kontrol grubu hücrelere kıyasla 0.95 kat azalış, $p=0,431$) 4-hidroksinonenal uygulanan hücrelerde aktif Kaspaz 3 düzeyleri anlamlı düzeyde değişmemiştir. Bununla birlikte 25 $\mu\text{mol/L}$ (Kontrol grubu hücrelere kıyasla 1,96 kat artış, $p<0.001$) ve 50 $\mu\text{mol/L}$ (Kontrol grubu hücrelere kıyasla 2,23 kat artış, $p<0.001$) 4-hidroksinonenal uygulanan hücrelerde aktif kaspaz 3 protein ifadenme düzeyleri anlamlı derecede artmıştır Grafik 15.



Grafik 15: INS-1 hücrelerinde 4-hidroksinonenal'in prokaspaz 3 ve aktif kaspaz 3 protein ifadenme düzeyleri üzerine etkisi. * $p<0,05$ vs. Kontrol (0)

5. TARTIŞMA

Tip 2 diyabetin ilerleyişinde, pankreatik beta hücrelerinde fonksiyon bozukluğuna bağlı azalmış insulin salgılanması hipergliseminin devamlılığını sağlar. Beta hücrelerinde geriye dönüşümsüz bu tür fonksiyon bozukluğu çoğu zaman glukoz toksisitesine bağlı olup, sonrasında gelişen hiperglisemi oksidatif stresi tetiklemektedir^{97, 98}. Kronik hiperglisemi birçok dokuda glikasyon reaksiyonları sonucu reaktif oksijen türlerinin üretimini artırır^{99, 100}. Reaktif oksijen türleri dokularda protein oksidasyonu, DNA oksidasyonu ve lipid peroksidasyonu sonucu oluşan ürünlerin artışına neden olur. 4-hidroksi-2-alkenaller grubunda yer alan ve hücreler için oldukça toksik olan 4-hidroksi-2-nonenal genellikle lipid peroksidasyonu sonucu, okside çoklu doymamış yağ asitlerinin fragmentasyonu sonucu oluşur, oldukça elektrofilitir ve nükleofilik protein amino asit yan zincirleri ile reaksiyona girerek proteinlerin oksidasyonuna hatta aynı zamanda yeni reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olur¹⁰¹.

Diyabetik süreçte pankreatik beta hücreleri oksidatif stresin hedefidir. 4-hidroksinonenal bu süreçte hızlıca proteinlerle reaksiyona girerek bu proteinlerde fonksiyon bozukluklarına hatta hatalı katlanmaya neden olmaktadır^{80, 102}. Daha önce yapılan çalışmada 4-hidroksinonenal ile modifiye olmuş proteinlerin Goto-Kagizaki türü sıçanların pankreatik beta hücrelerinde arttığı gösterilmiştir. Bu sıçanlar genellikle obez olmayan tip 2 diyabetin modellenmesinde kullanılmaktadır^{103, 104}.

Hiperglisemi sonuç olarak pankreatik beta hücrelerinde oksidatif stresi tetiklemektedir. Böylece beta hücre fonksiyon bozukluğuna bağlı olarak insulin sentezi ve salgılanması zarar görmektedir. Daha önce birçok çalışmada diğer hücrelere kıyasla, pankreatik beta hücrelerinin oldukça düşük seviyede antioksidan savunma sistemine sahip oldukları

vurgulanmıştır. Bu durum pankreatik beta hücrelerini, lipid peroksidasyonu sonucu oluşan toksik aldehyitlerin veya genel oksidatif stresin etkilerine karşı hassas hale getirmektedir ¹⁰⁵.

4-hidroksinonenal fizyolojik şartlarda normal hücrelerde 0.8-2.8 μM konsantrasyonlarda üretilmektedir ve hücrelerde sinyal iletiminde görev alan ikincil haberci olarak tanımlanmaktadır. Bununla birlikte 10 μM -1000 μM arası konsantrasyonlarda hücreler için sitotoksiktir ve birçok enzimatik sistemin baskılanmasında etkilidir ^{106, 107}.

Bu bağlamda, bizde çalışmamızda 4-hidroksinonenal' in fizyolojik dozda ve kronik yüksek dozlarda (0-50 μM) zamana bağlı olarak (60-180 dakika) pankreatik beta hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkisini ölçtük. 4-hidroksinonenal INS-1 sıçan pankreatik beta hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığını azaltarak toksik etki göstermiştir. 4-hidroksinonenal değişen konsantrasyonlarda (0-50 μM) 1 saat inkübasyon sonunda LD₅₀: 25-50 μM , 2 saat inkübasyon sonunda LD₅₀: 10-25 μM , 3 saat inkübasyon sonunda LD₅₀: 5-10 μM arasında ölçüldü.

4-hidroksinonenal in sitotoksik etkisi hücreden hücreye hatta zamana bağlı olarak değişmektedir. Daha önceki çalışmada, 0-30 μM 4-hidroksinonenal uygulaması aortik düz kas hücrelerinde 24 saat sonunda hücre canlılığını azaltmış LD₅₀: 10-15 μM arasında belirlenmiştir[108]. Diğer yandan sıçandan primer izole edilmiş astrositlerde 4-hidroksinonenal hücrelerde sitotoksik etki göstermiş ve 3 saat inkübasyon sonunda LD₅₀: 25-50 μM arasında ölçülmüştür ¹⁰⁹.

Numazawa ve arkadaşları çalışmalarında pankreatik beta hücrelerinin hepatoma ve fibroblastik hücrelere kıyasla 4-hidroksinonenal' in sitotoksik etkisine karşı daha hassas olduğunu vurgulamış bu durumu

da pankreatik beta hücrelerinin düşük antioksidan savunma sistemine bağlamışlardır. Aynı çalışmada 12 saat, 0-50 μ M arası değişen dozlarda 4-hidroksinonenal inkübasyonunun hepatoma ve fibroblastik hücrelerde hemen hemen hiç sitotoksik etki göstermezken hamster pankreatik beta hücrelerinde LD₅₀: 41.2 μ M, sıçan pankreatik beta hücreleri için LD₅₀: 26.3 μ M olarak ölçülmüştür ³⁰. Aynı zamanda bu çalışmaya kıyasla INS-1 hücrelerinin, 4-hidroksinonenal' in sitotoksik etkisine diğer pankreatik beta hücre hatlarına kıyasla daha hassas oldukları görülmektedir.

4-hidroksinonenal' in sitotoksik etkisine karşın hücrelerde antioksidan savunma sisteminin yanında enzimatik detoksifikasyon sistemleri de yer almaktadır. Hücrede 4-hidroksinonenal' in reaktif olmayan formu veya daha az toksik ürünlere dönüşümünü sağlayan başlıca üç enzimatik sistem tanımlanmıştır. Bunlar aldoz redüktaz ¹¹⁰ Glutasyon-S-transferaz ¹¹¹ ve aldehit dehidrogenaz ¹¹² enzimleridir.

Daha önce yapılan çalışmaların sonuçlarına göre; 4-hidroksinonenal hücrelerde transkripsiyon faktörü Nrf2 aracılı antioksidan cevap sistemi aktive eder. Eksojen uygulanan 4-hidroksinonenal hücrelerde stres olmayan koşullarda Nrf2 transkripsiyon faktörüne bağlı olan ve bu protein' in inhibitörü olarak bilinen Keap1' in Nrf2 den ayrılmasını sağlar ve böylece Nrf2 aktif hale gelir. Aktif Nrf2 hücrelerde başta glutatyon-s-transferaz ve aldoz redüktaz izoformları olmak üzere hemoksjenaz-1, glutamat sistein ligaz modifiye edici alt ünite, tiyoredoksin redüktaz-1 gibi birçok antioksidan ve detoksifiye edici proteinin ifadenme seviyelerini düzenler. Ayrıca glutamat sistein ligaz modifiye edici alt ünite proteini hücre içi glutatyon düzeylerini artırarak eksojen uygulanan veya patolojik koşullarda artan 4-hidroksinonenal' in ortadan kaldırılması için mücadelede etkin rol oynar ⁸⁰.

4-hidroksinonenal hücrede çoğunlukla glutatyon-S-transferaz katalizörlüğünde glutatyonla konjuge edilir. Bu konjugat (GS-

HNE) hücrede okside edilerek merkaptöürik asite veya aldoz redüktaz tarafından konjugatın aldehit grubu uygun alkole indirgenerek daha az reaktif veya toksik olmayan forma dönüştürülür. GS-HNE hücreden ATP bağımlı hücre zarı proteini RLIP76 aracılı ekstraselüler ortama atılır ¹¹³. Gen aktarımı ile glutatyon-S-transferaz proteinini yüksek düzeyde sentezleyen hücrelerde 4-hidroksinonenal' in toksik etkisinin azaldığı, böylece bu proteinin 4-hidroksinonenal' in toksik etkisine karşı koruyucu olabileceği gösterilmiştir ^{114, 115}. Ayrıca siRNA teknolojisi kullanılarak glutatyon-S-transferaz proteininin transkripsiyon düzeyinde sentezi baskılanmış hücrelerde 4-hidroksinonenal' in toksik etkisinin normal hücrelere kıyasla daha fazla olduğu ve enzimin koruyucu olduğu vurgulanmıştır ¹¹⁶. 4-hidroksinonenal yüksek konsantrasyonlarda çeşitli hücre tiplerinde glutatyon-S-transferaz mRNA düzeylerini, protein ifadenmesini ve enzim aktivitesini artırmıştır. ¹¹⁷⁻¹¹⁹. Bu durum genellikle hücrelerin oksidatif strese adaptasyon amaçlı savunma veya detoksifikasyon mekanizmasını harekete geçirmesi olarak açıklanmaktadır. Bizde çalışmamızda pankreatik beta hücrelerinde yüksek doz (25 μ M ve 50 μ M) 4-hidroksinonenal uygulamasının glutatyon-S-transferaz protein ifadenmesini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırdığını gösterdik. Burada glutatyon-s-transferaz protein ifadenmesi oksidatif strese uyum veya cevap olarak hücrelerde artmış olabilir.

Aldo-keto redüktaz süper ailesinin üyeleri, başlıca ksenobiyotik detoksifikasyonu, hücrede ozmotik regülasyon, hormonal metabolizma ve diyabetik komplikasyonlarda oldukça önemlidir. Aldoz redüktaz 1B1 ve 1B10 proteinleri monomerik yapıda NADPH-bağımlı enzim olup ksenobiyotiklerin veya elektrofilik aldehitlerin reaktif karbonil grubunun uygun alkol grubuna indirgenmesini sağlar. Böylece oluşan yeni ürün daha az toksik veya reaktivitesi oldukça düşüktür ¹²⁰. Çeşitli hücrelerde, aldoz redüktaz' ın 4-hidroksinonenal' in toksik etkisine karşı koruyucu olabileceğini gösteren birçok çalışma yapılmıştır. Ancak aldoz

redüktaz 1B1 protein ifadenmesinin fizyolojik veya patolojik dozlarda 4-hidroksinonenal uygulamasından sonra pankreatik beta hücrelerindeki değişimi daha önce gösterilmemiştir. Bu çalışmada 4-hidroksinonenal uygulaması fizyolojik dozda (1 μ M) hücrede aldoz redüktaz 1B1 protein ifadenmesini anlamlı derecede artırmıştır. Bu artış düşük dozda uygulanan 4-hidroksinonenal' in detoksifiye edilebilmesi ve hücrenin hayatta kalabilmeleri için geliştirdiği cevap mekanizması olarak açıklanabilir. Aldoaz redüktaz 1B1 pankreatik beta hücrelerinde 4-hidroksinonenal' in toksik etkisine karşı koruyucu enzim olabilir. Bununla birlikte pankreatik beta hücrelerinde glukotoksik ve glukolipotoksik koşullarda karbonil redüktaz 1 enziminin gen aktarımı ile ifadenmesinin artırıldığı hücrelerde lipid peroksidasyonu sonucu oluşan 4-hidroksinonenal ve malondialdehit düzeylerinin yabancı tip kontrol hücrelerine göre anlamlı derecede azaltıldığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada aynı enzim, transkripsiyon düzeyinde baskılandığı zaman hücrelerde oluşan lipid peroksidasyon ürünü toksik aldehitlerin düzeyleri anlamlı derecede artmıştır. Böylece bu çalışmada elektrofilik karbonil bileşiklerinin reaktif aldehit grubunu indirgeyen enzimlerin koruyucu etkisi vurgulanmıştır ¹²¹.

Pankreatik adacık hücrelerinin 36 saat, 11 mM glukoz varlığında RPMI-1640 besiyerinde inkübasyonu sonucu hücrelerde üretilen 4-hidroksinonenal miktarı 0.07 pmol/adacık olarak ölçülmüştür. Bu ölçüme göre adacıklarda 4-hidroksinonenal miktarı yaklaşık olarak 23-35 μ mol/l (sıçan adacıklarının hacmi 2-3 nl olarak kabul edilmiştir.) olarak hesaplanmıştır. Aynı çalışma 4-hidroksinonenal' in dokulardaki düzeyinin normal dokularla kıyaslandığında diyabetik dokularda artabileceği vurgulanmıştır. Ayrıca pankreatik adacık hücrelerinde 1-10 μ M 4-hidroksinonenal' in insülin salgılanmasını azalttığı gösterilmiştir. 4-hidroksinonenal insülin salgılanmasını diğer toksik aldehitlere (malondialdehit 10-50 μ M, pentanal 50-200 μ M) kıyasla daha düşük konsantrasyonlarda baskılamıştır ^{29, 122}.

INS-1 hücrelerinde 1 saat, 50 μ M 4-hidroksinonenal uygulaması gerek bazal gerekse glukozla tetiklenen insülin salgılanmasını anlamlı derecede azaltmıştır. Bununla birlikte 1-25 μ M 4-hidroksinonenal uygulaması aynı hücrelerde insülin salgılanması üzerine etkili olmamıştır.

Miwa ve arkadaşlarının pankreatik adacık hücreleriyle yaptıkları çalışmanın sonucuna göre 50 ve 100 μ M 4-hidroksinonenal uygulaması 1 saat sonunda anlamlı derecede insülin salgılanmasını azaltmıştır. Aynı çalışmada 25 μ M 4-hidroksinonenal uygulaması insülin salgılanmasında değişime neden olmamıştır. Aynı zamanda diğer toksik aldehytlerin (2-butenal, 2-hekzenal, 2-oktenal) insülin salgılanmasını azalttığı gösterilmiştir. Buna ek olarak ketoizokaproik asit ile tetiklenen insülin salgılanması üzerine 100 μ M 4-hidroksinonenal uygulamasının baskılayıcı etkisi de gösterilmiştir. Tüm bu çalışmalar ve bizim çalışmamızın sonuçlarına göre 4-hidroksinonenal pankreatik adacık ve beta hücrelerinde yüksek dozlarda insülin salgılanmasını baskılamaktadır ¹²³.

Lipit peroksidasyon ürünü toksik aldehytler dolaşım sisteminde birçok proteinle Michael reaksiyonuna girerek proteinlerin biyolojik aktivitelerini etkilemektedir. Bu kapsamda rekombinant insan insülin proteini ile 4-hidroksinonenal' in reaksiyonu ile oluşan Michael ürünlerinin insülin' in biyolojik fonksiyonunu olumsuz etkilediği gösterilmiş, bu durumun da insülin direncinin patogenezinde etkili olabileceği vurgulanmıştır ¹²⁴.

Birçok hastalığın patogenezinde, lipit peroksidasyon ürünü toksik aldehytler aracılı sinyal iletimindeki bozukluklar oldukça önemlidir. Dokular veya hücreler arasında kolaylıkla diffüze olabilen veya zara bağlı toksik aldehytler hücrelerde DNA veya proteinlerin modifikasyonu,

antioksidan cevap, ısı-şok protein cevabı, endoplazmik retikulum stres ve apoptozis gibi sinyal yollarını harekete geçirebilir ¹²⁵.

Hücrelere eksojen uygulanan 4-hidroksinonenal direkt olarak proteinlerle çapraz bağlanmalara neden olarak bu proteinlerin hatalı katlanmasını veya uygun katlanamamasını sağlar. Protein-Hidroksinonenal ürünleri hücrelerde hızlıca ısı-şok protein cevabını başlatır. Böylece hasarlı proteinler hızlıca şaperonlar tarafından proteolitik olarak ortadan kaldırılmaya çalışılır. Fakat hücre içersinde şaperonlar tarafından temizlenemeyecek kadar artmış hasarlı veya hatalı katlanmış proteinler endoplazmik retikulum stresi başlatır. Endoplazmik retikulum stres hücre ölümü veya canlılığın devam ettirilmesinde düzenleyici mekanizmalara sahiptir. Böylece endoplazmik retikulum stres sensör proteinleri harekete geçirilerek hatalı katlanmış proteinlerin tamir edilmesi veya ortadan kaldırılması için gerekli proteinlerin veya şaperonların sentezi hızlandırılır ^{80, 126}.

4- hidroksinonenal pankreatik beta hücrelerinde (INS-1) fizyolojik dozun üzerinde toksik dozlarda endoplazmik retikulum stresi uyarmıştır. Burada 4-hidroksinonenal PERK fosforilasyonu ve IRE1- α nın ifadenme düzeylerini artırmıştır.

Daha önceki yapılan çalışmada 4-hidroksinonenal hücre içersinde protein hasarına bağlı endoplazmik retikulum stresi uyarmıştır. Özellikle kolon kanseri hücre hattında 60 μ M 4-hidroksinonenal endoplazmik retikulum stres şaperonlarının ifadenme düzeylerini artırmıştır ⁸⁰.

Ayrıca Keith ve arkadaşlarının deney sonuçlarına göre 4-hidroksinonenal kardiyomiyosit, düz kas ve endotel hücrelerinde PERK ve eIF2- α nın fosforilasyonunu artırarak endoplazmik retikulumda strese neden olmuştur ⁸³.

Bir başka çalışmada 4-hidroksinonenal insan mikrovasküler endotel hücrelerinde PERK ve IRE1- α fosforilasyonunu artırarak endoplazmik retikulum stresi uyarmıştır¹²⁷.

Tüm bu çalışmalar ve bizim deney sonuçlarımıza göre reaktif 4-hidroksinonenal hücrelerde endoplazmik retikulum aracılı stresin tetiklenmesinde oldukça önemlidir.

Endoplazmik retikulum stres hücrelerde hatalı proteinlerin uzaklaştırılmasında ve hücre ölümünün engellenmesinde etkin mekanizmadır. Ancak uzamış veya engellenemeyen endoplazmik retikulum stres hücrelerde apoptotik hücre ölümünün gerçekleşmesinde de etkin mekanizmadır.

Daha önceki yapılan çalışmaların sonuçlarına göre 4-hidroksinonenal hücrelerde stresle aktive edilen protein kinaz sistemlerini uyarmıştır. p38 ve JNK gibi stresle aktive olan protein kinazlar 4-hidroksinonenal aracılı apoptozisin uyarılmasında oldukça etkili rollere sahiptir[128]. Ayrıca uzamış endoplazmik retikulum stres hücrelerde pPERK/CHOP ve kaspaz 12 gibi protein sistemlerinin de aktivasyonuna neden olarak apoptozisi başlatır. CHOP proteini transkripsiyon düzeyinde proapoptotik genlerin ifadelenme düzeylerini artırırken anti-apoptotik Bcl-2 protein düzeylerini azaltarak apoptozisi uyarır¹²⁹.

Hücrede endoplazmik retikulum stres aracılı apoptozis aynı zamanda IRE1-a/JNK sisteminin uyarılması ile başlatılır. IRE1-a'nın uzun süreli uyarılması veya ifadelenme düzeyinin artması JNK proteininin fosforilasyonuna bağlı uyarılmasını sağlar¹³⁰.

INS-1 hücrelerinde 4-hidroksinonenal endoplazmik retikulum stres aracılı apoptozisin belirteçleri olarak bilinen PERK/CHOP, kaspaz 12 ve IRE1-a/JNK sistemlerinin aktivasyonuna neden olmuştur.

4-hidroksinonenal aynı zamanda hücrelerde stres cevap elementi (SRE) ve AP-1 aktivitesini artırır. JNK veya p38 gibi kinaz sistemlerinin kronik aktivasyonu mitokondriyal geçirgenliğin bozulmasında ve mitokondri aracılı apoptozisin başlatılmasında etkin olabilir ¹³¹.

4-hidroksinonenal insan lens epitelyal, retinal pigment epitelyal ve jurkat hücrelerinde, hücre ölümünü indükleyen sinyal kompleksi bileşenleri olarak bilinen FAS-L/FADD/prokaspaz-8 den bağımsız olarak apoptozisi tetiklemiştir[132]. Bununla birlikte 4-hidroksinonenal Daxx proteininin çekirdekten stoplazmaya geçip FAS proteinine bağlanarak apoptozisin sınırlandırılmasını sağlamıştır. Bu mekanizma da hücrenin apoptozise karşı savunma hareketi olarak değerlendirilmiştir ¹³³.

Aynı zamanda 4-hidroksinonenal protein 53 'ün (p53) fosforilasyonu ve nükleusa translokasyonunu sağlar. Böylece p21, Bax, JNK ve kaspaz 3 gibi proapoptotik proteinlerin aktivasyonu sağlanarak apoptozis gerçekleşir ¹³⁴.

Diğer çalışmada glutatyon-hidroksinonenal konjugatının hücre dışına atılmasında gerekli membran proteini RalBP1 proteininin antikot ile baskılanması, hücrede bu konjugatın birikmesine bağlı olarak apoptozisin ilerlemesini sağlamıştır ¹³⁵.

Bizim çalışmamızın sonuçlarına göre 4-hidroksinonenal pankreatik beta hücrelerinde aktif kaspaz 9 ve kaspaz 3 proteinlerinin ifadenme düzeylerini toksik dozlarda anlamlı derecede artırmıştır.

Burada artmış düzeylerde ölçülen kaspaz seviyeleri apoptotik hücre ölümünün gerçekleşmesinde oldukça etkili olabilir.

Genel olarak bulgularımız 4-hidroksinonenal'in in vitro olarak pankreatik beta hücrelerinde hücre canlılığını azalttığı, endoplazmik retikulum stresi başlattığı ve apoptotik proteinlerin hücre içi ifadenme düzeylerini artırdığını göstermiştir.

6. SONUÇ

Bu tez çalışmasında lipid peroksidasyonu reaksiyonları sonucunda oluşan ve önceki çalışmaların sonuçlarına göre hücreler için oldukça toksik olduğu bilinen 4-hidroksinonenal'in pankreatik beta hücreleri (INS-1) üzerine olası etkisini araştırdık. 4-hidroksinonenal uygulamasının sonrasında 60., 120. ve 180. dakikalarda hücre kültürleri sonlandırılarak hücre canlılık oranları MTT ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) deneyi ile ölçüldü. Ayrıca 4-hidroksinonenal' in 60 dakika besi yerinde inkübasyonu sonucu bazal ve glukozla tetiklenen insulin salıverilmesi (ELISA yöntemi ile), endoplazmik retikulum stres sensör proteinleri, apoptozis ile ilişkili kaspaz protein ifadenme düzeyleri ve detoksifikasyon enzimlerinin ifadenme düzeyleri üzerine etkisini western blot yöntemi kullanarak araştırıldı.

INS-1 sıçan pankreatik beta hücrelerinde 4-hidroksinonenal artan zamana ve doza bağlı olarak hücre canlılığını azaltarak toksik etki göstermiştir. 4-hidroksinonenal'in 60 dakika süre ile pankreatik beta hücrelerine etkisi sonucu hücrelerde yüksek toksik dozda (50 μ M) gerek bazal gerekse glukozla tetiklenen insulin salıverilmesini anlamlı derecede azaltmıştır. Diğer yandan 4-hidroksinonenal uygulaması pankreatik beta hücrelerinde detoksifikasyonda görevli glutatyon-s-transferaz ve aldoz redüktaz 1B1 hücre içi protein ifadenmelerini toksik dozlarda uyarmıştır. İlginç olarak aldoz redüktaz protein ifadenme düzeyi toksik olmayan dozda (1 μ M) uygulanan 4-hidroksinonenal sonrası anlamlı düzeyde artmıştır. Endoplazmik retikulum stres sensör proteinleri olarak bilinen PERK' in fosforilasyonu 4-hidroksinonenal uygulaması sonrasında anlamlı derecede artmıştır. Ayrıca yüksek doz 4-hidroksinonenal uygulaması IRE1-a düzeylerini anlamlı derecede artırmıştır. Endoplazmik retikulum aracılı hücre ölümünde etkili CHOP ve kaspaz 12 proteinlerinin de hücre içi ifadenme düzeyleri 4-hidroksinonenal uygulamasından sonra anlamlı

düzeyde artmıştır. Bununla birlikte apoptozisin uyarılmasında etkin JNK protein kinaz sistemi de 4-hidroksinonenal uygulaması sonucu aktive olmuştur. Mitokondriyal apoptozisin göstergesi olarak da bilinen kaspaz 9 ve kaspaz 3 düzeyleri toksik doz (25 ve 50 μ M) 4-hidroksinonenal uygulaması ile anlamlı derecede artmıştır.

Sonuç olarak, diyabetin patogenezinde oldukça etkili beta hücre kaybında oksidatif stresin rolü oldukça açıktır. Bu bağlamda oksidatif strese bağlı lipid peroksidasyonu ile oluşan toksik aldehytler beta hücrelerinde apoptozla hücre kaybında oldukça etkilidir. Beta hücrelerinde 4-hidroksinonenal' in endoplazmik retikulum stres ve endoplazmik retikulum stres aracılı apoptozisi uyardığı ve bu durumda diyabette beta hücre kaybı ve devamında insulin eksikliğine bağlı hipergliseminin gelişimine etken olabilir. Ayrıca toksik dozlarda 4-hidroksinonenal insulin salıverilmesinide azaltarak hipergliseminin devamlılığına katkıda bulunabilir. Çalışmamızın sonuçlarına göre pre-diyabetik evrede antioksidan veya lipid peroksidasyonunu engelleyici tedavi yaklaşımları ile beta hücre kaybı engellenerek diyabetin seyri olumlu yönde değiştirilebilir.

7. ÖZET

Pankreatik beta hücrelerinde (INS-1) 4-hidroksinonenal' in endoplazmik retikulum stres, apoptozis, insulin saliverilmesi ve detoksifikasyon enzimleri üzerine olası etkileri

4-hidroksinonenal lipid peroksidasyonunun bir ürünü olup, yüksek konsantrasyonlarda hücrelerde proteinlerle stabil ürünler oluşturur. Artmış stabil ürünler endoplazmik retikulumda (ER) katlanmamış protein cevabını başlatır. Artmış katlanmamış protein cevabı veya kronik endoplazmik retikulum stres apoptozis ve otofajiyi indükler. Böylece bizde çalışmamızda, pankreatik beta hücrelerinde 4-hidroksinonenal' in ER stres sensör proteinleri, detoksifikasyon enzimleri, apoptozis ve insulin saliverilmesi üzerine etkilerini araştırdık.

INS-1 hücrelerinde 4-hidroksinonenal artan zamana ve doza bağlı olarak hücre canlılığını azaltmıştır. 4-hidroksinonenal toksik dozda bazal ve glukozla tetiklenen insulin saliverilmesini anlamlı derecede azaltmıştır. 4-hidroksinonenal uygulaması detoksifikasyonda görevli glutatyon-s-transferaz ve aldoz redüktaz 1B1 protein ifadenmelerini toksik dozlarda uyarmıştır. Endoplazmik retikulum stres belirteci PERK fosforilasyonu ve IRE1-a düzeylerini toksik doz 4-hidroksinonenal uygulaması ile anlamlı derecede artırmıştır.

4-hidroksinonenal yüksek dozda endoplazmik retikulum aracılı hücre ölümünde etkili CHOP ve kaspaz 12 proteinlerin ifadenmelerinde artışa neden olmuştur. Ayrıca toksik doz 4-hidroksinonenal uygulaması JNK, kaspaz 9 ve kaspaz 3' ün aktivasyonuna neden olmuştur.

Sonuç olarak, 4-hidroksinonenal pankreatik beta hücre kaybında oldukça etkilidir. 4-hidroksinonenal insulin eksikliğine bağlı hipergliseminin gelişimine etken olabilir. Belki de pre-diyabetik evrede

antioksidan veya lipid peroksidleri temizleyici tedavi yaklaşımları ile beta hücre kaybı engellenerek diyabetin seyri olumlu yönde değiştirilebilir.

Anahtar kelimeler: Pankreatik beta hücresi, 4-hidroksinonenal, Endoplazmik retikulum stres, Apoptozis, İnsulin salıverilmesi

8. SUMMARY

Effects of 4-hydroxynonenal on Endoplasmic reticulum stress, apoptosis, insulin release and detoxification enzymes in pancreatic beta cells (INS-1)

4-hydroxynonenal is a products of lipid peroxidation and, at the high concentration in the cell can be form to stabil products with cellular proteins. Increased stabil products leads to unfolded protein response in endoplasmic reticulum (ER). Increased unfolded protein response or chronic ER stress can induce apoptosis and autophagy. So aim of the our study is to investigate the effects of 4-hydroxy-trans-2-nonenal in ER stress sensor proteins, detoxification enzyme profiles, apoptosis and insulin release in pancreatic beta cells (INS-1).

Cell viability was decreased in time and dose dependent manner after 4-hydroxynonenal incubation in INS-1 cells. 4-hydroxynonenal alleviated basal and stimulated insulin release at high toxic dose. On the other hand 4-hydroxynonenal induced expression of detoxification enzymes such as glutathione-S-transferase (GST) and Aldose reductase (AKR1B1). 4-hydroxynonenal increased phosphorylation of PERK and levels of IRE1- α which are the markers of endoplasmic reticulum stress. At a high toxic dose, 4-hydroxynonenal leaded to CHOP and caspase 12 expression whic are effective in ER-mediated cell death. Also toxic dose 4-hydroxynonenal exposure caused to an activation on JNK, caspase 9 and caspase 3 protein expressions.

As a result, 4-hydroxynonenal is effective in loss of pancreatic beta cell mass. 4-hydroxynonenal can be a factor for progression of hyperglycemia depends on insulin defficiency. Perhaps in the pre diabetic stage, antioxidant and lipid peroxide scavenger like

therapeutic approaches for preventing beta cell loss can be changed prognosis of diabetes favorably.

Key words: Pancreatic beta cell, 4-hydroxynonenal, Endoplasmic reticulum stress, Apoptosis, Insulin release

9. KAYNAKLAR

1. Brissova M, Fowler MJ, Nicholson WE, Chu A, Hirshberg B, Harlan DM, Powers et al. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem* 2005; 53: 87-97.
2. Meier JJ, Bhushan A, Butler et al. The potential for stem cell herapy in diabetes. *Pediatr Res* 2006; 59: 65-73.
3. Elayat AA, el-Naggar MM, Tahir et al. An immunocytochemical and morphometric study of the rat pancreatic islets. *J Anat* 1995; 186: 629-37.
4. Rebsomen L, Khammar A, Raccah D, Tsimaratos et al. C-Peptide effects on renal physiology and diabetes. *Exp Diabetes Res* 2008; 2008: 281536.
5. Ratner RE, Dickey R, Fineman M, Maggs DG, Shen L, Strobel SA, Weyer C, Kolterman et al. Amylin replacement with pramlintide as an adjunct to insulin therapy improves long-term glycaemic and weight control in Type 1 diabetes mellitus: a 1-year, randomized controlled trial. *Diabet Med* 2004; 21 1204-12.
6. Goodge KA, Hutton et al. Translational regulation of proinsulin biosynthesis and proinsulin conversion in the pancreatic beta-cell. *Semin Cell Dev Biol* 2000; 11: 235-42.
7. Itoh N, Okamoto et al. Translational control of proinsulin synthesis by glucose. *Nature* 1980; 283: 100-2.
8. Wicksteed B, Herbert HP, Alarcon C, Lingohr MK, Moss LG Rhodes et al Cooperativity between the preproinsulin mRNA untranslated regions is necessary for glucose-stimulated translation." *J Biol Chem* 2001; 276: 22553-8.

9. Shoelson SE, Lee J, Goldfine et al. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 2006; 116: 1793-801.
10. Jackson RS, Creemers JW, Ohagi S, Raffin-Sanson ML, Sanders L, Montague CT, Hutton C, O'Rahilly et al. Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat Genet* 1997; 16: 303-6.
11. Kahn SE, Halban et al. Release of incompletely processed proinsulin is the cause of the disproportionate proinsulinemia of NIDDM. *Diabetes* 46(11): 1725-32.
12. Martin SK, Carroll R, Benig M, Steiner et al. Regulation by glucose of the biosynthesis of PC2, PC3 and proinsulin in (ob/ob) Mouse islets of Langerhans. *FEBS Lett* 1994; 356: 279-82.
13. Olsen HL, Hoy M, Zhang W, Bertorello AM, Bokvist K, Capito K, Efanov AM, Meister B, Thams P, Yang SN, Rorsman P, Berggren PO, Gromada et al. Phosphatidylinositol 4-kinase serves as a metabolic sensor and regulates priming of secretory granules in pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 5187-92.
14. Thorens B. Molecular and cellular physiology of GLUT-2, a high-Km facilitated diffusion glucose transporter. *Int Rev Cytol* 1992; 137: 209-38.
15. Newgard CB, McGarry et al. Metabolic coupling factors in pancreatic beta-cell signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1995; 64: 689-719.
16. Porksen N, Munn S, Steers J, Veldhuis JD, Butler et al. Effects of glucose ingestion versus infusion on pulsatile insulin secretion. The incretin effect is achieved by amplification of insulin secretory burst mass. *Diabetes* 1996; 45: 1317-23.
17. Iezzi M, Escher G, Meda P, Charollais A, Baldini G, Darchen F, Wollheim CB, Regazzi et al. Subcellular distribution and function of Rab3A, B, C, and D isoforms in insulin-secreting cells." *Mol Endocrinol* 1999; 13: 202-12.

18. Saltiel AR, Pessin et al. Insulin signaling pathways in time and space. *Trends Cell Biol* 2002; 12: 65-71.
19. Duckworth WC, Bennett RG, Hamel et al. Insulin degradation: progress and potential. *Endocr Rev* 1998; 19: 608-24.
20. Chandra J, Zhivotovsky B, Zaitsev S, Juntti-Berggren L, Berggren PO, Orrenius et al. Role of apoptosis in pancreatic beta-cell death in diabetes. *Diabetes* 2001; 50: 44-7.
21. Cnop M, Welsh N, Jonas JC, Jorns A, Lenzen S, Eizirik et al. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes* 2005; 54: 97-107.
22. Maedler K, Sergeev P, Ris F, Oberholzer J, Joller-Jemelka HI, Spinas GA, Kaiser N, Halban AP, Donath et al. Glucose-induced beta cell production of IL-1 β contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J Clin Invest* 2002; 110: 851-60.
23. Piemonti L, Leone BE, Nano R, Sacconi A, Monti P, Maffi P, Bianchi G, Sica A, Peri G, Melzi R, Aldrighetti L, Secchi A, Di Carlo V, Allavena P, Bertuzzi et al. Human pancreatic islets produce and secrete MCP-1/CCL2: relevance in human islet transplantation. *Diabetes* 2002; 51: 55-65.
24. Maedler K. Beta cells in type 2 diabetes - a crucial contribution to pathogenesis. *Diabetes Obes Metab* 2008; 10: 408-20.
25. Prentki M, Nolan et al. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 2006; 116: 1802-12.
26. Robertson RP, Harmon et al. Diabetes, glucose toxicity, and oxidative stress: A case of double jeopardy for the pancreatic islet beta cell. *Free Radic Biol Med* 2006; 41(2): 177-84.
27. Kaneto H, Nakatani Y, Kawamori D, Miyatsuka T, Matsuoka et al. Involvement of oxidative stress and the JNK pathway in glucose toxicity. *Rev Diabet Stud* 2004; 1: 165-74.

28. Lupi R, Dotta F, Marselli L, Del Guerra S, Masini M, Santangelo C, Patane G, Boggi U, Piro S, Anello M, Bergamini E, Mosca F, Di Mario U, Del Prato S, Marchetti et al. Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that beta-cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated. *Diabetes* 2002; 51: 1437-42.
29. Suarez-Pinzon WL, Strynadka K, Rabinovitch et al. Destruction of rat pancreatic islet beta-cells by cytokines involves the production of cytotoxic aldehydes. *Endocrinology*. 1996; 137: 5290-6.
30. Numazawa S, Sakaguchi H, Aoki R, Taira T, Yoshida et al. Regulation of the susceptibility to oxidative stress by cysteine availability in pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008; 295: 468-74.
31. Zhang K, Kaufman et al. Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 2004; 279 25: 25935-8.
32. Scheuner D, Kaufman et al. The unfolded protein response: a pathway that links insulin demand with beta-cell failure and diabetes. *Endocr Rev*. 2008; 29: 317-33.
33. Cox JS, Shamu CE, Walter et al. Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell*. 1993; 73: 1197-206.
34. Mori K, Ma W, Gething MJ, Sambrook et al. A transmembrane protein with a cdc2+/CDC28-related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus. *Cell*. 1993; 74: 743-56.
35. Tirasophon W, Welihinda AA, Kaufman et al. A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev*. 1998; 12: 1812-24.

36. Wang XZ, Harding HP, Zhang Y, Jolicoeur EM, Kuroda M, Ron et al. Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *EMBO J.* 1998; 17: 5708-17.
37. Shamu CE, Walter et al. Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *EMBO J.* 1996 Jun 17;15(12):3028-39.
38. Shi Y, Vatter KM, Sood R, An J, Liang J, Stramm L, Wek et al. Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, PEK, involved in translational control. *Mol Cell Biol.* 1998; 18: 7499-509.
39. Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori et al. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell.* 1999; 10: 3787-99.
40. Dorner AJ, Wasley LC, Kaufman et al. Overexpression of GRP78 mitigates stress induction of glucose regulated proteins and blocks secretion of selective proteins in Chinese hamster ovary cells. *EMBO J.* 1992; 11: 1563-71.
41. Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron et al. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol.* 2000; 2: 326-32.
42. Shen J, Chen X, Hendershot L, Prywes et al. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev Cell.* 2002; 3: 99-111.
43. Liu CY, Xu Z, Kaufman et al. Structure and intermolecular interactions of the luminal dimerization domain of human IRE1alpha. *J Biol Chem.* 2003; 278: 17680-7.
44. Liu CY, Wong HN, Schauer JA, Kaufman et al. The protein kinase/endoribonuclease IRE1alpha that signals the unfolded protein response has a luminal N-terminal ligand-independent dimerization domain. *J Biol Chem.* 2002; 277: 18346-56.

45. Sidrauski C, Walter et al. The transmembrane kinase Ire1p is a sitespecific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell* 1990; 90: 1031–1039.
46. Hollien J, Weissman et al. Decay of endoplasmic reticulumlocalized mRNAs during the unfolded protein response. *Science* 2006; 313:104–107
47. Harding H, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron et al. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell* 2000; 5: 897–904.
48. Harding HP, Calfon M, Urano F, Novoa I, Ron et al. Transcriptional and translational control in the mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2002; 18: 575–599.
49. Scheuner D, Song B, McEwen E, et al. Translational control is required for the unfolded protein response and in-vivo glucose homeostasis. *Mol Cell* 2001; 7: 1165–1176.
50. Scheuner D, Mierde DV, Song B, et al. Control of mRNA translation preserves endoplasmic reticulum function in beta cells and maintains glucose homeostasis. *Nat Med* 2005; 11: 757–764.
51. Chakravarthi S, Jessop CE, Bulleid et al. The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress. *EMBO Rep.* 2006; 7:271-5.
52. Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Davé UP, Prywes R, Brown MS, Goldstein et al. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell.* 2000; 6: 1355-64.
53. Yoshida H. ER stress and diseases. *FEBS J* 2007; 274: 630–658.
54. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35: 495–516.
55. van der Kallen CJ, van Greevenbroek MM, Stehouwer CD, Schalkwijk et al. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in the

- development of diabetes: is there a role for adipose tissue and liver? Apoptosis. 2009; 14: 1424-34.
56. Matsumoto M, Minami M, Takeda K, Sakao Y, Akira S. Ectopic expression of CHOP (GADD153) induces apoptosis in M1 myeloblastic leukemia cells.. FEBS Lett 1996; 395:143-7.
 57. McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook et al. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. Mol cell Bio 2001; 21: 1246-59.
 58. Novoa I, Zeng H, Harding HP, Ron et al. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2α. J Cell Biol 2001; 153:1011-22.
 59. Boyce M, Bryant KF, Jousse C, Long K, Harding HP, Scheuner D, Kaufman RJ, Ma D, Coen DM, Ron D, Yuan et al. A selective inhibitor of eIF2α dephosphorylation protects cells from ER stress. Science 2005; 307:935-9.
 60. Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, Ron et al. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. Science 2000; 287: 664-6.
 61. Nishitoh H, Saitoh M, Mochida Y, Takeda K, Nakano H, Rothe M, Miyazono K, Ichijo et al. ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2. Mol Cell 1998; 2:389-95.
 62. Lei K, Davis et al. JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100:2432-7.
 63. Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, Yui D, Gomi F, Katayama T, Tohyama et al. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. J Biol Chem 2001; 276:13935-40.

64. Nakagawa T, Yuan et al. Cross-talk between two cysteine protease families: Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* 2000; 150:887-94.
65. Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko et al. An ER stress-specific caspase cascade in apoptosis: Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem* 2002; 277:34287-94.
66. Nakanishi K, Sudo T, Morishima et al. Endoplasmic reticulum stress signaling transmitted by ATF6 mediates apoptosis during muscle development. *J Cell Biol* 2005; 169:555-60.
67. Mori K, Kawahara T, Yoshida H, Yanagi H, Yura et al. Signaling from endoplasmic reticulum to nucleus: Transcription factor with a basic-leucine zipper motif is required for unfolded protein-response pathway. *Genes Cells* 1996; 1:803-17.
68. Lipson KL, Fonseca SG, Ishigaki S, Nguyen LX, Foss E, Bortell R, Rossini AA, Urano et al. Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE1. *Cell Metab.* 2006; 4: 245-54.
69. Bachar E, Ariav Y, Ketzinel-Gilad M, Cerasi E, Kaiser N, Leibowitz et al. Glucose amplifies fatty acid-induced endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta-cells via activation of mTORC1. *PLoS One.* 2009; 4:e4954.
70. Elouil H, Bensellam M, Guiot Y, Vander Mierde D, Pascal SM, Schuit FC, Jonas et al. Acute nutrient regulation of the unfolded protein response and integrated stress response in cultured rat pancreatic islets. *Diabetologia.* 2007; 50: 1442-52.
71. Hartman MG, Lu D, Kim ML, Kociba GJ, Shukri T, Buteau J, Wang X, Frankel WL, Guttridge D, Prentki M, Grey ST, Ron D, Hai et al. Role for activating transcription factor 3 in stress-induced beta-cell apoptosis. *Mol Cell Biol.* 2004; 24: 5721-32.

72. Laybutt DR, Preston AM, Akerfeldt MC, Kench JG, Busch AK, Biankin AV, Biden et al. Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2007; 50: 752-63.
73. Bachar E, Ariav Y, Cerasi E, Kaiser N, Leibowitz et al. Neuronal nitric oxide synthase protects the pancreatic beta cell from glucolipotoxicity-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Diabetologia*. 2010; 53: 2177-87.
74. Haynes CM, Titus EA, Cooper et al. Degradation of misfolded proteins prevents ER-derived oxidative stress and cell death. *Mol Cell*. 2004; 15: 767-76.
75. Leibowitz G, Bachar E, Shaked M, Sinai A, Ketzinel-Gilad M, Cerasi E, Kaiser et al. Glucose regulation of β -cell stress in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 2010; 2: 66-75.
76. Halliwell B, Chirico et al. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr*. 1993; 57: 715-724
77. Guéraud F, Atalay M, Bresgen N, Cipak A, Eckl PM, Huc L, Jouanin I, Siems W, Uchida et al. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radic Res*. 2010; 44:1098-124.
78. Petersen DR, Doorn et al. Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets. *Free Radic Biol Med*. 2004; 37: 937-45.
79. Jacobs AT, Marnett et al. Systems analysis of protein modification and cellular responses induced by electrophile stress. *Acc Chem Res*. 2010 May 18;43(5):673-83.
80. West JD, Marnett et al. Alterations in gene expression induced by the lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal. *Chem Res Toxicol*. 2005; 18: 1642-53.
81. Smathers RL, Galligan JJ, Stewart BJ, Petersen et al. Overview of lipid peroxidation products and hepatic protein modification in alcoholic liver disease. *Chem Biol Interact*. 2011; Feb 24.
82. Sanson M, Augé N, Vindis C, Muller C, Bando Y, Thiers JC, Marachet MA, Zarkovic K, Sawa Y, Salvayre R, Nègre-Salvayre et al. Oxidized

- low-density lipoproteins trigger endoplasmic reticulum stress in vascular cells: prevention by oxygen-regulated protein 150 expression. *Circ Res*. 2009 Feb 13;104(3):328-36.
83. Keith RJ, Haberzettl P, Vladykovskaya E, Hill BG, Kaiserova K, Srivastava S, Barski O, Bhatnagar et al. Aldose reductase decreases endoplasmic reticulum stress in ischemic hearts. *Chem Biol Interact*. 2009 ; 178: 242-9.
 84. Barrera G, Martinotti S, Fazio V, Manzari V, Paradisi L, Parola M, Frati L, Dianzani et al. Effect of 4-hydroxynonenal on c-myc expression. *Toxicol Pathol*. 1987; 15: 238-40.
 85. Forman HJ, Dickinson et al. Introduction to serial reviews on 4-hydroxy-2-nonenal as a signaling molecule. *Free Radic Biol Med*. 2004; 37: 594-6.
 86. Liu W, Akhand AA, Takeda K, Kawamoto Y, Itoigawa M, Kato M, Suzuki H, Ishikawa N, Nakashima et al. Protein phosphatase 2A-linked and -unlinked caspase-dependent pathways for downregulation of Akt kinase triggered by 4-hydroxynonenal. *Cell Death Differ*. 2003; 10: 772-81.
 87. Yang Y, Sharma A, Sharma R, Patrick B, Singhal SS, Zimniak P, Awasthi S, Awasthi et al. Cells preconditioned with mild, transient UVA irradiation acquire resistance to oxidative stress and UVA-induced apoptosis: role of 4-hydroxynonenal in UVA-mediated signaling for apoptosis. *J Biol Chem*. 2003; 278: 41380-8.
 88. Barrera G, Pizzimenti S, Dianzani et al. 4-hydroxynonenal and regulation of cell cycle: effects on the pRb/E2F pathway. *Free Radic Biol Med*. 2004; 37: 597-606.
 89. Awasthi YC, Sharma R, Cheng JZ, Yang Y, Sharma A, Singhal SS, Awasthi et al. Role of 4-hydroxynonenal in stress-mediated apoptosis signaling. *Mol Aspects Med*. 2003; 24: 219-30.
 90. Marchette LD, Thompson DA, Kravtsova M, Ngansop TN, Mandal MN, Kasus-Jacobi A. Retinol dehydrogenase 12 detoxifies 4-

- ydroxynonenal in photoreceptor cells. *Free Radic Biol Med*. 2010; 48: 16-25.
91. Zhang W, He Q, Chan LL, Zhou F, El Naghy M, Thompson EB, Ansari et al. Involvement of caspases in 4-hydroxy-alkenal-induced apoptosis in human leukemic cells. *Free Radic Biol Med*. 2001; 30: 699-706.
 92. Barrera G, Pizzimenti S, Serra A, Ferretti C, Fazio VM, Saglio G, Dianzani et al. 4-hydroxynonenal specifically inhibits c-myc but does not affect c-fos expressions in HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996; 227: 589-93.
 93. Calonghi N, Boga C, Cappadone C, Pagnotta E, Bertucci C, Fiori J, Masotti et al. Cytotoxic and cytostatic effects induced by 4-hydroxynonenal in human osteosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 293: 1502-7.
 94. Cerbone A, Toaldo C, Laurora S, Briatore F, Pizzimenti S, Dianzani MU, Ferretti C, Barrera et al. 4-Hydroxynonenal and PPARgamma ligands affect proliferation, differentiation, and apoptosis in colon cancer cells. *Free Radic Biol Med*. 2007; 42: 1661-70.
 95. Uchida K, Shiraishi M, Naito Y, Torii Y, Nakamura Y, Osawa et al. Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. 4-hydroxy-2-nonenal is a potential inducer of intracellular peroxide production. *J Biol Chem*. 1999; 274: 2234-42.
 96. Janjic D., Wollheim et al. Islet cell metabolism is reflected by the MTT (tetrazolium) colorimetric assay. *Diabetologia* 1992, 35, 482-485.
 97. Kaneto H, Kawamori D, Matsuoka TA, Kajimoto Y, Yamasaki et al. Oxidative stress and pancreatic beta-cell dysfunction. *Am J Ther* 2005; 12: 529–533
 98. Poitout V, Robertson et al. Secondary beta-cell failure in Type 2 diabetes: a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology* 2002; 143: 339–342

99. Hunt JV, Dean RT, Wolff et al. Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. *Biochem J* 1988; 256: 205–212.
100. Sakurai T, Tsuchiya S. Superoxide production from nonenzymatically glycated protein. *FEBS Lett* 1988; 236: 406–410.
101. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner et al. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991; 11: 81–128.
102. Petersen DR, Doorn et al. Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets. *Free Radic Biol Med*. 2004; 37: 937-45.
103. Ihara Y, Toyokuni S, Uchida K, Odaka H, Tanaka T, Ikeda H, Hiai H, Seino Y, Yamada et al. Hyperglycemia causes oxidative stress in pancreatic beta-cells of GK rats, a model of Type 2 diabetes. *Diabetes* 1999; 48: 927–932.
104. Koyama M, Wada R, Sakuraba H, Mizukami H, Yagihashi et al. Accelerated loss of islet β -cells in sucrose-fed Goto-Kakizaki rats, a genetic model of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Pathol* 1998; 153: 537–545.
105. Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin producing cells. *Diabetes* 1997; 46: 1733–1742.
106. Benedetti A, Comporti M, Fulceri R, Esterbauer et al, Cyto-toxic aldehydes originating from the peroxidation of liver microsomal lipids—Identification of 4,5-dihydroxydecenal, *Biochim. Biophys. Acta* 1984; 792: 172–181.
107. Dianzani MU. 4-hydroxynonenal from pathology to physiology. *Mol Aspects Med*. 2003; 24: 263-72.
108. Li Y, Cao Z, Zhu et al. Upregulation of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes by the red wine polyphenol, resveratrol in cultured

- aortic smooth muscle cells leads to cytoprotection against oxidative and electrophilic stress. *Pharmacol Res.* 2006; 53: 6-15.
109. Ahmed I, John A, Vijayasathathy C, Robin MA, Raza et al. Differential modulation of growth and glutathione metabolism in cultured rat astrocytes by 4-hydroxynonenal and green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate. *Neurotoxicology.* 2002; 23: 289-300.
 110. Srivastava S, Chandra A, Wang L.F, Seifert W.E Jr., DaGue B.B, Ansari N.H, Srivastava S.K, Bhatnagar et al. Metabolism of the lipid peroxidation product, 4-hydroxy-trans-2-nonenal, in isolated perfused rat heart, *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 10893–10900.
 111. Fukuda A, Nakamura Y, Ohigashi H, Osawa T, Uchida et al. Cellular response to the redox active lipid peroxidation products: induction of glutathione S-transferase P by 4-hydroxy-2-nonenal, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997; 236: 505–509.
 112. Choudhary S, Xiao T, Srivastava S, Zhang W, Chan L.L, Vergara L.A, Van Kuijk F.J.G.M. Ansari et al. Toxicity and detoxification of lipid-derived aldehydes in cultured retinal pigmented epithelial cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2005; 204: 122–134.
 113. Awasthi YC, Ansari GA, Awasthi et al. Regulation of 4-hydroxynonenal mediated signaling by glutathione S-transferases. *Methods Enzymol.* 2005; 401: 379-407.
 114. Xie C, Lovell MA, Xiong S, Kindy MS, Guo J, Xie J, Amaranth V, Montine TJ, Markesbery et al. Expression of glutathione-S-transferase isozyme in the SY5Y neuroblastoma cell line increases resistance to oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2001; 31: 73-81.
 115. Gallagher EP, Huisden CM, Gardner et al. Transfection of HepG2 cells with hGSTA4 provides protection against 4-hydroxynonenal-mediated oxidative injury. *Toxicol In Vitro.* 2007; 21: 1365-72.
 116. Vaillancourt F, Fahmi H, Shi Q, Lavigne P, Ranger P, Fernandes JC, Benderdour et al. 4-Hydroxynonenal induces apoptosis in human

- osteoarthritic chondrocytes: the protective role of glutathione-S-transferase. *Arthritis Res Ther.* 2008; 10: R107.
117. Malone PE, Hernandez et al. 4-Hydroxynonenal, a product of oxidative stress, leads to an antioxidant response in optic nerve head astrocytes. *Exp Eye Res.* 2007; 84: 444-54.
 118. Zhu H, Zhang L, Xi X, Zweier JL, Li et al. 4-Hydroxy-2-nonenal upregulates endogenous antioxidants and phase 2 enzymes in rat H9c2 myocardial cells: protection against overt oxidative and electrophilic injury. *Free Radic Res.* 2006; 40: 875-84.
 119. Tjalkens RB, Luckey SW, Kroll DJ, Petersen et al. Alpha,beta-unsaturated aldehydes increase glutathione S transferase mRNA and protein: correlation with activation of the antioxidant response element. *Arch Biochem Biophys.* 1998; 359: 42-50.
 120. Barski O.A, Tipparaju S.M, Bhatnagar et al. The aldo–keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification, *Drug Metab Rev.* 2008; 40: 553–624., Shen Y, Zhong L, Johnson S, Cao D. Human aldo-keto reductases 1B1 and 1B10: A comparative study on their enzyme activity toward electrophilic carbonyl compounds. *Chem Biol Interact.* 2011; 191: 192-8.
 121. Rashid MA, Lee S, Tak E, Lee J, Choi TG, Lee JW, Kim JB, Youn JH, Kang I, Ha J, Kim et al. Carbonyl reductase 1 protects pancreatic β -cells against oxidative stress-induced apoptosis in glucotoxicity and glucolipotoxicity. *Free Radic Biol Med.* 2010; 49: 1522-33
 122. Suarez-Pinzon WL, Strynadka K, Rabinovitch et al. Destruction of rat pancreatic islet beta-cells by cytokines involves the production of cytotoxic aldehydes. *Endocrinology.* 1996;137: 5290-6.
 123. Miwa I, Ichimura N, Sugiura M, Hamada Y, Taniguchi et al. Inhibition of glucose-induced insulin secretion by 4-hydroxy-2-nonenal and other lipid peroxidation products. *Endocrinology.* 2000;141: 2767-72.
 124. Pillon NJ, Vella RE, Soulère L, Becchi M, Lagarde M, Soulage et al. Structural and Functional Changes in Human Insulin Induced by the

- Lipid Peroxidation Byproducts 4-Hydroxy-2-nonenal and 4-Hydroxy-2-hexenal. *Chem Res Toxicol*. 2011; 24: 752-762.
125. McGrath CE, Tallman KA, Porter NA, Marnett et al. Structure-activity analysis of diffusible lipid electrophiles associated with phospholipid peroxidation: 4-hydroxynonenal and 4-oxononenal analogues. *Chem Res Toxicol*. 2011; 24:357-70.
 126. Tabas I, Ron et al. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol*. 2011; 13: 184-90.
 127. Sanson M, Augé N, Vindis C, Muller C, Bando Y, Thiers JC, Marachet MA, Zarkovic K, Sawa Y, Salvayre R, Nègre-Salvayre et al. Oxidized low-density lipoproteins trigger endoplasmic reticulum stress in vascular cells: prevention by oxygen-regulated protein 150 expression. *Circ Res*. 2009; 104: 328-36.
 128. Soh Y, Jeong KS, Lee IJ, Bae MA, Kim YC, Song et al. Selective activation of the c-Jun N-terminal protein kinase pathway during 4-hydroxynonenal-induced apoptosis of PC12 cells. *Mol Pharmacol*. 2000; 58: 535-41.
 129. Toth A, Nickson P, Mandl A, Bannister ML, Toth K, Erhardt et al. Endoplasmic reticulum stress as a novel therapeutic target in heart diseases. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 2007; 7: 205-18.
 130. Kim R, Emi M, Tanabe K, Murakami et al. Role of the unfolded protein response in cell death. *Apoptosis*. 2006; 11: 5-13.
 131. Parola M, Robino G, Marra F, Pinzani M, Bellomo G, Leonarduzzi G, Chiarugi P, Camandola S, Poli G, Waeg G, Gentilini P, Dianzani et al. HNE interacts directly with JNK isoforms in human hepatic stellate cells. *J Clin Invest*. 1998; 102: 1942-50.
 132. Sharma R, Sharma A, Dwivedi S, Zimniak P, Awasthi S, Awasthi et al. 4-Hydroxynonenal self-limits fas-mediated DISC-independent apoptosis by promoting export of Daxx from the nucleus to the cytosol and its binding to Fas. *Biochemistry*. 2008; 47: 143-56.

133. Yang X, Khosravi-Far R, Chang HY, Baltimore et al. Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell*. 1997; 89: 1067-76.
134. Sharma A, Sharma R, Chaudhary P, Vatsyayan R, Pearce V, Jeyabal PV, Zimniak P, Awasthi S, Awasthi et al. 4-Hydroxynonenal induces p53-mediated apoptosis in retinal pigment epithelial cells. *Arch Biochem Biophys*. 2008; 480: 85-94.
135. Yadav S, Zajac E, Singhal SS, Awasthi et al. Linking stress-signaling, glutathione metabolism, signaling pathways and xenobiotic transporters. *Cancer Metastasis Rev*. 2007; 26: 59-69.

10. EKLER

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince engin bilgi ve deneyimlerini büyük bir özveriyle aktaran, ilgisini eksik etmeyen, tez danışmanım, değerli hocam Sayın Prof. Dr. AYSEL ARICIOĞLU' na en içten teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim boyunca emeklerini esirgemeyen değerli hocalarıma içten teşekkürlerimi sunarım.

Tezimim her aşamasında yardımını esirgemeyen değerli arkadaşım Arş. Gör. Volkan ERGİN ve Dr. Ebru Alp' e teşekkürü bir borç bilirim.

Hayatım boyunca sevgi ve desteklerini her zaman hissettiğim, bugünlere gelmemde çok büyük emekleri olan annem AYŞE CUMAOĞLU ve babam MUSTAFA CUMAOĞLU' na ayrıca kardeşlerime en içten sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı : Ahmet
Soyadı : Cumaoglu
Doğum Yeri ve Tarihi : Kayseri, 10.10.1982

Eğitimi

2004 : Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans
Eğitimi
2000-2004 : Erciyes Üniversitesi FEF Biyoloji Bölümü
1996-2000 : Melikgazi Lisesi
1993-1996 : Şehit Aziz Özkan İlköğretim Okulu
1988-1993 : Ahmet Paşa İlkokulu

Yabancı Dili : İngilizce

PROJE DENEYİMİ

- 1-) Diyabet Oluşturulan Rat Karaciğer Dokularında Stobadin'in Oksidatif Stres ve Paraoksonaz-1 Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin Araştırılması (01/2007-21 Gazi Üniv. BAP)
- 2-) Obez hastalarda diyet, egzersiz ve antiobezite ilaç (Orlistat ve Sibutramin) uygulamalarının oksidan stres ve antioksidan savunma mekanizmaları üzerindeki etkileri. (01/2007-02 Gazi Üniv. BAP)
- 3-) Ratlarda deneysel testis torsiyonu ile oluşturulan iskemi-reperfüzyon hasarında korunmada L-Karnitin ve Meloksikamın etkisi (01/2008/44 Gazi Üniv. BAP)
- 4-) Ağır sepsis veya septik şok tanısı konulan hastalarda ADMA ve NO düzeylerinin araştırılması (01/2009-38 Gazi Üniv. BAP)

5-) Deneysel vezikoüreteral reflü modelinde, tedavi amaçlı uyguladığımız üreteroneosistostominin apoptotik aktivite üzerine etkisi (01/2009-19 Gazi Üniv. BAP)

TÜBİTAK PROJELERİ

1-) “Olea europaea yaprağından elde edilen aktif bileşiklerin apoptoz sinyal iletimi yolu ve glukozla stimüle edilen insülin salıverilmesi üzerindeki etkilerinin INS-1E pankreas beta-hücre dizilerinde araştırılması COST-B35 SBAG-3303 106S025 Yardımcı Araştırmacı

2-) Pankreatik hücre disfonksiyonu ve apoptoziste oksidatif stresin rolü: Pridoinol türevi yeni antioksidanların koruyucu etkilerinin araştırılması 108S239 Bursiyer

KURS DENEYİMİ

İleri moleküler hücre biyolojisi teknikleri eğitimi 12-16 Mayıs 2008 Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi. (Hücre Kültürü, İmmünohistokimya, İmmünofloresan, Western Blotlama, Real Time PCR)

Hücre Füzyonu Yöntemi İle Monoklonal Antikor Üretimi Uygulamalı Eğitimi Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi 08-12 Haziran 2009. (İmmünizasyon, Hibridoma teknolojisi, ELISA Afinite kolon kromatografisi)