



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

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**PROTEOZOM İNHİBİTÖRÜ BORTEZOMİBİN TİP 1
DİYABETİN TEDAVİSİNDE KULLANILABİLİRLİĞİNİN İN
VİVO KOŞULLARDA ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS

Çiğdem EKİN

DANIŞMAN

Doç. Dr. Kamile ÖZTÜRK

AKSARAY, 2016



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

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**PROTEOZOM İNHİBİTÖRÜ BORTEZOMİBİN TİP 1
DİYABETİN TEDAVİSİNDE KULLANILABİLİRLİĞİNİN İN
VİVO KOŞULLARDA ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS

Çiğdem EKİN

DANIŞMAN

Doç. Dr. Kamile ÖZTÜRK

AKSARAY, 2016

AKSARAY ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ONAY BELGESİ

Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 132307009 numaralı Yüksek Lisans öğrencisi, “Çiğdem EKİN”, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “Proteozom İnhibitörü Bortezomibin Tip 1 Diyabetin Tedavisinde Kullanılabilirliğinin İn Vivo Koşullarda Araştırılması” başlıklı tezini, aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Doç. Dr. Kamile ÖZTÜRK**
Aksaray Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. A.Kevser ÖZDEN**
Hacettepe Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Doç. Dr. Mehmet KARACA**
Aksaray Üniversitesi

Teslim Tarihi :5 Eylül 2016

Savunma Tarihi :21 Ekim 2016

DOĞRULUK BEYANI

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu ve bu eserleri her kullanışında alıntı yaparak yararlandığımı belirtir; bunu şerefimle doğrularım.

Enstitü tarafından belli bir zamana bağlı olmaksızın, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildiririm.

Çiğdem EKİN

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince ve tez çalışmamın her aşamasında, benden yol gösterici önerilerini ve bilgi birikimini hiçbir zaman esirgemeyen, tez danışmanım Doç.Dr. Kamile ÖZTÜRK'e, laboratuvar çalışmaları süresince yardımları için Sercan MERCAN'a ve Mehtap TARHAN'a, istatistik çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Merve BAŞOL'a, ayrıca tez çalışmam sırasında benimle beraber çalışıp emek veren Pankreas Adacık Hücre Araştırma Merkezindeki hocalarıma, arkadaşlarıma ve tüm hayatım boyunca bir nefes kadar yakınımda olduklarını hissettiren sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

“Proteozom İnhibitörü Bortezomibin Tip 1 Diyabetin Tedavisinde Kullanılabilirliğinin İn vivo Koşullarda Araştırılması” adlı, 2015-081 nolu yüksek lisans projesine desteğinden dolayı Aksaray Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
DOĞRULUK BEYANI	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR DİZİNİ	x
1.GİRİŞ	1
2.LİTERATÜR ÖZETİ	5
2.1. Diyabet'in Tanımı ve Tarihçesi	5
2.2. Diyabet'in Epidemiyolojisi	6
2.3. Diyabet'in Tanısı	7
2.4. Diyabet'in Sınıflandırılması	8
2.4.1. Tip 1 Diabetes Mellitus	9
2.4.2. Tip 2 Diabetes Mellitus	10
2.4.3. Gestasyonel Diyabet	10
2.4.4. Prediyabet	11
2.5. T1D gelişiminde rol alan faktörler	11
2.5.1. Genetik faktörler	11
2.5.2. Çevresel Faktörler	12
2.5.3. Otoimmün reaksiyonlar	13
2.6. T1DM ve Otoimmünite	14
2.7. Nükleer Faktör Kappa B.....	17
2.7.1. NF-κB Protein Ailesi	17
2.7.2. İnhibitör Kappa B (IKB) Protein Ailesi	18
2.7.3. IκB Kinaz (IKK) Kompleksi	18
2.7.4. NF-κB Sinyal Yolağının Aktivasyonu.....	18
2.7.5. NF-κB'nin Aktivasyon Yolakları	21
2.8. NF-κB Sinyal Yolağı ve T1D	22
2.9. NF-κB Sinyal Yolağı ve Proteasom	24
2.10. NF-κB Sinyal Yolağı ve Kanser	25
2.11. T1D'in Tedavisi ve Bortezomib	27
3. MALZEME ve YÖNTEM	30
3.1. Araç ve Gereçler.....	30
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	30

3.1.2. Kullanılan Cihazlar	31
3.1.3. Kullanılan Kitler	32
3.1.4. Kullanılan Diğer Malzemeler	32
3.2. Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları	32
3.2.1. Sitrat Tamponu Çözeltisinin Hazırlanması	32
3.2.2. Streptozotosinin (STZ) Hazırlanması	32
3.3. Deney Hayvanlarının Seçimi ve Bakımı	33
3.4. Tip 1 Diyabet Modelinin Oluşturulması	34
3.5. Araştırma Grupları Planı	35
3.6. Canlı Ağırlık ve Açlık Kan Glukoz Ölçümleri	37
3.7. Pankreas Adacık Hücre İzolasyonunda Kullanılan Solüsyonlar ve İşlemler ..	37
3.7.1. NF-κB Protein Ailesi	37
3.8. Pankreasın Çıkarılması ve Adacık Hücrelerinin Saflaştırılması	38
3.8.1. Pankreasın Cerrahi Olarak Çıkarılması	38
3.8.2. Adacıkların Saflaştırılması ve Yıkınması	39
3.8.3. Adacık Hücrelerinin Sayımı	40
3.8.4. Adacık Hücrelerinin Canlılığının Floresan Mikroskop ile	
Değerlendirilmesi	40
3.8.5. Adacıkların Kültür İşlemleri	41
3.9. RNA İzolasyonu	41
3.10. RNA Miktarının ve Saflığının Belirlenmesi	42
3.11. RT-PCR Yöntemi ile Gen İfade Düzeylerinin Saptanması	43
3.12. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	43
3.13. Kantitatif Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)	44
3.14. 2 ^{-ΔΔCT} Yöntemi ile Gen İfade Düzeylerinin Hesaplanması	45
3.15. İstatiksel Değerlendirme	45
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	46
4.1. Ratların Canlı Ağırlık Sonuçları	46
4.2. Çalışma Boyunca Belirlenen Kan Glukoz Düzeyleri	49
4.3. Adacık Hücrelerinin Sayımı	54
4.4. Adacık Hücrelerinin Florasan Boyama ile Canlılık Değerlendirilmeleri	55
4.5. Adacık Hücrelerinden izole edilen RNA'ların Saflığının Kontrolü ve	
Konsantrasyon Tayini	62
4.6. Gen Ekspresyon Düzeyleri	63
4.7. Proteozom İnhibitörü Bortezomib'in β Hücrelerindeki Gen İfade Düzeyleri ..	63
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	70
6. KAYNAKLAR	72
ÖZGEÇMİŞ	86

ÖZET

Tip 1 Diyabet, pankreasın langerhans adacıklarına inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu ve sonrasında insülin salgılayan β hücrelerinin kaybı ile karakterize edilen otoimmün bir hastalıktır. İn vitro ve in vivo olarak yapılmış birçok çalışma, IL-1 β , TNF- α ve IFN- γ gibi proinflamatuvar sitokinlerin neden olduğu β hücre ölümünde Nüklear Faktör Kappa-B (NF- κ B) sinyal yolağının rol aldığını göstermiştir. NF- κ B'nin hücre büyümesi, hücre canlılığı, apoptozis ve inflamasyon gibi önemli biyolojik işlemlerde rol alan birçok genin ifadesini düzenleyen bir transkripsiyonel faktör olduğu bilinmektedir.

Bu tez çalışmasının amacı, günümüzde multiple myeloma tedavisinde kullanılan ve klinikteki etkinliği NF- κ B inhibisyonuna bağlı olan proteozom inhibitörü bortezomib'in, tip 1 diyabetin tedavisinde kullanılabilirliğini in vivo koşullarda araştırmaktır. Bunun için her bir grupta 5-7 tane obez olmayan dişi Sprague Dawley cinsi rat bulunan beş farklı çalışma grubu oluşturuldu. Bunlar, kontrol grubu, diyabet grubu (grup II), bortezomib verilen grup (grup III), STZ ve bortezomibin eş zamanlı verildiği grup (grup IV) ve STZ sonrası diyabetik olduğu doğrulanan ratlara bortezomib verilen tedavi grubudur (grup V). Bortezomib klinikte kullanıldığı şekilde 3 gün ara ile toplamda üç (0, 3, ve 7, gün) doz uygulanmıştır. İlaç uygulaması sonrası tüm hayvanlardan pankreatik adacıklar izole edilerek kültür ortamına alınmıştır. 24 saat kültüre edilmiş tüm adacıklarda hücre canlılığı, propidyum iyodit (PI) ve floresans diasetat (FDA) boyaları kullanılarak floresans mikroskopta saptanmıştır. Sonrasında kültür ortamından alınan adacıklardan RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapılarak apoptotik genlerden bcl-2, bax ve kaspaz 3 genlerinin ifade düzeyleri real time RT-PCR yöntemi kullanılarak araştırılmıştır.

Bu tez çalışması sonucunda, STZ'nin pankreasın insülin salgılayan beta hücrelerinde apoptozise neden olduğu kan şekersizindeki artış, adacıkların % canlılıklarındaki azalma ve apoptotik genlerin ifade düzeylerine bakılarak doğrulandı (bax/bcl-2=3.14/1.99). Tek başına uygulanan bortezomib dozunun pankreasın β hücrelerinde sitotoksik olmadığı (%91) kontrol grubuna göre değişiklik göstermemesi ile saptandı. Bu grupta ayrıca apoptotik gen ifade düzeylerine (bax/bcl-2=0.83/1.69) bakıldığında Bor'in antiapoptotik etkiye neden olduğu gözlemlendi. STZ ve Bor'in eş zamanlı uygulandığı grup IV de, STZ uygulaması ile kan şekeri düzeyleri artmasına karşın, Bor'in β hücrelerinde anti-apoptotik etkiye sahip olduğu bax/bcl-2 (3.84/4.68) oranına bakılarak saptandı. STZ sonrası Bor verilen grup V'de Bor'in hem kan şekeri hem de adacık sayısı açısından bir iyileşmeye neden olmadığı apoptotik gen ifade düzeylerine bakıldığında (bax/bcl-2=4.45/3.30) proapoptotik etki gözlemlendi. Sonuç olarak, adacıkları tamamen harap olmamış diyabetik ratlarda Bor'in NF- κ B sinyal yolağını bloke ederek hücrelerin apoptozise girmesini engelleyebileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Tip I diyabet, bortezomib, NF- κ B sinyal yolağı, apoptozis.

ABSTRACT

Tip 1 diabetes is an autoimmune disease that is characterized as the infiltration of inflammatory cells to pancreatic islets and destruction of the insulin-secreting β cells. The leukocytes, which infiltrate the inner parts of the islet, secrete proinflammatory cytokines like IL- β , TNF- α and IFN- γ that causes death of the β cells. In most studies both in vitro and in vivo, it is shown that Nuclear Factor Kappa-B (NF- κ B) pathway has a role in β cell death that is triggered by those cytokines.

The objective of this study is to investigate the usability of bortezomib, a proteasome inhibitor, whose effectiveness in clinical practice depends on NF- κ B inhibition and which is nowadays used in treatment of multiple myeloma, in treatment of Type-1 Diabetes Mellitus in vivo. For this purpose, five distinct study groups involving 5-7 female Sprague Dawley rats which were not obese were comprised. These were the control group, the diabetes group for which streptozotocin (STZ) was injected (Group II), the group for which bortezomib was administered (Group III), the group for which STZ and bortezomib were administered simultaneously (Group IV) and the treatment group in which bortezomib was administered to the rats which were confirmed to be diabetic following STZ administration (Group V). Bortezomib was administered totally as three (0^{th} , 3^{rd} and 7^{th} days) with 3-day interval, as it is used in clinical practice. Following drug administration, pancreatic islets from all animals were isolated and cultured. In all islets which were cultured for 24 hours, cell viability was determined under fluorescence microscopy by using propidium iodide (PI) and fluorescence diacetate (FDA) stains.

In conclusion of this study, the fact that STZ causes apoptosis in insulin-secreting beta cells of pancreas was confirmed by increase in blood glucose levels, decrease in viability of islets and investigation of expression levels of apoptotic genes (bax/bcl-2=3.14 /1.99). The fact that bortezomib dosage that was administered alone was not cytotoxic for β cells (91%) did not demonstrate any alteration compared to the control group. When apoptotic gene expression levels were investigated in this group, it was determined that Bortezomib had anti-apoptotic effect. In group IV, in which STZ and BOR were administered simultaneously, although blood glucose increased with administration of STZ, the fact that Bortezomib had anti-apoptotic effect on β cells was determined by evaluating bax/bcl-2 (3.84/4.68) ratio. In group V, in which Bortezomib was administered following STZ, it was determined that there was no improvement in terms of neither blood glucose nor number of islets. In group V, when apoptotic gene expression levels were investigated (bax/bcl-2=4.45/3.30), as is in the Group II, its pro-apoptotic effect was determined. In conclusion, it was concluded that in diabetic rats whose islets were not completely destroyed, Bortezomib may prevent cells to undergo apoptosis by inhibiting NF- κ B signalling pathway.

Keywords: NF- κ B, diabetes mellitus, bortezomib, cytokine.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1: HLA gen lokusu.	12
Şekil 2.2: NF-κB, IKB ve IKKprotein aileleri ve bunların yapısal birimleri.	19
Şekil 2.3: NF-κB aktive edici sinyaller ve NF-κB tarafından düzenlenen genler.	20
Şekil 2.4: NF-κB sinyal iletim yolunun aktivasyonu.	22
Şekil 2.5: NF-κB aktivasyonu ile β hücresi apoptozisin şematik gösterimi.	24
Şekil 2.6: Proteozom.	25
Şekil 2.7: Bortezomib'in moleküler yapısı.	26
Şekil 3.1: STZ uygulaması yapılan rat.	35
Şekil 3.2: Rat pankreasının duktus kanalına girilmesi.	38
Şekil 3.3: Rat pankreasının kollegenazla şişirilmesi.	39
Şekil 3.4: Real Time PCR amplifikasyon basamakları.	45
Şekil 4.1: Günlere göre ratların canlı ağırlık değişimleri.	49
Şekil 4.2: Çalışma grupların günlere göre açlık kan glukoz değerleri.	53
Şekil 4.3: 8.gün sonunda ratların açlık kan glukoz düzeyleri ortalamaları.	54
Şekil 4.4: Adacık hücrelerinin DTZ ile boyandıktan önce ve sonraki görünümü.	54
Şekil 4.5: 0.saat kontrol grubu adacık hücrelerinin floresan mikroskop görünümü..	55
Şekil 4.6: 24.saat kontrol grubu adacık hücrelerinin floresan mikroskop görünümü.	56
Şekil 4.7: 0.saat grup II adacık hücrelerinin floresan mikroskop görüntüsü.	56
Şekil 4.8: 24. saat grup II adacık hücrelerinin floresan mikroskop görüntüsü.	57
Şekil 4.9: 0.saat grup III adacık hücrelerinin floresan mikroskop görüntüsü.	57
Şekil 4.10: 24. saat grup III adacık hücrelerinin floresan mikroskop görüntüsü.	58
Şekil 4.11: 0.saat grup IV adacık hücrelerinin floresan mikroskop görüntüsü.	58
Şekil 4.12: 24. saat grup IV adacık hücrelerinin floresan mikroskop görüntüsü.	59
Şekil 4.13: 0.saat grup V adacık hücrelerinin floresan mikroskop görüntüsü.	59
Şekil 4.14: 24.saat grup V adacık hücrelerinin floresan mikroskop görüntüsü.	60
Şekil 4.15: Streptozotosin kimyasal formülü.	61
Şekil 4.16: Total RNA'ların %3'lük agaroz jel görüntüleri.	62
Şekil 4.17: Tüm çalışma gruplarında Bcl-2 geninin ifade düzeyleri.	64
Şekil 4.18: Tüm çalışma gruplarında Bax geninin ifade düzeyleri.	65
Şekil 4.19: Tüm çalışma gruplarında Kaspaz-3 geninin ifade düzeyleri.	65
Şekil 4.20: Tüm çalışma gruplarında genlerin ifade düzeyleri.	66

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1: DM'un tanı kriterleri	8
Çizelge 2.2: Diabetes Mellitus'un etiyolojik sınıflaması.	8
Çizelge 3.1: Deney hayvanlarına verilen yemin bileşimi.	34
Çizelge 3.2: Çalışma grupları	36
Çizelge 3.3: cDNA reaksiyon karışımı.	43
Çizelge 3.4: cDNA sentezi için PCR programı.	43
Çizelge 3.5: Real Time PCR reaksiyon koşulları.	44
Çizelge 4.1: Kontrol grubundaki ratlara ait canlı ağırlık değerleri.....	46
Çizelge 4.2: Grup II'deki ratlara ait canlı ağırlık değerleri.	47
Çizelge 4.3: Grup III'deki ratlara ait canlı ağırlık değerleri.	47
Çizelge 4.4: Grup IV'deki ratlara ait canlı ağırlık değerleri.	47
Çizelge 4.5: Grup V'deki ratlara ait canlı ağırlık değerleri.....	48
Çizelge 4.6: Tüm gruptaki ratların ağırlıklarının günlere göre ortalaması.	48
Çizelge 4.7: Kontrol grubundaki ratlara ait kan glukoz değerleri.	49
Çizelge 4.8: Grup II' deki ratlara ait kan glukoz değerleri.	50
Çizelge 4.9: Grup III'deki ratlara ait kan glukoz değerleri.	50
Çizelge 4.10: Grup IV'deki ratlara ait kan glukoz değerleri.	50
Çizelge 4.11: Grup V'deki ratlara ait kan glukoz değerleri.	51
Çizelge 4.12: Tüm grupta ait ortalama açlık kan glukoz değerleri.	51
Çizelge 4.13: Tüm grupta ait hücre canlılığı değerleri.	60

SİMGELER DİZİNİ

g/mol	Mol başına kütle birimi
IU/kg	Kilogram başna ünite
M	Molar
Mg	Miligram
mg/dL	Desilitre başına miligram
mg/kg	Kilogram başına miligram
mL	Mililitre
rpm	Dakikadaki devir sayısı
2^{-ΔΔCT}	Hedef genin kontrol grubuna göre ifade düzeyindeki katlık değişim

KISALTMALAR DİZİNİ

ADA	Amerikan Diyabet Birliği
ATM	Ataksi Telenjektazi Mutant Kinaz
Bax	Bcl-2 ile ilişkili X protein
Bcl-2	B hücresi lösemi/lenfoma-2
β	Beta
Bor	Bortezomib
CASP AZ-3	Apoptotik ölüm yolağında görev alan Kaspaz ailesinin bir üyesi
COX-2	Siklooksijenaz-2
DM	Diabetes Mellitus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
E1	Ubiquitin Aktive Edici Enzim
E2	Ubiquitin Konjuge Edici Enzim
E3	Ubiquitin Ligaz Enzimi
EDPG	Avrupa Diyabet Politikası Belirleme Grubu
FBS	Fetal sığır serumu
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Kuruluşu
FDA	Floresan Diasetat Solüsyonu
GAD	Glutamik Asit Dekarboksilaz
GAPDH	Gliseralaldehid-3-fosfat dehidrogenaz
GDM	Gestasyonel diyabet
GLUT2	Glukoz Taşıyıcısı 2
GRR	Glisin Amino Asidi Bakımından Zengin Bölgesi
HbA1c	Hemoglobin A1c
HLA	İnsan Lökosit Antijen
HLH	Sarmal-İlmek-Sarmal
IAA	İnsulin Otoantikorları
IA-2	Anti-tirozin Fosfataz Otoantikorları

IA-2β	Anti-Fogrin Otoantikorları
ICA	Adacık Hücresi Sitoplazmik Otoantikorı
IDF	Uluslararası Diyabet Fedarasyonu
IDDM	İnsüline Bağımlı Diyabet Mellitus (Insulin Dependent Diabetes Mellitus)
IDDM2	İnsüline Bağımlı Diyabet Mellitus 2
IDDM12	CTLA-4 Geni
IFN-α	İnterferon <u>alfa</u>
IFN-γ	İnterferon- γ
IκB	İnhibitör-kappa B
IKK	İnhibitör-kappa kinaz
IL-	İnterlökin (Interleukin)
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
JAK1-2	Janus Kinases
KD	Protein Kinaz Bölgesi
LZ	Lösın fermuarı motifi
MCP-1	Monosit Kemoatraktan Protein-1
MIP-1α	Makrofaj İnflamatuvar Protein 1-Alfa
NBD	IKK γ /NEMO bağlanma bölgesi
NDDG	Amerikan Ulusal Veri Grubu= National Diyabet Data Group
NEMO	NF- κ B esansiyel modölatör
NES	Nükleer Export Dizisi
NIDDM	İnsuline Bağımlı Olmayan
NO	Nitrik Oksid
NOD	Obez Olmayan Fare
NF-κB	Nükleer Faktör Kappa B
NLS	Nükleer Lokalizasyon Dizisi
PDX-1	Pankreas, Duodenal Homeobox 1
RHD	Rel homoloji bölgesi

RTK	Reseptör Tirozin Kinaz
RT-PCR	Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
STAT-1	Sinyal ileticisi ve aktivatörü 1(Signal Transducer And Activator Of Transcription 1)
STZ	Streptozotosin
T1D	Tip 1 Diyabet
T2D	Tip 2 Diyabet
TAD	Transkripsiyonal Aktivasyon Bölgesi
TBE	Tris-Boat-EDTA
TEKHARF	Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalıkları ve Risk Faktörleri
TGF-β	Transforme edici büyüme faktörü beta (Transforming growth factor beta)
T_h	T yardımcı hücre(T helper cells)
TH17	T yardımcı 17 hücre (T helper 17 cells)
TNF-α	<u>Tümör Nekroz Faktör</u> alfa
Treg	Düzenleyici T hücreleri
TURDEP	Türkiye Diyabet Epidemiyoloji Çalışması
PI	Propidyum İyodit Solüsyonu
VNTR	Değişken Sayıda Ardışık Tekrar Eden Dizinler Bölgesi
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)

1. GİRİŞ

Diyabet, diabetes mellitus (DM), pankreasın beta(β) hücrelerinin insülin salgılama yetersizliği ve/veya dokuların insüline yanıtının bozulmasıyla oluşan, karbonhidrat, protein ve lipid metabolizmasını etkileyen kronik ve metabolik bir hastalıktır.

Diyabet sadece Türkiye'nin değil tüm dünyanın güncel sağlık sorunları arasında olup her geçen gün hızla yayılan, aynı zamanda ülke ekonomisini de olumsuz etkileyen otoimmün bir hastalıktır. Uluslararası Diyabet Fedarasyonu (IDF) verilerine göre 2015 yılında dünyada yaklaşık 415 milyon diyabet hastası varken, 2040 yılında bu sayının 642 milyona çıkacağı tahmin edilmektedir [1]. Diyabetin tüm populasyonlarda ve yaş gruplarında yaygın olarak görülmesine ek olarak tüm metabolizmayı etkiliyor olması da bu hastalık üzerine yapılan çalışmaların giderek artmasına ve önem kazanmasına neden olmaktadır [2].

Diyabet, patolojik olarak Tip 1 ve Tip 2 olmak üzere iki ana forma ayrılır. Tip 1 diyabet, insülin bağımlı diyabet (IDDM), pankreasın langerhans adacıklarında insülin üreten β hücrelerinin yıkımı ve fonksiyon kaybı ile karakterize edilen otoimmün bir hastalıktır. Tip 2 diyabet ise insüline direncin geliştiği kısmi insülin yetersizliği ile karakterize edilen bir hastalıktır. Son yıllarda, diyabetin her iki tipinde de β hücre kütlesinde azalma olduğu ve bunun apoptozis yoluyla gerçekleştiği gösterilmiştir [3].

Tip 1 diyabet (T1D), tip 2 diyabete göre daha az sıklıkta rastlanan bir hastalık olmasına karşın, birçok populasyonda insidansı gittikçe arttığı ve erken evre hastalıklarından birisi olduğu için ana sağlık problemlerinden birisidir. Yapılan çalışmalarda, tip 1 diyabetin kesin sebebi bilinmemesine karşın, genetik olarak yatkın bireylerde gelişen çok faktörlü inflamatuvar bir hastalık olduğu, ayrıca viral enfeksiyonlar, stres veya travma gibi olaylar sonrasında tetiklenebileceği rapor edilmiştir [4].

Günümüzde halen T1D'in tedavisinde kullanılan en etkin ve tek tedavi yöntemi, insülin hormonunun hastaya enjekte edilmesi ve kan şekeri seviyelerinin düzenli bir şekilde kontrol edilmesi ile yapılmaktadır. İnsülin hormonu 1921 yılında keşfedilmiş

ve ilk defa aynı yıl diyabet tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır [2, 5]. Son yıllarda, hastalığın seyrini geri çevirememesi de, diyet ve egzersiz gibi hayat tarzı değişiklikleri de, T1D'in tedavisinde önem kazanmaya başlamıştır. 2000'li yılların başında subkütan insülin enjeksiyonundan farklı olarak, insülini bir pompa vasıtasıyla vücuda enjekte edecek yeni bir tedavi yöntemi kullanılmaya başlanmıştır. İnsülinin pompa vasıtasıyla kullanılan bu formu, Ocak 2006 tarihinde Amerikan Gıda ve İlaç Kuruluşu (FDA=Food and Drug Administration) tarafından onaylanmış ve kullanıma girmiştir. Ancak bu ilaç, Ekim 2007 tarihinde ekonomik olmaması nedeniyle üretici firma tarafından piyasalardan çekilmiştir [6]. Son on yılda, tip 1 diyabetin tedavisinde hastanın yaşam boyu insülin kullanımı yerine, adacık dokusu ya da pankreas nakli ile kesin tedavi edilebileceği gündeme gelmiştir. Ancak bu nakillerde en büyük sorun doku reddidir. Doku reddini önlemek için immün baskılayıcı ilaçlar kullanılmasına karşın halen vücudun nakledilen yeni organı reddetme ihtimali bulunmaktadır. Ayrıca uygun dokunun bulunamaması da diğer ciddi bir sorunu oluşturur. T1D'in tedavisinde günümüze kadar pek çok yöntem ve tedavi yaklaşımları denenmiş ve uygulanmış olsa da halen kesin bir tedavi şekli bilinmemektedir. Bu nedenle, alternatif tedavi yaklaşımları için yoğun çalışmalar sürdürülmektedir.

Bugün hastalığın tedavi edilmesine yönelik birçok farklı strateji araştırılırken, hastalığın başlaması ve gelişim sürecine ait çok önemli moleküler mekanizmalar da aydınlatılmıştır. Bu mekanizmaların birçoğu insan tip 1 diyabeti ile çok sıkı bir benzerlik gösteren obez olmayan diyabetik fare modellerinden (NOD) elde edilmiştir. NOD farelerle yapılan çalışmalar, adacık içerisine infiltrate olan otoreaktif lenfositlerin, pankreasın insülin salgılayan β hücrelerinin seçici yıkımında rol aldığını göstermiştir. İnsanda olduğu gibi, NOD farelerde de diyabet gelişimi inflamatuvar hücrelerin adacıklar içerisine sızmasıyla karakterize olan inflamasyon ile başlar. Adacık içerisine infiltrate olan lökositler β hücre ölümüne neden olan IL-1 β , TNF- α ve IFN- γ gibi proinflamatuvar sitokinleri salgırlar. İn vitro koşullarda β hücreleri IL-1 β , TNF- α ve IFN- γ gibi sitokinlerle muamele edildiğinde, β hücrelerinin apoptozis mekanizması ile öldüğü [3,7,8,9], ayrıca sitokionlerin neden olduğu bu apoptozis mekanizmasında nükleer faktör kappa B (NF- κ B) sinyal yolağının rol aldığı rapor edilmiştir [8,10,11]. NF- κ Bsitokinle indüklenen β hücre

fonksiyon bozukluğu ve ölümünü kontrol eden genlerin ekspresyonunu düzenleyen başlıca transkripsiyonel faktör olarak tanımlanır [8,10,11,].

NF- κ B 'nin hücre büyümesi, hücre canlılığı, apoptozis ve inflamasyon gibi önemli biyolojik işlemlerde rol alan birçok genin ifadesini düzenleyen bir transkripsiyonel faktör olduğu bilinmektedir [12]. NF- κ B'nin birçok hücre tipinde anti-apoptotik fonksiyona sahip olduğu gösterilmesine karşın, pankreasın β hücrelerinde tip 1 diyabetin gelişimine katkı sağlayacak şekilde pro-apoptotik olduğu rapor edilmiştir [13].

Bütün bu bilgiler ışığında, biz de bu tez çalışmasında, tip 1 diyabet gelişimine neden olan sitokinle indüklenmiş NF- κ B aktivasyonunu bortezomib ile inhibe edilerek β hücre kaybını önleyebileceğimizi hipotezledik. Bu hipotezin temelini bortezomibin multiple myeloma tedavisinde kullanılmasına ve klinikteki etkinliğinin NF- κ B inhibisyonuna bağlı olması gerçeğine dayandırdık.

Multiple myeloma kemik iliğindeki plazma hücrelerinin anormal proliferasyonu ve invazyonu ile karakterize edilen hematolojik bir kanserdir [14]. Günümüzde multiple myeloma tedavisi için kullanılan en etkin yöntem bortezomib'in kullanılmasıdır[15]. Bortezomib antitümör özelliğe sahip bir proteasom inhibitörüdür. 2003 yılında multiple myeloma ve mantle hücreli lenfoma tedavisinde kullanılmak üzere FDA tarafından onay almıştır. Bortezomib'in proteozomları inhibe etmesi, hücre döngüsünün durması, apoptozisin indüklenmesi ve anjiyogenezin inhibe olmasında rol alan sinyal iletim yollarının bozulmasına neden olur [16]. Bugün bortezomib'in birçok hematolojik kanser yanında kolon, akciğer, meme ve prostat kanserleri gibi farklı solid tümörlerde de etkili olduğu ve apoptozisi indüklediği klinik ve önklidik çalışmalarla gösterilmiştir [17,18].

Bu tez çalışmasının temel amacı, günümüzde multiple myeloma tedavisinde kullanılan ve klinikteki etkinliği NF- κ B inhibisyonuna bağlı olan bir proteozom inhibitörü olan bortezomibin, tip 1 diyabetin tedavisinde kullanılabilirliğini in vivo koşullarda araştırmaktır.

Bu amaç için her bir grupta 5-7 tane obez olmayan dişi Sprague Dawley cinsi rattan bulunan beş farklı çalışma grubu oluşturulmuştur. Bunlar, kontrol grubu, diyabetik bir ajan olan streptozotosin (STZ) enjekte edilen diyabet grubu (grup II), bortezomib verilen grup (grup III), STZ ve bortezomibin eş zamanlı verildiği grup (grup IV) ve

STZ sonrası diyabetik olduğu doğrulanen ratlara bortezomib verilen tedavi grubudur (grup V). Bu gruplarda ilaçların kan glukoz düzeylerinin etkisine bakmak için rutin kan glukoz düzeyleri ölçülmüştür. İlaç uygulaması sonrası tüm hayvanlardan pankreatik adacıklar izole edilerek kültür ortamına alınmıştır. İzolasyon sonrası ve 24 saat kültüre edilmiş tüm adacıklarda hücre canlılığı Propidyum İyodit solüsyonu (PI) ve Floresan Diasetat Solüsyonu (FDA) floresan boyaları kullanılarak fluoresans mikroskopta saptanmıştır. Sonrasında kültür ortamında alınan tüm adacıklardan total RNA izolasyonu yapılarak apoptotik genlerden bcl-2, bax ve kaspaz 3 genlerinin ifade düzeyleri real time (RT-PCR) yöntemi kullanılarak saptanmıştır. Sonuçta bortezomib'in diyabet tedavisinde kullanılabilirliği, tüm gruplardaki kan glukoz düzeylerinin, β hücre canlılığının ve apoptotik genlerin ifade düzeylerinin real time RT-PCR yöntemi ile karşılaştırılmasıyla değerlendirilmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Diyabet'in Tanımı ve Tarihçesi

Diabet Mellitus, pankreas β hücrelerinin insülin salgılama yetersizliği veya dokuların insüline yanıtının bozulmasıyla oluşan, karbonhidrat, protein ve lipid metabolizmasını etkileyen kronik ve metabolik bir hastalıktır. DM, akut metabolik komplikasyonların yanı sıra, vasküler, renal, retinal ya da nöropatik bozukluklara yol açan, hastalığa yakalanma (morbidite) ve erken ölüm riski (mortalite) yüksek bir hastalıktır [19].

DM'un tarihçesi çok eskilere dayanmaktadır. İlk olarak M.Ö 1500 yılında Mısır Ebers Papirüsünün de fazla idrar yapılan, idrar yoluyla şeker kaybedilen bir hastalık olarak tanımlanmıştır. M.Ö. 150 yılında Kapadokya'da Areteus, ilk defa "diabetes" adını kullanmıştır [5]. M.S. 9. y.y.'da İslam hekimi Razi ve 10-11. y.y. İslam hekimi İbn-i Sina ayaklarda görülen "diyabetik gangreni" tanımlayarak şeker hastalığının sınırları bozabileceğini ilk kez açıklamıştır. 18. y.y.'da William Cullen "Diabetes" kelimesinin yanına, tatlı veya ballı, anlamına gelen "Mellitus" u eklemiştir. 19. y.y.'da Claude-Bernard glukozun karaciğerde glikojen olarak depolandığını göstermiş, 1869 yılında Paul Langerhans, pankreastaki hücre tiplerini belirleyerek Langerhans adacıklarını tanımlamıştır. 1889'da Oskar Minkowski, DM'dan sorumlu organın pankreas olduğunu kanıtlamıştır [19]. 1921 yılından itibaren Frederick Banting ve Charles Best pankreas salgısı insülini izole ederek hastalığın tedavisine yeni bir boyut kazandırmışlardır [20]. 1940'lı yıllarda ise farklı insülinler keşfedilmiş ve 1964 yılında insülin molekülü sentez edilmeye başlanmıştır. 1970'li yıllarda oral antidiyabetik ilaçlar hızla geliştirilmeye ve daha sonra ikinci ve üçüncü kuşak ilaçlar diyabetin ve komplikasyonlarının önlenmesinde ve yaşam kalitesinin yükseltilmesinde kullanılmaya başlanmıştır. Böylece diyabet tedavisinde pankreas transplantasyonundanimmünoterapiye doğru uzanan yeni tedavi şekilleri denenmeye başlanmıştır [21].

2.2 Diyabet'in Epidemiyolojisi

Diyabet, kanda yüksek glukoz seviyesinin gözlemlendiği glukoz intoleransı ile kendini gösteren ve genetik olarak birden fazla genin etkili olduğu kompleks, heterojen bir hastalıktır.

Son yayımlanan IDF Diyabet Atlası'na göre ülkemiz Avrupa ülkeleri arasında diyabet prevalansının en yüksek olduğu ülkedir. 'Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalıkları ve Risk Faktörleri" Çalışması (TEKHARF)'nın 2009'da yayınlanan verilerine göre, Türkiye'de 35 yaş üstü nüfusta diyabet prevalansı %11,3 olarak tahmin edilmiş ve bunun 3.3 milyon kişiye karşılık geldiği hesaplanmıştır. Bu çalışmaya göre ülkemizde diyabetin artış hızı % 6,7 olup bu, diyabetli popülasyonun 10-11 yılda ikiye katlanması anlamına gelmektedir. Toplumda sıklığı gittikçe artan bir hastalık olan DM çocukluktan ileri yaşa kadar her yaşta görülebilmekte ve yaşam boyu devam etmektedir. Her yıl 7 milyon bireyin diyabet hastası olacağı ve yılda 3.8 milyon ölüm sebebinin de diyabete bağlanabileceği bildirilmiştir. Diyabet prevalansının giderek artması ve neden olduğu komplikasyonlardan dolayı Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization=WHO) tarafından önemli bir sağlık sorunu olarak tanımlanmıştır. Diyabet'in küresel ölüm nedenleri arasında dördüncü sırada yer aldığı bildirilmektedir. Tüm dünyada ve ülkemizde her geçen yıl bu hastalığın ve komplikasyonların sayısı artış göstermektedir [22,23].

1997-1998 yıllarında ülke genelinde yapılan 'Türkiye Diyabet Epidemiyoloji Çalışması(TURDEP-I) sonuçlarına göre ülkemizde yaşayan diyabetlilerin % 32'sinin hastalığının farkında olmadıklarını ortaya koymuştur. Ülkemizde diyabet prevalansı ile ilgili son veriler 2010 yılında TURDEP-I çalışmasının devamı niteliğinde olan ve aynı yöntem kullanılarak gerçekleştirilen TURDEP-II çalışması ile elde edilmiştir. TURDEP-II sonuçlarına göre diyabet sıklığı kadınlarda erkeklerden daha yüksek bulunmuştur (kadınlarda % 17,2, erkeklerde % 16,0). Kentsel kesimde diyabet oranı % 17,0 iken kırsal kesimde %15,5 olarak saptanmıştır. Ayrıca, bu çalışmaya göre ülkemizde yaşayan 20 yaş üstü popülasyonun % 28,7'si prediyabet olarak kabul edilmektedir. Yani, diyabet ve prediyabetli hasta oranı toplamda % 42,4'ü bulmaktadır. TURDEP-II çalışmasında ortaya çıkan çarpıcı sonuçlardan birisi de obezite ve fazla kilolu hasta sayılarıdır. Buna göre ülkemiz nüfusunun % 68,7'si obez veya fazla kilolu olarak sınıflandırılmaktadır.

TURDEP-II çalışmasında diyabet riskinin, yaş, yaşanan bölge, bel çevresinde artış, 8 yılın altında öğrenim görmüş olmak ve hipertansiyon varlığı ile ilişkili olduğu

saptanmıştır. IDF tarafından 2009 yılında yayımlanan son Diyabet Atlası'nda ülkemiz için diyabet prevalansı % 7.4 olarak belirlenmiş ve o zaman 3.5 milyon civarında olan diyabetli nüfusun 2030 yılında 6 milyonu geçeceği tahmin edilmiştir [131]. TURDEP-II çalışmasının sonuçları ve IDF'in 2013 yılı Diyabet Atlası tahminleri, diyabetin ülkemizde beklenenden de hızlı bir şekilde arttığını ve yirmi yıl sonrası için öngörülen rakamlara şimdiden ulaştığını göstermektedir. IDF Diyabet Atlası'na göre, 2013 itibarı ile Türkiye erişkin (20-79 yaş) nüfusta diyabet prevalansı %14,58, dünya nüfusuna göre standardize edilmiş prevalans %14,85 ve diyabetli hasta sayısı 7 milyondan fazladır [30].

WHO'nün Türkiye verilerine bakıldığında 2000 yılındaki 2,92 milyon diyabetik birey sayısının 2030 yıllarında 6,42 milyona ulaşacağı öngörülmektedir.

Diyabet hastalığı ile ilgili araştırmalara bakıldığında hastalığın prevalansında genetik, çevresel faktörlerin, sosyoekonomik nedenlerin etkili olduğu görülmektedir. Ayrıca bu prevalans ülkelere, cinsiyete ve yaşa göre de farklı göstermektedir [24,25]. İnsidansın bölgeler arasında farklılık göstermesinin en önemli nedeni koruyucu HLA-DQ allellerinin toplum içindeki prevalansının farklılık göstermesine ve çevresel faktörlerin etkisine bağlı olduğunu düşündürmüştür [26,27]. Otoimmünite, çevresel ve genetik faktörlerin yanı sıra, dengesiz beslenme, hareketsiz bir yaşam tarzı, sık gebelikler, gebelikte diyabet saptanması, hipertansiyon, kolesterol ve trigliserit yüksekliği, nüfus artışı, yaşlanma ve kentleşmenin getirdiği yaşam tarzı değişimi sonucu obezite ve fiziksel aktivitenin azalması da bu farklılığın nedenleri arasında sayılabilir.

2.3 Diyabet'in Tanısı

Diyabet tanısı, klasik semptomlar ve komplikasyonlar var ise kolaylıkla konabilir. 1979'da Amerikan Ulusal Veri Grubu (NDDG), 1985 yılında WHO, 1998 yılında Amerikan Diyabet Birliği (ADA) ve Avrupa Diyabet Politikası Belirleme Grubu (EDPG) tanı göstergelerini gözden geçirerek yeni kurallar geliştirmiştir.

Genel olarak hastalığın klasik semptomları arasında poliüri (aşırı miktarda idrara çıkma), polidipsi (aşırı miktarda su içme), çok yemek yemeye rağmen kilo kaybı, ağız kuruluğu, halsizlik, deri ve idrar yolu enfeksiyonları, tekrarlayan mantar enfeksiyonları, kaşıntı ve bulanık görme bulunmaktadır. Kesin tanı Çizelge 2.1'de belirtildiği şekilde kan glukoz düzeylerinin saptanmasıyla yapılır [28]. Aynı zamanda hastalığa özgü olan retinopati, nöropati, nefropati gibi komplikasyonlar da tanı

kriterleri arasındadır. Yakın zamanda, standardize edilmiş Hemoglobin A1c (HbA1c) ölçümü de diyabet tanı kriterleri arasına girmiştir [29].

Çizelge 2.1: DM'un Tanı Kriterleri [28].

- | |
|--|
| <ol style="list-style-type: none">1. Diyabet semptomları ve ≥ 200 mg/dl randomize plazma glukoz düzeyi:
Günün herhangi bir saatinde öğüne bakılmaksızın ölçülen plazma glukoz değeri
Poliuri
Polidipsi
Açıklanamayan ağırlık kaybı2. Açlık plazma glukoz düzeyi ≥ 126 mg/dl: En az 8 saatlik tam açlık sonrası3. Oral glukoz tolerans testi sırasında 2.saat plazma glukoz düzeyi >200 mg/dl |
|--|

2.4 Diyabet'in Sınıflandırılması

İlk kez 1979 yılında NDDG daha sonra da 1985 yılında WHO tarafından diyabetin geniş bir sınıflaması yapılmıştır. WHO'nun yaptığı sınıflama diyabeti insuline bağımlı (IDDM) ve insuline bağımlı olmayan (NIDDM) olarak adlandırmıştır. Daha sonra ADA tarafından 1998 yılında önerilen yeni sınıflamada insuline bağımlı ve insuline bağımlı olmayan diyabet yerine tip 1 ve tip 2 diyabet terminolojisi önerilmiştir [28,30,31,32]. Çizelge 2.2'de diyabetin etyolojik sınıflandırılması görülmektedir.

Çizelge 2.2: Diabetes Mellitus'un Etiyolojik Sınıflaması (ADA, 1997).

- | |
|--|
| <ol style="list-style-type: none">I. T1D<ol style="list-style-type: none">a. İmmunolojikb. İdiopatikII. Tip 2 diyabetIII. Gestasyonel diyabetIV. Diğer spesifik tipler<ol style="list-style-type: none">a. B hücre fonksiyonunda genetik hasarlarb. İnsulin etkisindeki genetik hasarlarc. Ekzokrin pankreas hastalıklarıd. Endokrinopatie. İlaç ya da kimyasallara bağlıf. Enfeksiyonlara bağlıg. İmmun diyabetin bilinmeyen formlarıh. Diyabetle birlikteliği olabilen genetik sendromlarV. Prediyabet |
|--|

2.4.1 Tip 1 diabetes mellitus

T1D, pankreasın langerhans adacıklarında insülin salgılayan β hücrelerinin T lenfositler tarafından otoimmün harabiyeti ile başlayan ve bunu takiben inflamatuvar olayların geliştiği (insülitis) çok faktörlü otoimmün bir hastalıktır [26,33].

T1D, immün kaynaklı diyabet veya idiyopatik tip olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. İnsanda adacık hücre antijenlerine karşı otoantikörlerin pozitifliği otoimmünite başlangıcının ilk belirtisidir. İmmün hasarın belirleyicileri, adacık hücre antikörleri (ICA), insulin otoantikörleri (IAA), glutamik asit dekarboksilaz (GADA) antikörleri, tirozin fosfotaza karşı otoantikörler (IA-2) ve anti-fogrin (IA-2 β) antikörleridir. İmmün kaynaklı diyabetde otoantikörler % 90'ın üzerinde pozitifken, idiyopatik diyabet de bu otoantikörler yoktur ve genetik özellikleri bilinmemektedir [34].

İmmün kaynaklı diyabet pankreasın β hücrelerinin hücre kaynaklı otoimmün yıkımı ile başlamaktadır [35]. T1D'de gelişen bu otoimmün yıkımın genetik olarak yönlendirilen bir değişimle beraber gittiği kabul edilmektedir. Özellikle 6.kromozomun kısa kolu üzerinde bulunan sınıf 2 MHC (Majör histokompatibilite kompleks) antijenlerini oluşturan genlerdeki rekombinasyonel düzenlemenin diyabet gelişiminde rol aldığı rapor edilmiştir. Bu antijenler DR, DQ lokuslerinde olup; HLA (İnsan lökosit antijen) doku tiplemesi yöntemi veya genomik DNA analizleri ile tayin edilebilirler. Böylece ailesinde T1D olan kişilerde bu hastalığa yakalanma şansı ölçülebilmektedir.

Diyabete yatkın genetik özellikleri olan bir şahıs, çeşitli dış etkenlerle (virüsler, fiziksel uyarılar, stres) karşılaştığında, diyabetin ortaya çıkması tetiklenmiş olabilir. Böyle bir durumda pankreasın β hücrelerine karşı immün saldırı başlar. Bu saldırının patolojik görünümü insülitis adını alır. Burada indüklenmiş T lenfosit ve makrofajlar β hücrelerine saldırı durumundadırlar. Daha az sıklıkta rastlanan idiyopatik diyabet gelişiminde ise bilinen herhangi bir neden yoktur. Bu diyabet formunun otoimmün kaynaklı bir hastalık olup olmadığına dair hiçbir veri bulunmamaktadır ve bu grup HLA genleri ile de ilgili değildir. Tüm diyabet hastalarının % 5-10'u T1D'li olmasına rağmen hem ülkemizde hem de dünyada bu sayı gittikçe artış göstermektedir [33,36]. Genellikle otoimmün kaynaklı olarak gelişen hastalığın, çoğunlukla çocukluk çağı ve genç erişkin yaşlarda ortaya çıktığı bilinse de her yaş grubunda görülebilir. Son zamanlarda yapılan epidemiyolojik çalışmalar, T1D görülme insidansında ve prevalansında belirgin değişikliklerin ve dünya ülkeleri

arasında belirgin farklılıkların olduğunu göstermiştir. Tip 1 diyabet insidansının gerek topluluklar arasında, gerekse aynı topluluk içinde farklılık göstermesinin ana nedeni, HLA-DQ allelerinin toplum içindeki prevalansının farklılık göstermesine ve çevresel faktörlerin etkisine bağlı olabileceği düşünülmektedir.

2.4.2 Tip 2 diabetes mellitus

İnsüline bağımlı olmayan diyabet mellitus'un diğer adı tip 2 diyabet (T2D)'tir. Tip 2 diyabet β hücrelerinde fonksiyon bozukluğu ve insülin direnci ile karakterizedir. Obezite ve insülin direnci, tip 2 diyabetin nedenleri arasında sayılan iki önemli faktördür. İnsüline bağımlı olmayan bu tip diyabetin tanısı, açlık kan şekerinin 125 mg/dl'nin üzerinde ya da herhangi bir zamanda ölçülen kan şekerinin 200 mg/dl ve üzerinde bulunması ile kesinleşir. Tüm diyabet vakalarının % 80-90'nını oluşturmakla birlikte, özellikle yaşam tarzı büyük ölçüde değişikliğe uğramış, endüstrileşmekte ve gelişmekte olan ülkelerde T2D insidansı ve prevalansı artış göstermektedir.

T2D gelişimi oldukça karmaşık olup genetik ve çevresel faktörleri içerir. Hastalık gelişiminde önemli olduğu gösterilmiş olan çevresel faktörlerin başında obeziteye yol açan aşırı kalori alımı ve pasif yaşam tarzı bulunmaktadır. T2D; nüfusun artışına, toplumların yaşlanmasına, obezitenin ve pasif hayat tarzının artmasına paralel olarak prevalansı hızla artan, uygun şekilde tedavi edilmediğinde ise morbidite ve mortalite artışına neden olan bir hastalıktır. Erken tanı ve yeterli tedavi ile hastaların hayat kalitesi yükseltilebilir, var olan komplikasyonların gelişmesi yavaşlatılabilir, hatta bazı hastalarda önlenmesi mümkün olabilir. Diyabet tedavisinin temelini eğitim, plazma glukozunun normale çekilmesi, mikro ve makrovasküler komplikasyonların ve kardiyovasküler risk faktörlerinin kontrol altına alınması oluşturmaktadır.

2.4.3 Gestasyonel diyabet

Gestasyonel diyabet (GDM) ilk kez gebelikte ortaya çıkan ya da gebelik sırasında başlayan hiperglisemi ile sonuçlanan glukoz tolerans bozukluğudur [37]. Hastalığın gerçek nedeni tam olarak bilinmemekle beraber topluma ve tanı kriterlerine göre değişiklik göstermektedir [38]. Normal gebelik sırasında insülin duyarlılığı gebeliğin ilerlemesiyle beraber düşüş göstermektedir [39]. Gestasyonel diyabetle birlikte oluşan obezite, beyaz yağ dokusu ve plesantadaki inflamasyon ile ilgilidir. Beyaz yağ dokusundan adipokinler ve leptin, adiponektin, TNF- α , İL-6 gibi sitokinler salgılanır.

Salgılanan sitokinlerin neden olduğu inflamasyonun, gestasyonel diyabetli hamilelerde artmış insülin direnci ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir [40,41,42].

2.4.4 Prediyabet

Eğer bir kişinin kan şekeri düzeyi normalden yüksek olmasına karşın diyabet tanısı koymaya yeterli yükseklikte değilse bu durumda kişi pre-diyabet (gizli şeker hastası) olarak tanımlanır. Pre-diyabetli bireyler yaşam tarzı değişiklikleri sayesinde prediyabetli olmayı önleyebilir veya geciktirebilir.

2.5 T1D Gelişiminde Rol Alan Faktörler

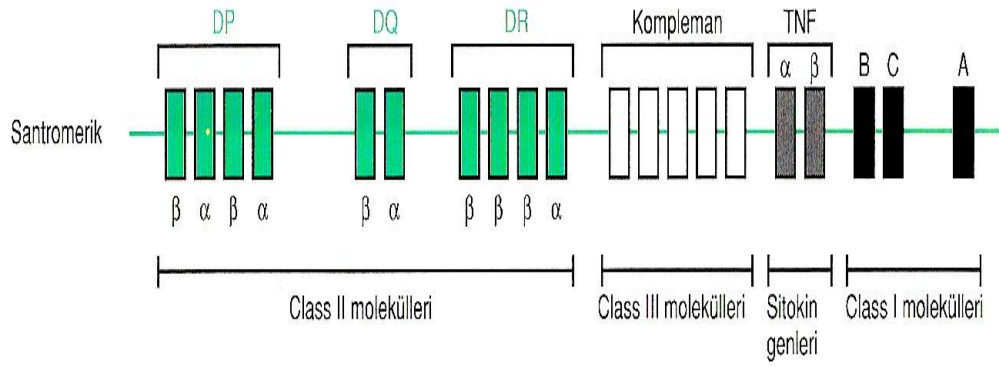
T1D, çocukluk ve genç erişkin döneminde başlayan, etiyolojisi kesin olarak bilinmeyen, genetik olarak yatkın bireylerde, enfeksiyonlarında içerisinde yer aldığı çevresel faktörlerin etkisiyle pankreasın β hücrelerinin tahribatı ile sonuçlanan otoimmün bir hastalıktır [43]. T1D gelişiminde rol alan faktörler, genetik, çevresel ve otoimmünite olmak üzere üç ana başlık altında incelenebilir [24,26,44].

2.5.1 Genetik faktörler

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, tip 1 DM gelişiminde genetik faktörlerin önemli yer tuttuğu bildirilmesine karşın herhangi bir kalıtsal faktörün tek başına rol oynamadığını, gelişiminin ise karmaşık olduğu öne sürülmektedir. T1D gelişimde, 6 kromozomun kısa kolunda yer alan (6p21) MHC genleri ve 11. kromozom üzerindeki insülin geninin 5' ucundaki VNTR bölgesi kritik öneme sahiptir [33].

HLA moleküllerinin başlıca fonksiyonu, yabancı proteinlerin antijenik özelliğe sahip peptit parçalarını T hücrelerine sunmaktır. HLA antijenleri kimyasal yapıları, doku dağılımları ve fonksiyonları açısından 3 sınıfa ayrılırlar. Sınıf I antijenler, HLA-A, HLA-B, HLA-C denilen üç yakın bağlı lokusta kodlanır. Tüm çekirdekli hücrelerde ve trombositlerde bulunur. Sınıf II antijenler, HLA-D olarak bilinen bölgede kodlanırlar. T1D gelişiminde en önemli genetik faktör HLA sınıf II genleri olup en iyi bilinenleri HLA DR, HLA DQ, HLA DP dir.

Antijen sunan hücreler (monositler, makrofajlar, dendritik hücreler), B hücreler ve bazı aktive olmuş T hücrelerde bulunur. Sınıf III proteinler, MHC'de kodlanan kompleman sistemidir (şekil 2.1) [24,45,46].



Şekil 2.1: HLA gen lokusu

Sınıf II HLA genleri pankreatik β hücre otoantijenine karşı immün cevabı etkileyebilir ya da bir β hücre otoantijenini, anormal immünolojik bir reaksiyona neden olacak şekilde sunulabilir [45]. 1970'lerin başında T1D ve HLA sınıf I arasındaki ilişki bulunduğundan sonra devam eden çalışmalar sonucunda lenfosit tanımlı HLA-D antijenlerinden HLA sınıf II DR4 ve DR3 haploitlerinin T1D ile daha yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir [34]. DR3 MHC Sınıf-II antijenlerinden HLA-DR antijeninde, DR4 HLA-DQ antijeninde yer alan haploitlerdir [46]. Sınıf II HLA-DR3 ya da HLA-DR4 antijenlerinden herhangi birinin bulunması tip 1 DM olma riskini 5–6 kez arttırırken, her ikisinin birlikte bulunması riski 14 kat arttırmaktadır. Bununla birlikte HLA DR2 ve DR7 genotipinin DM'nin gelişiminde koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir [45,47,48]. Ayrıca HLA-DQ antijenindeki tek amino asit değişimlerinin de diyabet gelişimine neden olan otoimmün reaksiyonları başlattığı rapor edilmiştir [49].

HLA genlerinin tip 1 DM gelişiminde önemli rollerinin olduğu bilinmesine karşın, HLA dışında fonksiyonu tam olarak bilinmeyen yaklaşık 20 tane geninde diyabete yatkınlık sağladığı ortaya konmuştur. Bunlar içerisinde de fonksiyonları bilinen iki gen tanımlanmıştır. Bunlar, diyabete yatkınlığın %10'undan sorumlu olan ve 11p5.5. kromozomda yer alan IDDM2 (insulin-dependent diabetes mellitus 2) ile 2q33 kromozomda yer alan ve T hücre aktivasyonundan sorumlu olan IDDM12 (CTLA-4 geni) genleridir [24, 50].

2.5.2 Çevresel faktörler

T1 diyabete neden olan faktörler üzerinde yapılan çalışmalarda çevresel faktörlerin β hücre tahribatını artırdığı ve bu hastalığın patogeneğinde rol oynadığı bilinmesine rağmen, bu faktörlerin tam olarak ne oldukları halen tartışma konusu ve araştırılmaya

devam etmektedir [24,51]. Genetik yatkınlığı olan bireylerde tetikleyici çevresel faktörlerin etkisi ile β hücrelerine yönelik immün olaylar başlamakta ve hücressel ve humoral otoimmünite ile adacık hücre immünopatolojisi, insülitis gelişmesi sonunda β hücrelerinde progressif yıkım ve hasar olmaktadır [52].

Bilinen genetik ve çevresel faktörlerin yanında mevsimsel değişikliklerde tip 1 diyabetin gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Dünyanın, güney ve kuzey yarım küresinde bulunan ülkeler de sonbahar ve kış aylarında, diyabetli hastaların bulaşıcı hastalığa daha sık yakalandıkları saptanmıştır. Tip 1 DM, yaz döneminde daha az salgın hastalık yaparken kış ve sonbahar aylarında viral enfeksiyonsıklığındaki artışla ilişkili olarak salgın hastalık sıklığının daha yüksek olduğu saptanmıştır [51,53]. Viral enfeksiyonlar, öncesinde tetiklenmiş olan otoimmün sürecin hızlanmasına veya enfeksiyon döneminde artan insülin ihtiyacını karşılayacak pankreatik rezervin azalması sonucu diyabet ile ilişkili semptomlarının daha erken ortaya çıkmasına neden olmaktadır [54]. Mekanizma olarak, viral etkenlerin yapısında bulunan antijenlerin pankreasın β hücreleri ile çapraz reaksiyona girerek otoimmüniteyi tetiklemesinin yanı sıra viral ajanların direkt olarak pankreasın β hücrelerini tahrip ettiği öne sürülmektedir [51,54].

Bununla birlikte bebeklerin inek sütü ile beslenmeleri ve özellikle daha az güneşli alanlarına maruz kalan kuzey kesimindeki insanlarda D vitamini düzeylerinin daha düşük olması tip 1 diyabet gelişim riskini arttırdığı saptanmıştır [9,55,56]. Kimyasal ajanların ve ilaçlarında pankreasın β hücrelerinde haraplanma yaparak tip 1 diyabet gelişimini kolaylaştırdığı saptanmıştır. Alloxan, streptozotosin, pentamidin ve vacor gibi ilaçların diyabetojenik ilaçlar olduğu öne sürülmüştür. Bunlarda en önemlisi diyabetik hayvan modeli oluşturmak için kullanılan streptozosindir. Streptozosin, pankreasın β hücrelerini direkt olarak ve otoimmün yanıt oluşturarak haraplamaktadır [53].

2.5.3 Otoimmün reaksiyonlar

Otoimmünite, herhangi bir organizmanın bağışıklık sisteminin kendi antijenlerine karşı immün yanıt oluşturmaması ile ilgili mekanizmaların bozulması ve kendi komponentlerine karşı immün cevabın uyarılması olarak tanımlanır. Organizmanın kendi yapılarına karşı immün cevap karşısında oluşan otoantikorların saldırıya geçmesi sonucu saldırıya uğrayan [dokular](#) bozulur ve bu da çeşitli otoimmün hastalıkların ortaya çıkmasına neden olur.

Otoimmün bir hastalık olan T1D tanısı alan olguların %70-80'inde β hücre antijenlerine karşı gelişen otoantikorlar T lenfosit aracılı β hücre tahribatına neden olurlar [24,26,57]. Otoimmün süreç ile birlikte pankreasın adacıklarında hücre ölümünün başladığı ve insülin sekresyonunun azaldığı bilinmektedir [58,59]. Otoimmün kaynaklı tip 1 diyabetde insülin sekresyonudaki azalma, pankreasın β hücre kütlelerinde azalma veya ortamdaki sitokinlerin pankreasın β hücrelerinden insülin sekresyonunu azaltması şeklinde iki mekanizma ile açıklanmaktadır [49,54].

2.6 T1DM ve Otoimmünite

β hücre yıkımı, pankreasın langerhans adacıklarında ve çevresinde meydana gelen kronik inflamasyonun son noktasıdır ve bu durum çeşitli çalışmalar ile ortaya konmuştur. 1986 yılında, Dr. Gian Franco Bottazzo yaptığı çalışmada otoimmün saldırının β hücre ölümüne neden olduğunu bildirmiştir [60].

Klinik olarak kendini göstermiş olan hastalığın erken dönemlerinde, pankreasın langerhans adacıklarında lenfositlerce zengin ve yoğun bir iltihabi infiltrasyona rastlanır ki, bu durum organa özgü otoimmün hastalıkların klasik örneklerinden biridir. İnsülin üreten β hücrelerinin yok olmasına ve sonuçta diyabet gelişimine neden olan insülitis, β hücrelerindeki sınıf II HLA moleküllerinin ekspresyonu ile ilişkilidir [61]. Normal β hücreleri yüzeylerinde sınıf II molekülleri içermezken, insülitis durumunda HLA molekülleri aşırı derecede ifade olurlar. Yapılan çalışmalar bu aşırı ekspresyonun aktive olmuş T hücrelerinden salınan sitokinler aracılığı ile gerçekleştiğini göstermiştir [42,61].

T lenfositler, hücrel immünitenin esas elemanı olması yanında karşılaşılan antijenlere karşı humoral immünitenin gelişmesi için de temeldir [42,61]. Antijen sunumu sırasında, Thücrelerindeki CD4 molekülleri antijen sunan hücrenin sınıf II MHC moleküllerinin nonpolimorfik kısımlarına, CD8 molekülleri, antijen sunumu sırasında sınıf I MHC moleküllerine bağlanır. T lenfositler, makrofajlardan salınan sitokinlere göre β -hücre apoptozunu teşvik eden ve adacığa özgü T hücrelerinin infiltrasyonunu artıran sitokinleri üretirler. Adacıklardaki inflamatuvar infiltrasyon, daha çok T lenfositlerinden kaynaklanmaktadır ki bunlardan en önemlileri CD4 + (Th4 veya T helper) veya CD8 + (Th8 veya sitotoksik) T hücreleridir [62].

CD4+ T hücreleri farklı tipteki immün cevapları düzenleyen ve farklı sitokinler salgılayan fonksiyonel alt gruplara ayrılırlar. Bunlar; Th1, Th2, Th17 ve düzenleyici T hücreleri (Treg)'dir. Proinflamatuvar sitokinler: TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-12, IFN- α , IFN- γ 'dır. TNF- α , IL-1 β , IL-6 başlıca makrofajlar ve monositlerden üretilir.

Hücresel bağışıklıkta etkili olan IL-2, TNF- β ve IFN- γ gibi sitokinler Th1 hücrelerinden salgılanırken, humoral bağışıklıkta rol oynayan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 ise Th2 hücrelerinden üretilir. Th1 hücreleri, IL-2 salınımı ile sitotoksik T hücrelerini, interferon- γ salınımı ile doğal öldürücü hücreler (naturel killer) ve makrofajları uyarmaktadır. Th1 tarafından üretilen sitokinler hücresel bağışıklık mediyatörlerdir ve Th1 fonksiyonları dengelenmezse inflamatuvar hastalıklar ve doku hasarı ortaya çıkabilir [63]. Bu hücrelerden salınan proinflamatuvar sitokinlerden IL-1 β 'nın β hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi bulunmakla beraber TNF- α ve IFN- γ 'nın tek başına veya birlikte kombinasyonu, β hücreleri tarafından toksin ve nitrik oksit üretimini uyarır. Böylece insülin üretimini inhibe ederek insülitisin başlamasına neden olurlar [64, 65].

Th1 kaynaklı sitokinler: TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-12, IFN- α , IFN- γ , TGF- β 'dır. Kronik Th1 uyarısı, otoimmün hastalıklara ve kronik inflamasyona yol açar. Otoimmün hastalıkların çoğunun patogenezinde artmış Th1 tipi sitokin yanıtı rol oynamaktadır. Diyabet, hashimoto tiroiditi, multiple skleroz, crohn hastalığı gibi hastalıklar Th1'in dominant olduğu durumlarda ortaya çıkan otoimmün hastalıklardır.

İmmün yanıtın aktivasyon veya supresyon basamaklarının spesifik kontrolü immün hücreler aracılığı ile pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokinlerin salınımı yoluyla gerçekleşir. Th1 (pro-inflamatuvar) ve Th2 (anti-inflamatuvar) hücrelerin oranı ve onların sitokinleri, ortaya çıkan immün yanıt açısından önemlidir. Birbirlerinin fonksiyonlarını karşılıklı olarak regüle ederler. Th2 hücrelerce yapılan IL-4 ve IL-10, Th1 hücrelerini inhibe ederken, Th1 hücrelerce üretilen IFN- β , Th2 hücrelerini inhibe eder.

IL-17 üreten ve fonksiyonu Th1 ve Th2 hücresinden farklı olan üçüncü bir efektör Th hücresi (Th17) keşfedilmiştir. Th17 hücreleri ilk kez organ spesifik otoimmün hastalıklarda gösterilmiştir. Bu hücrenin başlıca fonksiyonu Th1 ve Th2 tarafından tam olarak kontrol altına alınamamış patojenlerin yok edilmesini sağlamaktır. Th17 hücreleri doku inflamasyonunun temel tetikleyicileridir. İnsanlarda ve birçok deneysel modelde Th17 hücrelerinin inflamatuvar ve otoimmün hastalıkların patogenezinde rol aldığı gösterilmiştir [66].

Düzenleyici T hücreleri (Treg), otoimmün hastalıkların gelişiminin kontrolünde önemli bir mekanizma olmakla birlikte T hücre aktivasyonuna engel olmak yerine, devam eden yanıtı inhibe ederek kronik ve muhtemelen zararlı yanıtları önlerler [67].

Treg'ler immün baskılayıcı etkilerini IL-10 ve TGF- β gibi baskılayıcı sitokinlerin salınımı, IL-2 lokal konsantrasyonunun tüketimi, apoptozisin tetiklenmesi ve hücre-hücre temasında hücre döngüsünün durdurulması ile gösterir [68]. Th1, Th2 veya T17 hücrelerinin özelliklerini taşımazlar ancak hem Th1 hem de Th2 yanıtını baskılayabilirler.

Bilindiği gibi sitokinler, immün sistem hücrelerinin gelişmesi, farklılaşması ve aktivasyonunda, antijen sunumu, adezyon moleküllerinin ekspresyonu, akut faz yanıtları gibi immün yanıtın ve inflamasyonun her safhasında, hücre ölümünde, hematopoez ve yara iyileşmesi gibi birçok biyolojik olaylarda hücreler arasındaki ilişkileri düzenleyen yüksek düzeyde spesifik bir protein grubudur. Özellikle Th hücreleri ve makrofajlar olmak üzere tüm immün sistem hücreleri tarafından salgılanırlar. Genel olarak doğal immün sistemin hücreleri, sitokinlerle aktivasyona oldukça duyarlıdır. Bunlar hücreler arası haberleşmeyi sağlayan kimyasal mediyatörler olup efektör hücrelerin farklılaşmasını düzenler ve immün yanıtı ayarlarlar. Yapılan çalışmalar aktif makrofajlar, T lenfositler ve NK hücreleri, IFN- γ , IL-1 β ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinler, kemokinler ve uyarıcı sitokinlerin pankreasın β hücrelerini indüklediğini göstermiştir. Bu sonuç insülit sırasında, bağışıklık hücreleri ve hedef pankreatik β hücreleri arasında bir iletişim olabileceğini düşündürmektedir.

Son yıllarda yapılan birçok çalışma, adacık içerisine infiltre olan özellikle aktive olmuş makrofajlar ve T lenfositler tarafından salgılanan IL-1 β , TNF- α ve IFN- γ gibi proinflamatuvar sitokinlerin, ayrıca nitrik oksit ve serbest oksijen radikalleri gibi kemokinlerin β hücre fonksiyon bozukluğu ve apoptozisine neden olduğunu göstermiştir [13,69,70].

İn vitro koşullarda β hücreleri IL-1 β , TNF- α ve IFN- γ gibi sitokinlerle muamele edildiğinde, β hücrelerinin apoptozis mekanizması ile öldüğü [7,8,369]. sitokinlerin neden olduğu bu apoptozis mekanizmasında da NF- κ B sinyal yolağının rol aldığı rapor edilmiştir [10,13,71].

NF- κ B, sitokinle indüklenen β hücre fonksiyon bozukluğu ve ölümünü kontrol eden genlerin ekspresyonunu düzenleyen başlıca transkripsiyonel faktör olarak tanımlanır [8, 11,72].

2.7 Nükleer Faktör Kappa B (NF-κB)

İlk kez 1986 yılında Ranjan Sen ve David Baltimore tarafından keşfedilen nükleer faktör-kappa B (NF-κB), başlangıçta B lenfositlere özgü immünoglobulin K hafif zincir (light chain) geninin ekspresyonunu düzenleyen bir protein olarak tanımlanmıştır [73]. İleriki çalışmalarda ise NF-κB'nin tüm hücre tiplerinde bulunan ve birçok genin ekspresyonunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörü olduğu saptanmıştır [74]. Son yıllarda, NF-κB transkripsiyon faktörünün hücrenin stresse karşı cevabı, inflamasyon, hücre proliferasyonu, apoptozis, angiogenez ve metastaz gibi birçok önemli olayda rol alan, 500 den fazla genin ifadesini düzenlediği rapor edilmiştir [75,76].

2.7.1 NF-κB protein ailesi

NF-κB protein ailesi, memeli hücrelerinde Rel ailesine ait olan RelA (p65), RelB, c-Rel, NF-κB1(p50; öncülü p105) ve NF-κB2 (p52; öncülü p100) olmak üzere 5 proteinden oluşur [77,78]. Bu proteinler farklı kombinasyonlara girerek homodimer ya da heterodimer formlar oluştururlar. Bu dimerik formlar ise DNA'da kapa B (κB) olarak da bilinen korunmuş hedef bölgelere bağlanarak gen ifadesini düzenlerler [79,80].

NF-κB protein ailesinin tüm üyeleri aminocunda "Rel homoloji bölgesi" (RHD) olarak adlandırılan yaklaşık 300 amino asit uzunluğunda N-terminal domaine sahiptirler (Şekil 2.2). RH domaini DNA'ya bağlanma, inhibitöre bağlanma ve dimerizasyondan sorumludur. Yapısal olarak önemli diğer bir bölge olan "nükleer lokalizasyon dizisi" (NLS) serbest NF-κB dimerlerinin çekirdeğe geçişinden sorumludur. Bununla birlikte NF-κB proteinlerinden RelA, RelB ve c-Rel alt birimlerinde "transkripsiyonal aktivasyon bölgesi" (TAD) vardır [81]. p50 ve p52 alt birimlerinin yapısında TAD bölgesi yoktur ve bunun yerine "glisin amino asidi bakımından zengin, GRR" bölgesi bulunmaktadır. p50 ve p52 alt birimlerinden oluşan dimerler çekirdeğe geçip DNA'ya bağlanabilir, ancak hedef genlerinin transkripsiyonunun baskılanmasına sebep olurlar. Transkripsiyon aktivatörü olarak işleve gören NF-κB dimerleri TAD bölgesini içeren RelA, RelB ve c-Rel alt birimlerinden oluşur [81, 83].

NF-κB protein dimerleri, uyarılmamış hücrelerde inhibitör kapa B (IκB) olarak bilinen proteinlere bağlı bir şekilde sitoplazmada inaktif formda tutulurlar. Hücreye NF-κB aktivasyonuna neden olan bir sinyal geldiğinde bu dimerler IκB

proteinlerinden ayrılarak serbest dimerik forma geçerler. Bu durumda dimerler nükleusa geçer ve hedef genlerin transkripsiyonunu düzenlerler [82].

2.7.2 İnhibitör kappa B (IKB) protein ailesi

NF- κ B protein dimerleri, hücrelerde uyarım olmadığı durumlarda, sitoplazmada I κ B inhibitör proteinlerine nonkovalent etkileşim yoluyla bağlanmış halde inaktif formda bulunmaktadır. Şimdiye kadar I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , I κ B δ , Bcl-3, p100, p105 olmak üzere sekiz adet I κ B proteini tanımlanmıştır (Şekil 2.2).

Bilinen tüm I κ B proteinleri ankirin tekrar bölgeleri içerirler. Ankirin tekrarlar ve de RH domaini arasındaki spesifik etkileşim NF- κ B ve I κ B arasındaki bağlantının özelliğini belirlemektedir. Hücresel uyarımın olmadığı durumlarda, I κ B proteininin NF- κ B molekülündeki NLS dizisini maskeleyerek, NF- κ B proteininin nükleer translokasyonunu önleyerek sitoplazmada kalmasını sağlamaktadır [83,84]. Bunun yanı sıra I κ B α bazı NF- κ B komplekslerinin çekirdekten sitoplazmaya hızlı transferini sağlayan Nükleer Export Dizisi (NES) taşımaktadır. Sitoplazma ve çekirdek arasındaki dinamik mekik dengesi I κ B α 'nın yıkım hızına bağlıdır [85].

2.7.3 I κ B Kinaz (IKK) kompleksi

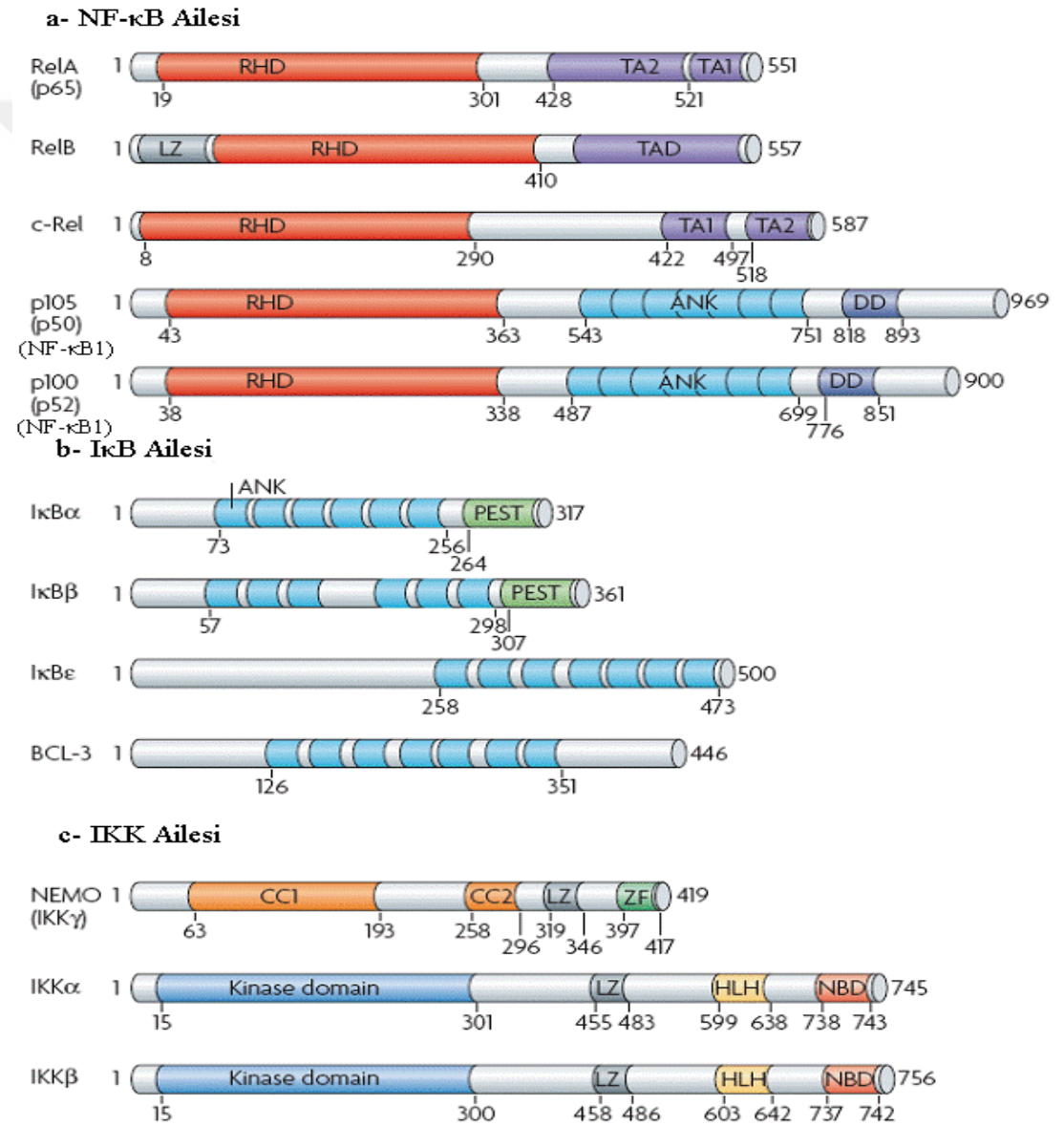
NF- κ B dimerlerinin transkripsiyonu düzenleyebilmesi için ilk olarak I κ B biriminden ayrılarak serbest dimerik forma geçmesi gerekir. Hücreye dışarıdan ya da içeriden bir sinyal geldiğinde sitoplazmada bulunan I κ B kinaz (IKK) kompleksi, I κ B'yi fosforilleyerek NF- κ B /I κ B kompleksinin bozulmasını ve sonuçta NF- κ B dimerlerinin nükleusa geçebilecek serbest forma geçmesini sağlar.

I κ B proteinlerinin fosforilasyonundan sorumlu olan kinaz kompleksi, IKK α /IKK1 ve IKK β /IKK2 olmak üzere iki tane katalitik alt birimi ve IKK γ /NEMO olarak bilinen düzenleyici bir birimden oluşmaktadır [87,88]. Yapılarında amino ucundan başlayarak yaklaşık 300 amino asit uzunluğunda bir protein kinaz bölgesi (KD), 22 amino asitten oluşan bir lösin fermuarı (LZ motifi) ve sarmal-ilmek-sarmal (HLH motifi) bölgesi bulunmaktadır. Ayrıca Şekil 2.2C'de de görüldüğü gibi IKK α ve IKK β 'nin karboksil ucunda NEMO bağlanma bölgesi (NBD) mevcuttur [89].

2.7.4 NF- κ B sinyal yolağının aktivasyonu

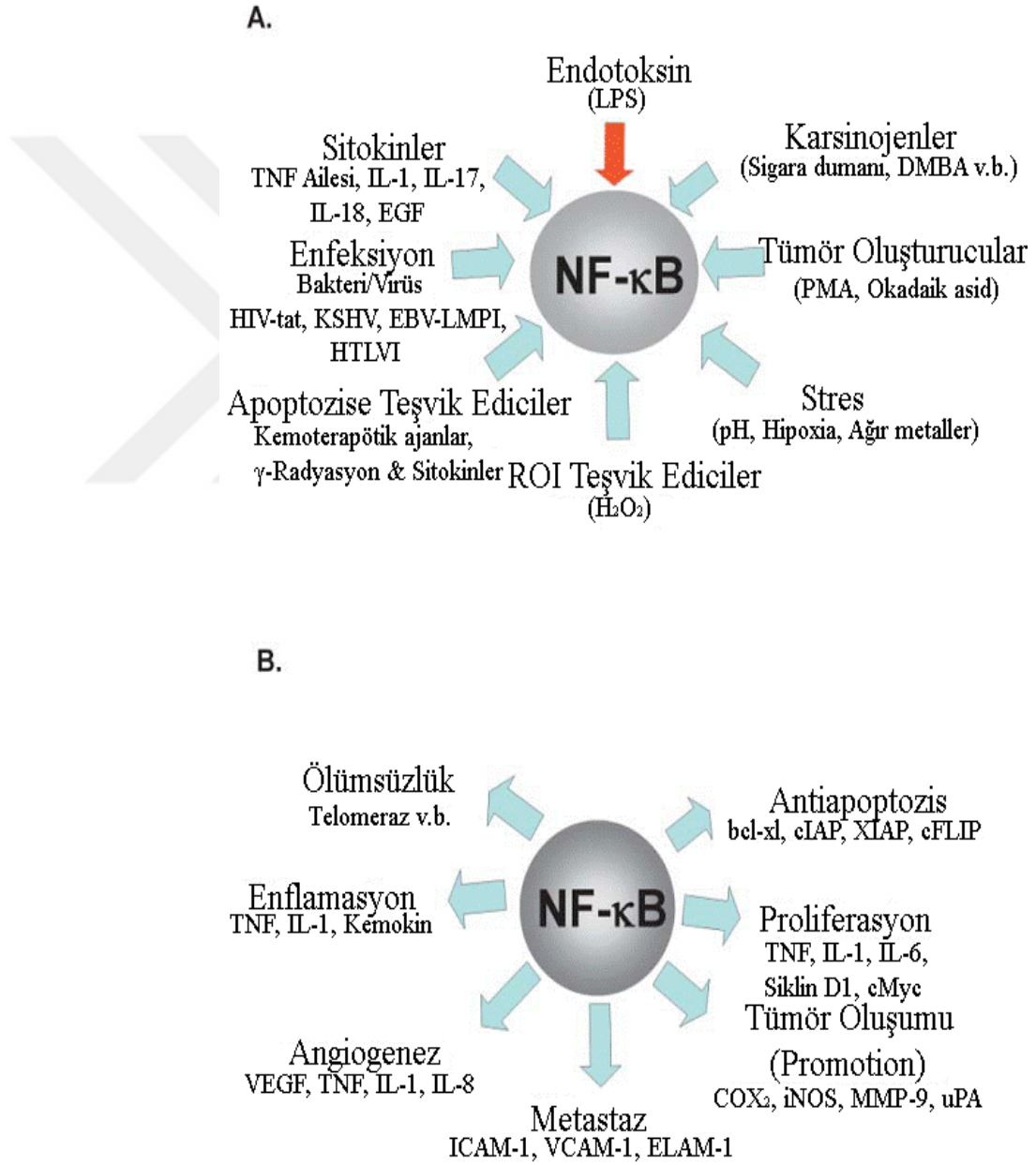
Daha önce de belirtildiği gibi NF- κ B, I κ B ile kompleks oluşturmuş şekilde sitoplazmada inaktif olarak bulunur. Ne zaman ki hücrelere dışarıdan bir uyarı gelir o zaman NF- κ B aktive olarak çekirdeğe transloke olur ve kendi regülasyonunu sağlayan I κ B α 'nın da dahil olduğu programlı hücre ölümü (apoptozis), hücre adhezyonu, hücre proliferasyonu, doğuştan ve sonradan kazanılan immün yanıtlar,

inflamasyon ve hücrel strese cevapta etkili olan birçokgenin ekspresyonu başlar [85,90]. Yapılan çalışmalarda NF- κ B'nin tüm bu biyolojik süreçlerde rol alan 500 den fazla genin transkripsiyonunu düzenlediği rapor edilmiştir [91]. Şekil 2.3 B' de görüldüğü gibi NF- κ B sinyal yolağı immün cevap ve karsinogenez ile doğrudan ilişkili proliferasyon, metastaz, anjiyogenez, apoptoz ve inflamasyonda görev alan genleri regüle etmektedir. Bu durum NF- κ B sinyal yolağının kanser gelişimi ile doğrudan ilişkili olduğunu göstermektedir (Şekil 2.3 B). Ayrıca yapılan birçok çalışma NF- κ B'nin hematolojik kanserler başta olmak üzere birçok solid tümörde daima aktif olduğunu göstermiştir [92].



Şekil 2.2: NF- κ B, I κ B ve IKK protein aileleri ve bunların yapısal birimleri.

NF- κ B sinyal iletim yolunun aktivasyonuna neden olan çok sayıda ve çeşitli uyarının olduğu bilinmektedir. Bunların arasında, bazı bakteri ve mantar türleri ile bunların ürettikleri bazı moleküller, bazı virüsler ve ökaryotik parazitler, interlökinler (IL-) ve tümör-nekroz faktör- α (TNF- α) gibi sitokinler, stres, doksorubisin, etoposid gibi kemoterapik ajanlar, apoptozu indükleyen reseptör ligandları, apoptotik ajanlar, büyüme faktörleri ve hormonlar sayılabilir. NF- κ B protein ailesinin düzenlediği hedef genler ve NF- κ B aktive edici sinyaller Şekil 2.3’de şematize edilmiştir.



Şekil 2.3: NF- κ B aktive edici sinyaller ve NF- κ B tarafından düzenlenen genler.

2.7.5 NF- κ B'nin aktivasyon yolları

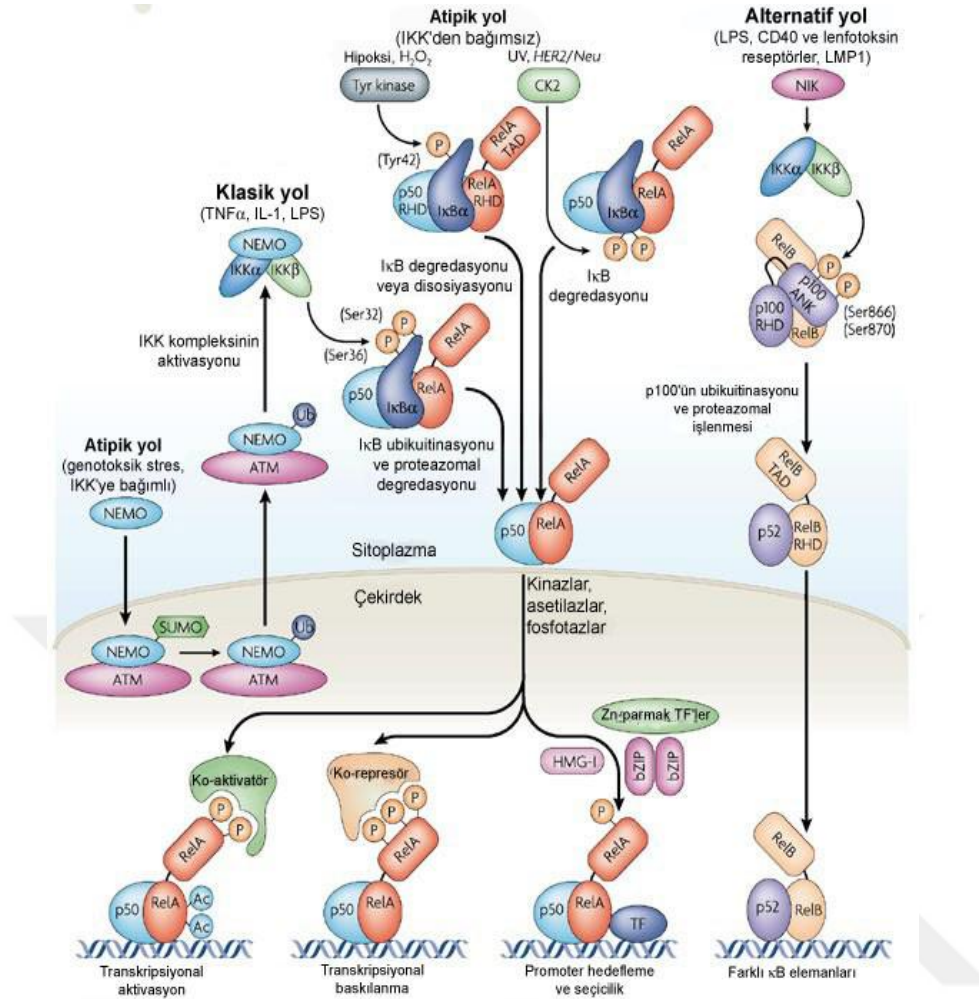
NF- κ B sinyal yolağının aktivasyonu Şekil 2.4'de de görüldüğü gibi başlıca klasik, alternatif ve atipik olmak üzere üç şekilde gerçekleşir [93].

Klasik yolakta; Mikrobial ve viral enfeksiyonlar ya da pro inflamatuvar sitokinler IKK kinaz kompleksinin β altünitesini uyararak aktive eder ve IKK kompleksi, I κ B α molekülünün N-terminalindeki 2 spesifik serin (Ser32 ve Ser34) bölgesini fosforile eder. Böylece hedef I κ B molekülü 26S Proteozomda degradasyona uğrar (Şekil 2.4). 26S proteozom, ökaryotik organizmaların çekirdek ve sitoplazmasında bulunan, esas görevi proteinleri yıkmak olan, büyük (1500-2000 kDa) multikatalitik bir enzim kompleksidir [94,95]. Bu enzim kompleksi p53, Bcl-2, p21, p27 gibi apoptotik proteinler ve siklin A, B, D, E gibi hücre döngüsünün kontrolünde görev alan proteinlerin yıkımından sorumludur. Bu klasik yolağın aktivasyonu, doğal immünte ve apoptozun düzenlenmesinde rol alır.

Alternatif yolakta; IKK kompleksinin α altünitesi aktive edilir ve p100 veya p105 proteininin C-terminal ucundan fosforile eder. Fosforile edilmiş olan p100 ubiquitin ligaz mekanizması tarafından tanınır. Ubiquitin ligazlarca polibikütinasyona uğrayan p100 proteinleri bunun sonucunda C-terminalinden proteozomlarca degradasyona uğrar [96,97]. Bunun sonucunda p105'in aminoterminal yarısından oluşan p50 meydana gelir (Şekil 2.4). Alternatif yolak ikincil lenfoid organ gelişimi ve adaptif immün cevap için önemlidir.

Her iki aktivasyon sinyal yolunda da maskelenmiş NLS açığa çıkar. Serbest hale geçmiş olan NF- κ B dimeri nükleusa geçerek, hedef genin promotör ya da enhancer bölgesindeki spesifik dizilere bağlanır ve ekspresyonu başlatır. NF- κ B'nin hedef genlerinden birisi I κ B'dir. Yeni sentezlenmiş I κ B çekirdekte tekrar NF- κ B ile kompleks oluşturarak onu inaktif eder [98]. Bu durum NF- κ B'nin transkripsiyonu sonlandırmasına neden olurken aynı zamanda kendi aktivitesini kontrol eden birregülasyon mekanizması sağlar.

Atipik yolakta; NEMO çekirdekte sumoylasyona ve sonra ubikütinasyona uğrar. Bu yol, ataksi talengiensi mutant (ATM) kinaza bağımlıdır. NEMO, ATM ile birlikte sitoplazmaya geçer ve IKK aktivasyonu sağlanır. Bu yolağın özellikle hücre içi stres koşulları ve DNA hasarı gibi durumlarda aktive olduğu rapor edilmiştir [99].



Şekil 2.4: NF-κB sinyal iletim yolunun aktivasyonu.

P, Fosforilasyon; Ub, Ubikütinasyon; Ac, Asetilasyon; TF, Transkripsiyon faktörü [100].

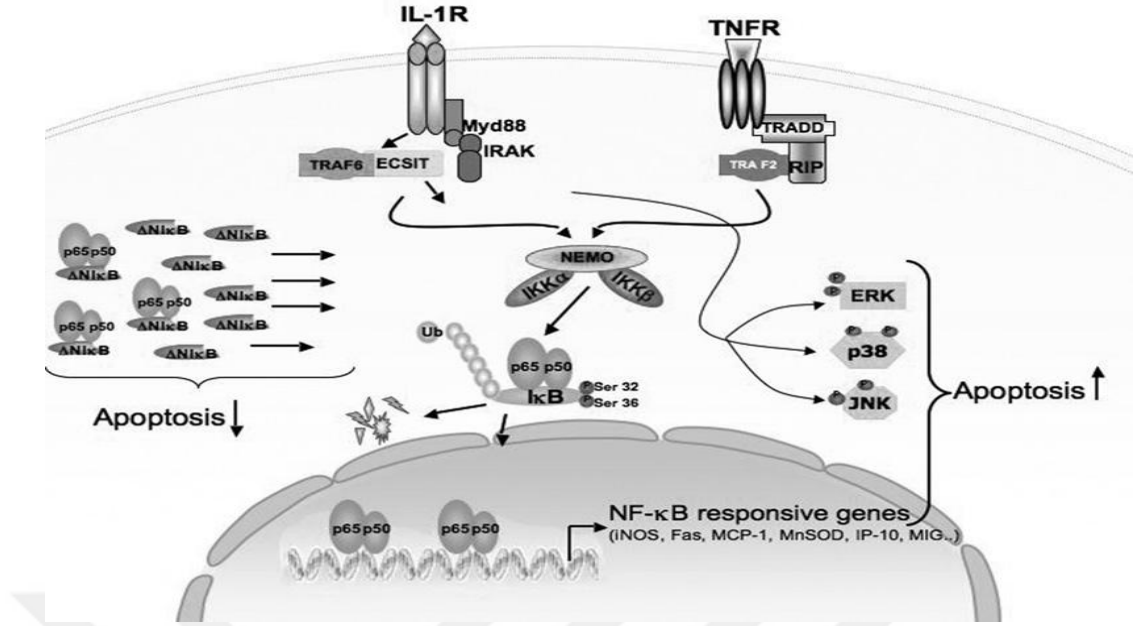
2.8 NF-κB Sinyal Yolağı ve T1D

Sitokin kaynaklı β hücre ölümü T1D patogeneğinde önemli bir olaydır. Pankreasın adacıkları içine infiltre olan makrofajlar, T hücreleri ve diğer immün sistem hücreleri tarafından üretilen proinflatuar sitokinler, hedef hücreler üzerindeki etkilerini NF-κB'nin aktivasyonu ile gösterirler [84,101]. NF-κB'nin aktivasyonu, TNF-α, IL-1β gibi inflammatuar yanıtta görev alan pek çok sitokinin transkripsiyonel artışına neden olmaktadır. Başka bir deyişle sitokinler NF-κB sinyal yolağını aktive ederken aynı zaman da kendi transkripsiyonel aktivasyonlarını da sağlarlar [84].

Yapılan çalışmalarda IL-1β, IFN-γ, TNF-α, serbest oksijen radikalleri ve NO (nitrik oksid) gibi inflammatuar sitokinler ve faktörlerin β hücre ölümünü hızlandığı bilinmektedir [7,102,103]. β hücreleri kısa bir süre sitokinlere maruz kaldıklarında

insülin, GLUT2 (glukoz taşıyıcısı 2), prokonvertaz PC1/3 ve transkripsiyon faktörü PDX-1 (pankreas, duodenal homeobox 1) gibi önemli genlerin ekspresyonunda azalma gözlenir ki bu durum β hücrelerinde fonksiyon kayıplarına ve tip 1 diyabet gelişimine neden olur [7,102,103]. Sitokinler etkilerini sitoplazmik sinyal ileti sistemlerini aktive ederek ve/veya gen transkripsiyonu üzerinden göstermektedirler [104]. Burada ilk adım, sitokinlerin hücre membranı üzerinde bulunan özgün reseptörlerine bağlanmalarıdır. Bu reseptörler yapı ve fonksiyonlarına göre farklı şekilde sınıflandırılmaktadırlar. “Reseptör tirozin kinaz” (RTK) gibi, kendileri enzimatik bir aktiviteye sahip olan reseptörler, doğrudan sitoplazmik protein kinaz kaskadını başlatırlar. IL-1 β , TNF- α ve IFN- γ bağlayıcı reseptörler, farklı sinyal kaskadlarını aktive etse de, sonuçta çok sayıda transkripsiyon faktörlerinin de aktivasyonuna neden olur. IL-1 β , TNF- α ve IFN- γ , NF- κ B sinyal yolağının aktivasyonuna aracılık ederler. Bununla birlikte IFN- γ , STAT-1 (signal transducer and activator of transcription 1) yolağının aktivasyonuna JAK1-2 (Janus kinases) yolağının inhibisyonuna neden olur. Sonuçta sitokin hangi reseptöre bağlanırsa bağlansın, hedef hücrede ortaya çıkan yanıt çoğunlukla hücrenin gen ekspresyonunun düzenlenmesidir. Bunun sonucunda apoptozun uyarılması ya da özgün hücre siklus kontrol noktalarındaki kinazların fosforilasyonu ile proliferasyon gerçekleşmektedir [105].

Şekil 2.5’de gösterildiği gibi, çeşitli uyaranlar tarafından salgılanan TNF- α , IL-1 β gibi proinflamatuvar sitokinler IKK kompleksini aktif hale getirir. IKK kompleksi ise I κ B α ’nın Ser32 ve 36 rezidülerini fosforiller. Sonrasında poliubikutinlenen I κ B α proteozomda yıkılır ve NF- κ B dimeri serbest hale gelir. Serbestleşen NF- κ B dimerleri ise hedef genlerin transkripsiyonunu düzenlerler.

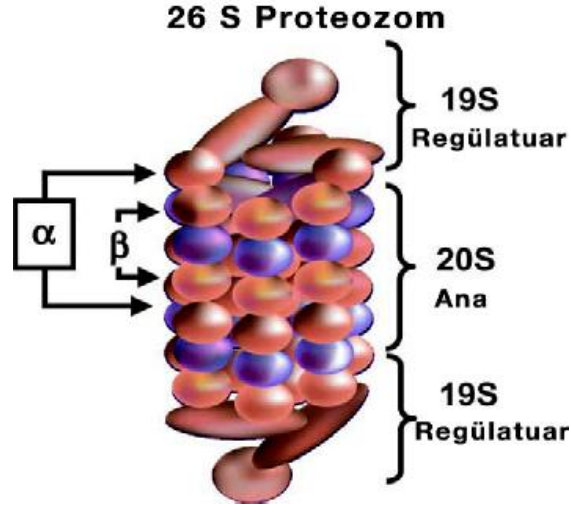


Şekil 2.5: NF-κB aktivasyonu ile β-hücresi apoptozisin şematik olarak gösterimi [3].

2.9 NF-κB Sinyal Yolağı ve Proteozom

Ubiquitin-proteozom yolu, NF-κB sinyal iletim yolağında önemli bir role sahip olup, hücre içindeki hasarlı, yanlış katlanmış ve kısaömürlü proteinlerin yıkımda rol alan proteolitik bir yoldur. NF-κB sinyal yolağının aktive olabilmesi için IκB'nin fosforillendikten sonra poliubikutinlenmesi ve ardından proteozomda degrade olması gerekir. Yapılan birçok çalışmada ubiquitin-proteazom yolağının gelişim, farklılaşma, proliferasyon, hücre siklusunun kontrolü, transkripsiyonun başlaması, inflamasyon, yaşlanma, strese karşı yanıt, apoptozis ve sinyal iletiminde rol oynayan birçok önemli proteinin hücre içi seviyelerini kontrol eden kilit bir düzenleyici olduğunu göstermiştir [106,107] .

Proteazomlar sitoplazma ve çekirdekte bulunan multikatalitik bir proteaz kompleksidir. Şekil 2.6'de görüldüğü gibi Proteozom 1 adet katalitik 20S ve iki adet 19S düzenleyici kompleks içeren toplamda 26S'lik bir enzim kompleksidir [100,108]. Ubiquitin-proteazom yolağı tarafından degrade edilecek bir protein, ubiquitin aktive edici enzim (E1), ubiquitin-konjuge edici enzim (E2) ve ubiquitin ligaz enzimi (E3) tarafından poliubikutinlenerek işlenirler [109,110]. Poli-ubiquitin ile belirlenmiş proteinler proteazomlara giderek degrade olurlar. Proteazomlar, proteinlerin amino asitlere kadar yıkılmasının dışında NF-κB gibi bazı transkripsiyon faktörlerinin yıkılmasından, işlenerek olgulaşmasından ve aktivasyonundan sorumludur.



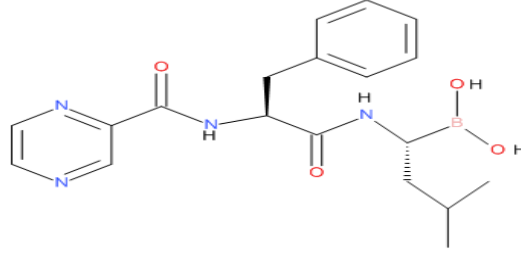
Şekil 2.6:Proteozom

2.10 NF-κB Sinyal Yolağı ve Kanser

NF-κB sinyal yolağı inflamasyonun dolayısıyla doğal bağışıklık sisteminin de bir parçasıdır. Bu nedenle inflamasyonla ilişkili tüm otoimmün ve metabolik hastalıklarda, ayrıca kanser gelişiminde de kritik bir öneme sahiptir. Normal koşullarda NF-κB aktivitesi çok sıkı kontrol altında tutulmasına karşın kanserin dedahil olduğu birçok hastalıkta sinyal yolağının aktivitesinde bozukluklar görülür. NF-κB'nin özellikle hücre proliferasyonu ve apoptozisle olan ilişkisi ayrıca invazyon, metastaz ve anjiogeneze görev alan genlerin ifadelerini düzenliyor olması onu tümöröenezle doğrudan ilişkilendirir [75,76]. Son yıllarda yapılan çalışmalar, NF-κB 'nin hematolojik malignitelerin neredeyse tamamında ve birçok solid tümörde daimi olarak aktif olduğunu göstermiştir [111,112]. Bu sonuç, NF-κB' nin tümör oluşumunda önemli bir rol oynadığını desteklerken, kanser terapi içinde umut verici bir terapötik hedef haline getirmektedir. Özellikle kanserin ve diğer inflamatuvar hastalıkların tedavisi için NF-κB sinyal yolağını hedef alan birçok moleküller ve terapötik strateji üzerinde çalışmalar devam etmektedir [113].

Günümüze kadar, NF-κB aktivitesinin inhibisyonunda kullanılabilecek yaklaşık 800 inhibitör rapor edilmiştir [114,115]. NF-κB'nin inhibisyonu için farklı stratejiler önerilse de reseptörlerin inhibisyonundan, adaptör moleküllere, IKK ve IκB proteinlere kadar sinyal iletim yolunun birçok basamağında inhibisyonunun olabileceği bildirilmiştir. Bununla birlikte, protezomu inhibe ederek NF-κB aktivasyonu engellenebileceği gibi NF-κB alt birimlerinin çekirdeğe geçişi veya DNA'ya bağlanması da önlenabilir [114]. Bugün klinikte NF-κB sinyal yolağını bloke etmek için kullanılan en bilinen örnek bortezomib'dir. Bortezomib (Bor-

Velcade, PS-341) dipeptit boronik asit türevi olan bir protezom inhibitörüdür (Şekil 2.7). Bortezomib, 2003 yılında FDA tarafından multiple myeloma ve mantel hücreli lenfoma tedavisinde kullanılması onaylanan ilk ilaçtır [116,117]. Son yıllarda yapılan birçok araştırma Bor'un myeloma dışındaki hematolojik kanserlerde ve kolon, akciğer, meme ve prostat kanserleri gibi birkaç solid tümörlerde de klinik olarak etkili olduğu ve apoptozisi indüklediği rapor edilmiştir [118,119,120].



Şekil 2.7:Bortezomib'in moleküler yapısı.

Bir proteozom inhibitörü olan Bor'un proteozomları inhibe etmesi, hücre döngüsünün durmasına, MAP kinaz sinyal yolağının ve hücre proliferasyonunun inhibe edilmesine, kaspaz bağımlı apoptozun indüklenmesine ve NF- κ B'yi inhibe edebilmesine bağlı olarak invazyon ve metastazın azalmasına neden olduğu rapor edilmiştir. Bor multiple miyeloma tedavisinde şu ana kadar anlamlı aktivite gösteren tek ajandır [100].

Aslında proteozomun inhibisyonu; hücredeki önemli sinyal yollarından biri olan NF- κ B'nin baskılanması demektir. NF- κ B'nin engellenmesi ise genel olarak; hücre proliferasyonunu inhibe etmek, büyüme faktörleri, sitokinler, hücre adezyon molekülleri ve apoptozis proteinlerini kodlayan çeşitli genlerin transkripsiyonunu baskılamak anlamına gelir.

Bor'in inflamasyonu baskılama yeteneği kanser dışında diğer otoimmün hastalıkların tedavisinde de kullanılabilirliğini gündeme getirmiştir. Van der Heijden ve arkadaşlarının Romatoid artritli hastalara Bor vererek yaptığı çalışmada, T hücreleri tarafından salgılanan sitokinleri azalttığını bildirilmiştir [121]. Ayrıca 2012 yılında yapılan başka bir çalışmada Bor'in TNF- α , IL-1 β , IL-6, MCP-1, MIP-1 α , iNOS ve COX-2 ekspresyonunu inhibe ederken IL-10 ekspresyonunu artırdığı bildirilmiştir [122].

Ayrıca başka bir çalışmada Bor'un birçok kemokin ve sitokin serum düzeyini düşürdüğü de gösterilmiştir [123]. Tüm bu veriler diyabetin de içinde olduğu birçok

inflamatuvar ve otoimmün hastalıkta NF-κB sinyal yolağını bloke etmenin yeni bir tedavi stratejisi oluşturabileceğini gündeme getirmiştir.

2.11 T1D'in Tedavisi ve Bortezomib

Tip 1 diyabet'in bugüne kadar ki bilenen tedavi şekli sentetik insülinin dışarıdan vücuda enjekte edilmesi ve kan şekeri regülasyonunun sağlanmasıdır. Bu hastalıkta insülin tedavisinin yanında diyet ve egzersiz de çok önemli rol oynamaktadır. İnsülin tedavisi, diyabetin rutin bir tedavi şekli olmasına karşın, yıllar boyunca uygulanan insülin ve oral antidiyabetik ilaçların, hastaların zaman zaman hipoglisemi, havale ve komaya girmelerini engelleyememektedir. Bu yüzden bilim adamları farklı tedavi seçenekleri aramaya başlamıştır. İnsülin tedavisine ek olarak son 50 yıl içinde önemli tedavi stratejileri denenmiştir. Bu tedavi seçeneklerinden biri olan insülin pompası, ilk defa 1963 yılında Dr. Arnold Kadish tarafından büyük hacimli ve sırt çantası gibi bir pompa olarak dizayn edilmiştir[124]. Bu pompa 2006 tarihinde FDA tarafından onaylanmış ve kullanıma girmiştir. Ancak Ekim 2007 tarihinde ekonomik olmaması nedeniyle üretici firma tarafından piyasalardan çekilmiştir. Bununla birlikte diyabet bir tek gen hastalığı olmamasına karşın, asıl etkenin insülin yetersizliğinden kaynaklanmasından dolayı insülin geni transferinin gerçekleştirilerek diyabetin gen terapisi yöntemi ile tedavi edilebileceği yeni bir yaklaşım gündeme gelmiştir. Ancak insülin gen tedavisi ile ilgili olarak insülin üretimi için hedeflenebilecek endokrin hücreler henüz izole edilememiş ve tanımlanamamıştır. Bu somatik hücre hedefli insülin gen tedavisinin gelecekte kullanım potansiyeli yüksek olabilir, ancak mevcut tedavi yaklaşımlarına oranla etkinlik derecesinin belirlenebilmesi için daha ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir [125,126]. Son on yılda, T1D'in tedavisinde hastanın yaşam boyu insülin kullanımı yerine, adacık dokusu ya da pankreas nakli ile kesin tedavi edilebileceği gündeme gelmiştir. Ancak bu nakillerde en büyük sorun doku reddidir. Doku reddini önlemek için immün baskılayıcı ilaçlar kullanılmasına karşın halen vücudun nakledilen yeni organı reddetme ihtimali bulunmaktadır ([127,128]. Ayrıca uygun dokunun bulunamaması da diğer ciddi bir sorunu oluşturur. Bu nedenle araştırmacılar embriyonik kök hücre tedavisi ile yeni adacık hücresi elde edilebileceklerini düşünmektedirler. T1D'in tedavisinde günümüze kadar pek çok yöntem ve tedavi yaklaşımları denenmiş ve uygulanmış olsa da halen kesin bir tedavi şekli bilinmemektedir. Bu nedenle, alternatif tedavi yaklaşımları için yoğun çalışmalar sürdürülmektedir.

2000’li yılların başından beri diyabetin mekanizmasını moleküler düzeyde çözmeye yönelik olarak diyabet modeli oluşturarak yapılan hayvan deneylerinde çeşitli ajanların, kimyasalların, antioksidanların ve antiinflamatuvar ilaçların etkileri incelenmeye başlanmıştır. Obezite, insülin direnci gibi faktörlerden kaynaklı meydana gelen kronik inflamasyon sonucunda TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinler sentezlenir. Artan sitokin seviyesi, ateroskleroz ve kardiyovasküler hastalıklar için risk faktörü olmakla birlikte pankreas β hücre disfonksiyonuna etki edebilmektedirler [129].

Diyabetin tedavisine yönelik tedavi yöntemleri geliştirilmesinde kullanılan antienflamatuvar ilaçlar araştırmacıların gözdesi olmaya devam etmektedir. Bu nedenle sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri, hücre-adezyon molekülleri ve yüzey reseptörleri benzeri molekülleri kodlayan genlerin düzenlenmesinde görevli olan transkripsiyon faktörü NF- κ B’ye olan ilgi artmış olup diyabet tedavisi için yeni bir hedef olmuştur.

Bununla ilgili olarak Chang ve arkadaşlarının 2003 yılında yaptıkları çalışmada proteozom inhibitörü olan MG132’nin NF- κ B aktivasyonunu başarılı bir şekilde inhibe ettiğini göstermişlerdir [9].

2004 yılında Petrovic ve arkadaşlarının, obez olmayan transgenik farelerde yaptıkları çalışmada, proteozom inhibitörü olan MG132’in NF- κ B aktivasyonunu bloke etme yeteneği sayesinde inflamatuvar aracılardan ve sitokinlerin üretimini azaltmalarını sonucunda ve pankreas lenf nodlarında bulunan T hücrelerinin proliferasyonunu engelleyerek diyabeti önlediklerini ifade etmişlerdir [130].

Eldor ve arkadaşlarının 2005 yılında metaloproteinaz inhibitörü olan doksisiklin ile yaptıkları çalışmada ise NF- κ B’nin aktivasyonunun β hücre kaybı için önemli bir olay olduğunu ve bu işlemin inhibisyonunun β hücrelerinin korunması için etkili bir strateji olabileceği savunarak çalışmalarını devam ettirmişlerdir [11].

Yine bu alanda yapılan başka bir çalışma ise 2009 yılında Sarkar ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada T1D’li insanların pankreatik β hücrelerinin tahrip edilmesinde aktive edilmiş makrofajlar ve T hücreleri tarafından salgılanan sitokinlerin nekroz ve apoptozisde önemli bir rol oynadığını savunmuşlardır. Sitokinlerin aracılık ettiği pankreas β hücrelerinin apoptozunda transkripsiyon faktörü NF- κ B’nin önemli bir rol oynadığını söylemişlerdir. İnsan adacık ve MIN6 hücrelerinde proinflamatuvar sitokinlerin, anti-apoptotik genleri inhibe etmesinde NF- κ B yolğunun etkili olabileceğini göstermişlerdir [71].

Roy Eldor ve arkadaşları 2013 yılında transgenik farelerinde, pankreas adacık naklinin T1D için bir tedavi olabileceği yönünde çalışma yapmışlardır. NF- κ B aktivasyonunun, sitokin kaynaklı β hücre apoptozunda ve proinflamatuvar ve kemokin genlerinin ekspresyonunu düzenleme de rol oynadığına dair kanıtlar sunmuşlardır. Farelerde doku reddi ile ilgili yaptıkları çalışmada; proteozom inhibitörü Bortezomib'in allograft doku reddini geçiktirdiğine dair sonuçlar elde etmişlerdir [12].

Bortezomib anti-tümör özelliğe sahip bir proteozom inhibitörüdür. Bortezomibin proteozomları inhibe etmesi, hücre döngüsünün durmasına, apoptozu ve anjiyogenezi inhibe eden çeşitli sinyal iletim yollarının bozulmasına neden olur. Yapılan çalışmalarda, bortezomibin transkripsiyonel faktör NF- κ B'nin aktivasyonunu inhibe ettiği ve dolayısıyla inflamatuvar araçların ve sitokinlerin üretimini azalttığı yönünde veriler elde edilmiştir [130]. Bütün bu yapılan çalışmalardan yola çıkılarak bizde T1D gelişimine neden olan sitokinle indüklenmiş NF- κ B aktivasyonunu bortezomib ile inhibe ederek β hücre kaybını önleyebileceğimizi hipotezledik. Bortezomib, günümüzde multiple myeloma tedavisinde kullanılan ve klinikteki etkinliği NF- κ B inhibisyonuna bağlı olan bir proteozom inhibitörüdür. Bu tez çalışmasının temel amacı, Bortezomibin, T1D'in tedavisinde kullanılabilirliğini in vivo koşullarda diyabetik ratlardan izole edilmiş β hücre kültürlerinde, apoptozis, hücre canlılığı, inflamasyon ve NF- κ B sinyal yolağındaki genlerin ifade düzeylerini saptayarak moleküler düzeyde araştırmaktır.

IKK α 'nın alternatif sinyal iletim yolundaki rolü B hücresi aracılığıyla oluşturulan cevaplarda önemli olduğundan, bununla birlikte klasik yolda yardımcı rolü olabileceği belirtildiğinden hem otoimmün hastalıklar hem de kanser tedavisinde ilgi çekici bir hedef gibi görünmektedir. Bununla ilgili olarak, 2013 yılında Eldor ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada diyabetik ratlardan elde edilen adacıklar proteozom inhibitörü bortezomib ile kültüre edildikten sonra diyabetik ratların böbrek kapsüllerine transplante edildi. Daha sonra haftada iki doz intraperitoneal olarak Bortezomib uygulaması yapıldıktan sonra 7. günün sonunda adacık canlılık yüzdelерinde ve kan glukoz değerlerinde anlamlı değişiklik gözlenmiştir. Bu sonuçlar β -hücrelerinde NF- κ B aktivasyonunun, immün kaynaklı olarak doku adacığı naklinin reddinin önlenmesinde önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Bizlerde bugüne kadar uygulanan tip 1 diyabette olası bir tedavi şekli olarak ratlara direk olarak uygulama yapılmasını amaçladık.

3. MALZEME VE YÖNTEM

Bu proje çalışması ilk önce in vitro olarak planlamıştı başka bir deyişle bortezomib, kültüre edilmiş adacık hücrelerine laboratuvar ortamında verilecekti. Ancak in vitro ortamda üretilen β hücrelerinin kültür koşullarındaki büyüme faktörleri, hücre canlılığı testindeki (MTT testi) renkli formazan kristalleriyle girişime girdiği için doğru bir hücre canlılığı datası elde edilemedi. Bu nedenle projenin devamı için daha zahmetli ancak daha doğru olan in vivo hayvan modellerinin hazırlanması ile proje devam ettirildi.

3.1 Araç ve Gereçler

Çalışmamızda Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim Araştırma Hastanesinin, Pankreas Adacık Hücre Araştırma Laboratuvarın da bulunan ve aşağıda özellikleri verilen cihazlar/ laboratuvar malzemelerinden yararlanılmıştır.

3.1.1 Kullanılan kimyasal maddeler

- Streptozotosin (STZ, N- (Methylnitros^oCarbamoyl)- α -D-glucosamine)
- Sodyum Sitrat
- Sitrik Asit
- Bortezomib (VELCADE™ 3,5 mg)
- % 1 L-Glutamin içeren RPMI 1640 besiyeri
- % 1 Penisilin-Streptomisin (10,000 U/mL penisilin, 10,000 μ /mL streptomisin)
- Dimetilsülfoksit (DMSO)
- %10 fetal bovine serumu (FBS)
- HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)
- Bicoll 1100, Bi°Coll 1077
- % 0.05 Trypsin
- Ketamin (ketamin hidroklorid, 40 mg/kg)
- Ksilazin Hidroklorür (Xylazine hydr°Chloric 4 mg/kg)
- Dithizone

- D-glukoz
- Kollajenaz tip 5 enzimi

3.1.2 Kullanılan Cihazlar

- Spektrofotometre
- Su banyosu
- Santrifüj
- Soğutmalı santrifüj
- Vorteks
- Kaba terazi
- Hassas terazi
- -20 °C derin dondurucu
- -80 °C derin dondurucu
- Buz makinası
- Buzdolabı
- Glukometre
- Operasyon takımı
- Polietilen enjektör (2.5, 5, 10 ml)
- Isıtcılı manyetik karıştırıcı
- Homojenizatör
- pH metre
- Microtom
- Elektroforez düzeneği
- 20x20 yatay elektroforez tankı
- Güç kaynağı
- Flöresan mikroskop
- Işık mikroskobu
- Kültür plağı okuyucusu
- Ayarlanabilir otomatik pipetler (1, 10, 20, 100, 1000 µL)
- Etüv
- Real Time PCR (Applied Biosystems)

3.1.3 Kullanılan Kitler

- PureLink® RNA Mini Kit Ambion-Life Technologies
- High- Capacity cDNA Reverse Transkription Kit
- RNase inhibitör, Taqman Gene Expression Master Mix
- GAPDH Primer
- CASPAZ3 (FAM-MBG Probe) geni,
- Bax (FAM-MBG Probe) geni,
- Bcl-2 (FAM-MBG Probe) geni.

3.1.4 Kullanılan Diğer Malzemeler

- Steril enjektör (5, 10 ml)
- Steril insülin enjektörü (1 ml)
- EDTA'lı kan tüpü (Venoject)
- Ependorf tüpü (0,5-1,5 ve 2 ml'lik)
- Otomatik pipet uçları (10, 100 ve 1000 µl)
- Mikro Playte (96 kuyucuklu)
- Lam (Özel yapım buzlu lam)
- Lamel (24 x 60 mm, 24 x 50 mm)
- Cerrahi makas, pens, doku tutucular
- Cerrahi eldiven
- Heparinli tüp

3.2 Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları

3.2.1 Sitrat Tamponu Çözeltisinin Hazırlanması

0,1 M sodyum sitrat ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O=294,1$ g/mol) ve 0,1 M (10 mmol) sitrik asit ile pH'sı 4.5 olacak şekilde sitrat tamponu hazırlandı. Buz içerisinde gömülür.

3.2.2 Streptozotosinin (STZ) Hazırlanması

Hazırlanan sodyum sitrat tamponundan 1 ml olacak şekilde alınarak tartılan 168,75 mg/kg Streptozotosin (STZ = Sigma Chemical Co., St. Louis Misouri) çözündürüldü. STZ çözeltisi ışık altında bozulabileceği ve ısıdan etkilenebileceği için hazırlandığı tüpün üzeri alüminyum folyo ile sarılıp enjeksiyon süresince içi buz dolu beher içinde muhafaza edildi ve taze bir şekilde hayvanlara uygulandı. Diyabet oluşturulacak hayvanlara, 1 ml'lik insülin enjektörü ile hayvanların ağırlıklarına göre kg'a 45 mg

olacak şekilde intraperitoneal olarak tek doz şeklinde enjekte edildi. Kontrol grubu hayvanlara ise yalnızca sodyum sitrat çözeltisi enjekte edildi. STZ uygulaması sonrası ratlara normal yem verilerek beslenmeleri devam edildi.

3.3 Deney Hayvanlarının Seçimi ve Bakımı

Çalışmamızda Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim Araştırma Hastanesinin, Pankreas Adacık Hücre Araştırma Laboratuvarında üretilen, ortalama ağırlıkları 200-300 gr, 4-6 aylık 25 adet obez olmayan dişi Sprague Dawley cinsi rat kullanıldı. Ratların bakımı ve beslenmeleri çalışma boyunca sert, dayanıklı ve şeffaf plastik materyalden yapılmış kafeslerde yapıldı. Ratların barındırılmasında hava akımını önlemek veya patojen mikroorganizmalar ile bulaşmayı engellemek için filtreli kapaklara sahip kafesler kullanıldı. Her bir kafesde 5 rat olacak şekilde yerleştirme yapıldı. Ratların bakımı ve beslenmeleri çalışma boyunca 21 ± 2 °C çevre sıcaklığında, % 55–60 nem 12 saatlik sabit bir ışık-karanlık döngüsü altında tutularak, günlük ortalama 15-25 g kadar hazır yem (Çizelge 3.1) ve 30-45 mL kadar dinlendirilmiş su verilerek sağlandı. Ratlar, sese karşı çok hassas olduklarından ratların barındırıldığı odaların gürültüden ve titreşim yaratacak cihazlardan uzak olması sağlandı. Çalışma boyunca hayvanlara yapılacak tüm müdahaleler Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulundan alınan 02.10.2014 tarihli 51 sayılı etik kurulu onayı doğrultusunda, Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hücre Tedavi, Rejeneratif Tıp ve Genomiks Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yapıldı. Çalışmanın diğer tüm moleküler aşamaları, Aksaray Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkez (ASÜBTAM) Laboratuvarında yapıldı. Çalışma, ilk 8 gün deneysel tip 1 diyabet modeli oluşturma aşaması ve ilaç uygulaması olarak tasarlandı. 10. günde RNA izolasyonu yapıldı ve sonrasında Real Time (RT-PCR) aşaması yapılarak çalışmanın tamamlanması tasarlandı. Son grup olan tedavi grubumuzda ise STZ uygulaması yapılmasını takiben 15 gün boyunca kan şekerleri takip edilerek diyabet oldukları tespit edildikten sonra literatüre uygun şekilde haftada 2 kez (0-3 ve 7. günler) olacak şekilde toplam 3 doz ilaç uygulaması yapılarak tedavi grubunun çalışmasının tamamlanması tasarlandı.

Çizelge 3.1: Deney hayvanlarına verilen yemin bileşimi.

KURU MADDE	En az	%	88
Ham protein	En az	%	23
Ham selüloz	En çok	%	7
Ham kül	En çok	%	8
HCl'de çözünmüş kül	En çok	%	2
NaCl	En çok	%	1
Metabolik Enerji	En az (Kcal/kg)		2600
MAKRO ELEMENTLER			
Kalsiyum	En az-en çok	%	1-2.5
Fosfor	En az	%	0,9
Sodyum	En az-en çok	%	0,5-1
MİKRO ELEMENTLER			
Mangan	En az mg/kg	%	10
Çinko	En az mg/kg	%	4
AMİNOASİTLER			
Lizin	En az	%	1,0
Metionin	En az	%	0,3
Sistin	En az	%	0,1
VİTAMİNLER			
A vitamini	En az (IU/kg)		400
D3 vitamini	En az (IU/kg)		300
B2 vitamini	En az (mg/kg)		5
B12 vitamini	En az (mcg/kg)		20
E vitamini	En az (IU/kg)		30
K3 vitamini	En az (IU/kg)		1

3.4 Tip 1 Diyabet Modelinin Oluşturulması

Deney öncesi ratlar bir gece aç bırakıldıktan sonra kan şekerleri (Accu-Check Go, Bayer) ölçüldü. Kan glukoz değeri 80-110 mg/dL olanlar normal kabul edildi. Deney grubu hayvanlarda diyabet oluşturmak için 0.1 M sitrat tamponda çözölmüş (pH:4,5) 45 mg/kg streptozotosin (STZ; Sigma Chemical Co., St. Louis Missouri, ABD), intraperitoneal yolla tek doz olarak uygulandı (Şekil 3.1) [132,143]. Streptozotosin enjeksiyonundan 48 saat sonra ratların kuyruklarından “stick” aracılıklı (Plusmed®) alınan kanların glukoz düzeylerine bakıldı [133]. 250 mg/dL ve üzerinde kan glukozuna sahip olan ratlar diyabet olarak kabul edilip çalışmaya dahil edildi.



Şekil 3.1:STZ uygulaması yapılan rat

3.5 Araştırma Grupları Planı

Ratlar her grupta 5-7 adet olacak şekilde toplam 5 gruba ağırlıklarına göre dağıtıldı. Kontrol grubu ve Bortezomib grubu ile birlikte, tip 1 diyabet modeli oluşturulan ratların bulunduğu 5 grup Çizelge 3.2’de gösterildiği gibi oluşturuldu.

Çizelge 3.2: Çalışma grupları

Gruplar	Yapılacak Uygulamalar
Grup I: Kontrol grubu (KONTROL)	Çalışma süresince standart yemle beslenen sağlıklı ratlardan meydana getirildi ve 1 ml sitrat tamponu intraperitoneal (i.p.) olarak enjekte edildi.
Grup II: Diyabet Grubu (DİYABET)	0.1 mmol sodyum sitrat tamponu (pH: 4.5) içerisinde taze olarak hazırlanan STZ çözeltisi (buzlu ortamda saklanmak koşuluyla), rat başına intraperitoneal (ip) yöntem ile 45 mg/kg olacak şekilde enjekte edildi.
Grup III: Bortezomib Grubu (BORTEZOMİB)	Bortezomib, rat başına 0,2 mg/kg olacak şekilde intraperitoneal yöntem ile 0, 3 ve 7. günlerde enjekte edildi.
Grup IV: STZ + BOR eş zamanlı (STZ- BOR)	Rat başına 45 mg/kg olacak şekilde STZ ve 0,2 mg/kg olacak şekilde Bortezomib intraperitoneal yöntem ile eş zamanlı olarak enjekte edildi. Daha sonra deneyin 3. ve 7. günleri Bortezomib enjekte edildi.
Grup V: Diyabet Tedavi Grubu	Tip 1 diyabet modeli oluşturulan ratların 15 gün boyunca kan şekerleri takip edildikten sonra rat başına 0,2 mg/kg olacak şekilde intraperitoneal yöntemle, 0,3 ve 7. günlerde Bortezomib tedavisi uygulandı.

3.6 Canlı Ağırlık ve Açlık Kan Glukoz Ölçümleri

Deney hayvanları laboratuvara getirildikten sonra ilk günden başlamak üzere gün aşırı (0, 2, 4, 6 ve 8. gün) ratların canlı ağırlıkları belirlendi. Çalışmaya başlarken (0. gün), çalışma başladıktan sonra gün aşırı (0, 2, 4, 6 ve 8. gün) ve çalışma sonunda ratların açlık kan glukoz seviyeleri ölçüldü. Ölçümler öncesinde bir gece boyunca aç bırakılan ratların canlı ağırlıkları elektronik terazi ile ölçüldü ve sonrasında kuyruk venasından alınan 1 damla kan ile glukoz ölçümleri Accu Check Go cihazı yardımıyla yapıldı.

3.7 Rat Pankreas Adacık Hücre İzolasyonunda Kullanılan Solüsyonlar ve İşlemler

3.7.1 Yıkama solüsyonlarının hazırlanması

Solüsyon 1:

500 mL' lik Hank's Buffered Medium (HBSS) içine; 50 mL fetal Bowin serum (FBS, Lonza) yavaşça ve köpürtmeden konuldu. Ardından içine 5 mL penisilin/streptomisin(Lonza) ve 5 mL L-glutamin (Lonza) eklendi.

Solüsyon 2:

500 mL Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-1640 with Lglutamin) içine 50 mL FBS köpürtmeden yavaşça konuldu. 5 mL Penisilin/streptomisin eklendi.

Ditizon (DTZ) boyası:

10 g DTZ (Ditizon) ile 5 mL DMSO tüpe eklendi. Karışımın üzerine 25 mL HBSS eklendi. Tüm karışım bir enjektöre çekilerek ucuna 0,4 µm filtre takıldı ve filtreden geçirildi. DTZ boyası günlük kullanım için endorf tüplerine ayrıldı.

Kollagenaz hazırlanması: 1000 g'lık kollegenaz V içinden 100 mg kollegenaz alınarak 50 mL'lik falkon tüpüne koyuldu. Üzerine 50 mL'ye kadar HBSS ilave edildi. İzolasyon sırasında 7 mL kullanıldı.

Floresan Diasetat Solüsyonu (FDA):

24 µM FDA hazırlamak için; 1 mg toz floresan diasetat tartıldı, 100 mL asetonda içinde çözüldü. +4°C'de karanlıkta saklandı.

Propidyum İyodit Solüsyonu (PI):

5 mg toz propidyum iyodit tartıldı, 10 mL PBS (pH 7,4) solüsyonu içerisinde çözülerek hazırlandı. +4°C'de karanlıkta saklandı.

3.8 Pankreasın Çıkarılması ve Adacık Hücrelerinin Safılaştırılması

3.8.1 Pankreasın cerrahi olarak çıkarılması

200-300gr ağırlığında, 4-6 aylık, 25 adet obez olmayan dişi Sprague Dawley dişi ratlara, intraperitonel yolla ksilazin (80 mg/kg) ve ketamin (20 mg/kg) karışımı kilograma 0,1 mL gelecek şekilde sol ön ayak adalesine intramusküler yolla uygulanarak anestezi yapıldı. İşlem boyunca ratlar solunumları spontan olarak devam edecek şekilde uyutuldu. Rat çalışma tablasına sırt üstü yatırıldı ve abdomen % 70'lik alkol ile temizlendi ve Linea alba hizasından kesilerek karın boşluğuna ulaşıldı. Diyaframa baskı uygulayarak karaciğer gazlı bez arasına alındı. Ductus kanalı bulundu ve duodenuma açılan kısmı klemplendi. Barsaklar, hayvanın soluna çıkartılarak pankreas ortaya çıkarıldı. Ortak safra kanalının karaciğer ucuna ve duodenuma birleştiği uca hemostat klempler yerleştirildi. Vidalı enjektöre 7 mL kollegenaz çözeltisi çekildi. Duktus'a küçük bir çentik atıldı. Daha önceden enjektör ucuna 10 cm'lik PE50 kateteri takılmış olan kateterin ucu bu çentikten içeri alındı (Şekil 3.2). Kollagenaz enzim solüsyonu ile enjektör pistonu yavaşça itilerek pankreas şişirildi (Şekil 3.3). Pankreas şiştikten sonra hızlı bir şekilde diğer doku ve organlardan ayrıldı ve bir bütün olarak 50 mL'lik falkon tüpüne alındı.



Şekil 3.2: Rat pankreasının duktus kanalına girilmesi



Şekil 3.3: Rat pankreasının kollegenazla şişirilmesi

3.8.2 Adacıkların saflaştırılması ve yıkanması

Pankreaslar çıkartıldıktan hemen sonra 37 °C de su banyosunda 18-20 dakika inkübasyon yapıldı. İnkübasyon sonunda falcon tüp içindeki pankreasların üzerine 35 mL'ye kadar solüsyon 1 ilave edildi. Kolu hızla sallayarak tüp alt üst edildi ve pankreasın iyice parçalanması sağlandı. 1300 rpm de yavaş frende 3 dakika santrifüj yapıldı ve süpernatant atıldı. Peletler tüpün kenarına parmakla vurularak kırıldı. 35 mL'ye solüsyon I ile tamamlandı. Tekrar 1300 rpm de yavaş frende 3 dakika santrifüj yapıldı. 450 µm'lik çelik eleğin altına huni koyularak 50 mL'lik falcon tüpe süzülerek alındı. İki kere daha 1300 rpm de yavaş frende 3 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı. Tüm peletler bir falcon tüpte birleştirildi. Üzerine 50 mL solüsyon II eklendi. 1300 rpm, 3 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüjden sonra üç adet 15 mL'lik falkon tüpe 5'er mL olarak medium ve pelet konuldu. Üzeri tekrar RPMI ile tamamlandı. 1500 rpm de yavaş frende 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Üzerine 5 mL'ye kadar ficoll 1077 eklendi ve üzerine 14 G'lik iğne ucu ile yavaşça 5'er mL serumsuz medium eklendi. 2400 rpm de, +10 °C'de 20 dakika frensiz olarak santrifüj edildi. Santrifüjden çıkan tüplerde bir dansite yoğunluğu oluştu ve adacık hücreleri orta tabakada birikti. Bu hücreler pastör pipeti ile alındı başka bir 50 mL'lik tüpe koyuldu. 1400 rpm de yavaş frende 4 dakika santrifüj yapıldı. Aynı işlem iki kez daha tekrarlandı [134].

3.8.3 Adacık hücrelerinin sayımı

Adacık hücrelerinin diğer hücrelerden ayrıştırılmasını sağlamak için Dithizon (DTZ) boyası kullanılmaktadır. DTZ boyası, insulin moleküllerinin merkezindeki çinkoya bağlanarak etki gösterir. Adacık hücrelerinin insulin granüllerine özel bir boya olan dithizon (DTZ) kullanımı, adacık hücrelerinin kırmızı bir renk ile boyayarak, açık kahverengi olan hücrelerinin ayrılmasına yardım eder. Böylelikle adacık hücrelerinin sayımı kolaylaşır. Adacık boyutundaki büyük değişiklikleri hesaplamak için adacık eşdeğeri hesabı (IEQ) sayımı yapıldı. Bu hesaplama, çapı 150 µm olan standart bir adacık hücresine tüm adacıkların eşitlenmesine dayanarak yapılmış bir hesaplama. 50 µm'den daha küçük parçacıkların toplam hacime katkısı olmadığından hesaba katılmadı. 50 µm'den büyük ve 300 µm'den büyük adacıklar tek tek sayıldı. IEQ hesabı için oluşturulmuş bir tablo vasıtasıyla, her bir grup içindeki adacık sayısı standart faktörlerle çarpıldı. Örnek alınmadan önce adacık preparasyonunun yeterli ölçüde tekrar süspansiyon haline getirildi. Steril displasman pipeti ile numuneler alınıp 10x35 mm boyundaki ölçekli petri kaplarına konuldu. Adacık hücreleri DTZ boyası ile boyandıktan sonra, ökülerinde kalibre edilmiş µm bulunan bir inverted tip mikroskop ile boyutlarına göre 10 x'luk büyütmede tüm adacıklar sayıldı. Şaryo kontrolleri kullanılarak inceleme alanı, petri kabının dış sınırına alındı. Grupta bulunan her boyuttaki adacık sayısı uygun IEQ faktörüyle çarpıldı ve tüm boyut gruplarının toplanmış olduğu excel tablosu ile adacık eşdeğeri hesaplandı.

3.8.4 Adacık hücrelerinin canlılığının floresan mikroskopi ile değerlendirilmesi

Adacık hücrelerinin canlılığının değerlendirilmesinde iki reaktif boyanın belli oranlarda karıştırılarak muamele edilmesi ile bakıldı. Öncelikle pH 7.4 olan 100 mL steril deiyonize su içinde PBS hazırlandı. Propidium iyodür (PI), 6.346 mg PI, 100 mL PBS'de çözünerek hazırlandı. 1mg fluorescein diasetat (FDA), 100 mL aseton içinde çözüldü. Hazırlanan karışımlardan; 465 µL PBS, 21 µL PI ve 14 µL FDA bir ependorf tüpünde karanlık ortamda karıştırıldı. İzolasyon aşaması sonunda alınan 1 mL'lik hücre süspansiyonu 35 mm'lik petri kabına konuldu. Karanlık ortamda 50 µL PI/FDA çalışma solüsyonu petriye eklendi. 5 dakika oda sıcaklığında karanlık ve nemli bir ortamda inkübe edildi. 5 dakikanın sonunda adacıklar (0. saatte) FDA+IP (fluorescein diasetat+ propidium iyodür) ile boyanıp, floresan ışık altında incelendi.

Bu yöntem kullanılarak aynı anda hem canlı hem de ölü hücrelerin görülmesi sağlandı. Kullanılan reaktif boyalardan FDA adacık hücreesindeki canlı hücrelerin membranından geçerek sitoplazmada ki esterase enzimi tarafından fluoresceine dönüşecek ve 490 nm dalga boyunda mavi floresan eksitasyon ışık altında yeşil renkli ışımaya yaparak canlı hücreler belirlendi [135]. Diğer reaktifPI'un, uyarılma dalga boyu 536 nm'dir. Ölü hücrelerin geçirgen hücre membranlarından DNA arasına girerek kırmızı floresans veren bir boyadır. Her bir adacığın kırmızı ve yeşil renkli floresan görüntüleri çekildi. Bu resimlerden, yeşil floresans ve kırmızı floresans yoğunluğu hesaplanıp birbirine oranlanarak, Matlab programında renk analizi kodu kullanılarak canlılık yüzdesi hesaplandı [136].

3.8.5 Adacıkların kültür işlemleri

Saflık ve canlılıkları belirlenen adacık hücreleri 5 mL RPMI 1640 (+) solüsyonu ile T25'lik kültür flaskları içerisinde 37°C'de % 5 CO₂ varlığında 24 saat kültüre edildi. 24 saat kültürde bekletilen adacık hücrelerinden bir miktar alınarak DMSO içerisinde çözülerek, hazırlanan 10 mg/mL derişimindeki dithizone boyası ile boyanarak inverted mikroskop altında adacık hücrelerinin equivalent, IEQ olarak saflığına ve morfolojisine tekrar bakıldı. Her bir ratdan adacıklar ayrı ayrı petri kaplarına alınarak canlılıkları belirlendi.

3.9 RNA İzolasyonu

RT-PCR yönteminin uygulanabilmesi için öncelikle hücredeki total RNA'nın izole edilmesi gerekmektedir. Bunun için PureLink®RNA Mini Kit Ambion-Life Technologies izolasyon kiti kullanıldı. Tüm gruplardaki ratların adacık hücrelerinden total RNA izolasyonu yapıldı. Adacık hücrelerinden RNA izolasyonu aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi.

- Kuyucuklarda bulunan hücreler 15 mL'lik RNase-free tüplere alınarak 2000 g'de 4 °C'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
- Her tüpe % 1'lik 2-merkaptoetanol içeren Lysis Buffer' dan 0,3 mL eklendi. Hücre peleti parçalanana kadar yavaş bir şekilde pipetaj yapıldı.
- Hücre homojenatının üstüne 1:1 oranında % 70'lik etil alkol (0,3 mL) eklendi.
- Ependorf içindeki örneklerin hepsi koleksiyon tüplerine dağıtıldı.

- Koleksiyon tüpüne aktarılan örnekler, oda sıcaklığında 12.000 g'de 15 sn. santrifüj edildi.
- Her koleksiyon tüpüne % 96-100'lük etanol içeren Wash Buffer I'den 700 µl ilave edildi.
- Yeni koleksiyon tüplerine aktarılan örneklerin üzerine 500 µl Wash Buffer II eklendi.
- Örnekler oda sıcaklığında 12.000 g'de 15 sn. santrifüj edildi.
- Koleksiyon tüpündeki örnekler oda sıcaklığında 12.000 g'de 1 dk. santrifüj edilerek RNA'nın membrana bağlanması sağlandı. Örnekler boş koleksiyon tüpe alınarak tekrar 12.000 g'de 1 dk. santrifüj edildi. Daha sonra koleksiyon tüpleri toplama tüplerine aktarıldı.
- Tüpün merkezine gelecek şekilde RNase-Free sudan 30 µl eklendi.
- Oda sıcaklığında 1 dk. inkübasyona bırakıldıktan sonra 12.000 g'de 2 dk. santrifüj edildi.

İzolasyonu yapılan RNA'ların kontrolü agaroz jel elektroforezi ile konsantrasyonları, 260/280 nm deki absorbans değerleri oranlanarak spektrofotometrik olarak hesaplandı. Safılıkları ve konsantrasyonları belirlenen RNA'lar genlerin mRNA düzeyindeki gen ifade düzeylerini saptamak için -80 °C'de saklandı.

3.10 RNA Miktarının ve Safılığının Belirlenmesi

Total RNA izolasyonun miktarının ve saflığının belirlenmesi için 260 ve 280 nm dalga boylarında absorbans ölçümleri yapıldı. Bu ölçümler nükleik asit (DNA, RNA) ve protein değerlerini verir. RNA örneklerinin saflığı 260 nm'deki absorbansın 280 nm'ye bölünmesi ile bulunur. Optimum 260/280 nm'deki RNA'ların absorbansları 1,8-2,0 değeri arasındadır. Kaliteli bir RNA izolasyonunun absorbans değeri 2,0 civarındadır.

RNA'nın saflığı ve miktarı Nanodrop 2000 cihazı kullanılarak saptandı. RNA izolasyonundan sonra izolasyon kontrolü % 3'lük agaroz jel elektroforezi kullanılarak yapıldı. Elektroforez için 1X Tris-Boat-EDTA (TBE) tamponu kullanıldı. Etidyum Bromür ile boyanmış örnekler jel görüntüleme cihazında görüntülenerek fotoğrafları çekildi.

3.11 Real time RT-PCR Yöntemi İle Gen İfade Düzeylerinin Saptanması

Tüm hücre örneklerinde apoptozis ile ilişkili *bcl-2*, *bax* ve *kaspaz 3* genlerin mRNA düzeyindeki değişimleri kantitatif real time RT-PCR yöntemi ile saptanmıştır. Öncelikli olarak izole edilen her RNA örneğinden komplementer DNA (cDNA) sentezinin yapılması gerekmektedir.

3.12 Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

İzole edilen RNA'lerden 1µg/mL kullanılarak High Capacity Reverse Transkriptaz enzimi tarafından cDNA sentezi gerçekleştirildi. Tüm mRNA'lerden Random primer kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. cDNA sentezinde 20 µl'lık bir reaksiyon için 2 µl reaksiyon tamponu, 0.8 µl 25X dNTP Mix, 2 µl 10X RT Random Primer, 1 µl enzim ve 4,2 µl nükleaz-free su içeren toplam 10 µl'lık bir reaksiyon karışımı hazırlandı (Çizelge 3.3). RNA ilavesi ile son hacim 20 µl'ye tamamlandı. Daha sonra Çizelge 3.4 de gösterilen PCR programı kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA' lar -20 °C de muhafaza edildi.

Çizelge 3.3: cDNA reaksiyon karışımı (20 uL reaksiyon başına)

Reaksiyon içeriği	Hacim (µl)
10X RT Tampon	2.0 µl
25X dNTP Mix (100 mM)	0.8 µl
10X RT Random Primer	2.0 µl
MultiScribe™ters Transkriptaz	1.0 µl
RNase İnhibitör	–
Nucleaz-free H2O	4.2 µl
Toplam Reaksiyon	10.0 µl

Çizelge 3.4: cDNA sentezi için PCR Programı

	Adım 1	Adım 2	Adım 3	Adım 4
Sıcaklık	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
Zaman	10 dakika	120 dakika	5 dakika	∞

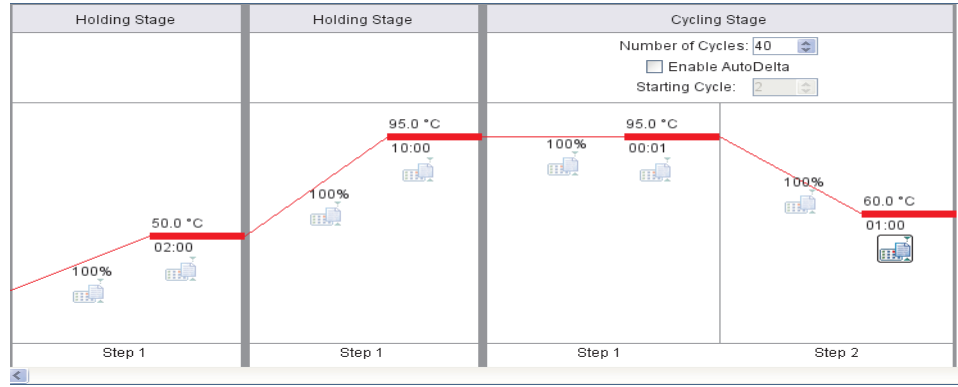
3.13 Kantitatif Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

Çalışmanın bu aşamasında gen ekspresyon düzeylerini saptamak için çalıştığımız genlere özgü TaqMan prob kullanıldı. “TagMan®probe” yöntemi çoğaltılmak istenilen DNA’ya komplementer olan ve floresan işaretlenmiş tek zincirli bir prob içerir. 5' nükleaz (TaqMan®) yöntemi Taq DNA polimerazın 5' -3' ekzonükleaz aktivitesine dayanmaktadır. TaqMan probu yaklaşık 23–30 baz uzunluğunda bir oligonükleotid dizisidir. Probun 5' ucunda bir raportör florokrom boya (6-carboxyfluorescein =6-FAM), ve 3' ucunda ise quencer florokrom boya (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine =TAMRA) bulunmaktadır. 3' ucunda bulunan quencer boya reporter boyanın ışımasını baskılamakta aynı zamanda da probun primer gibi davranarak uzamasına engel olmaktadır. PCR esnasında enzim aktivitesi ile birlikte reporter ve quencer arasında bulunan prob parçalanarak ayrılır, baskılanmanın ortadan kalkmasıyla ışıma meydana gelir. Bu işlem sadece hedef bölge üzerinde hibridize olmuş problarda gerçekleşir. Amplifikasyon miktarı arttıkça, reporter boyanın açığa çıkmasıyla birlikte ışıma doğrusal olarak artmakta ve bu artış cihaz tarafından eş zamanlı olarak tespit edilmektedir.

Çalışmamızın tüm aşamalarında *Bax*, *Bcl-2* ve *Kaspaz-3* genlerine ilaveten kontrol olarak *GADPH* geni için TaqMan problemleri kullanıldı. Gen ekspresyonu çalışmalarımız ABI 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Her örnek 3 tekrar olacak şekilde çalışıldı. Negatif kontrol olarak cDNA içermeyen reaksiyon karışımı kullanıldı. Real time PCR için reaksiyon koşulları çizelge 3.5’de ve amplifikasyon basamakları şekil 3.4’de verilmiştir.

Çizelge 3.5: Real timePCR reaksiyon koşulları.

Assay (primerler ve probe)	0,5 µl
Master Karışım	10 µl
RNaz Distile Su	7,5 µl
cDNA	2 µl
Total Hacim	20 µl



Şekil 3.4: Real time PCR Amplifikasyon Basamakları

3.14 $2^{-\Delta\Delta CT}$ Yöntemi ile Gen İfade Düzeylerinin Hesaplanması

Gen ekspresyonunda miktar tayini $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi kullanılarak hesaplandı. $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodunda gen ekspresyonlarındaki değişiklik kontrole göre kat değişimi olarak değerlendirilir. Gen ekspresyonunun kat değişimleri aşağıdaki şekilde hesaplanarak saptandı.

$$\Delta C_t \text{ Çalışma grubu} = C_t (\text{Hedef gen}) - C_t (\text{Referans gen})$$

$$\Delta C_t \text{ Kontrol grubu} = C_t (\text{Hedef gen}) - C_t (\text{Referans gen})$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta C_t \text{ Çalışma grubu} - \Delta C_t \text{ Kontrol grubu}$$

$$\Delta\Delta CT = [(C_t (\text{Hedef gen}) - C_t (\text{Referans gen})) - (C_t (\text{Hedef gen}) - C_t (\text{Referans gen}))]$$

Hedef genin kontrole grubuna göre ifade düzeyindeki katlık değişim (Relative kantitasyon) değeri $2^{-\Delta\Delta CT}$ eşitliğinden hesaplandı.

3.15 İstatiksel Değerlendirme

Sonuçlar Windows uyumlu SPSS programı kullanılarak değerlendirildi. Elde edilen sonuçların her grupta dağılımları Shapiro Wilk testi ile değerlendirildi. Normal dağılım gösterenlerde analizler için bağımsız grupların değerlendirilmesinde kullanılan t testi ve normal dağılım göstermeyenlerde Mann Whitney U testi kullanıldı. Sonuçlar ortalama $\pm$ std sapma olarak verildi ve $P < 0,05$ olanlar anlamlı kabul edildi [1374. *

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Gereç ve Yöntemler bölümünde belirtilen yöntemlerle deneysel tip 1 diyabet başarıyla oluşturulmuş ve daha sonrasında belirtilen tedavi protokolleri uygulanmıştır. Çalışmanın bitirilmesiyle deney hayvanlarından elde edilen hücrelerden laboratuvar analizleri yapılarak, sonuçların istatistiki analizleri yapılmıştır.

Tüm gruptaki ratların vücut ağırlıkları hassas tartı ile ölçülmüş ve kan glukoz düzeyleri glukometre ile tespit edilmiştir. Normal kan glukoz değeri 80-110 mg/dL olarak kabul edilirken; kan glukoz düzeyleri 250 mg/dL 'nin üzerinde olanlar diyabetik olarak kabul edilmiştir [138]. Çalışmadan elde edilen bulgular aşağıda özetlenmiştir.

4.1 Ratların Canlı Ağırlık Sonuçları

Çalışmada planlanan, Kontrol grubu, STZ verilerek diyabet yapılan Diyabet grubu (**Grup II**), Bortezomib grubu (**Grup III**), STZ ve ilk doz bortezomibin eş zamanlı verildiği STZ-bortezomib grubu (**Grup IV**) ve kan glukoz değerlerine bakılarak STZ ile diyabet olduğu doğrulana ratlara bortezomibin verildiği STZ-Bortezomib tedavi grubu (**Grup V**) hayvanların ilk günden (0.gün) deney sonlanıncaya kadar gün aşırı olarak vücut ağırlıklarına ve kan glukoz değerlerine bakılmıştır. Gruplardaki her hayvana ait vücut ağırlıkları Çizelge 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4.1: Kontrol grubundaki ratlara ait canlı ağırlık değerleri.

	0.gün	2.gün	4.gün	6.gün	8.gün
1.rat	214 gr	223 gr	238 gr	211 gr	217 gr
2.rat	221 gr	242 gr	255 gr	231 gr	237 gr
3.rat	215 gr	223 gr	228 gr	200 gr	209 gr
4.rat	197 gr	201 gr	213 gr	251 gr	241 gr
5.rat	203 gr	215 gr	217 gr	194 gr	191 gr

Çizelge 4.2: Grup II'deki ratlara ait canlı ağırlık değerleri.

	0.gün	2.gün	4.gün	6.gün	8.gün
1.rat	218 gr	217 gr	227 gr	221 gr	201 gr
2.rat	231 gr	225 gr	224 gr	220 gr	208 gr
3.rat	191 gr	199 gr	195 gr	190 gr	197 gr
4.rat	252 gr	242 gr	257 gr	243 gr	246 gr
5.rat	181 gr	187 gr	194 gr	189 gr	183 gr

Çizelge 4.3: Grup III'deki ratlara ait canlı ağırlık değerleri.

	0.gün	2.gün	4.gün	6.gün	8.gün
1.rat	181 gr	178 gr	183 gr	192 gr	191 gr
2.rat	233 gr	235 gr	243 gr	254 gr	251 gr
3.rat	212 gr	221 gr	227 gr	217 gr	238 gr
4.rat	176 gr	188 gr	192 gr	184 gr	187 gr
5.rat	225 gr	228 gr	218 gr	226 gr	235 gr

Çizelge 4.4: Grup IV'deki ratlara ait canlı ağırlık değerleri.

	0.gün	2.gün	4.gün	6.gün	8.gün
1.rat	182 gr	173 gr	180 gr	181 gr	184 gr
2.rat	217 gr	202 gr	201 gr	197 gr	201 gr
3.rat	189 gr	182 gr	183 gr	180 gr	191 gr
4.rat	205 gr	196 gr	201 gr	197 gr	193 gr
5.rat	256 gr	238 gr	239 gr	223 gr	205 gr

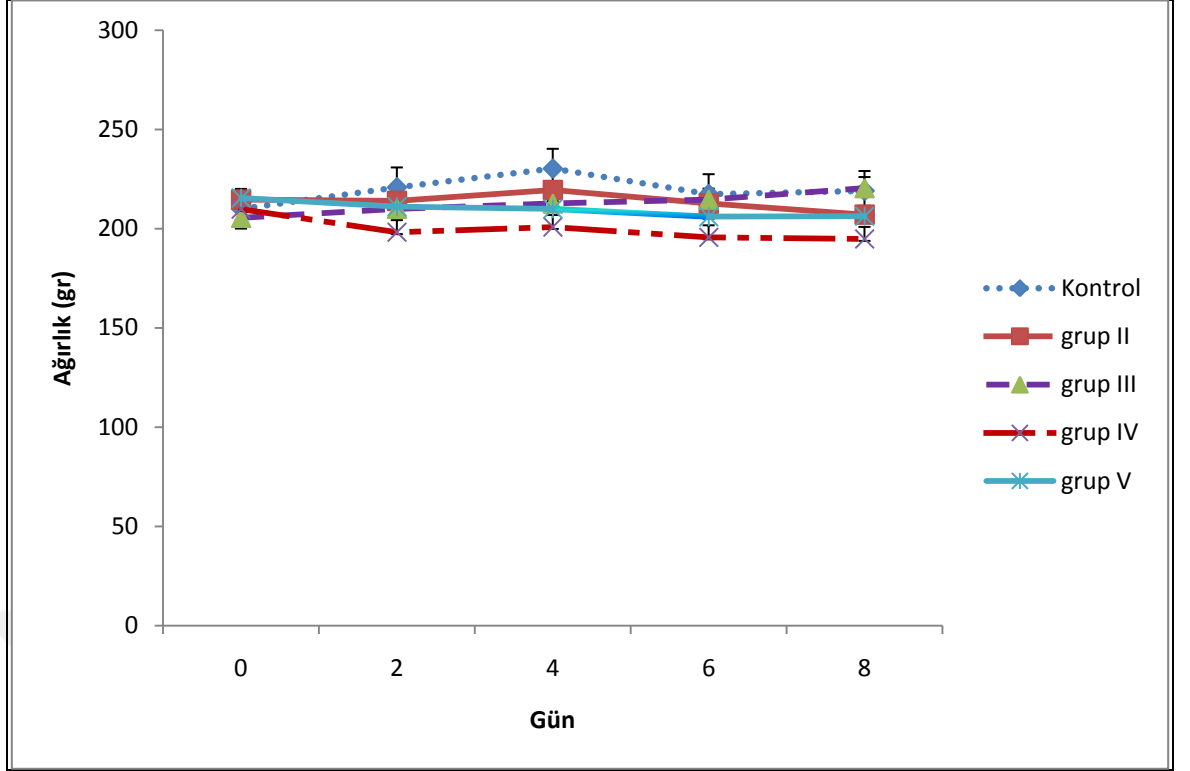
Çizelge 4.5: Grup V'dekiratlara ait canlı ağırlık değerleri.

	0.gün	2.gün	4.gün	6.gün	8.gün	10.gün	12.gün	14.gün	16.gün	18.gün	20.gün
1.rat	213gr	211gr	207gr	202gr	192gr	214gr	211gr	194gr	195gr	198gr	206gr
2.rat	223gr	211gr	221gr	212gr	210gr	210gr	218gr	203gr	195gr	192gr	198gr
3.rat	214gr	202gr	210gr	205gr	209gr	213gr	216gr	201gr	206gr	207gr	215gr
4.rat	212gr	215gr	211gr	198gr	201gr	221gr	217gr	212gr	202gr	204gr	207gr
5.rat	215gr	216gr	220gr	213gr	219gr	224gr	221gr	211gr	215gr	213gr	216gr

Çizelge 4.6:Tüm gruplardaki ratların ağırlıklarının günlere göre ortalaması.

Gruplar	Ratların Ağırlık Ölçüm Zamanları (gr)					
	0.gün	2.gün	4.gün	6.gün	8.gün.	20.gün
Kontrol	210, 1 ± 9,48	220,8 ±1,32	230,2±10,72	217,4±2,08	219,5±0,76	
Grup II	214,6±1,08	214,1±0,48	219,4±5,88	212,6±0,92	207,1±6,52	
Grup III	205,4±7,2	210,2±2,6	212,6±0,6	214,6±2	220,4±7,8	
Grup IV	209,8±9,96	198,2±1,64	200,8±0,96	195,6±4,24	194,8±5,04	
Grup V	215,4±6,46	211,3±2,06	213,8±4,86	207,4±1,94	206,6±2,34	208,4± 0,54

Ratların ağırlıklarını takip etmemizin amacı, ratlardaki kilo değişimini hayvan sağlığı açısından takip edebilmek ve ratlara uygulanan borteomib ağırlıklara göre hesaplandığı için, doğru ilaç konsantrasyonunu hesaplayabilmektir. İlaç uygulaması yapılan ratlarda herhangi bir ağırlık değişimi karşısında ilaç dozu her uygulamada yeniden hesaplanarak hayvanlara verilmiştir. Tüm çalışma gruplarına ait ağırlık değişimleri şekil 4.1'de gösterilmiştir. Çalışma süresince elde edilen ağırlık değişimleri gruplar arasında istatistiksel bir fark göstermemiştir.



Şekil 4.1: Günlere göre ratların canlı ağırlık değişimleri

4.2 Çalışma Boyunca Belirlenen Kan Glukoz Düzeyleri

Çalışmanın 0.,2.,4.,6. ve 8., günlerinde ilk dört grubun kan glukoz değerleri ölçülerek kendi aralarında değerlendirildi. Sadece beşinci grupta ilk 15 gün diyabet gözlemlendikten sonra ilaç uygulaması yapıldı ve kendi aralarında kontrol grubu ile kan glukoz değerleri değerlendirildi. Gruplara ait kan glukoz değerleri Çizelge 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7: Kontrol grubundaki ratlara ait kan glukoz değerleri(mg/dL).

	0.gün	2.gün	4.gün	6.gün	8.gün
1.rat	89	92	91	94	92
2.rat	101	96	94	93	89
3.rat	96	103	95	92	101
4.rat	92	89	91	88	97
5.rat	87	95	99	93	102

Çizelge 4.8: Grup II’ deki ratlardaki ait kan glukoz değerleri (mg/dL).

	0.gün	2.gün	4.gün	6.gün	8.gün
1.rat	102	345	301	158	271
2.rat	94	213	265	215	275
3.rat	89	165	212	201	267
4.rat	96	406	433	340	361
5.rat	91	464	369	406	364
6.rat	86	312	184	121	98
7.rat	62	213	165	131	119

Çizelge 4.9: Grup III’deki ratlara ait kan glukoz değerleri (mg/dL).

	0.gün	2.gün	4.gün	6.gün	8.gün
1.rat	90	92	98	91	109
2.rat	93	95	101	87	120
3.rat	98	96	95	92	81
4.rat	87	91	97	103	91
5.rat	103	105	99	106	90
6.rat	98	94	112	86	92

Çizelge 4.10: Grup IV’deki ratlara ait kan glukoz değerleri(mg/dL).

	0.gün	2.gün	4.gün	6.gün	8.gün
1.rat	101	437	396	425	427
2.rat	89	454	447	433	434
3.rat	91	376	412	323	402
4.rat	85	413	451	316	371
5.rat	87	434	465	324	404
6.rat	83	197	165	132	121
7.rat	92	165	141	119	108

Çizelge 4.11: GrupV'deki ratlara ait kan glukoz değerleri (mg/dL).

	0.gün	2.gün	4.gün	6.gün	8.gün	10.gün	12.gün	14.gün	16.gün	18.gün	20.gün
1.rat	81	411	457	422	469	>600	434	421	417	432	416
2.rat	103	164	139	198	305	386	324	345	368	351	376
3.rat	96	346	395	>600	446	>600	483	437	415	421	436
4.rat	91	297	310	296	305	300	293	305	364	342	353
5.rat	89	396	464	447	377	456	482	390	413	431	387

Çizelge 4.12: Tüm gruplara ait ortalama açlık kan glukoz değerleri

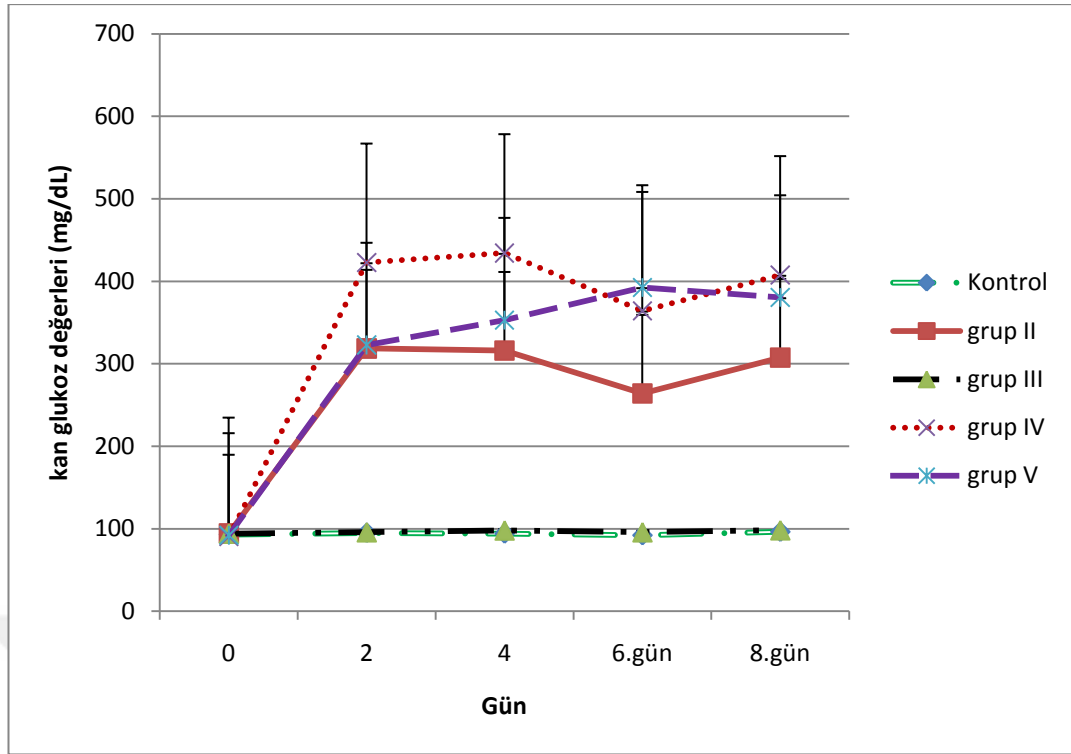
	Glukoz (mg/dL)					
	0.gün	2.gün	4.gün	6.gün	8.gün	20.gün
Kontrol	93±5,61	95±5,24	94±3,31	92±2,34	96,2±5,63	
Grup II	94,4±502	318,6±126,70	316±86,80	264±104,33	307,6±50,21	
Grup III	94,2±6,37	95,8±5,54	98±2,23	95,8±8,22	98,2±15,86	
Grup IV	90,6±6,22	422,8±29,94	434,2±28,92	364,2±59,31	407,6±24,78	
Grup V	92±8,18	322,8±99,44	353±134,67	392,6±153,33	380,4±76,70	393,6±32,79

Tüm gruplardaki hayvanların deney süresince değişen kan glukoz seviyeleri Çizelge 4.12.'de görülmektedir. 0. gün çalışmanın başlangıcını göstermektedir. 0. günde hayvanların 8 saat açlık sonrası kan glukoz seviyeleri belirlenerek hemen arkasından intraperitoneal olarak STZ enjeksiyonu yapıldı. Enjeksiyonu takiben 48. saatte (2. gün) kan glukoz seviyelerine bakılarak diyabet doğrulandı. Bortezomib ve STZ'nin eş zamanlı olarak verildiği **IV. grupta** bortezomib 0, 3. ve 7. günlerde aynı saatte olacak şekilde intraperitoneal olarak uygulandı. **V. Grup** olan tedavi grubunda ise ilk on beş gün diyabet takibi gözlemlendikten sonra bortezomib aynı saatte olacak şekilde 0, 3. ve 7. günlerde intraperitoneal olarak uygulandı. Bu periyot içinde tüm hayvanların kan glukoz seviyeleri gün aşırı ölçülerek takip edildi. Başlangıçta (0. günde) grupların kan glukoz seviyelerinin 81-103 mg/dL arasında olduğu gözlemlendi. Kontrol ve Bortezomib grubunun (**grup III**) kan glukoz seviyelerinde çalışmanın sonuna kadar istatistiksel açıdan anlamlı bir artış gözlenmedi ($p>0,5$). Ancak STZ uygulanan tüm gruplarda (**grup II, grup IV ve grup V**) açlık kan glukoz seviyeleri ilk gün (0.gün) ile karşılaştırıldığında önemli artışlar gösterdi ($p<0,05$).

Ratların çalışma başındaki açlık kan şeker düzeyleri kontrol ve grup III gruplarında sırasıyla $93 \pm 5,61$ ve $94,2 \pm 6,37$ mg/d; grup II, grup IV ve grup V'de sırasıyla $94,4 \pm 6,37$, $90,6 \pm 6,22$ ve $92 \pm 8,18$ mg/dL olarak ölçülmüştür. Bu beş grup arasında 0. Gün açlık kan glukoz (AKŞ) değerleri açısından istatistiksel bir fark saptanmamıştır. STZ uygulaması sonrası 2.gündeki açlık kan şekeri düzeyleri ise grup II, grup IV ve grup V'de sırasıyla $318,6 \pm 126,70$, $422,8 \pm 29,94$ mg/dL ve $322,8 \pm 99,44$ mg/dL olarak ölçülmüştür. 2. gün AKŞ düzeyleri STZ uygulanan bu üç grupta kontrole göre istatistik olarak önemli bir artış göstermiştir Çalışmanın 4. günündeki değerler kontrol ve grup III'de sırasıyla $94 \pm 3,31$ ve $98 \pm 2,23$ mg/dL olarak ölçülmüş ve gruplar arasında istatistiksel bir fark saptanmamıştır. Grup II, grup IV ve grup V' de sırasıyla ise sırasıyla $316 \pm 86,80$, $434,2 \pm 28,92$ ve $353 \pm 134,67$ mg/dL olarak ölçülürken açlık kan şekeri düzeyleri zamana göre önemli bir artış göstermiştir.

Çalışmanın 6. günündeki değerler kontrol ve grup III'de sırasıyla $92 \pm 2,34$ ve $95,8 \pm 8,22$ mg/dL olarak ölçülmüş ve gruplar arasında istatistiksel bir fark saptanmamıştır. Grup II, grup IV ve grup V'de 6. gündeki AKŞ değerleri sırasıyla $264 \pm 104,33$, $364,2 \pm 59,31$ ve $392,6 \pm 153,33$ mg/dL olarak ölçülürken açlık kan şekeri düzeyleri zamana göre (0. güne göre) önemli bir artış göstermiştir (Çizelge 4.12).

Çalışmanın 8. gününde AKŞ değerleri kontrol ve grup III'de sırasıyla $96,2 \pm 5,63$ ve $98,2 \pm 15,86$ mg/dL olarak ölçülmüş ve gruplar arasında istatistiksel bir fark saptanmamıştır. Grup II, grup IV ve grup V'de 8.gün AKŞ değerleri sırasıyla $307,6 \pm 50,21$, $407,6 \pm 24,78$ ve $380,4 \pm 76,70$ mg/dLolarak ölçülürken, AKŞ düzeyleri zamana göre bu gruplarda istatistiksel olarak önemli bir artış göstermiş, fakat gruplar arasında büyük bir fark gözlenmemiştir (Çizelge 4.12). STZ uygulaması yapıp diyabet olmayan ratlar çalışmaya alınmamıştır.

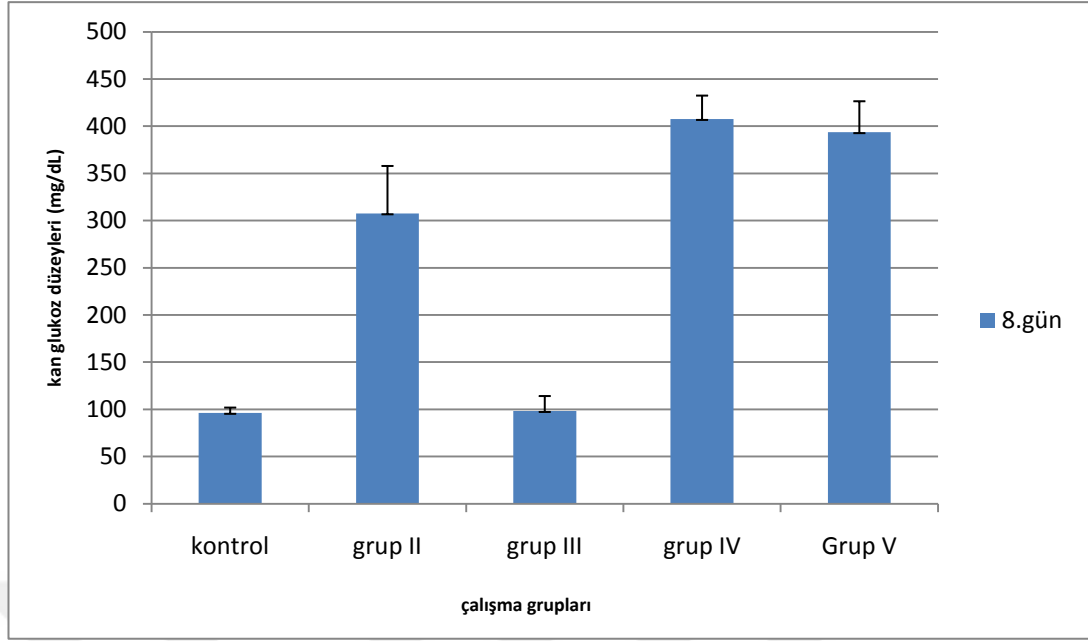


Şekil 4.2: Tüm çalışma grupların günlere göre değişen açlık kan glukoz değerleri

Şekil 4.2. ve Çizelge 4.12’de görüldüğü gibi Bortezomib uygulaması yapılan Grup III ratlarda, bortezomibin kan şekeri regülasyonunu bozacak herhangi bir etkisinin olmadığı gün aşırı olarak yapılan kan glukoz ölçümleri ile doğrulanmıştır. Ayrıca grup IV de, bortezomibin STZ’nin sitotoksik etkisini inhibe etme özelliği bulunmadığı ölçülen kan glukoz düzeyleri ile gözlenmiştir.

Grup V deki ratlarda kan şekerleri ilk günden başlayarak çalışma sonlanıncaya kadar gün aşırı ölçülmüştür. Ratlarda herhangi bir antidiyabetik ajan kullanılmadığı için kan şekerlerinde herhangi bir azalma görülmediği gibi, bortezomibin kan şekerini düşürücü etkisi olmadığı da Şekil 4.2’ da görülmektedir.

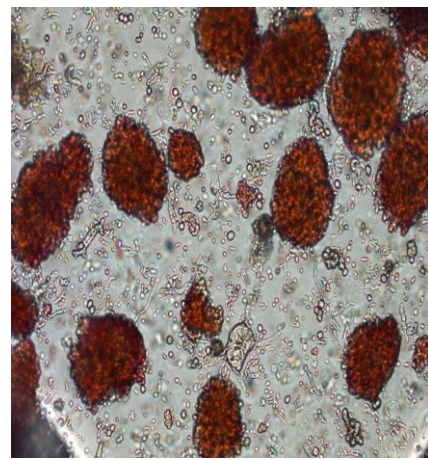
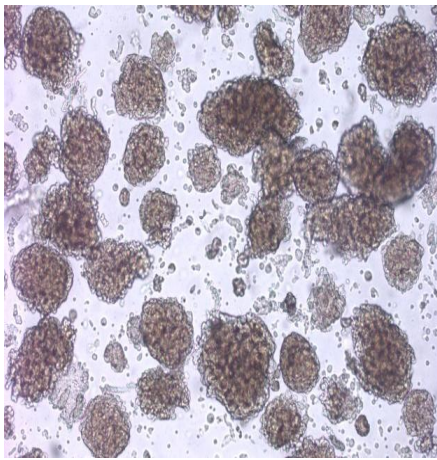
Bortezomib uygulamasının son günü olan 8. günde kan glukoz değerleri ise Şekil 4.3’de verilmiştir. Bu uygulama sonrası tüm grupların adacık hücreleri izole edilerek hücresel ve moleküler çalışmalara başlanmıştır.



Şekil 4.3: 8.gün sonunda tüm gruplardaki ratların ortalama açlık kan glukoz düzeyleri.

4.3 Adacık Hücrelerinin Sayımı

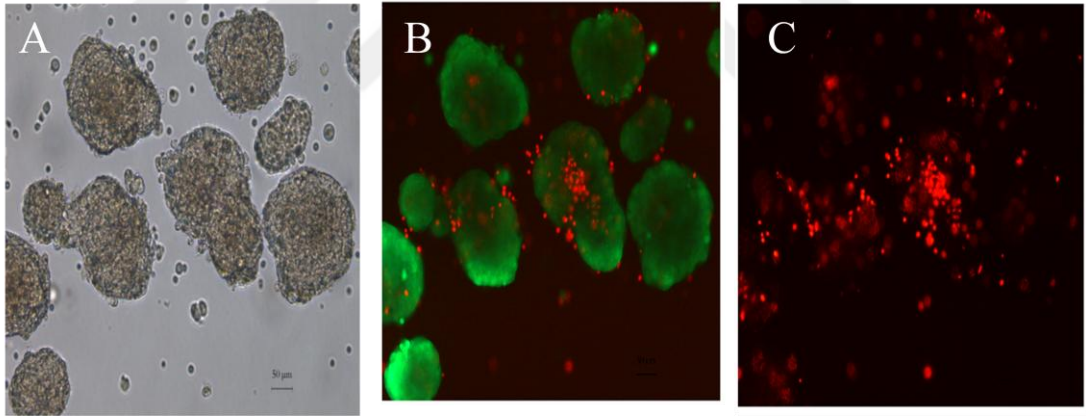
Pankreas dokusundan elde ettiğimiz adacık hücrelerini, pankreasın diğer hücreleri olan beta, alfa ve delta hücrelerinden ayrıştırılmasını sağlamak için DTZ boyası kullanıldı. DTZ boyası ile adacık hücreleri kırmızı rene boyandığı için ayırt edilmesi kolay olmaktadır. Adacık boyutundaki büyük değişiklikleri hesaplamak için adacık eşdeğeri hesabı (IEQ) sayımı yapıldı. Adacık hücreleri DTZ boyası ile boyandıktan sonra, inverted mikroskop ile boyutlarına göre 10 x'lik büyütmede sayıldı. Adacık hücrelerinin DTZ ile boyanmadan önceki ve boyandıktan sonraki görüntüleri Şekil 4.4'de görülmektedir.



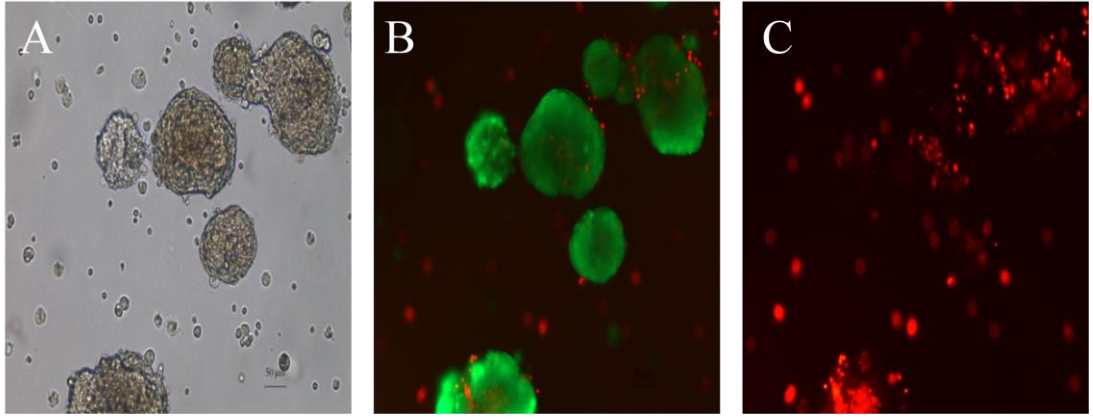
Şekil 4.4: Adacık hücrelerinin DTZ ile boyanmadan önceki ve sonraki görünümü

4.4 Adacık Hücrelerinin Floresan Boyama İle Canlılık Değerlendirilmeleri

Çalışma gruplarının canlılıkları, PI/ FDA floresan boyalar ile boyanmış adacıkların floresan mikroskobundan alınan görüntülerinin MATLAB programı aracılığı ile ölçülmesi ile elde edilmiştir. Aşağıda her bir gruba ait floresans mikroskop görüntüleri görülmektedir. Taze izole edilen ve pipet yardımı ile toplanan pankreatik adacıkların düzenli bir morfolojik yapısı olmakla birlikte, adacıklar ortalama 100-200 µm çapına sahipti. Genel olarak gruplara göre adacıklar izole edildikten hemen sonra (0. Saat) ve adacıklar 24 saat kültüre edildikten sonra hücre canlılığı ve saflığı açısından değerlendirildi ve MATLAB programı ile % canlılıklar hesaplandı. DTZ boyaması sonrasında adacıkların saflıkları yaklaşık olarak belirlendi. PI/FDA boyaması ile izole edilen pankreatik adacıklarında bazı apoptotik hücreler dışında tamamen canlı olduğu saptandı. Sonuçlarımız, yüksek sayıda ve kalitede adacık elde edilmesinde kollegenaz enzimin pankreas içerisine tamamen dağılımının önemli olduğunu gösterdi.

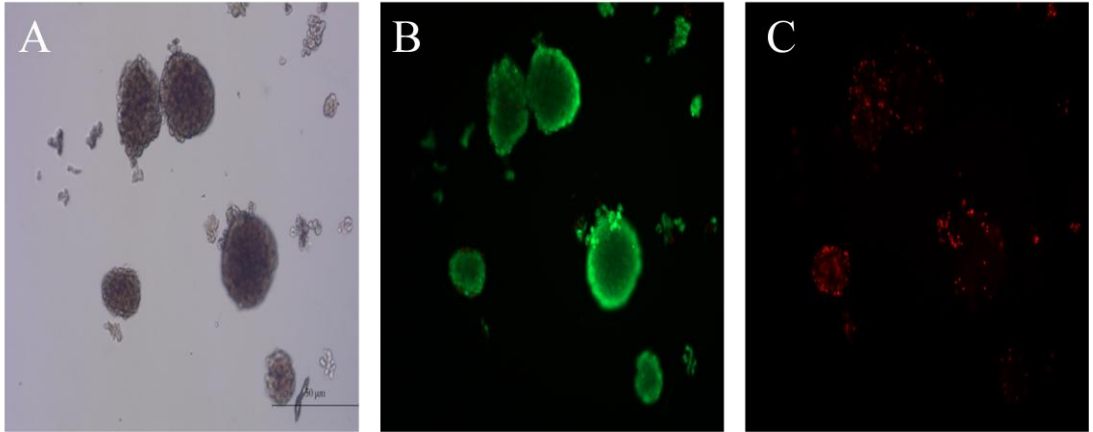


Şekil 4.5: 0. saat Kontrol grubu adacık hücrelerinin A) floresan mikroskop görüntüsü B) % 86 oranında canlılık gösteren adacık hücreleri C) % 14 ölü adacık hücreleri (PI/ FDA X 400).

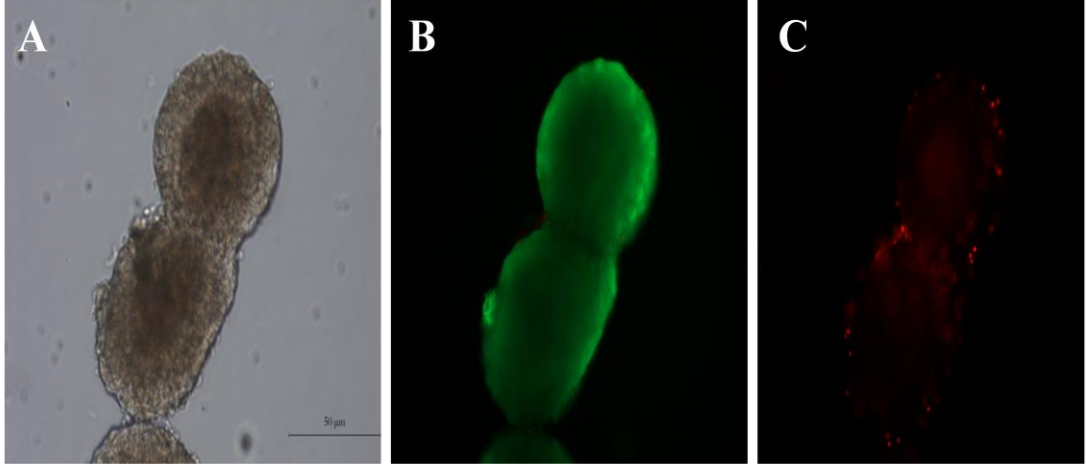


Şekil 4.6: 24. saat Kontrol grubu adacık hücrelerinin A) floresan mikroskop görüntüsü B) % 97 oranında canlılık gösteren adacık hücreleri C) % 3 Ölü adacık hücreleri (PI/ FDA X 400).

Kontrol grubundaki ratlardan izole edilen pankreatik adacıklar hücre canlılığı ve saflığı açısından değerlendirilerek DTZ boyaması sonrasında adacıkların saflıkları 0. saat de yaklaşık % 86 olarak belirlendi. 24 saat kültüre bırakılıp dinlenen hücreler de % 97 olarak belirlenmiş ve anlamlı bir şekilde stresden çıkan adacıklarda canlılıklarının arttığı gözlemlenmiştir.

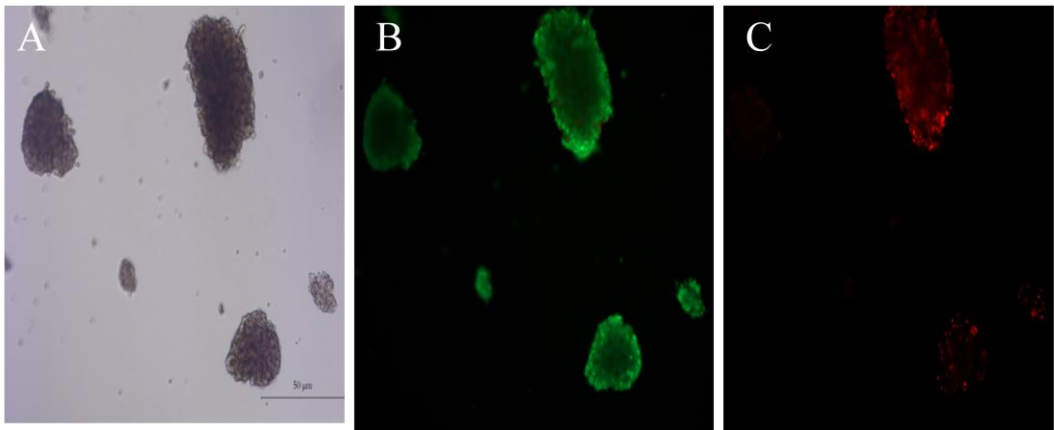


Şekil 4.7: 0. saat Grup II adacık hücrelerinin A) floresan mikroskop görüntüsü B) % 61 oranında canlılık gösteren adacık hücreleri C) % 39 ölü adacık hücreleri (PI/ FDA X 400).

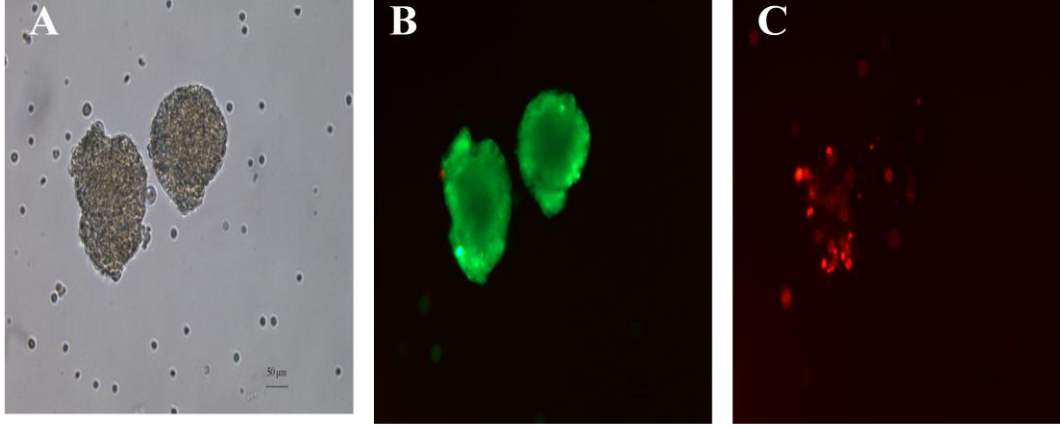


Şekil 4.8: 24. saat Grup II adacık hücrelerinin A) floresan mikroskop görüntüsü B) % 75 oranında canlılık gösteren adacık hücreleri C) % 25 Ölü adacık hücreleri (PI/FDA X 400).

Grup II deki ratlardan izole edilen pankreatik adacıklar hücre canlılığı ve saflığı açısından değerlendirilerek DTZ boyaması sonrasında adacıkların saflıkları 0. saat de yaklaşık % 61 olarak belirlendi. 24 saat kültüre bırakılıp dinlenen hücreler de % 75 olarak belirlenmiş ve anlamlı bir şekilde stresten çıkan adacıklarda canlılıklarının arttığı gözlemlenmiştir.

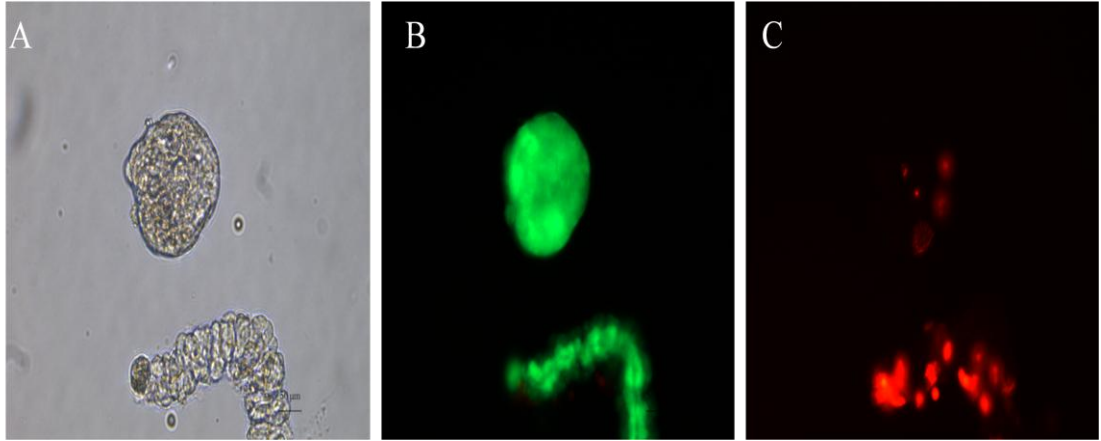


Şekil 4.9: 0. saat Grup III adacık hücrelerinin A) floresan mikroskop görüntüsü B) % 92,8 oranında canlılık gösteren adacık hücreleri C) % 7,2 ölü adacık hücreleri (PI/FDA X 400).

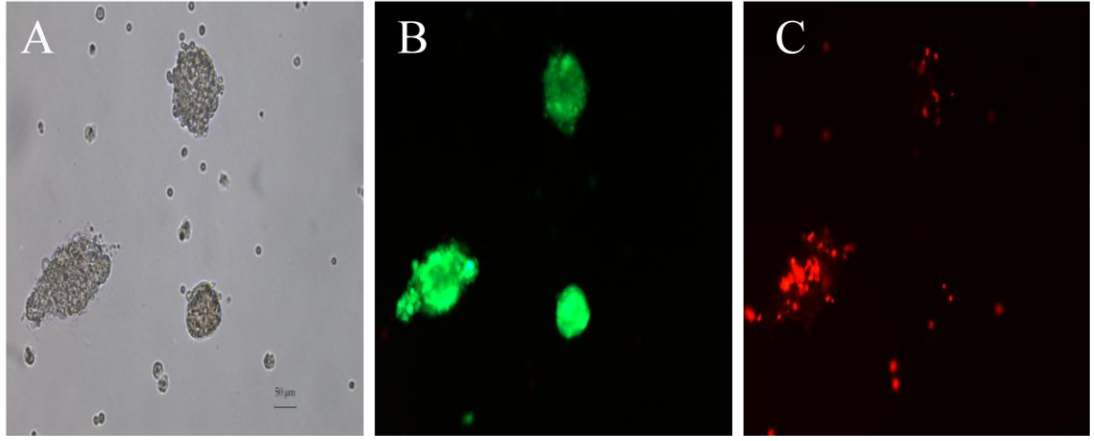


Şekil 4.10: 24. saat Grup III adacık hücrelerinin A) floresan mikroskop görüntüsü B) % 96,2 oranında canlılık gösteren adacık hücreleri C) % 3,8 ölü adacık hücreleri (PI/FDA X 400).

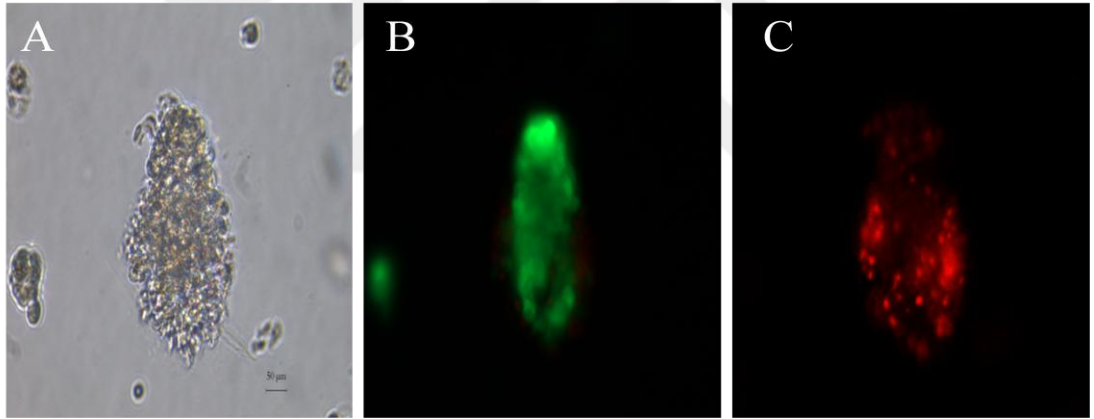
Grup III deki ratlardan izole edilen pankreatik adacıklar hücre canlılığı ve saflığı açısından değerlendirilerek DTZ boyaması sonrasında adacıkların saflıkları 0. saat de yaklaşık % 92,8 olarak belirlendi. 24 saat kültüre bırakılıp dinlenen hücreler de % 96,2 olarak belirlenmiş ve bortezomibin adacık hücreleri üzerinde canlılıklarını etkileyecek herhangi bir etkisinin olmadığı anlamlı bir şekilde artan adacıkların canlılıkları ile gözlemlenmiştir.



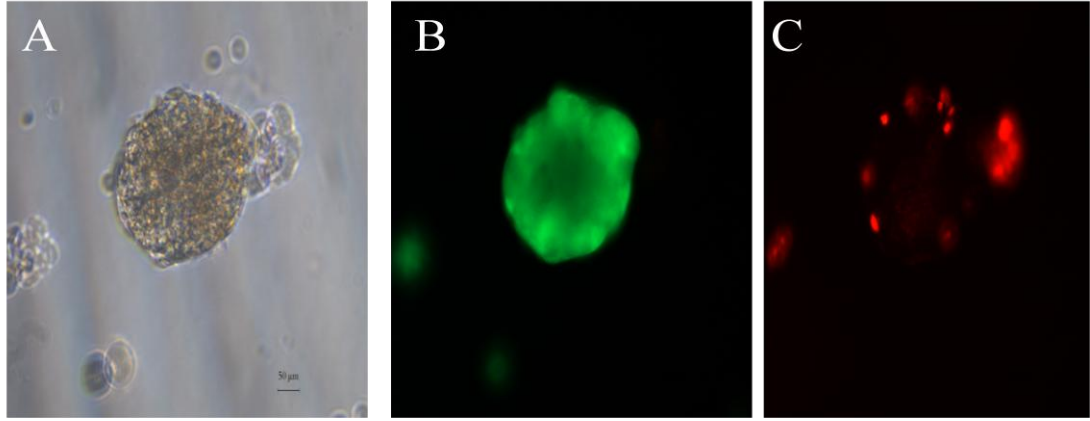
Şekil 4.11: 0. Saat Grup IV adacık hücrelerinin A) floresan mikroskop görüntüsü B) % 94,1 oranında canlılık gösteren adacık hücreleri C) % 5,9 ölü adacık hücreleri (PI/FDA X 400).



Şekil 4.12: 24. saat Grup IV adacık hücrelerinin A) floresan mikroskop görüntüsü B) % 71,7 oranında canlılık gösteren adacık hücreleri C) % 28,3 ölü adacık hücreleri (PI/ FDA X 400).



Şekil 4.13: 0. saat Grup V adacık hücrelerinin A) floresan mikroskopunda görüntüsü B) % 59 oranında canlılık gösteren adacık hücreleri C) % 41 ölü adacık hücreleri (PI/ FDA X 400).



Şekil 4.14: 24. saat Grup V adacık hücrelerinin A) floresan mikroskop görüntüsü B) % 53,6 oranında canlılık gösteren adacık hücreleri C) % 46,4 ölü adacık hücreleri (PI/ FDA X 400).

Yeşil renkte görülen adacıklar canlılığı, kırmızı renkte görülen adacıklar ise ölülük oranını simgelemektedir. Bu iki renk Matlab programında üst üste getirilerek yapılan hesaplama yöntemiyle adacık hücrelerinin canlılığı hesaplanmıştır. Tüm gruplara ait hücre canlılığı değerleri Çizelge 4.13’de toplu halde gösterilmiştir.

Çizelge 4.13: Tüm gruplara ait hücre canlılığı değerleri

	0.saat % hücre canlılığı	24.saat % hücre canlılığı
	% canlı hücre	% canlı hücre
Kontrol	%83±9,87	%89±5,32
Grup II	%67±12,53	%65±8,76
Grup III	%84±8,98	%91±5,43
Grup IV	%79±4,11	%71±5,08
Grup V	%59±10,75	%53±8,65

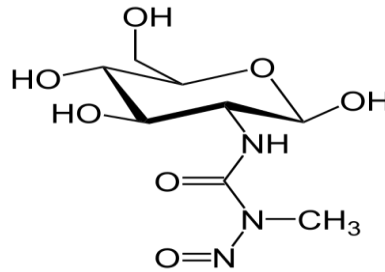
STZ uygulanan gruplar (Grup II, IV ve V) kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kan glukoz değerlerindeki artışın göstergesi olarak adacıkların canlılıklarında bir azalma gözlenmiştir (%65.0, %.71, %53)($p<0,05$). Bu durum STZ’nin β hücrelerini hasarladığını doğrulamaktadır.

Grup II'nin % canlılık verileri, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, STZ'nin β hücrelerini hasarladığı ölçülen kan glukoz değerlerindeki artış ve yapılan canlılık analiz yüzdeleri sonucu ile gösterilmektedir.

Çizelge 4.9'da grup III'de Bortezomibin β hücreleri üzerine herhangi bir toksik etkisinin olmadığı da kan şekeri ölçüm sonuçlarımız ve Matlab' da hazırlanan program ile yapılan analizler sonucunda açıkça görülmektedir.

Buna ek olarak, bortezomibin, STZ uygulanan Grup IV ve Grup V ratlarda kan şekerini düşürücü etkisi olmadığı gözlenmişti. Grup IV ve Grup V ratlardaki % canlılık verilerine bakıldığında eş zamanlı bortezomib uygulamasının (Grup IV= %71.), STZ sonrası bortezomib uygulamasına göre (Grup V =% 53) % canlılıklarda daha koruyucu olduğu gözlemlendi. Bu sonuç bortezomib'in STZ'nin neden olduğu apoptozisi önleyemediği ancak eş zamanlı verildiğinde koruyucu bir etkisi olabileceği şeklinde yorumlanabilir.

Streptozotosin (STZ), N-(Methylnitrosocarbamoyl)- α -D-glucosamine yapısındadır (Şekil 4.15), ışıktan korunmalıdır. Diyabet araştırmalarında STZ en uygun diyabetik ajandır. STZ antimikrobiyal, aynı zamanda kemoterapotik alkileyici ajan olarak da kullanılmaktadır [139,140]. STZ insulin salgılanmasını inhibe ederek, insuline bağımlı diyabete neden olur. Alloksanda olduğu gibi, β -hücresi STZ'yi spesifik olarak hücre içine alır ve biriktirir. STZ'den DNA'ya metil grubunun transferi hasara neden olur ve DNA fragmentasyonu ile sonuçlanır [141]. DNA'nın tamiri için poli(ADP-riboz) polimeraz (PARP) yüksek derecede stimule edilir. Bu olay hücredeki NAD⁺ ve daha sonra ATP depolarını azaltır. Hücrel enerji depolarının tükenmesi sonucunda β hücresi nekroza uğrar [142].

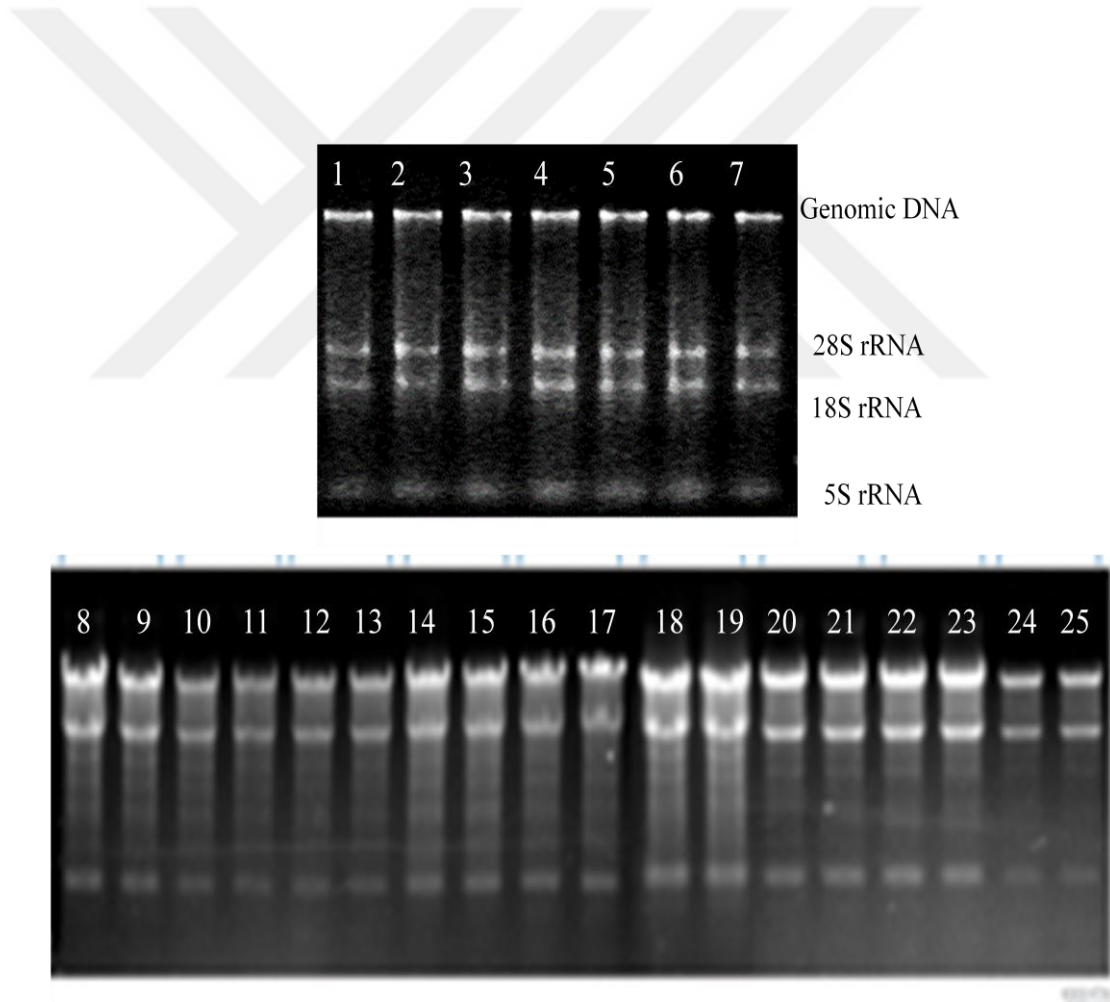


Şekil 4.15: Streptozotosin'in kimyasal yapısı [143].

4.5 Adacık Hücrelerinden İzole Edilen RNA'ların Saflığının Kontrolü

veKonsantrasyon Tayini

Bortezomib'in NF- κ B sinyal yolağına ve adacık hücrelerinin apoptozisine etkisini gen ekspresyon düzeyinde incelemek için RNA izolasyonu yapıldı. Ratlardan izole edilen adacık hücreleri strese girdiklerinden dolayı 24 saat boyunca 37 °C'de % 5 CO₂ ve % 95 nem varlığında CO₂ etüvde kültüre edildi. Kültür sonrası hücrelerden PureLink® RNA Mini Kit (Ambion-Life Technologies) protokolü kullanılarak total RNA izolasyonları yapıldı. İzolasyonun ardından RNA'ların saflığı ve miktarı Nanodrop 2000 (Thermo) cihazı kullanılarak tayin edildi. Şekil 4.16.'de adacık hücrelerinden elde edilen RNA izolasyonunun % 3'lük agaroz jel görüntüsü bulunmaktadır.



Şekil 4.16: Total RNA'ların % 3'lük agaroz jelde görüntüleri

4.6 Gen Ekspresyon Düzeyleri

Real time RT-PCR ve kantitatif PCR uygulamaları, hücre ve dokuların çevresel uyarılara verdikleri mRNA düzeyindeki cevabın incelenmesi için başvurulan yöntemlerdir. RT-PCR uygulamalarında ilgilenilen genin ekspresyon düzeyinin incelenebilmesi için dokuda ekspresyonu değişmeyen bir diğer genin ürünü olan mRNA ile standardize edilmesi gereklidir (normalizasyon). Bu amaçla çeşitli doku ve hücre tiplerinde kullanılan ve ekspresyonu minimal farklılık gösteren housekeeping genler kullanılmaktadır. Kısa ölçekli ve doku mimarisi değişiklikleri sergilemeyen deneylerde housekeeping genlerden uygun olanı seçilerek normalizasyon aşamalarında kullanılabilir. Primerler her bir transkripsiyon analizi için spesifik olup, yeniden dizayn ve sentez ettirilerek elde edildi. Denatürasyon, primer yapışması ve zincir uzatma olmak üzere üç basamaktan oluşan amplifikasyon işleminden sonra elde edilen amplifikasyon eğrilerine ait döngü eşiği (Ct) değerlerinden hareketle, hedef genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinin nisbi değişimleri $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu ile hesaplandı [137] ve mRNA ekspresyon düzeyi misli olarak azalma ya da artış şeklinde belirlendi. Endojen kontrol olarak gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) geni kullanıldı ve tüm genler GAPDH kontrol geni ile birlikte aynı reaksiyon ortamında çalışılarak single PCR yöntemi kullanıldı. Bortezomib uygulamasının β hücrelerinde *Bcl-2*, *Bax* ve *Kaspaz-3* genlerinin mRNA ekspresyon düzeylerindeki değişimlere etkisi RT-PCR yöntemi ile saptandı ve her gen için değişim grafikleri çizildi. Elde edilen analiz sonuçlarımıza göre her grubumuzun kontrol grubuna göre anlamlılıkları istatistiksel olarak hesaplanarak belirlendi.

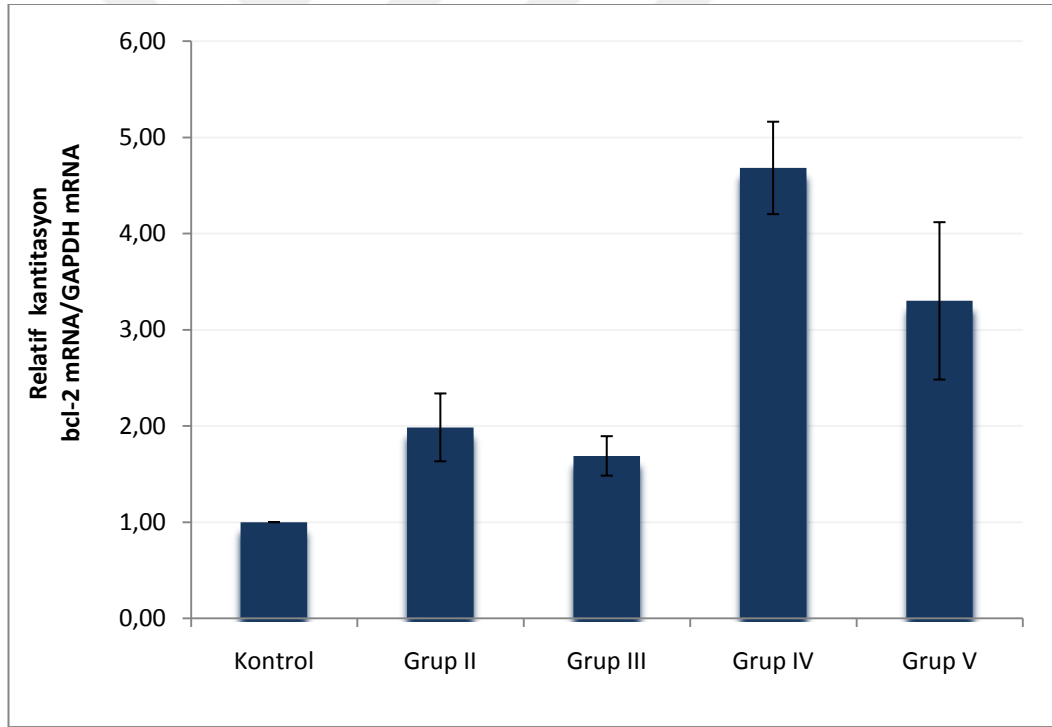
4.7 Proteozom İnhibitörü Bortezomib'in β hücrelerindeki Gen İfade Düzeyleri

Bcl-2 (B-cell lymphoma gene-2) protein ailesi antiapoptotik ve proapoptotik üyelerden oluşan ve apoptozu düzenlemede en önemli role sahip olan onkoprotein grubudur. Anti-apoptotik protein olan bcl-2 dış mitokondriyal membranın bütünlüğünü sağlayarak sitokrom c salınımını engeller [144]. Bcl-2 geni ilk kez B hücreli foliküler lenfomadan klonlanmış bir onkogendir.

Bcl-2 protein ailesinin diğer bir üyesi de Bax (Bcl-2-associated X protein) genidir. Bax hücrenin apoptozise girmesinde görev alan pro-apoptotik bir genidir [145].

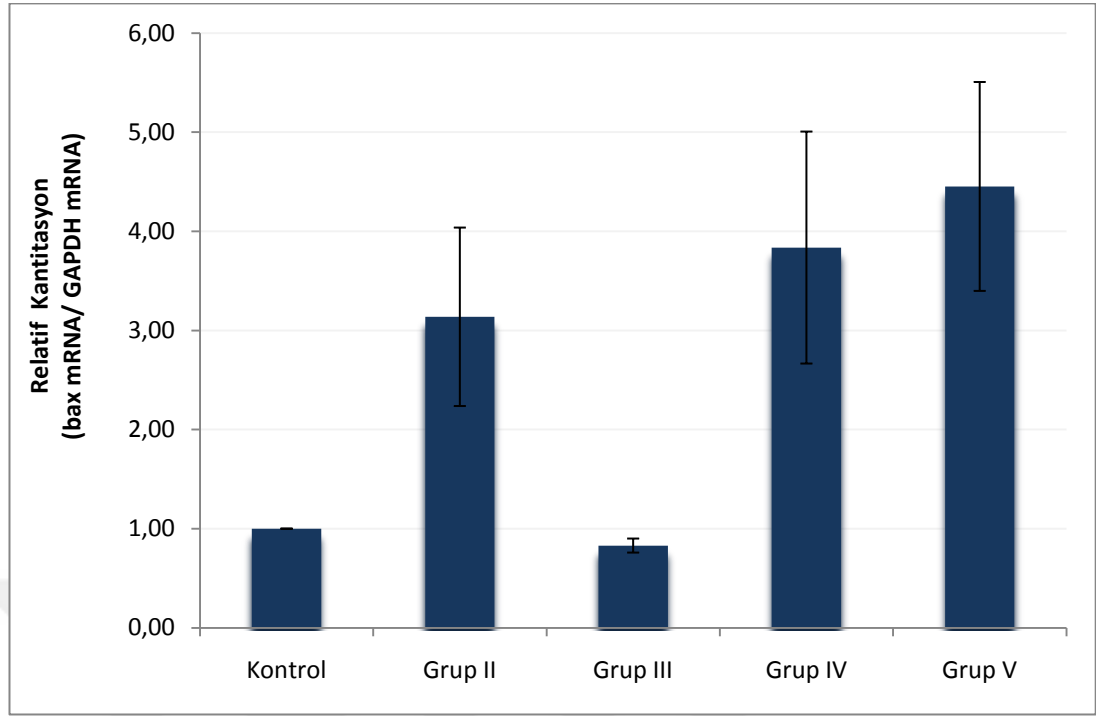
Apoptotik ölüm mekanizmasının önemli yapılarından biri olan Kaspaz enzimleri büyük bir proteaz ailesidir. Kaspaz ailesinin 7 üyesi (kaspaz-2, -3 ve 6-10) apoptotik ölüm yolunda görev alırken, diğer üçü (kaspaz-1, -4 ve 5) proinflamatuvar sitokinleri aktifleştirerek savunma sisteminde görev alır. Aktif merkezlerinde sistein aminoasidi taşırlar ve hedefledikleri proteinleri aspartik asit birimlerinden kestikleri için kaspaz ismini almışlardır. Kaspazlar, sitoplazmada normalde inaktif proenzimler olarak bulunur. Fakat proteolitik parçalanmadan sonra aktif hale geçerler ve böylece kaspaz aktivasyon kaskadı başlar. Başlangıçta, kaspazlar mitokondride membran hasarı oluşturur ve bu olayların sonucunda; zar değişimleri, hücre iskeleti ve çekirdek değişimine yol açan hasarlar ortaya çıkar [146].

Aşağıda Bortezomibin pankreasın β hücrelerinde proapoptotik bax, anti-apoptotik bcl-2 ve apoptozis mekanizmasının gerçekleşmesinde doğrudan rol alan kaspaz 3 genlerinin ifade düzeylerine etkileri verilmektedir.



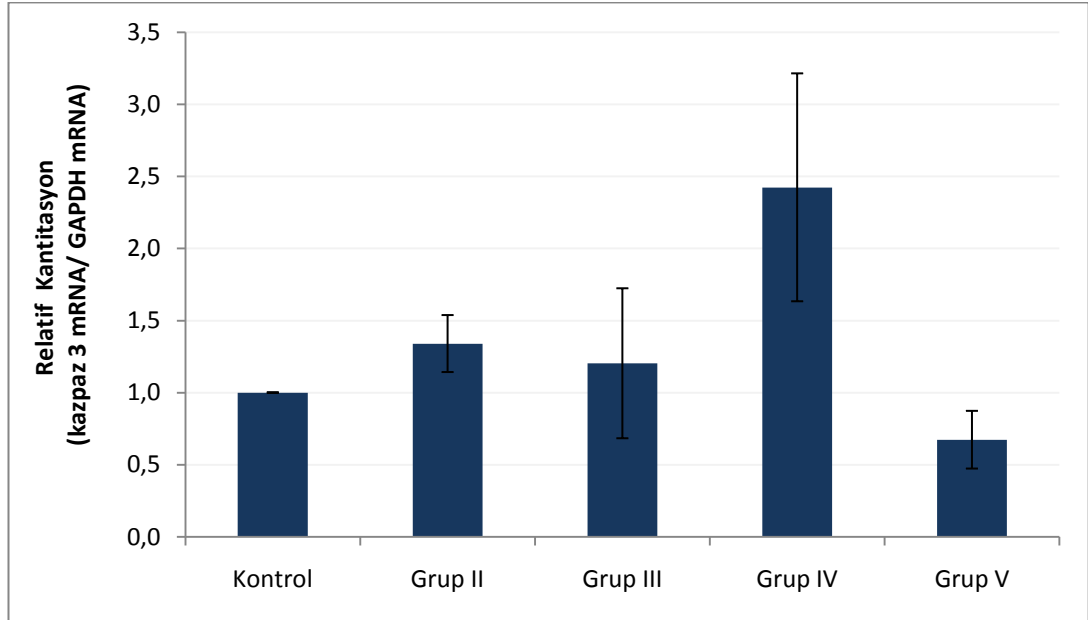
Şekil 4.17: Tüm çalışma gruplarında Bcl-2 geninin ifade düzeyleri. 5-7 hayvandan elde edilen 3 ayrı deneyin ortalaması ve standart sapmasını içerir.

Şekil 4.17’de anti-apoptotik bir gen olan Bcl-2 ifade düzeyinin Grup IV ve Grup V’de kontrole göre arttığı bulunmuştur ($p<0.05$)



Şekil 4.18: Tüm çalışma gruplarında Bax geninin ifade düzeyleri. 5-7 hayvandan elde edilen 3 ayrı deneyin ortalaması ve standart sapmasını içerir.

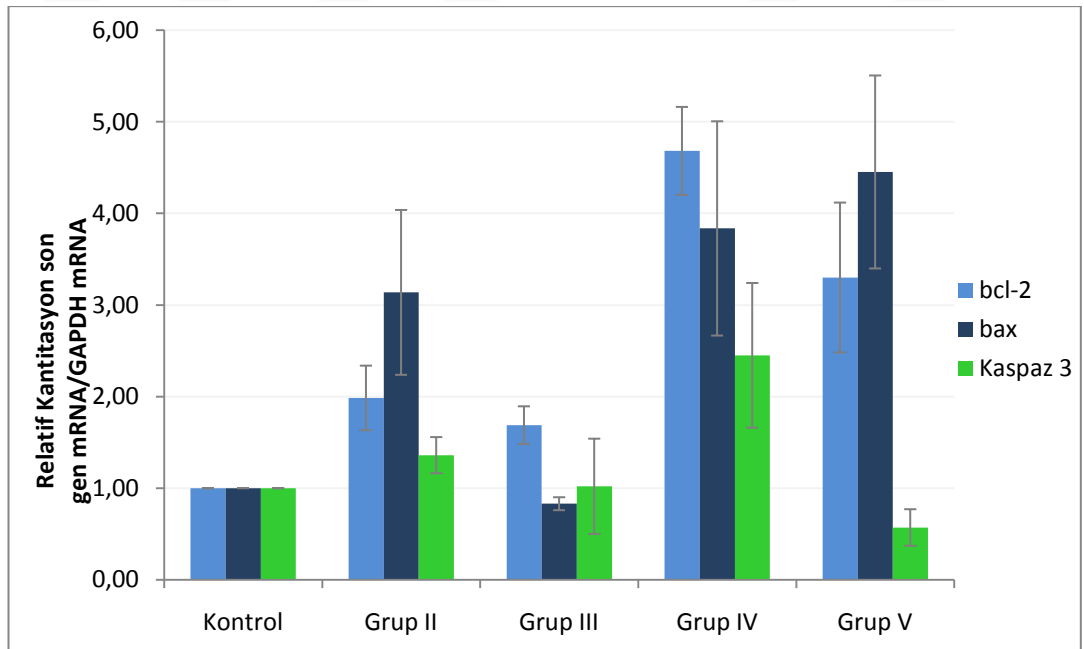
Şekil 4.18’de proapoptotik bir gen olan Bax ifade düzeyinin Grup IV ve Grup V’de kontrole göre arttığı bulunmuştur. ($p < 0.05$)



Şekil 4.19: Tüm çalışma gruplarında Kaspaz 3 geninin ifade düzeyleri. 5-7 hayvandan elde edilen 3 ayrı deneyin ortalaması ve standart sapmasını içerir.

Apoptotik ölüm mekanizmalarının önemli yapılarından biri olan Kaspaz ("caspase")'lar, zimojen (inaktif prekürsör) olarak sitoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sistein yer aldığından sistein proteazlar olarak adlandırılan bir grup enzimlerdir. Şu ana kadar 14 tanesi tanımlanmıştır ve çoğu apoptozisde rol almaktadır. Kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek preteolitik bir kaskad (şelale tarzı reaksiyon dizisi)'a neden olurlar. Bazıları (Kaspaz 2, 8, 9, 10) başlatıcı kaspazlar olarak bilinirken bazıları da (3, 6, 7) efektör kaspazlar olarak bilinir. Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara naklederler. Efektör kaspazlar ise ilgili proteinleri parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar. Kaspazlar hücrede iki önemli biyolojik yolda görev almaktadırlar; inflamatuvar sinyal yolu ve hücre ölüm yolu. Kaspaz ailesinin 7 üyesi (kaspaz-2, -3 ve 6-10) apoptotik ölüm yolunda görev alırken, diğer üçü (kaspaz-1, -4 ve 5) proinflamatuvar sitokinleri aktifleştirerek savunma sisteminde görev alır.

Şekil 4.19'da anti-apoptotik bir gen olan Kaspaz 3 ifade düzeyinin Grup IV ve Grup V'de kontrole göre arttığı bulunmuştur. ($p < 0.05$)



Şekil 4.20: Tüm çalışma gruplarında genlerin ifade düzeyleri

Diyabet, insülin salınımı, β hücre fonksiyonu ya da her ikisinde oluşan defektler sonucunda ortaya çıkan hiperglisemi ile seyreden, karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında meydana gelen anormalliklerle karakterize edilen kronik metabolik bir hastalıktır. Bu hastalarda, pankreasın β hücrelerinden insülinin üretilmemesi ya da vücudun insüline cevap verememesi söz konusudur. Tüm diyabet türlerinin ortalama % 10-15'inde görülen tip 1 diyabetin ise hangi sebep veya sebeplere bağlı olarak oluştuğu bilinmemekle beraber stres, virusler, toksinler gibi çevresel faktörlerin etkisiyle, genetik olarak yatkın bireylerde β hücrelerine yönelik otoimmün hasar sonucu geliştiği bilinmektedir.

Bu tez çalışmasında, günümüzde sadece multiple myeloma tedavisinde kullanılan ve klinikteki etkinliği NF- κ B inhibisyonuna bağlı olan bir proteozom inhibitörü olan bortezomibin tip 1 diyabet gelişimine neden olan sitokinle indüklenmiş NF- κ B aktivasyonunu inhibe etmesi sonucu, β hücre kaybını dolayısı ile diyabeti önleyebileceğimizi hipotezledik. Bu hipotezi doğrulamak için öncelikle 5 farklı çalışma grubu oluşturduk. Sonrasında tüm çalışma gruplarındaki ratların kan glukoz düzeylerini ölçerek STZ ve bortezomibin kan glukoz düzeylerine etkisine baktık. Ayrıca ilaç uygulama sonrası tüm adacıklarda PI ve FDA boyaları kullanılarak hücre canlılığı değerlerini saptadık. Buna ek olarak tüm adacıklardan RNA izolasyonu yapılarak apoptotik genlerinin ifade düzeylerini RT-PCR yöntemi kullanılarak saptadık.

Araştırmamızda öncelikle az denek kaybı ile diyabet oluşturmak hedeflendiğinden, diyabet oluşturmak için tek kullanımlık en düşük doz STZ uygulaması seçilmiştir. STZ, hızlı ve geri dönüşümsüz bir nekrozu tetikleyen pankreatik β hücrelerine karşı sitotoksik etkiye sahip olan diyabetik bir ajandır. Literatürde ratlar için tek doz STZ uygulamasının tip 1 diyabet modeli oluşturmada % 80 verimlikte gerçekleştiği vurgulanmaktadır [147]. Çalışmamızda uygulamış olduğumuz 45 mg/kg tek doz STZ uygulamasının 7 hayvandan en az 5 tanesini diyabet yaparak % 71 verimlilikte tip 1 diyabet oluşumuna neden olduğu bulundu. STZ enjeksiyonu sonrası hayvanların diyabet olup olmadıklarının belirlenebilmesi için uygulamayı takiben 2 gün sonra kan glukoz düzeylerine bakılmış ve >250 mg/dl'den yüksek kan glukozuna sahip ratlar diyabet olarak kabul edildi.

STZ uygulaması yapılan Grup II ve grup V'deki adacıklar ile kontrol grubundaki adacıkların canlılık sonuçları incelendiğinde anlamlı derecede azaldığı dolayısı ile STZ'nin pankreasın insülin salgılayan β hücrelerinde apoptozise neden olduğu tespit edildi. Bu sonuç hem kan şekerlerindeki artış hem % canlılıklardaki azalma hem de bax/ bcl-2 gen ifade düzeylerinin oranlanması ile gözlendi. Biz ayrıca, gen ifade düzeylerine ve % adacık sayılarına baktığımızda, bortezomibin STZ'nin neden olduğu apoptozisi önleyemediğini ancak eş zamanlı verildiğinde koruyucu bir etkisinin olabileceğini (bcl-2/ bax = 4.68/3.84 antiapoptotik etki) gördük. Özellikle grup III (bcl-2/bax= 1.69/0.83) ve grup IV'deki (bcl-2/bax= 4.68/3.84) gen ifade düzeylerine baktığımızda diğer gruplardan farklı olarak, bortezomib'in β hücrelerinde anti-apoptotik etkiye sahip olduğu gözlendi. Bugüne kadar özellikle kanser hücreleri ile yapılan çalışmalarda bortezomibin NF- κ B sinyal yolağını, hücre tipine göre değişebilen farklı mekanizmalarla etkilediğini göstermektedir. Bortezomibin doza bağımlı olarak sitotoksik etkisine neden olduğu bunu da özellikle bcl-2 gibi anti-apoptotik gen ifadesini baskımlarken bax gibi pro-apoptotik gen ifadesini artırarak yaptığı birçok farklı çalışmada gösterilmiştir [148]. Bu sonuç bortezomibin kanser tedavisinde kullanılmasının ana nedenlerinden birisidir [149,150]. Bizim çalışmamızda ise tek başına bortezomib uygulamasının pankreas β hücrelerinde anti-apoptotik bcl-2 gen ekspresyonunu aktive ettiği pro-apoptotik Bax ve Kaspaz-3 gen ekspresyonunu baskıladığı gözlendi. Artan Bcl-2 ile azalan Bax ve Kaspaz-3 gen ekspresyonları bortezomibin β hücrelerinde apoptozu engellediğinin bir kanıtı olarak yorumlandı.

Bortezomib günümüz de klinikte myeloma gibi hematopoetik kökenli kanserlerin tedavisinde çok fazla kullanılmasına rağmen, büyüyen temel ve klinik çalışmalar, bortezomib'in kolon, akciğer, meme ve prostat kanserleri gibi solid tümörleri tedavi etmede de başarılı olduğunu göstermiştir [151, 152]. Tümör oluşumunu tetikleyen ana mekanizma, immün/enflamatuvar hücreler tarafından üretilen sitokinlerin hücre proliferasyonu, sağkalım, anjiyogenez ve metastazdan sorumlu genleri indükleyen NF- κ B, STAT3 ve AP1 gibi transkripsiyon faktörleri aktive etmesine dayanır. Bununla birlikte adacık hücrelerinin inflamasyona bağlı olarak tahribata uğramasında, hücre sağkalımı ve ölümü arasındaki kritik kararın alınmasında etkisi olan pek çok genin aktivitesi, NF- κ B transkripsiyon faktörü ailesinin üyeleri

tarafından kontrol edilmektedir. Proteozom inhibitörü bortezomibin anti-tümör özelliğe sahip olması ile birlikte proteozomları inhibe etmesi, hücre döngüsünün durmasına, apoptozu ve anjiyogenezi inhibe eden çeşitli sinyal iletim yollarının bozulmasına neden olur. Yapılan çalışmalarda, bortezomibin transkripsiyonel faktör NF-kB'nin aktivasyonunu bloke etme yeteneği sayesinde inflamatuvar araçların ve sitokinlerin üretimini azalttığı rapor edilmiştir [12]. Özellikle günümüzde kanser tedavisinde kullanılan bortezomib'in klinikteki etkinliği NF-kB sinyal yolağını bloke etmesine bağlı iken diyabette β hücre ölümüne neden olan en önemli mekanizma NF-kB sinyal yolağının aktivasyonudur.

Bu çalışmada, bortezomib'in STZ verilen ratlarda (Grup IV ve Grup V) kan şekeri düşürücü (iyileştirici) bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Başka bir deyişle bortezomib kan şekeri değerlerinden bağımsız olarak hücrede apoptotik sürece etki etmiş görünmektedir. Özellikle grup V'de adacık hücrelerinin bozulması için geçen zaman çok yüksek olduğu için iyileştirici bir etkisinin olmaması beklenen bir durumdur. Ancak grup V'de bortezomibin anti-apoptotik etkisine karşın kan şekeri düzeyinde iyileşme görülmemesi bortezomibin uygulama zamanı ve dozu ile ilgili olabilir. Çünkü grup IV'de gözlenen adacık hücre sayıları grup II ve grup V'deki kadar düşük değildir. Bu nedenle kan şekeri düzeylerindeki iyileşme muhtemelen bortezomib uygulaması ile ilgilidir. Eldor ve arkadaşlarının 2013 yılında yapmış oldukları çalışmada, diyabetik transgenik farelerin karaciğerine nakil edilen adacık hücrelerinin, β hücre canlılıklarını artırdığı ve kan şekeri glukoz düzeylerini kontrol grubuna göre düşürdüğünü göstermişlerdir [12]. Ancak bu çalışmanın en ilginç tarafı transplante edilecek adacıklara sistemik olarak bortezomib uygulaması ve NF-kB sinyal yolağını bloke ederek sitokin üretimini düşürmektir. Böylece transplante edilen adacıkların apoptozisi bloke edilerek doku reddi de engellenmiştir. Bu veri bizim çalışmamızda özellikle grup IV'de gözlenen kan şekeri değerlerinde düşüş olmamasının bortezomib uygulamasını ile ilgili olduğunu doğrular niteliktedir.

Sonuç olarak bortezomib tip I diyabetin ancak başlangıç aşamasında tedavi amacıyla kullanılabilir. STZ nin yarattığı beta hücre harabiyeti geri döndürülemez bir noktaya geldiğinde herhangi bir immün modülatör ya da bortezomib gibi bir ilaçla tedavi edilmesi mümkün olmamaktadır.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bortezomibin, Tip 1 diyabetin tedavisinde kullanılabilirliğinin in vivo diyabetik hayvan modellerinde β hücre canlılığı ve apoptozis üzerine etkisinin biyokimyasal ve moleküler düzeyde çalışıldığı bu çalışmada şu sonuçlar elde edildi:

1. Literatürde ratlar için tek doz (45 mg/kg) STZ uygulamasının tip 1 diyabet modeli oluşturmada %80-85 verimlikte gerçekleştiği vurgulanmıştı. Bizim çalışmamızda 45 mg/kg tek doz STZ uygulamasının (7 hayvandan 5 tanesinde) tip 1 diyabet oluşumuna neden olduğu, verimliliğin % 71 olduğu gözlemlendi. STZ uygulanan tüm gruplarda kan şekeri ölçümleri kontrole göre anlamlı yüksek bulundu. Bu sonuç STZ'nin diyabetojenik bir ajan olduğunu doğrularken, bizim çalışmamızda da gerekli olan deneysel koşulları hazırladı.
2. STZ uygulaması tüm gruplarda (Grup II, IV ve V) kontrole göre adacıkların canlılığını azalttı. STZ pankreasın insülin salgılayan β hücrelerinde apoptozise neden oldu. Bu sonuç hem kan şekerlerindeki artış hem % canlılıklardaki azalma hem de bax/ bcl-2 (=3.14 /1.99, apoptotik etki) gen ifade düzeylerinin oranlanması ile gözlemlendi.
3. Bortezomib uygulaması kan şekeri değişimine neden olmadı (Grup III). Bu sonuç uygulanan bortezomib dozunun pankreasın β hücrelerinde ölüme neden olmadığı şeklinde yorumlandı. Bortezomib'in sitotoksik olmadığı aynı zamanda adacıkların % canlılık ölçümlerinde de (%91) gözlemlendi.
4. Bu çalışmanın belkide en önemli verisi bortezomib'in tek başına uygulandığı grup III ve STZ ile birlikte uygulandığı Grup IV'de apoptotik gen ifade düzeylerindeki değişimlerden elde edildi. Grup III'de bcl-2/ bax oranı (1.69/0.83) ve Grup IV'de bcl-2/bax oranı (4.68/3.84) ile diğer gruplardan farklı olarak bortezomib'in β hücrelerinde anti-apoptotik etkiye sahip olduğu gözlemlendi. Bu sonuç bugün çalışılan birçok hücre tipinden farklı olarak

bortezomib'in pankreasın β hücrelerinde farklı bir etkiye neden olabileceğini çelişkili datalarla tartışan literatüre de katkı sağlayabilecek bir veridir.

5. Bu çalışmanın diğer önemli bir verisi, bortezomib'in STZ verilen ratlarda (Grup IV ve Grup V) kan şekeri düşürücü (iyileştirici) bir etkisinin olmamasıdır. Başka bir deyişle bortezomib kan şekeri değerlerinden bağımsız olarak hücre de apoptotik sürece etki etmektedir. Bu sonuç ileride bortezomib'in insülin gen ifadesinin regülasyonuna etkisini özellikle de transkripsiyonel ve posttranslasyonel aktivitesi üzerine olan etkisini NF- κ B sinyal yolağı üzerinden çalışmasını gerektiren yeni projelerin oluşturulmasının önünü açmaktadır.
6. Bortezomib'in STZ ile eş zamanlı uygulandığı Grup IV'deki adacıkların % canlılığının Grup V'e göre yüksek olması (%71.7- %53.6), bortezomib'in STZ hasarını geri döndüremediğini göstermektedir. Bu veri aynı zamanda Grup V'deki gen ifade düzeylerindeki değişim bcl-2/ bax oranı (=3.30/4.45, apoptotik etki) ile de doğrulanmaktadır. Bu sonuç STZ'nin β hücre ölümüne neden olduktan sonra tekrar geri döndürülemez bir aşamaya gelmesinden dolayı şaşırtıcı değildir

6. KAYNAKLAR.

1. Bluestone, J.A., Herold, K., ve Eisenbarth, G., 2010. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes, *Nature*, 464, 1293–1300.
2. Watkins, P.I., Drury, P.L. ve Howell, S.L., 1996. Diabetes and its management fiveth edition, Blackwell Co, P3.
3. Melloul D., 2008. Role Of NF- κ B İn β -Cell Death, *Biochemical Society Transactions*, 36, 334-9.
4. Salem, H.H., Trojanowski, B., Fiedler, K., Maier, H.J., Schirmbeck, R., Wagner, M., Boehm, B.O., Wirth, T. ve Baumann, B., 2014. Longterm IKK2/NF- κ B signaling in pancreatic β cells induces immune mediated diabetes, *Diabetes*, 63,960–975.
5. Hatemi, H.,1996. Diabetes Mellitus'un tarihçesi, *Aktüel Tıp Dergisi*,7, 497–499.
6. FDA Approves First Ever Inhaled Insulin Combination Product for Treatment of Diabetes. 2006, <http://www.fda.gov/bbs/topics/news/2006/NEW01304.html>.
7. Eizirik, D.L. ve Mandrup-Poulsen, T., 2001. A choice of deaththe signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptozis, *Diabetologia*, 44, 2115.
8. Cnop, M., Welsh, N., Jonas, J.C., Jörns, A., Lenzen, S. ve Eizirik, D.L., 2005. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities, *Diabetes*, 54, 97-107.
9. Chang, I., Kim, S., Kim, J. Y., Cho, N., Kim, Y., Kim, H.S., Lee, M.K., Kim, K.W. ve Lee, M.S., 2003. Nuclear Factor κ B Protects Pancreatic β Cells FromTumor Necrosis Factor- α Mediated Apoptozis, *Diabetes*, 52, 1169–1175.
10. Cardozo, A.K., Heimberg, H., Heremans, Y., Leeman, R., Kutlu, B., Kruhøffer, M., Ørntoft, T. ve Eizirik D.L., 2001. A comprehensive analysis of cytokine-induced and nuclear factor-kappa Bdependent genes in primary rat pancreatic beta-cells, *J Biol Chem.*, 276, 48879–48886.

11. Eldor, R., Yeffet, A., Baum, K., Doviner, V., Amar, D., Ben-Neriah, Y., Christofori, G., Peled, A., Carel, J.C., Boitard, C., Klein, T., Serup, P., Eizirik, D.L. ve Melloul, D., 2006. Conditional and specific NF-kappaB blockade protects pancreatic beta cells from diabetogenic agents, *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 5072–5077.
12. Eldor, R., Abel, R., Sever, D., Sadoun, G., Peled, A., Sionov, R. ve Melloul, D., 2013. Inhibition of nuclear factor- κ B activation in pancreatic β -cells has a protective effect on allogeneic pancreatic islet graft survival, *PLoS One*, 8, 2, e56924.
13. Ortis, F., Pirot, P., Naamane, N., Kreins, A.Y., Rasschaert, J., Moore, F., Théâtre, E., Verhaeghe, C., Magnusson, N.E., Chariot, A., Orntoft, T.F. ve Eizirik, D.L., 2008. Induction of nuclear factor-kappaB and its downstream genes by TNF-alpha and IL-1beta has a pro-apoptotic role in pancreatic beta cells, *Diabetologia*, 5, 7, 1213.
14. Frankland-Searby, S. ve Bhaumik, R.S., 2012. The 26S proteasome complex: An attractive target for cancer therapy, *Biochimica. et Biophysica Acta*, 1825, 64–76.
15. Richardson, P.G., Mitsiades, C., Schlossman, R., Munshi, N., Anderson, K., Richardson, P.G., Mitsiades, C., Schlossman, R., Munshi, N. ve Anderson, K., 2007. New drugs for myeloma, *Oncologist*, 12, 6, 664-89, 207.
16. Chauhan, D., Tian, Z., Zhou, B., Kuhn, D.J., Orlowski, R.Z., Raje, N.S., Richardson, P.G. ve Anderson, K.C., 2011. In vitro and in vivo selective antitumor activity of a novel orally bioavailable proteasome inhibitor MLN9708 against multiple myeloma cells, *Clin. Cancer Res*, 17, 5311–5321.
17. Krętowski, R., Stypułkowska, A. ve Cechowska-Pasko, M., 2015. Efficient apoptozis and necrosis induction by proteasome inhibitor: bortezomib in the DLD-1 human colon cancer cell line, *Mol Cell Biochem*, 398, 1-2, 165-73.
18. Jin, R., Yamashita, H., Yu, X., Wang, J., Franco, O.E., Wang, Y., Hayward, S.W. ve Matusik, R.J., 2014. Inhibition of NF-kappa B signaling restores responsiveness of castrate-resistant prostate cancer cells to anti-androgen treatment by decreasing androgen receptor-variant expression, *Oncogene*, 34, 28, 3700-10.

19. Jin, R., Yamashita, H., Yu, X., Wang, J., Franco, O.E., Wang, Y., Hayward, S.W. ve Matusik, R.J., 2014. Inhibition of NF-kappa B signaling restores responsiveness of castrate-resistant prostate cancer cells to anti-androgen treatment by decreasing androgen receptor-variant expression, *Oncogene*, 34, 28, 3700-10.
20. Bluestone, J.A., Herold, K. ve Eisenbarth, G., 2010. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes, *Nature*, 464, 1293–1300.
21. Banting, F.G., ve Campbell, W.R., 1923. Further Clinical Experience With Insulin (Pancreatic Extracts) In The Treatment Of Diabetes Mellitus, *Br Medical Journal*, 1, 3236, 8–12.
22. Warran, J.H., Rich, S.S. ve Krolewski, A.S., 1994. Epidemiology and genetics of diabetes mellitus, in: *Diabetes Mellitus*, Kahn CR Weir GC: Ed Phyladelphia Lea & Febiger, 201-205.
23. Satman, İ., 2001. Diabetes mellitusun epidemiyolojisi, *Nobel Tıp Kitabevi*, 69-84, M. Yenigün, M. Altuntaş, Her Yönüyle Diabetes Mellitus, 2. Baskı, İstanbul.
24. Boyle, J.P., Honeycutt, A.A., Narayan, K.M., Hoerger, T.J., Geiss, L.S., Chen, H. ve Thompson, T.J., 2001. Projection of diabetes burden through 2050, impact of changing demography and disease prevalence in the U.S., *Diabetes Care*, 24, 11, 1936-40.
25. Haller, M.J., Atkinson, M.A. ve Schatz, D., 2005. Type 1 diabetes mellitus: etiology, presentation, and management, *Pediatric Clinics of North America*, 52, 6, 1553-78.
26. Baz, H., 2014. Streptozotocinle indüklenen diyabetli ratlar üzerinde *Myrtus Communis* L. Yaprığı Su Ekstresi Etkilerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
27. Steck, A.K. ve Rewers, M.J., 2011. Genetics of Type 1 Diabetes, *Clinical Chemistry*, 57, 2, 176–185.
28. Maahs, D.M., West, N.A., Lawrence, J.M. ve Mayer-Davis, E.J., 2010. Chapter 1: Epidemiology of Type 1 Diabetes, *Endocrinol Metab Clin North Am*, 39, 3, 481–497.

29. American Diabetes Association, 2004. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, *Diabetes Care*, 27, 5-10.
30. Todd, J.A., Aitman, T.J., Cornall, R.J., Ghosh, S., Hall, J., Hearne, C.M., Knight, A., Love, J., McAleer, M.A. ve Prins, J.B., 1991. Genetic analysis of a complex, multifactorial disease, autoimmune type 1 (insulin-dependent) diabetes, *Res Immunol*, 142, 5-6, 483.
31. International Diabetes Federation, 2013. Diabetes Atlas. 6th edition, <http://www.idf.org/diabetesatlas>.
32. Triplitt, C., Solis-Herrera, C., Reasner, C., DeFronzo, R.A. ve Cersosimo, E., 2015. Classification of Diabetes Mellitus, Endotext, South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc, 2000.
33. Like, A.A. ve Rossini, A.A., 1976. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus, *Science*, 30, 193, 4251, 415-7.
34. Morran, M.P., Vonberg, A., Khadra, A. ve Pietropaolo, M., 2015. Immunogenetics of type 1 diabetes mellitus, *Mol Aspects Med*, 42, 42-60.
35. Mehers, K.L. ve Gillespie, K.M., 2008. The genetic basis for type 1 diabetes, *British Medical Bulletin*, 88, 115-129.
36. Zimmet, P.Z., Tuomi, T., Mackay, I.R., Rowley, M.J., Knowles, W, Cohen, M. ve Lang, D.A., 1994. Latent autoimmune diabetes mellitus in adults (LADA): the role of antibodies to glutamic acid decarboxylase in diagnosis and prediction of insulin dependency, *Diabetic Medicine*, 11, 3, 299-303.
37. Vaseghi, H. ve Jadali, Z., 2016. Th1/Th2 cytokines in Type 1 diabetes: Relation to duration of disease and gender, *Indian J Endocrinol Metab*, 20, 3, 312-316.
38. Turok, D.K., Ratcliffe, S.D. ve Baxley, A.G., 2003. Management of gestational diabetes mellitus, *American Family Physician*, 68, 1769-72.
39. Radaelli, T., Varastehpour, A., Catalano, P. ve Hauguel-de Mouzaon, S., 2003. Gestational diabetes induces placental genes for chronic stress and inflammatory pathways, *Diabetes*, 52, 2951-58.
40. Kampmann, U., Madsen, L.R., Skajaa, G.O., Iversen, D.S., Moeller, N. ve Ovesen, P., 2015. Gestational diabetes: A clinical update, *World J Diabetes*. 25, 6, 8, 1065-72.

41. Hauguel-de Mouzon, S. ve Guerre-Millo, M., 2006. The placenta cytokine network and inflammatory signals, *Placenta*, 27, 794-98.
42. Barbour, L.A., McCurdy, C.E., Hernandez, T.L., Kirwan, J.P., Catalano, P.M. ve Friedman, J.E., 2007. Cellular mechanisms for insulin resistance in normal pregnancy and gestational diabetes, *Diabetes Care*, 30, 2, 112-119.
43. Robbins, S.L., Kumar, V., Cotran, R.S., 2000. Basic pathology. 6. ed. 2000, 17, 563-574.
44. Leong, K.S. ve Weston, P., 2001. Diabetes illustrated: An illustrated guide to diabetes and its complications, London, UK.
45. Taşçı, E. Tip 1 Diyabetli Çocuk ve Adölesan Hastalarda Adiponektin, Leptin ve inflamatuvar markırlar ile metabolik kontrol arasındaki ilişki, Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Adana.
46. Devendra, D., Liu, E. ve Eisenbarth, G.S., 2004. Type 1 diabetes: recent developments, *BMJ*, 328, 750-54.
47. Akçam, F.Z., 2005. HLA System: Review. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 25, 829-834, Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Isparta.
48. Chuang, L., Tsai, S., Juang, J., Tsai, W. ve Tai, T., 2000. Genetic epidemiology of type 1 diabetes mellitus in Taiwan. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 50, 41-47.
49. Renando, M.J., Rewers, M., Yu, L., Garg, S., Pilchner, G.C., Elliott, R.B. ve Eisenbarth, G.S., 1999. Genetic determination of islet cell immunity in monozygotic twin, dizygotic twin and non-twin siblings of patients with type 1 diabetes mellitus: a prospective study, *British Medical Journal*, 318, 698-702.
50. Abacı, A., Böber, E. ve Büyükgebiz, A. 2007. Tip 1 Diyabet, *Güncel Pediatri*, 5, 1-10.
51. Ei Wafai, R. J., Chmaisse, H. N., Makki, R. F., and Fakhoury, H., 2011. Association of HLA class II alleles and CTLA-4 polymorphism with type 1 diabetes, *Saudi J Kidney Dis Transpl*, 22, 273-81.
52. Rosenbloom, A.I. ve Silverstein, J.H., 2003. Diabetes in the Child and Adolescent, In, Lifshitz, F. (Editor), *Pediatric Endocrinology*, 4 edition, New York (USA).

53. Atkinson, M.A. ve Eisenbarth, G.S., 2001. Type 1 diabetes: New perspectives on disease pathogenesis and treatment, *Lancet*, 358,9277, 221-229.
54. Alemzadeh, R. ve Wyatt, D.T., 2004. Diabetes Mellitus, pp.1947-72, In, Behrman, R.E., Kliegman, R.M. ve Jenson, H.B. (Editör), *Nelson Textbook of Pediatrics*, 17. edition, Elsevier Saunders, Pennsylvania.
55. Scharer, R. F. ve Eisenbarth, G.S., 2004. Patophysiology of İnsulin-Dependent Diabetes, pp.411-26 In: Pescovitz O.H, Eugster E.A (Editor). *Lippincott Williams and Wilkins PediatricEndocrinology*, 1. edition, Philadelphia (USA) .
56. Couper, J.J., Steele, C., Beresford, S., Powell, T., McCaul, K., Pollard, A., Gellert, S., Tait, B., Harrison, L.C. ve Colman, P.G., 1999. Lack of association between duration of breast-feeding or introduction of cow's milk and development of islet autoimmunity, *Diabetes*, 48, 2145-2149.
57. Hypponen, E., Laara, E., Reunanen, A., Jarvelin, M.R. ve Virtanen, S.M., 2001. Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study, *Lancet*, 358, 1500-1503.
58. Redondo, M.J, Fain, P.R, ve Eisenbarth, G.S., 2001. Genetics of type 1A diabetes, *Recent Prog Horm Res*, 56, 69-89.
59. Kurrer, M.O., Pakala, S.V., Hanson, H.L. ve Katz, J.D., 1997. Beta cell apoptozis in T cell-mediated autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 7, 94,1, 213-8.
60. Vives-Pi, M., Rodríguez-Fernández, S. ve Pujol-Autonell, I., 2015. How apoptotic β -cells direct immune response to tolerance or to autoimmune diabetes: a review, *Apoptozis*, 20,3, 263-72.
61. Bottazzo, G. F., 1986. Lawrence lecture. Death of a beta cell: homicide or suicide? *Diabetic Medicine*, 62,18, 2617-35.
62. William, F., 2001. Ganong. *Review of Medical Physiology*, Lange medical books, 20th ed.,19, 322–343.
63. Szablewski, L., 2014. Role of immune system in type 1 diabetes mellitus pathogenesis *International İmmünopharmacology*,22,1,182–191.
64. Williams, M.A. ve Bevan, M.J.,2007. Effector and memory CTL differentiation, *Annu Rev İmmünol*, 25,171.

65. Kurrer, M.O., Pakala, S.V., Hanson, H.L. ve Katz, J.D., 1997. Beta cell apoptosis in T cell-mediated autoimmune diabetes, *Proc Natl Acad Sci USA*, 7, 94,1, 213-8.
66. Comens, P.G., Wolf, B.A., Unanue, E.R., Lacy, P.E. ve McDaniel, M.L., 1987. Interleukin 1 is potent modulator of insulin secretion from isolated rat islets of Langerhans, *Diabetes*, 36,8, 963-70.
67. Cooke, A., 2006. Th17 cells in inflammatory conditions, *Rev Diabet Stud.*, 3, 2, 72-5.
68. Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M. ve Shlomchik, M.J., 2001. *İmmünobiology*, 5th edition, Garland Science, ISBN 0-443-07310-4, London.
69. Sakaguchi, S., 2004. Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev İmmünol.*, 22, 531-62.
70. Chan, J. Y., Biden, T. J. ve Laybutt, D. R., 2012. Cross-talk between the unfolded protein response and nuclear factor- κ B signalling pathways regulates cytokine mediated beta cell death in MIN6 cells and isolated mouse islets, *Diabetologia*, 55, 2999–3009.
71. Baker, M.S., Chen, X., Cao, X.C. ve Kaufman, D.B., 2001. Expression of a dominant negative inhibitor of NF- κ B protects MIN6 b-cells from cytokine induced apoptosis, *The Journal of Surgical Research*, 97, 117–122.
72. Sarkar, S.A., Kutlu, B., Velmurugan, K., Kizaka-Kondoh, S., Lee, C.E., Wong, R., Valentine, A., Davidson, H.W., Hutton, J.C. ve Pugazhenti, S., 2009. Cytokine-mediated induction of anti-apoptotic genes that are linked to nuclear factor kappa-B (NF-kappaB) signalling in human islets and in a mouse beta cell line, *Diabetologia*, 52,6, 1092-101.
73. Cardozo, A.K., Heimberg, H., Heremans, Y., Leeman, R., Kutlu, B., Kruhøffer, M., Ørntoft, T. ve Eizirik, D.L., 2001. A comprehensive analysis of cytokine-induced and nuclear factor kappa B-dependent genes in primary rat pancreatic beta-cells, *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 48879–48886.
74. Sen, R. ve Baltimore, D., 1986. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences, *Cell*, 46,5, 705-716.

75. Baeuerle, P.A. ve Henkel, T., 1994. Function and activation of NF- κ B in the immune system, *Annual Review of Immunology*, 12, 141–179.
76. Tabruyn, S.P. ve Griffioen, A.W., 2008. NF-kappa B: a new player in angiostatic therapy, *Angiogenesis*, 11, 1, 101-6.
77. Horie, R., 2013. Molecularly-targeted Strategy and NF- κ B in lymphoid malignancies. *J Clin Exp Hematop.*, 53, 3, 185-95.
78. Gilmore, T.D., 2006. Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives, *Oncogene*, 25, 51, 6680-6684.
79. Oeckinghaus, A. ve Ghosh, S., 2009. The NF- κ B Family of Transcription Factors and Its Regulation, *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 1, 4, a000034.
80. Ghosh, S. ve Karin, M., 2002. Missing pieces in the NF-kappa B puzzle, *Cell*, 109, 81-96.
81. Sethi, G., Sung, B. ve Aggarwal, B.B., 2008. Nuclear factor-kappaB activation: from bench to bedside, *Exp Biol Med*, Maywood, 233, 1, 21-31.
82. Huxford, T. ve Ghosh, G., 2009. A structural guide to proteins of the NF- κ B signaling module, *Cold Spring Harbor Perspectives Biology*, 1, a000075, 1-16.
83. Tak, P.P. ve Firestein, G.S., 2001. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases, *J. Clin. Invest.*, 107, 1, 7-11.
84. Kopp, E.B. ve Ghosh, S., 1995. NF-kappa B and rel proteins in innate immunity, *Adv Immunol.*, 58, 1-27.
85. Baldwin, A.S., 1996. The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights, *Annu Rev Immunol.*, 14, 649-681.
86. Hayden, M.S. ve Ghosh, S., 2004. Signaling to NF- κ B, *Genes Dev.*, 15, 18, 2195-224.
87. May, M.J., Marienfeld, R.B., Ghosh, S. 2002. Characterization of the I κ B-kinase NEMO binding domain, *Journal of Biological Chemistry*, 277, 48, 45992-46000.
88. DiDonato, J.A., Hayakawa, M., Rothwarf, D.M., Zandi, E., ve Karin, M., 1997. A cytokine-responsive I kappa B kinase that activates the transcription factor NF-kappa B, *Nature*, 388, 6642, 548-554.

89. Mercurio, F., Murray, B.W., Shevchenko, A., Bennett, B.L., Young, D.B., Li, J.W., Pascual, G., Motiwala, A., Zhu, H., Mann, M. ve Manning, A.M., 1999. I κ B Kinase, IKK-associated protein 1, a common component of the heterogeneous IKK complex, *Molecular and Cellular Biology*, 19, 2, 1526-1538.
90. May, M.J., Marienfeld, R.B. ve Ghosh, S. 2002. Characterization of the I κ B-kinase NEMO binding domain, *Journal of Biological Chemistry*, 277 ,48, 45992-46000.
91. Pahl, H.L., 1999. Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors, *Oncogene*, 18, 6853–6866.
92. Karin, M. ve Ben-Neriah, Y.,2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity, *Annu Rev İmmünol.*, 18, 621-63.
93. Li, F., Zhang, J., Arfuso, F., Chinnathambi, A., Zayed, M.E., Alharbi, S.A., Kumar, A.P., Ahn, K.S., ve Sethi, G., 2015. NF- κ B in cancer therapy, *Arch Toxicol.*, 9, 5, 711-31.
94. Bonizzi, G. ve Karin, M., 2004. The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity, *Trends in İmmünology*, 25, 280–288.
95. Ciechanover, A., 1994. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway, *Cell*, 79, 13– 21.
96. Brooks, P., Fuertes, G., Murray, R.Z., Bose, S., Knecht, E., Rechsteiner, M.C., Hendil, K.B., Tanaka, K., Dyson, J. ve Rivett, J. 2000. Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells, *Biochem. J.*, 346, 1, 155–161.
97. Palombella, V.J., Rando, O.J., Goldberg, A.L. ve Maniatis, T., 1994. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B, *Cell*, 78, 5, 773-785.
98. Karin, M. ve Ben-Neriah, Y., 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: The control of NF- κ B activity, *Annual Review of İmmünology*, 18, 621-663.
99. Chiao, P.J., Miyamoto, S. ve Verma, I.M., 1994. Autoregulation of I κ B α activity, *Biochemistry*, 91, 28–32.
100. Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F.R., Krähn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S.C. ve Karin, M. 2001. Activation by IKK α of a

- second, evolutionary conserved, NF- κ B signaling pathway, *Science*, 293, 5534, 1495-1499.
101. Bladé, J., Cibeira, M.T. ve Rosiñol, L., 2005. Bortezomib: a valuable new antineoplastic strategy in multiple myeloma, *Acta Oncol.*, 44,5, 440-8.
 102. Collins, T., Read, M.A., Neish, A.S., Whitley, M.Z., Thanos, D. ve Maniatis, T., 1995. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa-B and cytokine-inducible enhancers, *FASEB J.*, 9, 899-909.
 103. Mandrup-Poulsen, T., 2001. β -Cell apoptosis: stimuli and signaling, *Diabetes*, 50,1, 58–63.
 104. Mandrup-Poulsen, T., 2003. Apoptotic signal transduction pathways in diabetes, *Biochem. Pharmacol.*, 66, 1433–1440.
 105. Rakesh, K. ve Agrawal, D.K., 2005. Controlling cytokine signaling by constitutive inhibitors, *Biochem Pharmacol.*, 70, 5, 649-657.
 106. Hao, X.R., Cao, D.L., Hu, Y.W., Li, X.X., Liu, X.H., Xiao, J., Liao, D.F., Xiang, J. ve Tang, C.K., 2009. IFN- γ down-regulates ABCA1 expression by inhibiting LXR α in a JAK/STAT signaling pathway-dependent manner, *Atherosclerosis*, 203, 2, 417-428.
 107. Wolf, D.H. ve Hilt, W., 2004. The proteasome: A proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochim Biophys Acta.*, 1695, 19-31.
 108. Adams, J., Palombella, V.J., Sausville, E.A., Johnson, J., Destree, A., Lazarus, D.D., Maas, J., Pien, C.S., Prakash, S. ve Elliott, P.J., 1999. Proteasome inhibitors: A novel class of potent and effective antitumor agents, *Cancer Res*, 59, 2615-2622.
 109. Richardson, P.G., Mitsiades, C., Hideshima, T. ve Anderson, K.C., 2005. Proteasome inhibition in the treatment of cancer, *Cell Cycle*, 4, 290-296.
 110. Myung, J., Kim, K.B. ve Crews, C.M., 2001. The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors, *Med. Res. Rev.*, 21, 245-273.
 111. Winkler, G.S., Albert, T.K., Dominguez, C., Legtenberg, Y.I., Boelens, R. ve Timmers, H.T., 2004. An altered-specificity ubiquitin-conjugating enzyme/ubiquitin-protein ligase pair, *J Mol Biol*, 337, 157-165.
 112. Karin, M., 2006. Nuclear factor-kappa B in cancer development and progression, *Nature*, 441,7092, 431-436.

113. Perkins, N.D.,2012. The diverse and complex roles of NF- κ B subunits in cancer, *Nat. Rev. Cancer*, 19, 12, 2, 121-32.
114. Gasparini, C. ve Feldmann, M.,2012.NF- κ B as a target for modulating inflammatory responses, *Curr Pharm Des.*,18, 35, 5735-45.
115. Viatour, P., Dejardin, E., Warnier, M., Lair, F., Claudio, E. ve Bureau, F., 2004. GSK3-mediated BCL-3 phosphorylation modulates its degradation and its oncogenicity, *Molecular Cell*, 16, 1, 35-45.
116. Barnes, P.J. ve Karin, M., 1997. Nuclear Factor-B - A Pivotal Transcription Factor in Chronic Inflammatory Diseases, *New England Journal of Medicine*, 336,15, 1066-1071.
117. Richardson, P.G., Mitsiades, C., Schlossman, R., Munshi, N. ve Anderson, K., 2007. New drugs for myeloma, *Oncologist*, 12,6, 664-89.
118. Richardson, P.G. ve Mitsiades, C., 2006. Bortezomib: Proteasome İnhibition As An Effective Anticancer Therapy, *Annu Rev Med.*, 57, 33-47.
119. Ling, X., Calinski, D., Chanan-Khan., A.A., Zhou, M., ve Li, F., 2010. Cancer cell sensitivity to bortezomib is associated with survivin expression and p53 status but not cancer cell types, *J Exp Clin Cancer Res.*, 22, 29,8.
120. Ludwig, H., Khayat, D., Giaccone, G. ve Facon, T., 2005. Proteasome inhibition and its clinical prospects in the treatment of hematologic and solid malignancies, *Cancer*, 1,104,9, 1794-807.
121. Papandreou, C.N. ve Logothetis, C.J., 2004. Bortezomib as a potential treatment for prostate cancer,*Cancer Res.*, 1, 64,15, 5036-43.
122. Van der Heijden, J.W., Oerlemans, R., Lems, W.F., Scheper, R.J., Dijkmans, B.A. ve Jansen, G., 2009. The proteasome inhibitor bortezomib inhibits the release of NF κ B-inducible cytokines and induces apoptosis of activated T cells from rheumatoid arthritis patients, *Clin Exp Rheumatol.*, 27,1, 92-8.
123. Mao, X., Pan, X., Peng, X., Cheng, T. ve Zhang, X., 2012. Inhibition of titanium particle-induced inflammation by the proteasome inhibitor bortezomib in murine macrophage-like RAW 264.7 cells, *Inflammation*, 35,4,1411–1418.
124. Tilahun, A.Y., Theuer, J.E., Patel, R., David, C.S. ve Rajagopalan, G., 2010. Detrimental effect of the proteasome inhibitor, bortezomib in bacterial

- superantigen- and lipopolysaccharide-induced systemic inflammation, *Molecular Therapy*, 18,6, 1143–1154.
125. Dirice, E., 2009. Tip 1 Diyabet Tedavisinde Kullanılmak Üzere Adenovirüs Aracılı Trail Gen Tedavi Metodlarının Geliştirilmesi ve Etkinliklerinin Diyabetik Hayvan Modellerinde Test Edilmesi, Doktora Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Antalya.
126. Şanlıoğlu, A.D., Griffith, T.S., Omer, A., Dirice, E., Sari, R., Altunbaş, H.A., Balci, M.K. ve Şanlıoğlu, S., 2008. Molecular mechanisms of death ligand-mediated immune modulation: a gene therapy model to prolong islet survival in type 1 diabetes, *J Cell Biochem.*, 1, 104,3,710-20.
127. Dirice, E., Şanlıoğlu, A.D., Kahraman, S., Ozturk, S., Balci, M.K., Omer, A., Griffith, T.S. ve Sanlioglu, S., 2009. Adenovirus-mediated TRAIL gene, Ad5hTRAIL delivery into pancreatic islets prolongs normoglycemia in streptozotocin-induced diabetic rats, *Hum Gene Ther.*, 20,10, 1177-89.
128. Aathira, R. ve Jain, V., 2014. Advances in management of type 1 diabetes mellitus, *World J Diabetes*, 15, 5,5, 689-696.
129. Orozakunov, E., Akyol, C., Cakmak, A., Genc, V., Sevim, Y., Oray, S., ve Hazinedaroglu, M., 2014. Pancreas transplantation: experience of single center, *Chirurgia ,Bucur*, 109,3, 310-2.
130. Wieser, V., Moschen, A.R., Tilg, H., 2013. Inflammation, cytokines and insulin resistance: a clinical perspective, *Arch İmmünol Ther Exp ,Warsz.*, 61,2, 119-25.
131. Petrovic, J., Hall, H., Mehr, R., Glas, R. ve Höglund, P., 2004. Inhibition of the proteasome reduces transfer-induced diabetes in nonobese diabetic mice, *Scand J İmmünol.*, 60, 1-2, 134-42.
132. International Diabetes Federation. 2009. Diabetes Atlas, 4th Edition, Brussels,
133. Szhudelsky, T., 2001. The mechanism of alloxan and STZ action in beta cells of rat pancreas, *Physiol Res.*, 50,536-46.
134. Furman, B. L., 2015. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats, *Current Protocols in Pharmacology*, 5-47.

135. Morgan, N. G. Diakogiannaki, E. ve Russell, M. A., 2009. The Incubation and Monitoring of Cell Viability in Primary Rat Islets of Langerhans and Pancreatic β -Cell Lines. *Type 2 Diabetes, Methods and Protocols*, 53-64.
136. Carter, J. D., Dula, S. B., Corbin, K. L., Wu, R. ve Nunemaker, C. S., 2009. A practical guide to rodent islet isolation and assessment. *Biological procedures online*, 11,1, 3.
137. London, J.M. Contractor, H. Lake, S.P., 1990. A fluorometric viability assay for single human and rat islets, *Horm Metab Res.*, 25, 82-87.
138. Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res.*, 1, 29,9, 45.
139. Jaouhari, J. T. Lazrek, H. B. ve Jana, M., 2000. The hypoglycemic activity of *Zygophyllum gaetulum* extracts in alloxan-induced hyperglycemic rats, *Journal of ethnopharmacology*, 69, 1, 17-20.
140. White, F.R., 1963. Streptozotocin. *Cancer Chemotherapy, Reports*, 30, 49-53.
141. Schein, P.S. O'Connell, M.J. ve Blom, J., 1974. Clinical antitumor activity and toxicity of streptozotocin, NSC-85998, *Cancer*, 34, 993-1000.
142. Yamamoto, H. Uchigata, Y. ve Okamoto, H., 1981. Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly ,ADP-ribose synthetase in pancreatic islets, *Nature*, 294, 284-286.
143. Sandler, S. ve Swenne, I., 1981. Streptozotocin, but not alloxan, induces DNA repair synthesis in mouse pancreatic islets in vitro, *Diabetologia*, 25,444-447.
144. Lenzen, S., 2008. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes, *Diabetologia*, 51, 2, 216-26.
145. Goping, S. Gross, A. Lavoie, J.N. Nguyen, M. Jemmerson, R. Roth, K. ve Shore, G.C., 1998. Regulated targeting of BAX to mitochondria, *The Journal of cell biology*, 143, 1, 207-215.
146. Miyashita, T. Krajewski, S. Krajewska, M. Wang, H.G. Lin, H.K. Liebermann, D.A. ve Reed, J.C., 1994. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo, *Oncogene*, 9, 6, 1799-1805.
147. Leach, A.P,1998. Apoptozis molecular mechanism for physiologic cell death, *Clin Lab Sci*, 11, 6, 346-9.

148. Furman, B.L. 2015. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats, *Curr Protoc Pharmacol.* 1, 70, 5.47.1-20.
149. Golestani Eimani, B; Sanati, M.H; Houshmand, M., Ataei, M; Akbarian, F.ve Shakhssalim, N., 2013. Expression and prognostic significance of bcl-2 and bax in the progression and clinical outcome of transitional bladder cell carcinoma, *Cell Journal*, 15, 4,356-63.
150. Frankland-Searby, S. ve Bhaumik, R.S., 2012. The 26S proteasome complex: An attractive target for cancer therapy, *Biochimica. et Biophysica. Acta.*, 1825, 64–76.
151. Scagliotti, G., 2006. Proteasome inhibitors in lung cancer, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 58, 177–189.
152. Shishodia, S. ve Aggarwal B.B., 2002. Nuclear factor-kB activation: a question of life and death, *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 35,1, 28-40.
153. Terzic, J., Grivennikov, S., Karin, E. ve Karin, M., 2010, Inflammation and colon cancer, *Gastroenterology*. 138, 6, 2101-2114.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Çiğdem EKİN
Doğum Tarihi ve Yeri : 04.07.1978/ ILGIN
E-posta adresi : crocus78@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans : Aksaray Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü
Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLERİ

Sağlık Bakanlığı Dışkapı Yıldırım Beyazıt E.A.H Bölüm: Aziz Sancar Araştırma
Merkezi Hücre Tedavi, Rejeeratif Tıp ve Genomik Araştırma ve Uygulama Merkezi.