

I

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

**TİROİD HORMONLARININ
DİABETİK RAT KARACİĞER GLUKOKİNAZ ENZİMİ
ÜZERİNE OLASI ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DUYGU ŞAHİN

TEZ YÖNETİCİSİ
PROF. DR. NİLGÜN ALTAN

2007

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince bilgi ve deneyimlerini aktararak, desteğini esirgemeyen tez danışmanım ve değerli hocam Prof. Dr. Nilgün Altan'a:

Tez çalışmalarım sırasında her türlü destek, yardım, anlayış ve güleryüzü için Uzm. Dr. Aylin Sepici-Dinçel'e;

Eğitimimde emeği geçen Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki değerli hocalarıma;

Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarında çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen asistan arkadaşlarıma;

Her zaman yanımda olan aileme;

Ve sevgili arkadaşlarıma;

Teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Diabetes Mellitus.....	3
2.1.1. Diabetes Mellitusun Tanımı ve Sınıflandırılması	3
2.1.1.1. İnsüline Bağımlı Diabetes Mellitus (Tip 1 DM).....	4
2.1.1.2. İnsüline Bağımlı Olmayan Diabetes Mellitus (Tip 2 DM).....	5
2.2. İnsülin.....	8
2.2.1. İnsülin Biyosentezi ve Salınımı.....	8
2.2.2. İnsülin Reseptörü.....	11
2.2.3. İnsülinin Metabolik Etkileri.....	13
2.2.3.1. İnsülinin Karaciğer Üzerine Metabolik Etkileri.....	13
2.2.3.2. İnsülinin Kas Üzerine Metabolik Etkileri.....	13
2.2.3.3. İnsülinin Adipöz Doku Üzerine Metabolik Etkileri.....	14
2.3. Tiroid Hormonu.....	15
2.3.1. Tiroid Bezi.....	15
2.3.2. Tiroid Hormonu Yapımı ve Salınımı.....	15
2.3.3. Tiroid Hormonlarının Vücutta Taşınmaları.....	17
2.3.4. Tiroid Hormonlarının Etkileri.....	18
2.3.4.1. Tiroid Hormonlarının Protein Metabolizmasına Etkileri.....	19
2.3.4.2. Tiroid Hormonlarının Karbohidrat Metabolizmasına Etkileri.....	19
2.3.4.3. Tiroid Hormonlarının Lipid Metabolizmasına Etkileri.....	20
2.3.4.4. Tiroid Hormonlarının Vitamin Metabolizmasına Etkileri.....	20
2.3.5. Tiroid Hormonu Etki Mekanizması.....	20
2.4. Glukokinaz.....	22
2.4.1. Glukokinazın Kinetiği ve Yapısı.....	23
2.4.2. Glukokinazın Transkripsiyonel ve Post-Translasyonel Regülasyonu.....	27

Sayfa No

2.4.3. Glukoz Alımı ve Homeostazında Glukokinazın Önemi.....	31
2.4.3.1. Pankreas β Hücre Glukokinazının Rolü.....	31
2.4.3.2. Hepatik Glukokinazın Rolü.....	32
2.4.4. Glukokinaz Regülatör Proteini.....	33
2.4.5. Glukokinaz Aktivatörleri.....	35
2.4.6. Tiroid Hormonları ve Glukokinaz.....	36
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	39
3.1. Kullanılan Gereçler.....	39
3.1.1. Deney Hayvanları.....	39
3.1.2. Kullanılan Aletler.....	39
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	40
3.2. Uygulanan Yöntemler.....	40
3.2.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması.....	40
3.2.2. Metodların Uygulanması.....	41
3.2.2.1. Doku Protein Tayini.....	41
3.2.2.2. Serum Tiroid ve HbA1c Tayini.....	42
3.2.2.3. Doku Glukokinaz Enzim Aktivitesi Tayini.....	42
3.2.2.4. Sonuçların Analizi.....	44
4. BULGULAR.....	45
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	48
6. ÖZET.....	52
7. SUMMARY.....	53
8. KAYNAKLAR.....	54
9. ÖZGEÇMİŞ.....	69

ŞEKİL LİSTESİ**Sayfa No**

Şekil 1. İnsülinin Yapısı	8
Şekil 2. İnsülin Biyosentezi	9
Şekil 3. İnsülin Salınımı	10
Şekil 4. İnsülin Reseptörü	12
Şekil 5. İnsülin eksikliğinin etkileri	14
Şekil 6. Tiroid Hormonları (T_3 ve T_4)	15
Şekil 7. Tiroid Hormonlarının Yapım ve Salınımı	17
Şekil 8. Tiroid hormonlarının salınımının negatif-feedback ile kontrolü	21
Şekil 9. Glukokinazın kinetik yapısı	25
Şekil 10. Hepatik GK gen ekspresyonunun stimülasyonunda F-2,6-P ₂ 'nin rolü	31
Şekil 11. β hücresi ve hepatik GK'nın glukoz dengesindeki rolü	33
Şekil 12. GK'nın LY2121260 ile aktivasyonu	36

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Diabetin monogenik formları	6
Tablo 2. Tip 1 ve Tip 2 Diabetes Mellitus'un Karşılaştırılması	7
Tablo 3. Glukokinazın karakteristik özellikleri	24
Tablo 4. Ratların ağırlık, kan glukoz ve HbA1c değerleri	45
Tablo 5. Ratların serum serbest T_3 ve T_4 değerleri	46
Tablo 6. Karaciğer dokusu glukokinaz enzim aktivitesi değerleri	46

GRAFİK LİSTESİ

Grafik 1. Karaciğer dokusu glukokinaz enzim aktivitesi değerleri	47
---	----

1.GİRİŞ

Diabetes Mellitus (DM), pankreasın insülin salgısının tam ya da kısmi yetersizliği ya da insülin etkisinin yetersizliği ile oluşan, kendini hiperglisemi ile belli eden, karbohidrat, lipid ve protein metabolizma bozukluğu ile de karakterize bir endokrin ve metabolizma hastalığıdır^{1,2}. Diabetes Mellitusta tiroid hormonları ve insülinin karbohidrat ve lipid metabolizmaları üzerine ortak etkileri birçok araştırmacı tarafından incelenmiş olmasına rağmen mekanizmalar henüz kesin olarak aydınlatılamamıştır.

Diabetes Mellitusta tiroid hormon konsantrasyonlarında farklılıklar olduğu görülmüş ve diabetin tiroid fonksiyonlarında değişikliklere neden olabileceği düşünülmüştür³⁻⁵. Yapılan çalışmalar, tiroid hormonlarının dokuların normal fonksiyonu için gerekli olan metabolizma hızını ayarladığını, vücut doku hücrelerinin oksijen kullanımını arttırdığını, karbohidrat ve lipid metabolizmasının düzenlenmesine aracılık ettiğini göstermektedir⁶.

Tiroid hormonlarının hedef hücrelerdeki etkilerinin büyük bir kısmını, hücre çekirdeği içindeki reseptörler aracılığı ile, bir kısmını da mitokondrilerdeki reseptörler aracılığı ile gösterdikleri bildirilmiştir⁷. Yapılan çalışmalarda, nükleus içine giren tiroid hormonu tarafından reseptörler aktive edilerek, bazı genlerin transkripsiyonunu hızlandırmak suretiyle özel mRNA'lar aracılığı ile yapısal ve fonksiyonel bazı hücre proteinlerinin sentezinin artırıldığı gösterilmiştir⁸. Tiroid hormonlarının, insülinin yıkımı üzerinde de etkili olduğu ve yüksek dozda, insülin yıkımını arttırdığı araştırmacıların savları arasında bulunmaktadır⁷. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, diabette tiroid hormonlarının karbohidrat metabolizmasındaki bazı anahtar enzim aktivitelerinde değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir³. Glikolizin ilk basamağında, glukozun, glukoz-6-P'a ATP bağımlı fosforilasyonunu katalizleyen, heksozfosfotransferazlar sınıfına ait bir enzim olan glukokinazın aktivitesi üzerinde tiroid hormonlarının etkisinin olduğu düşünülmektedir⁹⁻¹².

Hepatik glukokinazın, glukoz kullanımı ve glikojen sentezinde oldukça güçlü etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Glukokinaz ekspresyonundaki ufak bir değişikliğin, kan glukoz konsantrasyonunda ölçülebilir bir bozunmaya yol açtığı bildirilmiştir^{10,13}. Yapılan

alışmalar, glukokinaz overekspresyonunun, intraselüler glukoz 6-fosfat düzeylerini arttırdığını ve bu durum sonucunda hem glikoliz hem de glikojen sentezinin tetiklendiğini kanıtlamaktadır¹⁰.

Plazma glukoz konsantrasyon artışının, β hücreleri glukokinaz gen ekspresyonunu uyararak, insülin salgılanmasını stimüle ettiği, bu şekilde artan plazma insülin konsantrasyonunun hepatik glukokinaz gen ekspresyonunu uyararak hepatik glukoz alımının artmasını sağladığı, bu durumun plazma glukoz konsantrasyonlarını düşürdüğü bildirilmiştir¹⁴. Yapılan alışmalar ışığında, glukokinaz aktivitesindeki ufak bir değişikliğin insülin salgısı eşik değerini ve pankreatik adacıklarda glukokinaz ekspresyonu üzerinde etkili olan çeşitli hormonların ve diğer ajanların etkilerini değiştirebildiğı bilinmektedir¹⁰.

Yapılan çalışmalarla rat karaciğerinde glukokinaz ekspresyonu, sentezi ve degradasyonunun insülin, glukagon, tiroid hormonları ve glukokortikoidleri içeren çoklu hormonal kontrol altında olduğı belirtilmiştir^{15,16}. Transkripsiyonal evrede insülin tarafından indüklendiğı¹⁷ ve pretranslasyonel evrede cAMP yoluyla glukagon tarafından baskılandığı gösterilmiştir^{15,17-20}. Tiroid hormonları, glukokinaz gen transkripsiyon hızını fizyolojik döngüsel konsantrasyonları dahilinde arttırır^{15,17-19}. Döngüsel triiodotironin seviyeleri, artan karbohidrat tüketimi ile birlikte gözlenmekte, bu durum glukokinaz aktivitesinin indüksiyonunu uyarmaktadır²¹. Yapılan araştırmalarda glukokinaz gen ekspresyonunun insülinle regülasyonunda, tiroid hormonlarının rolü olabileceğı bildirilmiştir^{15,22}.

Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda, diabette bozulmuş glukokinaz enzim aktivitesinin insülinle regüle edilmesinde, tiroid hormonlarının olası rolünü incelemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DİABETES MELLİTUS

2.1.1. Diabetes Mellitusun Tanımı ve Sınıflandırılması

Diabetes Mellitus, pankreasın insülin salgısının tam ya da kısmi yetersizliği ya da insülin etkisinin yetersizliği ile oluşan, kendini hiperglisemi ile belli eden, karbohidrat, lipid ve protein metabolizma bozukluğu ile de karakterize bir endokrin ve metabolizma hastalığıdır^{1,2}.

Diabet primer ve sekonder olarak ikiye ayrılır. Primer diabet, Tip I (IDDM) ya da insüline bağımlı , Tip II ya da insüline bağımlı olmayan Diabetes Mellitus (NIDDM) olarak ayrılmaktadır. Sekonder diabet ise hormonal dengesizlikten ve cerrahi sonrasında kullanılan ilaçlar tarafından pankreasın harabiyetine bağlı gelişebilmektedir²³.

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) Sınıflamasına Göre:²³⁻²⁵

1. İnsüline bağımlı Diabetes Mellitus (IDDM)
2. İnsüline bağımlı olmayan Diabetes Mellitus (NIDDM)
 - Obezler
 - Obez olmayanlar
3. Malnütrisyonla ilişkili Diabetes Mellitus (MRDM)
4. Sendrom ve bazı koşullara bağlı olan Diabetes Mellitus
 - Hormonal kaynaklı hastalıklar,
 - Pankreatik hastalıklar,
 - Genetik bozukluklar,
 - Kimyasal ya da ilaçlara bağlı durumlar
 - İnsülin veya reseptörlerinin anomalisi
5. Glukoz toleransı bozukluğu (IGT)
 - Obezler
 - Obez olmayanlar
 - Sendrom ve şartlara bağlı olanlar
6. Gestasyonel Diabetes Mellitus (GDM)

2.1.1.1. İnsüline Bağımlı Diabetes Mellitus (IDDM, Tip I DM)

Tip I diabet (insüline bağımlı diabet), endojen insülin salgılama kapasitesinin büyük bir kısmının ya da tamamının ortadan kalkmasıdır. Hücrel kaynaklı otoimmün yıkım sonucu pankreatik β hücrelerinin harabiyetine bağlı olarak, kan-glukoz konsantrasyonunun yükselmesi ile karakterizedir. β hücrelerindeki harabiyete bağlı olarak glukoz alımının ardından, pankreastan insülin salgılanamaz ve Tip I diabetiklerde insülin eksikliğinin tipik bulguları görülür²⁶⁻²⁸. Diabetin bu tipi genellikle çocukluk ya da adolesan çağında görülür. Polidipsi, poliüri, ketoasidoz, kilo kaybı gibi semptomlar gösterir. Organizmada karbohidrat kaybindan ortaya çıkan kalori açığını kapatmak için yağ ve protein yıkımının artması, glikozüriye bağlı kalori kaybı, dehidratasyon, zayıflamanın başlıca sebebidir. Tip I diabetiklerde oluşan insülin yetersizliği, metabolik hastalıkların çoğunun temelini oluşturur. Sadece insülin eksikliği değil aynı zamanda glukagonun ve pankreatik polipeptidlerin konsantrasyonlarının yüksekliği de Tip I diabeti gösterir²³.

Diabetiklerde, insülin eksikliğine bağlı olarak glukozun kullanımı azalır. Hücrede glukoz yetersizliği, amino asitlerden glikoneogenezi uyarır. Yağ asidi oksidasyonu ve ketogeneze artar²⁸.

Beta (β) hücrelerinin harabiyetinden üç mekanizmanın sorumlu olduğu düşünülür; Bunlar çevresel etkiler, genetik duyarlılık ve otoimmünitedir.

Tip I diabetin diğer komplikasyonları arasında katarkt, nöropati, nefropati ve anjiopati vardır. Bunların gelişmesi ve ilerlemesi tamamen gliseminin kontrol derecesine bağlıdır^{26,29}.

Tedavi edilmemiş Diabetes Mellitusta, hiperglisemi ve ketoasidoz görülür. Hiperglisemi, glukozun hepatik yapımının artmasıyla beraber, periferik kullanımının azalması nedeniyle meydana gelmektedir. Ketozis ise, adipoz dokudan yağ asidi salınımının artışına bağlı olarak karaciğerde 3-Hidroksibütirat ve asetoasetat sentezinin uyarılması sonucu oluşmaktadır. Ancak, karaciğere gelen yağ asitlerinin hepsi oksidasyon ya da keton cismi sentezinde kullanılmaz, bir kısmı triaçilgliserole dönüşür ve VLDL olarak paketlenerek kana

verilir. Şilomikronlar yemek sonrası, diyet lipidlerinden barsak mukoza hücrelerinde sentezlenir. Diabetiklerde, yağ dokusunda, lipoprotein lipaz tarafından, lipoprotein yıkımının düşük olması nedeniyle, plazma şilomikron ve VLDL düzeyleri yükselir ve sonuçta hipertrigliseridemi oluşur. Bu metabolik değişiklikler, insülin yetersizliği ve glukagonun kısmen yükselmesi nedeniyle oluşmaktadır²⁷. İnsülin tedavisine bağlı olarak serbest yağ asit değerleri düşer, lipoprotein lipaz değerleri yükselir ve hipertrigliseridemi hızla kontrol altına alınır ve LDL değerleri düşer, HDL değerleri de normal ya da diabeti bulunmayan kontroller ile karşılaştırıldığında, normal değerlere ulaşır³⁰.

2.1.1.2. İnsüline Bağımlı Olmayan Diabetes Mellitus (NIDDM, Tip II Diabet)

Bu tip diabet, insülin sekresyonundaki yetersizlik ya da bazı vakalarda glukoz yüklemesine karşı göreceli bir yetmezlik ve buna eklenen periferik dokuların insüline yanıt vermedeki yetmezliği ile ilişkilidir (İnsülin rezistansı). NIDDM'de pankreasın β hücrelerinin bir kısmı fonksiyonlarını korurlar ve glukoz homeostazını korumak için yeterli olmayan düzeylerde insülin salgırlarlar²⁶. IDDM'nin aksine, insülin yetersizliğinin şiddetli olmadığını ve NIDDM'nin patogeneğinde temel rolü insülin rezistansının oluşturduğunu belirtmek gerekir^{25,31}.

Tip II diabet, kesinlikle diabetin en yaygın tipidir ve yaşlılarda daha sık görülür. Hastalığın bu türünde endojen insülin salgılama kapasitesi korunmuştur. Susama, poliüri ve kilo kaybı bulunabilir ancak çok nadiren bu bulgular şiddetlidir. Kadınlarda ise, vulva puritis en sık bulunan semptomlarıdır²³.

Tip II DM'nin, bazı bireylerde normal insülin sensitivitesine sahip oldukları halde monogenik β hücre (MODY: maturity onset diabetes of the young) fonksiyon defektine bağlı olarak gelişebildiği görülebilmektedir. Bu alt gruplar MODY 1-5 olarak adlandırılmaktadır. MODY-1' de hepatik nükleer faktör- 4 α , MODY-2'de glukokinaz, MODY-3'de hepatik nükleer faktör-1 α , MODY- 4'de insülin promotor faktör 1, MODY- 5'de ise hepatosit nükleer faktör- 1 β genlerinde hatalar gözlenmektedir³². (Tablo I).

Tablo 1: Hasarlanmış β hücre fonksiyonlarıyla karakterize edilen diabetin monogenik formları³²

Tip	Gen	Kromozom	Hasar
MODY 1	Hepatik nükleer faktör 4- α	20q	β -hücre hasarında ilerleme
MODY 2	Glukokinaz	7q	İnsülin sekreyonunun düzenlenmesinde glukozun azalması
MODY 3	Hepatik nükleer faktör 1- α	12q	β -hücre hasarında ilerleme
MODY 4	İnsülin promotor faktör	13q	Pankreasın gelişiminde azalma
MODY 5	Hepatosit nükleer faktör 1- β	17 cen-q	β -hücre hasarında ilerleme + renal hastalıklar

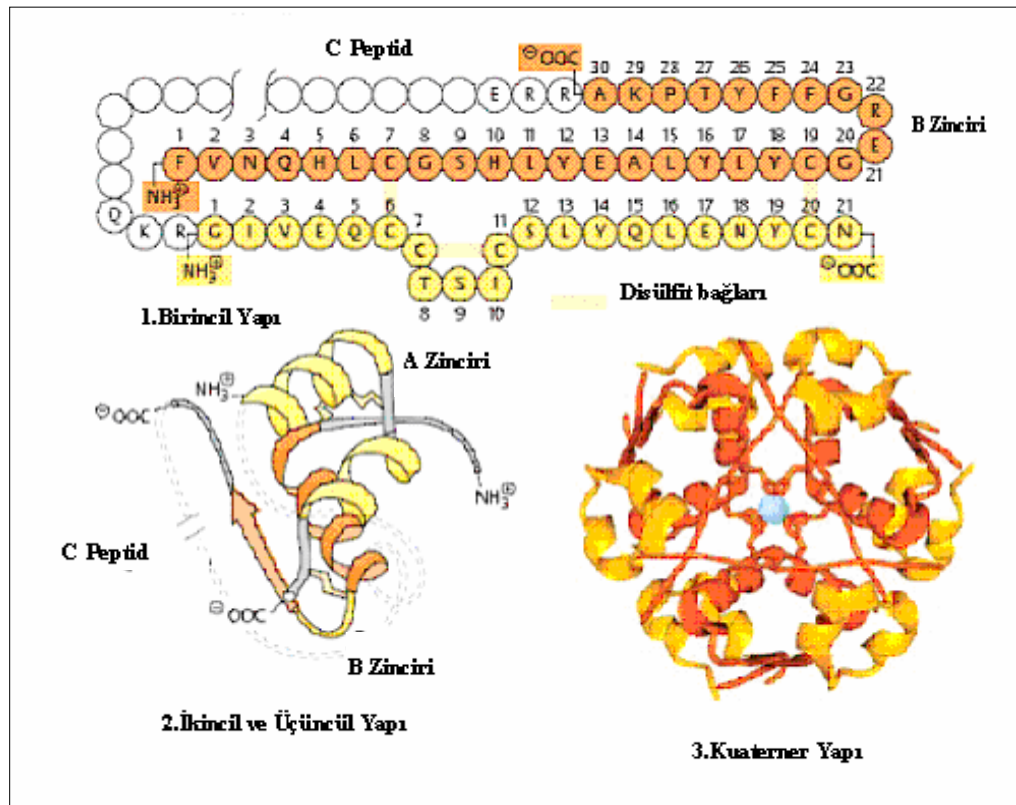
Kısacası, NIDDM, hedef organ yanıtında azalma, bozulmuş insülin sekresyonu ile karakterli, karmaşık ve multifaktöriyel bir hastalık olarak tanımlanabilir. İnsülin rezistansı, β hücreleri üzerinde, sürekli yüksek insülin ihtiyacını karşılama stresi ve giderek yetmezliğe neden olabilecek bir hiperinsülinizm oluşturabilir. Olasılıkla NIDDM’li hastalarda, pankreatik β hücreleri, genetik olarak bu tip streslere duyarlıdır. Böylece, insülin rezistansı, zamanla, yetersiz ya da bozulmuş insülin sekresyon yanıtına yol açabilecek olaylar zincirini başlatabilir. Bulmacanın parçaları henüz tamamlanmış değildir. Fakat her yıl birkaç ek parçanın daha yerine konulduğu görülmektedir³¹.

Tablo 2 . Tip 1 ve Tip 2 Diabetes Mellitus'un Karşılaştırılması^{23,25}

	İnsüline Bağımlı Diabetes Mellitus (IDDM)	İnsülininden Bağımsız Diabetes Mellitus (NIDDM)
Eşanlamlısı	Tip 1, genç tip diabet	Tip 2, erişkin tip diabet
Başlama yaşı	Tüm yaşlar	Sıklıkla 35 yaşından sonra
Hastalığın başlangıcındaki beslenme durumu	Sıklıkla iyi beslenmiş	Obezite (genellikle)
Görülme sıklığı	Diabetlilerin %10-20'si	Diabetlilerin %80-90'ı
Genetik yatkınlık	İlımlı vasat HLA-B8-B15-DR3-DR4-DQ2-8 CTLA-4, 6. kromozomda lokalize	Çok güçlü
Kusur veya eksiklik	Otoimmün β hücreleri yıkılmıştır İnsülin üretimi yoktur	β hücreleri uygun nicelikte insülin üretemez, insülin direnci vardır
Ketozis	Sıktır	Nadirdir
Plazma insülini	Düşük veya yoktur	Normal veya yüksek
Akut komplikasyonları	Ketoasidoz	Hiperozmolar koma
Oral hipoglisemik ilaçlar	Yanıt vermez	Yanıt verir
İnsülin tedavisi	Her zaman zorunludur	Genellikle gerekmez, Hiperglisemi diyetle kontrol edilir
Bulgular	Poliüri, polidipsi, hızlı kilo kaybı	Aynı

2.2. İNSÜLİN

İnsülin iki zincirde toplam 51 aminoasidi olan 5600 dalton ağırlığında bir polipeptid hormondur. Kısa olan A zinciri 21, uzun olan B zinciri 30 aminoasit içermektedir. Zincirler arasında iki disülfid bağı vardır ve buna majör 'loop' adı verilir; bir de zincir içi disülfid bağı vardır ve buna da minör 'loop' denir³³.

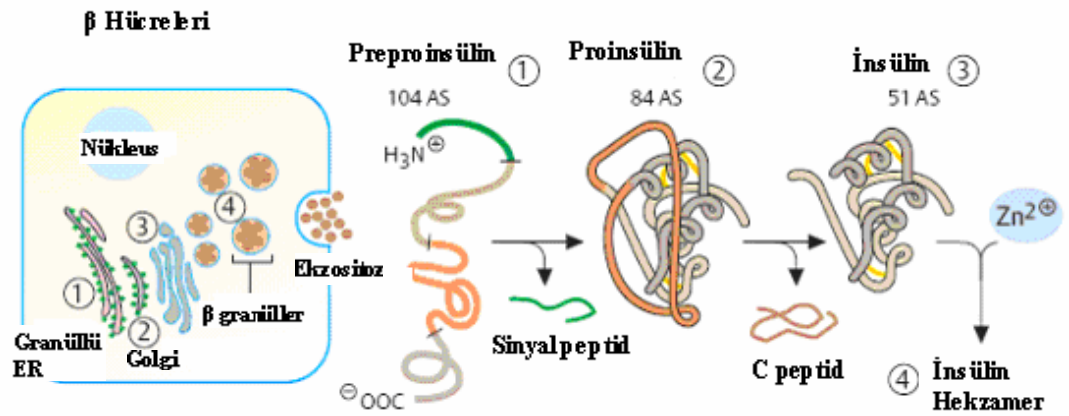


Şekil 1. İnsülinin Yapısı³⁴

2.2.1. İnsülin Biyosentezi ve Salınımı

İnsülin, pankreasın β hücrelerinde proinsülin olarak sentezlenmektedir. Daha sonra golgi kompleksi içindeki mikrovезiküllere giren proinsülin, proteazların etkisiyle, C peptidini kaybeder³⁵. Proinsülinin insüline dönüşümünde tripsin, karboksipeptidaz ve çeşitli proteazlar rol oynamaktadır³⁶.

Pankreasın β hücrelerinden insülin salınımı, depo veziküllerinin hücre membranına taşınması, membranın yapışma noktasından delinmesi ve sonunda vezikülün dışarı atılmasıyla gerçekleşir. β hücresi stimülasyonu ile insülin salıverilmesi arasındaki bağlantıyı Ca^{+2} sağlar. Bu yolda c-AMP'nin ve fosfoinozitol hidrolizi sonucu hücrede oluşan inozitol trifosfatın (IP_3) da katkısı vardır. Ca^{+2} hücre içinde kalmodulin ve ona bağlı bir protein kinaz aracılığı ile, insülin veziküllerinin hücrenin içinden membranın iç yüzüne taşınmalarını ve emiyositoza uğramak üzere veziküller içindeki insülinin salınımını sağlar. cAMP ve IP_3 mitokondriler ve endoplazmik retikulumdan Ca^{+2} salıverilmesine neden olur^{7,37}.



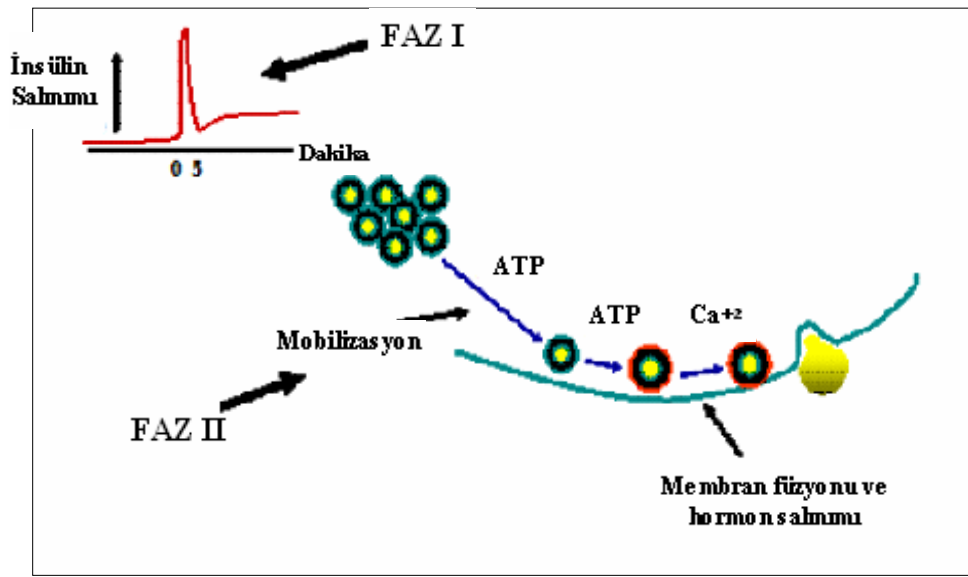
Şekil 2. İnsülin Biyosentezi³⁴

İnsülin salınımı besinler, gastrointestinal hormonlar, diğer hormonlar ve sinirsel uyarılar ile stimüle edilmektedir. Glukoz, insanda, insülinin hem biyosentezini hem de salınımını uyaran tek besin ögesidir³⁸.

Yiyecek alımına bağlı olarak insülin iki fazda salınım gösterir :

- 1.Faz; yiyecek alımından 1-2 dakika sonra başlar ve 8-10 dakika sonra pik yapar. Başlangıç fazı hücre içi Ca^{+2} depolarının mobilizasyonuna bağlıdır.
2. Faz; 1. fazın sonundan 30-45 dakika sonra pik yapar ve normoglisemi olana kadar sürer.

Faz 2, hücre dışı kaynaklardan Ca^{+2} alımının glukoza bağlı uyarımı sonucu gerçekleşir. Glukoreseptörler aracılığıyla kalsiyum kanalları açılarak bu kanallardan hücre içine giren Ca^{+2} etkisiyle glukoza bağlı insülin salınımı başlatılır. β hücrelerinden insülin salınımı, insülin depolayan veziküllerin mikrotübüller aracılığı ile hücre membranı iç yüzüne taşınması, membran yapışma noktasından delinmesi ve veziküllerin dışarı atılması ile olur³⁹.



Şekil 3. İnsülin Salınımı

Glukozun yaptığı salgılamamanın ilerleyen döneminde ise, β hücrelerine giren glukozdan glukokinazın yardımıyla oluşan metabolitler rol oynamaktadır⁴⁰. Glukokinaz, β hücrelerinden insülin salgılanmasını düzenleyen en önemli enzimdir. Salgılanma kinetiği açısından β hücrelerinde insülin kolay salıverilen küçük bir havuz ve daha zor salıverilen büyük bir havuz halinde bulunmaktadır. Başlangıç döneminde sadece küçük havuzda bulunan insülin salgılandığı halde, glukokinaz etkisiyle ve hücre içerisinde oluşan metabolitler aracılığı ile ikinci havuzdan da salgılanma başlar. Glukozdan oluşan hücre içi metabolitler, insülin salgılatan diğer maddelerin etkilerini artırırlar. Ayrıca β hücrelerinde glukozun metabolize edilmesi (glikoliz) intraselüler ATP düzeyinin yükselmesi sonucu ATP'ye duyarlı K^{+}

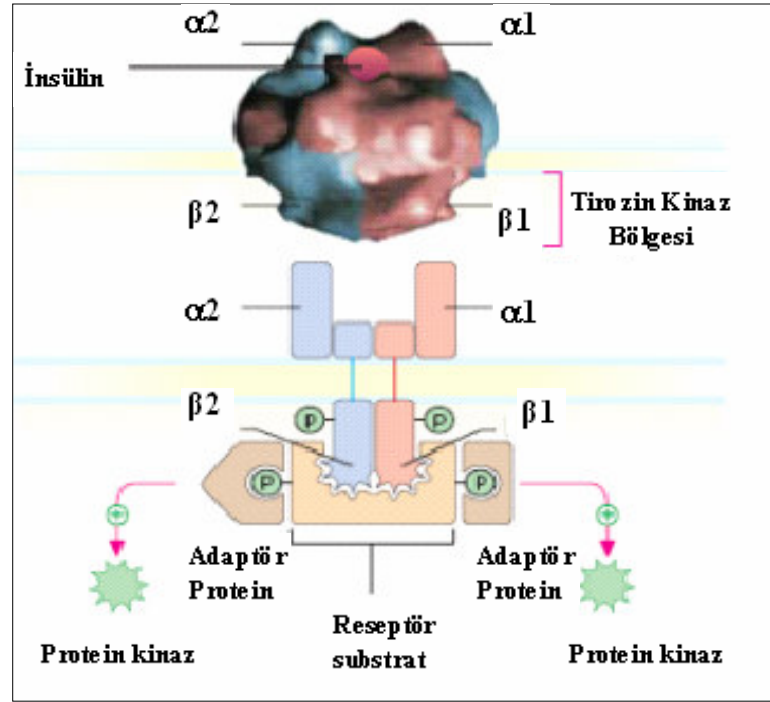
kanallarını kapatarak hücrede depolarizasyona neden olur. Depolarizasyon sonucunda membrandaki voltaj-bağımlı Ca^{+2} kanallarını açılarak dışarıdan içeri giren Ca^{+2} aracılığı ile insülin salınımı artar⁴⁰.

β hücrelerinden insülin salınımı intraselüler K^+ konsantrasyonu ile kontrol edilir. K^+ konsantrasyonunun kontrolü de K-ATP kanalları ile sağlanır. Bu por sistemi, voltaj bağımlıdır, hücre membranının depolarizasyonunu takiben açılır. İnsülin salgılanması K^+ transport mekanizmasındaki dengeye bağlıdır.

Üç aminoasit insülin salınımına neden olur: glisin, alanin ve arginin. Bunu glukozla aynı mekanizmayla yapar. Aminoasitlerin β hücre içine girişleri iyonik değişimlere sebep olur, bu, β hücrelerini depolarize eder, Ca^{+2} alımını hızlandırır, insülin içeren granüllerin ekzositozunu uyarır. β hücresinde alanin ve glisin Na^+ ile simport bir ilişki kurar. Argininin hücre içine girişi ise β hücresi plazma membranında bulunan arginin transport proteini ile gerçekleşir.

2.2.2. İnsülin reseptörü

İnsülin etkisini hücre yüzeyinde yer alan spesifik reseptörüne bağlanarak gösterir. Reseptör, yaklaşık 350.000 daltonluk bir glikoproteindir, birbirine disülfid bağları ile bağlı iki α ve iki β alt biriminden oluşur. İki α alt birimi tamamen hücre dışı yerleşimlidir ve spesifik olarak insülinin bağlanmasından sorumludur. β alt birimlerinin üç bölgesi vardır: α alt birimlerine bağlı küçük bir hücre dışı kısım, yaklaşık 20 aminoasitlik bir transmembran kısım ve tirozin kinaz aktivitesine sahip büyük bir hücre içi kısım. İnsülin molekülünün reseptöre bağlanarak onu aktive etmesi tirozin kinaz etkinliğini artırır. Tirozin kinaz etkinliği ise sinyal iletimi için gereklidir^{7,27,41}.



Şekil 4. İnsülin Reseptörü³⁴

İnsülin hücre içindeki etkisini, reseptörünün tirozin kinaz aktivitesi ile hem kendisini hem de başka proteinleri tirozinler üzerinden fosforillemesi yoluyla gösterir. Otofosforilasyonun başlaması diğer hedef proteinlerin tirozin rezidülerinin fosforile olmasına sebep olmaktadır. Bu hedef proteinlerden bir tanesi insülin reseptör substrat 1 (IRS-I)'dir⁴¹. Bu kompleks proteinler; mesajları insülin reseptöründen sitozol ve nükleustaki son hedefe taşımaktadır. İlk olarak IRS-I'de bulunan tirozin P rezidusu, Grb2 proteinindeki SH2 domaini ile bağlanır. Grb2, zincirdeki diğer proteini çalıştırır ki bu SOS'u (guanin nükleotidi yer değiştirme faktörü) etkileyerek büyüyen kompleksi oluşturur. SOS Grb2'ye bağlandıktan sonra GDP'nin Ras üzerindeki GTP ile yer değiştirmesini katalize eder. GTP, guanozin nükleotid bağlayan protein ailesindendir ve bir çok sinyal iletimini kontrol etmektedir. GTP bağlandıktan sonra, Raf-I (MAPK kinaz kinaz) olarak bilinen protein kinaz Ras aracılığı ile aktive edilir. Raf-I, üç protein kinazdan ilkidir. Diğerleri MEK (mitojen aktive edici kinaz) ve MAPK (mitojen aktive edici protein kinaz)'dır. Bunlar bir kaskad olarak bilinmekte ve her biri diğer fosforilasyonu aktive etmektedir. Son protein kinaz MAPK, treonin ve tirozin rezidülerinin fosforilasyonu ile aktive edilir. Aktive olduğunda nükleusa girerek ve ELK-I (eksraceller düzenleyici kinaz) gibi proteinleri fosforile ederek, insülinin biyolojik etkilerine ara buluculuk

yapmaktadır. ELK-I, insülin tarafından regüle edilen bazı genlerin transkripsiyonunu yönlendirir⁴¹.

2.2.3. İnsülinin Metabolik Etkileri

İnsülinin direkt ya da indirekt olarak vücuttaki her dokuda etkisi olmasına karşın, enerji depolayan 3 büyük organ olan karaciğer, kas ve yağ dokusundaki hormonal etkileri oldukça önemlidir. Ayrıca insülinin, pankreas adacıklarının komşu hücrelerinden salgılanan glukagon ve somatostatin arasındaki metabolizmanın düzenlenmesini içeren parakrin etkisi de vardır⁴².

2.2.3.1. İnsülinin Karaciğer Üzerine Etkileri⁴³

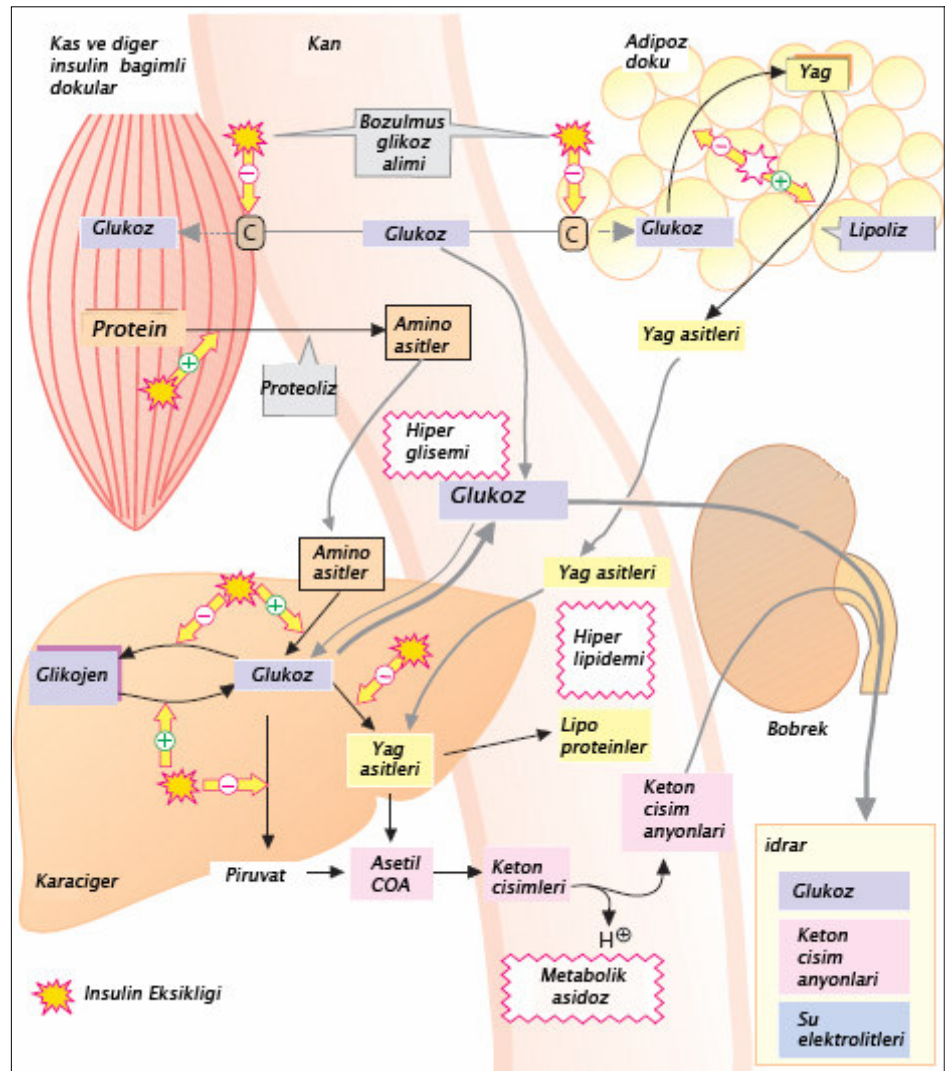
- Glikojen depolanmasını artırır.
- Trigliserit, kolesterol ve VLDL sentezini artırır.
- Glikolizi uyarır.
- Glikojenolizi inhibe eder.
- Ketogenezi inhibe eder.
- Glukoneogenezi inhibe eder.

2.2.3.2. İnsülinin Kas Üzerine Etkileri⁴³

- Protein sentezini uyarır
 - Aminoasit transportunu artırır.
 - Ribozomal protein sentezini uyarır.
- Glikojen sentezini uyarır.
 - Glukoz transportunu artırır.
 - Glikojen sentetaz aktivitesini artırır.
 - Glikojen fosforilaz aktivitesini inhibe eder.

2.2.3.3. İnsülinin Adipöz Doku Üzerine Etkileri⁴³

- Trigliserit depolanmasını uyarır.
- Lipoprotein lipazı uyarır, yağ hücreleri içine absorpsiyon için yağ asitleri yapar.
- Yağ hücreleri içine glukoz transportunu artırır, böylece trigliserit sentezi için a-gliserofosfat miktarı artar.
- İntraselüler lipolizi inhibe eder.



Şekil 5. İnsülin eksikliğinin etkileri³⁴

2.3. TİROİD HORMONU

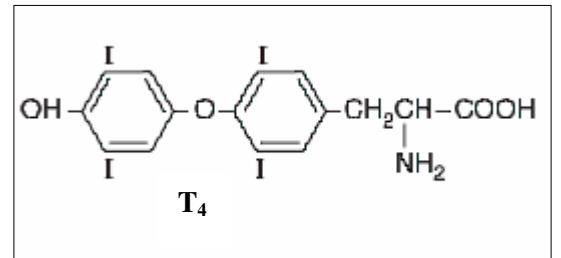
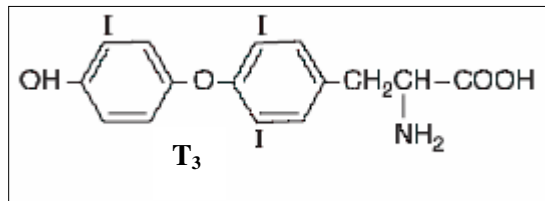
2.3.1. Tiroid Bezi

Tiroid bezi, boyunda krikoid kıkırdak ve trekeanın önünde yerleşmiş olup ağırlığı erişkinde 15-20 g kadardır. Tiroid bezi kan damarlarınca çok zengindir. Birim zaman içinde ve bir gram doku ağırlığı için bezden akan kan miktarı, vücuttaki diğer bütün dokulardan fazladır (4-6 ml/g/dakika). Histolojik yapısı incelendiğinde birçok küremsi (sferik) foliküllerden oluştuğu görülür. Foliküllerin çeperi tek sıralı epitel hücreleri ile çevrilmiştir. Folikülün ortasındaki boşluk yarı sıvı ve protein yapısında kolloid adı verilen bir madde ile doludur. Bez istirahat halinde iken folikülü çevreleyen epitel hücreleri yassı ve folikül boşluğu geniştir. Bez aktif iken foliküller küçülür ve epitel hücreleri kübik bir biçim alırlar⁶. Foliküler hücreler tiroglobülin adı verilen globüler bir protein sentezlerler ve onu tiroid foliküllerinin kolloidine salgırlar. Her bir tiroglobülin molekülü tiroid hormonlarının yapıtaşı olan tirozin aminoasidini içerirler.

Tiroid bezi dokuların normal fonksiyonu için gerekli olan metabolizma hızını ayarlar. Vücut doku hücrelerinin oksijen kullanımını artırır, karbonhidrat ve lipid metabolizmasının ayarlanmasına yardım eder⁶.

2.3.2. Tiroid Hormonu Yapımı Ve Salınımı

Tiroid bezinin başlıca hormonları, triiyodotironin (T₃) ve tiroksin (T₄)'dir. Tiroksin 4, triiyodotironin 3 iyot taşıyan amin asididirler.

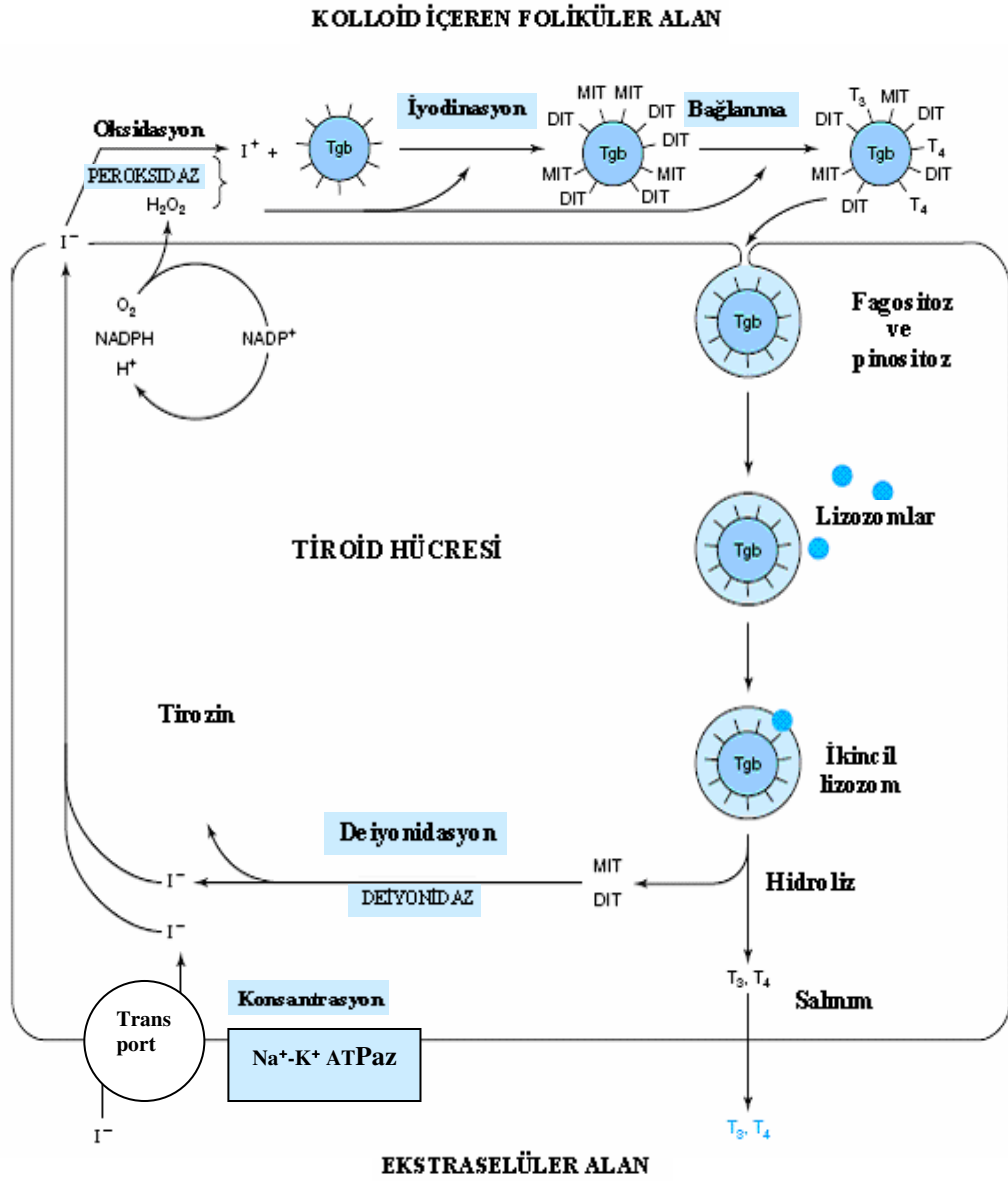


Şekil 6. Tiroid Hormonları (T₃ ve T₄)⁴⁴

İyot, iyon halinde iyodid (indirgenmiş formda, I^-), okside olmuş formda iyot (I_2), ya da organik bileşik halinde iyot olarak besinlerle alınır. Organik ve element halindeki iyot, sindirim ve emilim esnasında iyodide (I^-) indirgenir ve plazmada bu şekilde bulunur.

Tiroid bezi hücreleri, iyodidi aktif transport yoluyla dolaşımdan hücre içine alırlar. Bez içinde, plazma ya da serumda bulunandan çok daha fazla iyodid bulunur. İyodid aktif transportu, tiroid stimüle edici hormon (TSH, tirotropin) tarafından hızlandırılır. İyodid hücreye girince tiroid peroksidaz ile iyot (I_2) haline dönüştürülür. İyot, tiroglobüline bağlı tirozin moleküllerine bağlanır. Bu şekilde monoiyodotirozin (MIT) ve diiyodotirozin (DIT) meydana gelir. Bu iyotlu tirozinler bir araya gelerek tiroid bezinin aktif hormonları oluşur. İki molekül diiyodotirozinin birleşmesi ile tetraiyodotironin (T_4), bir diiyodotirozin ile bir monoiyodotirozinden de triiyodotironin meydana gelir. Bu reaksiyonların oluşmasında enzim sistemlerinin önemli rolü vardır⁶.

T_3 ve T_4 hormonları, tiroid hücrelerinin folikül içine salgıladığı proteolitik ve peptidaz enzimleri ile tiroglobülünden ayrılarak serbestleşir. T_3 ve T_4 sistemik dolaşıma geçer. Hormon haline gelmemiş MIT ve DIT' lar serbest kalır, ancak kan akımına karışmazlar. Bunlardaki iyot, tiroid bezinde bulunan deiyodinaz enzimleri ile deiyonize edilir, serbestleşmiş bu iyot yeniden hormon sentezinde kullanılır^{1,45}.



Şekil 7. Tiroid Hormonlarının Yapım ve Salınımı⁴⁴

2.3.3. Tiroid Hormonlarının Vücutta Taşınmaları

T₄ moleküllerinin yaklaşık %75'i, T₃ moleküllerinin yaklaşık %70'i tiroid bağlayıcı globülinler (TBGs) adı verilen taşıyıcı proteinlere bağlı olarak dolaşıma girerler. Dolaşımda T₃ veya T₄'ün kalanının çoğu tiroid-bağlayıcı prealbumine (TBPA) ya da plazma proteinlerinden biri olan albümine bağlanırlar.

Tiroid bezi, TSH tarafından uyarılınca tiroglobulin proteolitik bir enzim tarafından parçalanır, tiroksin ve triiyodotronin serbest kalarak kana geçer. Kana geçen bu hormonlardan çoğu (%90) tiroksin, az bir kısmı (%10) triiyodotronindir. Fakat gerek tiroid bezinde gerekse diğer doku hücrelerinde tiroksinden (T_4) bir iyot enzimatik bir reaksiyonla ayrılarak triiyodotronin (T_3) meydana getirilir. Esasen T_4 'ün metabolik yönden etkisiz olduğu, asıl hormon etkisi yaratanın T_3 olduğu kabul edilmektedir⁶.

Tiroid hormonunun çoğunu alan dokular karaciğer, böbrek ve kaslardır. Beyin, dalak ve gonadlar çok az tiroid hormonu alırlar. Bu farklı alımların nedeni T_4 'ün oksijen kullanımı üzerine metabolik etkileri ile ilgilidir¹. Tiroid hormonlarının periferik dokulara nasıl girdiği kesinlik kazanmamakla birlikte pasif difüzyon ile gerçekleştiği tahmin edilmektedir. Yine olasılıkla, periferik dokularda hücre yüzeyinde tiroid hormonuna spesifik reseptörler olduğu düşünülmektedir. Hücre içinde tiroid hormonları ya sitoplazmada serbest halde kalırlar ya da düşük afiniteli sitozolik reseptörler ya da yüksek afiniteli nükleer mitokondriyal reseptörlere bağlanırlar⁴⁶.

2.3.4. Tiroid Hormonlarının Etkileri

Tiroid hormonları hedef hücrelerdeki etkilerinin büyük bir kısmını, hücre çekirdeği içindeki reseptörler aracılığı ile ve bir kısmını da mitokondriler içindeki reseptörler aracılığı ile gösterirler. Nükleustaki reseptörlerin doğal ligandının T_3 olduğu ve T_4 'ün onun prekürsörü olarak görev yaptığı bilinmektedir⁷.

Nükleus içine giren tiroid hormonu tarafından bu reseptörlerin aktivasyonu, bazı genlerin transkripsiyonunu hızlandırarak özel mRNA'lar aracılığı ile yapısal ve fonksiyonel bazı hücre proteinlerinin sentezini artırır. Tiroid hormonu reseptörlerinin ikinci yerleşme yeri mitokondrilerin iç membranıdır. Buradaki reseptörler lipoprotein yapısındadır. Bu hormonlar, bazı hücre türlerinde, mitokondrilerin oksidatif metabolizmasını, oksijen tüketimini ve dolayısıyla oksidatif fosforilasyon olayını (ATP oluşumunu) artırırlar. Hücrede oksidasyonun artmasında, mitokondrilerin sayısının artması ve her bir mitokondri içindeki

oksidasyon yapan birimlerin sayısının artması rol oynar. Tiroid hormonları bazı organlarda (beyin, testis ve dalak gibi) oksidasyon ve oksijen tüketimini arttırmazlar⁸.

Hücre membranında Na^+ ve K^+ döngüsünden sorumlu bir aktif transport mekanizmasının esasını oluşturan Na^+ , K^+ -ATPaz' ın, tiroid hormonları tarafından indüklenerek, etkinliği arttırılır ve hücrenin ATP kullanımı artar⁷.

2.3.4.1. Tiroid Hormonunun Protein Metabolizmasına Etkileri

Tiroid hormonlarının protein metabolizması üzerine olan etkileri, hormonun genel metabolizma üzerine olan etkilerinin temelini oluşturur. Protein sentezini artırması nedeniyle, özgül enzimlerin sentezini de arttırır; bunlar da diğer metabolik olayları hızlandırır⁶.

Tiroid hormonlarının protein metabolizmasına etkisi, hormon verilen hayvanın ya da bireyin metabolik durumuna ve hormon dozuna göre değişir. mRNA, tRNA ve rRNA sentezini artırarak, azot dengesi üzerinde pozitif etki gösterir. Bu etki ile büyüme hormonu uyarılarak sentezi arttırılır⁴⁷.

2.3.4.2. Tiroid Hormonunun Karbohidrat Metabolizmasına Etkileri

Tiroid hormonları karbonhidrat metabolizmasının hemen hemen bütün evrelerini etkiler. Hormon miktarı arttıkça bağırsaklardan glukoz Emilimi, buna paralel olarak artar. Dokular tarafından glukoz kullanımını arttırır. Karaciğer, iskelet kası ve kalp kasında glikojenolizi arttırır ve kan glukoz düzeyini yükseltir. Bu yükseliş başlangıçta glukozüriye bile neden olabilir. Ancak sonradan katabolizmanın ve epinefrin salınmasının artması nedeniyle, karaciğer glikojeni tükenir ve kan glukoz düzeyi düşer. Tiroid hormonlarının karbonhidrat metabolizması üzerinde doza bağımlı ters bir etkisi mevcuttur. Örneğin, sıçanlarda küçük dozda ve insülin varlığında glikojen sentezini arttırırken, yüksek dozda tiroid hormonu karaciğer glikojeninin glukozu parçalanmasını hızlandırır⁶.

Tiroid hormonları glukozun intestinal absorpsiyon hızını, yağ dokusu ve kaslar tarafından, alım hızını arttırırlar. İnsülinin yıkımı üzerinde de etkilidirler ve yüksek

dozda, insülin yıkımını arttırmırlar. Tiroid hormon preparatları , diabetiklerde insülin gereksimini arttırmırlar. Hipotiroidizm halinde insülin yıkımı azalır. Hipertiroitli hastalarda insüline duyarlılık genellikle azalır, hipotiroidizmde ise duyarlılık artar.⁷

2.3.4.3. Tiroid Hormonunun Lipid Metabolizmasına Etkileri

Tiroid hormonu fazlalığında lipid depoları azalır ve kanda lipid düzeyi düşer. Yağ dokuda lipolizi arttırır. Bu etkisini adenilet siklaz-cAMP mekanizmasını uyarmakla ve dokuları diğer lipolitik maddelere karşı (örneğin, kateşolaminler, büyüme hormonu, glukagon) duyarlı hale getirmekle yapar. Lipoliz sonucu meydana gelen ve kanda derişimi artan serbest yağ asitlerinin okside olmalarını hızlandırır. Tiroid hormonunun lipid metabolizmasına olan klasik etkisi, kolesterolün kan plazmasındaki derişimini düşürmesidir. Kolesterolün dışkı ile atılmasını ve safra asitlerine dönüşmesini arttırır.⁴² Ayrıca hücrelerin apoprotein reseptörlerinin yapımını arttırarak, kolestrol taşıyan LDL' nin hücrelere girişini ve yıkımını da hızlandırır⁴⁸.

2.3.4.4. Tiroid Hormonunun Vitamin Metabolizmasına Etkileri

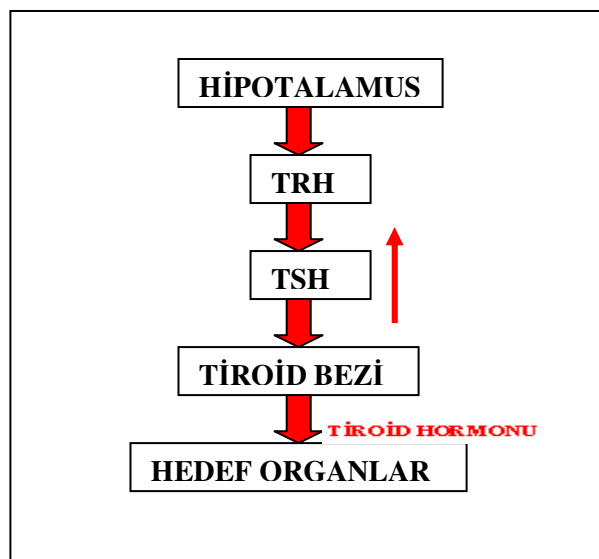
Tiroid hormonları enzim sentezini arttırmaları ve metabolik olayları hızlandırmaları nedeniyle, hücrelerin koenzimler ve bunları oluşturan vitaminlere olan gereksimini arttırırlar⁷. Hipertiroidizmde, suda eriyen vitaminlerden tiyamin, riboflavin, B₁₂ ve C vitaminlerine ihtiyaç artar. Hipertiroidili hayvanlarda nikotinamid'den piridin nükleotidlerin (NAD ve NADP'nin) sentezi aksar. Vitaminlerden bazı koenzimlerin sentezi için tiroid hormonu gereklidir. Örneğin, karotenden vitamin A sentezi ve vitamin A'nın retinen'e dönüştürülmesi için tiroid hormonuna ihtiyaç vardır⁶.

2.3.5. Tiroid Hormonu Etki Mekanizması

Tiroid hormonlarının birçok enzimler ve hemen hemen bütün organ sistemleri üzerine büyük etkileri vardır. Tiroid hormonu nükleer reseptörlerinin T₃'e karşı affinitesi T₄'den daha fazladır⁴⁹. Bu reseptör, histon özellik göstermeyen asidik bir proteindir⁵⁰ ve T₃'ün hücre düzeyindeki etkisi reseptörle birleşmesi ile başlar. Hormon-reseptör birleşmesi,

hormon tarafından sentezi başlatılacak proteine ait mRNA dizisinin meydana gelmesini hızla arttırmaktadır. Bu olay nükleer reseptörlerin transkripsiyonu hızlandırdığını gösterir. T_3 ile nükleer reseptör kompleksinin transkripsiyon yönünden aktif kromatin ile ilişki kurduğu tahmin edilmektedir⁵¹.

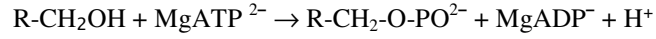
T_3 etkisinin meydana gelmesinde bazı hormonlar ve faktörler işe karışmaktadır. Metabolik faktörler tiroid hormonu tarafından ilgili genin harekete geçirilmesini etkileyebilir. Örneğin açlıkta nükleer T_3 reseptörleri azalmaktadır^{52,53}. Kanda tiroid hormonu belli bir düzeyi aşınca TSH salınması inhibe edilir. Bu inhibisyon, kanda hormon miktarının ayarlanmasında negatif-feedback mekanizması ile olmaktadır. Tiroid hormonu bu etkisini, diğer etkileri gibi, adenohipofizde TSH salgılayan hücrelerin nükleer reseptörleri ile etkileşerek yapmaktadır. Adenohipofizin TSH sentezleyen hücrelerinin nükleer reseptörleri T_3 tarafından işgal edilince TSH salınması durur. Kanda tiroid hormonu düzeyi düşünce, nükleer reseptörlerin T_3 ile işgal edilemeyen miktarı artar ve TSH salınması, dolayısıyla T_4 salınması artar. T_4 diğer doku hücrelerinde olduğu gibi, tirotrof (TSH salgılayan) hücrelerde de deiyodinasyon yoluyla T_3 'e dönüştürülmektedir. T_3 'ün TSH salgılayan hücrelerin nükleer reseptörleri ile birleşmeleri, negatif-feedback yoluyla, TSH salınımını inhibe eder⁵⁴.



Şekil 8. Tiroid hormonlarının salınımının negatif-feedback ile kontrolü

2.4. GLUKOKİNAZ (GK)

Glukokinaz (ATP:D-glukoz 6- fosfotransferaz, EC 2.7.1.2), heksokinaz IV veya heksokinaz D olarak da bilinir⁵⁵⁻⁵⁸. Glukozun fosforilasyonunu ATP ile aşağıdaki reaksiyona göre katalizler:



Bu reaksiyon, heksoz fosfotransferaz enzim ailesi tarafından katalizlenir. Heksoz fosfotransferazlar iki genel gruba ayrılabilir. Birinci sınıf, heksokinaz I, II ve III'ü kapsar. Bu enzimler glukozu yüksek afinite gösterirler, K_m değerleri yaklaşık 20-130 μM 'dır, yaklaşık 100 kD moleküler ağırlığına sahiptirler. Bu enzim sınıfının aktiviteleri, glukoz 6-P tarafından feedback mekanizmasıyla inhibe edilir. İkinci sınıfta glukokinaz yer alır, çok daha küçük bir moleküler ağırlığa sahiptir ve glukoz 6-P tarafından inhibe edilmez⁵⁹, heksokinazlara göre daha yüksek $V_{\max}$ ve K_m değerine sahiptir⁶⁰. Glukokinaz, glukozun α anomerini tercih eder⁶¹.

Glukokinaz, yaklaşık 40 yıl önce 3 farklı laboratuvarında birbirinden bağımsız olarak keşfedildi ve enzimin karaciğere spesifik olduğu, sirkülasyonda postprandial glukozun temizlenmesinde kritik bir rol oynayarak görev yaptığı belirtildi⁶²⁻⁶⁵. 1968'den sonra Matschinsky ve Ellerman⁶⁶ pankreas adacıklarında da glukokinaz varlığını kanıtladılar ve 2 önemli görevi olduğunu ileri sürdüler:

- 1-İnsülin üreten pankreatik β hücrelerinde, moleküler glukoz alıcısı olarak rol oynar.
- 2-Karaciğerde glukozun glikojen formunda depolanmasında enzimatik bir adım olarak görev yapar.⁹

2.4.1. Glukokinazın Kinetiği Ve Yapısı

Glukokinaz, 50 kD moleküler ağırlığında, monomer bir enzimdir⁹, başlıca karaciğer⁶⁷ ve pankreatik β hücrelerinde eksprese edilir^{66,67}. Ancak son dönemde glukokinaz mRNA'sı nöroendokrin hücreler, jejunal enterositler ve de median ve lateral hipotalamusta tanımlanmıştır⁶⁸.

Glukokinaz, glikolizin ilk basamağında, glukozun glukoz-6-P'a ATP bağımlı fosforilasyonunu katalizler⁹⁻¹². Glukokinazın termodinamik, kinetik, ve moleküler genetik özellikleri glukoz alıcısı olarak görev yapması için çok uygundur, reaksiyon hemen hemen geri dönüşümsüzdür⁶⁹. Glukoz $S_{0,5}$ pH 7,4'de 7,5 mM'dır ve enzim $MgATP^{-2}$ (K_m yaklaşık 0,4 mM) ile fizyolojik olarak doygundur⁶⁹. Glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak pozitif kooperativite (sigmoidal kinetik) gösterir⁶⁷. Reaksiyon ürünü olan glukoz-6-P tarafından inhibe edilmez^{10,11,69}. Glukokinazın bu eşsiz kinetik özellikleri karaciğer ve pankreatik β hücrelerinde oldukça önemli fonksiyonel bir rol oynadığını düşündürmektedir.

Pankreatik β hücrelerinde glukokinaz, glukoz sensing mekanizmasında anahtar bir bileşendir⁷⁰. β hücrelerinde glukoz fosforilasyonu insülin sekresyonu ile sıkı bir ilişki içindedir. Glukokinazın eşsiz kinetiği bu hücrelerin, plazma glukoz konsantrasyonunda meydana gelen değişikliklere cevabının ve duyarlılığının temelini oluşturur. Bundan dolayı glukokinaz, β hücrelerinde "glukoz sensörü" olarak değerlendirilir⁷¹. Glukoz fosforilasyonu, β hücrelerinde glikolitik akışın kontrolü için anahtar noktadır. Sonuç olarak, glukokinaz aktivitesindeki küçük değişimlerin fizyolojik olarak anlamlı olması, glukoz-stimüle edici insülin sekresyonunun başlangıcını direkt etkilemesiyle olur¹⁰. Pankreatik glukokinaz, plazma glukoz seviyeleri tarafından kontrol edilir^{14,72}.

Karaciğerde, bu dokunun eşsiz metabolik görevleri için glukokinazın esansiyel olduğu düşünülmektedir¹⁰. Hepatik glukokinaz, glukoz kullanımı ve glikojen sentezinde oldukça güçlü etkilere sahiptir. Glukokinaz ekspresyonundaki ufak bir değişiklik, kan glukoz konsantrasyonunda ölçülebilir bir bozunmaya yol açmaktadır^{10,13}. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki glukokinaz overekspresyonu, intraselüler glukoz-6-P düzeylerini

arttırmaktadır, bu durum hem glikoliz hem de glikojen sentezini tetikler¹⁰. Karaciğer glukokinazı insülin tarafından regüle edilir^{14,18}.

Glukokinaz, hepatik glukoz metabolizmasının regülasyonunda anahtar bir rol oynar. Yağ asidi metabolizmasına karışmış genlerin regülasyonu belirlenirken glukokinaz gen ekspresyonunun da hepatik lipogenezde önemli bir rol aldığı anlaşılmıştır⁷³.

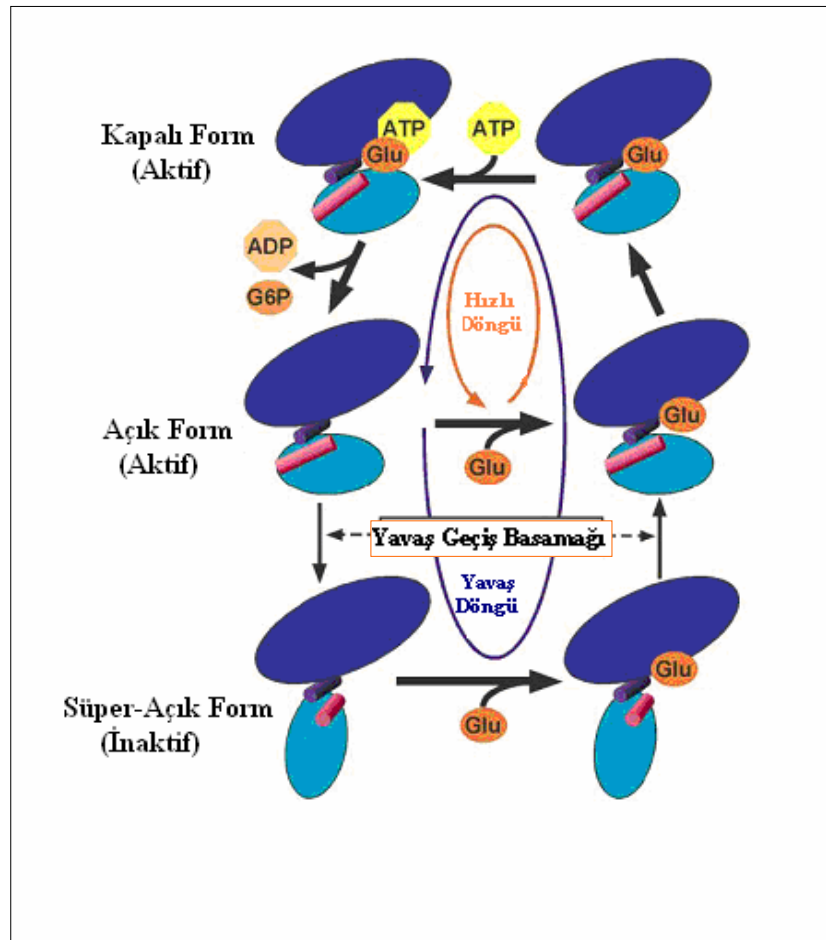
Tablo 3. Glukokinazın karakteristik özellikleri⁹

Moleküler Ağırlığı	50 kD, monomer
k_{cat}	60-70 s ⁻¹
Glukoz S_{0,5}	~7,5 mmol/l
ATP K_m	~0,4 mmol/l
Hill katsayısı (n_H)	~1,7
İnhibitörler	Glukokinaz regülatör protein (GKRP) Açıl Co-A
Aktivatörler	Glukokinaz aktivatörleri
Hücrel yerleşim	Sitozol, nükleus, mitokondri ve salgı granülleri
Doku dağılımı	Pankreatik α ve β hücreleri, hepatositler, enteroendokrin hücreler, hipotalamik nöronlar ve hipofiz hücreleri

*Bütün kinetik sabitler pH=7,4'deki değerlerdir ve glukoz S_{0,5}, pH'nın düşmesiyle yükselir.

Glukokinazın yapısı, homoloji modeli ve kristallografi ile incelendiğinde, glukoz bağlanma bölgesi, ATP bağlanma bölgesi ve allosterik aktivatör bölgelere rastlanmıştır. Enzimde aminoasitlerin bulunduğu yer, substrat bağlanan bölgeye 20 Å uzaklıktadır⁶⁹. Enzimin glukoz bağlanma bölgesi 8 aminoasit içerir: S151, T168, K169, N204, D205, N231,

E256 ve Q287. ATP bağlanma bölgesi 7 aminoaside ihtiyaç duyar: T82, R85, T228, K296, S336, S411 ve K414⁹. Enzim, aminoasitlerin glukokinaz aktivatör bağlanma cebine yerleşmesi durumunda, küçük aktivatör moleküllerin hem varlığında hem de yokluğunda kristalize olur⁷⁴⁻⁷⁶. Glukokinaz aktivatörleri ve D-glukoz varlığında kristalize olduğu zaman, kapalı form incelenmiş ve görülmüştür ki, substrat bağlanma bölgesi daralmakta ve aktivatör bölge açılmaktadır. Bu liganttan bağımsız açık formdan liganta bağımlı kapalı forma olan konformasyonel değişim, molekülün küçük ve büyük loblarını birleştirerek, -COOH terminalinin uzayan-genişleyen hareketini etkiler. Bu yapısal değişiklik glukozu indükleyen bir durumdur⁹.



Şekil 9. Glukokinazın kinetik yapısı⁷⁶

Glukokinazın üç farklı konformasyonu ve iki katalitik döngüsü mevcuttur. İki katalitik döngü arasındaki denge, glukozu cevaben oluşan sigmoidal yanıttan sorumludur. Ortamda glukoz bulunmadıkça glukokinazın büyük bir kısmı süper-açık formda kalır, glukoz süper-açık forma bağlandığı zaman glukokinaz, konformasyonel değişikliğe uğrayarak açık forma geçer. Açık form ile süper-açık form arasındaki konformasyonel değişiklikler, glukoz fosforilasyonu sırasında gözlenen kapalı-açık form konformasyonel değişikliklerinden daha yavaş basamaklardır. Açık forma geçişten sonra enzimatik reaksiyon, ATP'nin varlığında kapalı formdaki değişikliklerle tamamlanır. Reaksiyon tamamlandıktan sonra glukokinaz, glukoz-6-P ve ADP'nin serbest kalması amacı ile açık forma geçer. Çünkü açık form, süper-açık form ile yavaşça dengelenir ve glukokinazın büyük bir bölümü açık formda kalır. Eğer bu süreçte glukoz, açık forma bağlanırsa glukokinaz, yeniden katalitik döngüye girer. Eğer bu durum gerçekleşmezse glukokinaz, süper-açık forma dönüşür⁷⁶. Glukokinazın açık ve kapalı formda bulunması, “mnemonic” ve “slow transition” olarak adlandırılan farklı iki durumda olabildiğini desteklemektedir^{9,59,67,76}.

Glukokinazın yavaş ve hızlı siklus olmak üzere iki katalitik siklusu vardır. Bu iki siklusun dengesi glukoz konsantrasyonu tarafından belirlenir. Düşük glukoz konsantrasyonlarında glukokinaz büyük ölçüde yavaş siklusu kullanır, çünkü süper-açık form, glukozun yokluğunda diğer formlardan çok daha stabildir. Glukoz konsantrasyonu yeterince yükseldiğinde glukokinaz, yüksek afiniteli yapısıyla hızlı döngüyü kullanır⁷⁶.

Allosterik olmayan enzimlerin gösterdiği Michaelis-Menten hiperbolik eğrisi yerine, glukokinaz sigmoidal bir eğri sergiler. Glukokinaz monomerik bir enzim olmasına rağmen, kinetik özellikleri bakımından farklılıklar göstererek allosterik enzimler gibi davranmaktadır. Hill katsayısının yaklaşık 1,7 olması da glukozun, glukokinaza bağlanmasında pozitif kooperativite gösterdiğini desteklemektedir^{67,76}. Heksokinazlar glukoz için Michaelis-Menten hiperbolik doygunluk eğrisi gösterir. Çünkü heksokinazlar sadece kapalı form ya da açık formda bulunurlar, bağlanma bölgesinin yapısal farklılığından dolayı süper-açık formda bulunmazlar. Heksokinazlar herhangi bir glukoz konsantrasyonunda hızlı katalitik döngüyü

kullanırlar. Dolayısıyla Michaelis-Menten hiperbolik doygunluk eğrisi, yavaş geçiş basamağının (slow transition step) eksikliğinin bir sonucudur⁷⁶.

2.4.2. Glukokinazın Transkripsiyonel Ve Post-Translasyonel Regülasyonu

Hücrede insülin sekresyonunda glukokinazın hayati önemi, glukozun karaciğer tarafından alınması ve hepatik glukoz reponsive (cevap) genlerinin tüm networkünde değiştirici ekspresyonundan kaynaklanır. Bu nedenle glukokinaz gen ekspresyonunun regülasyonu karmaşıktır¹⁰.

1986'da kabul edilen görüşe göre, glukokinaz ekspresyonu pankreatik β hücrelerinde ve hepatositlerde farklı şekilde kontrol edilmektedir^{10,72}.

Endokrin ve hepatik glukokinazın dokuya özgü 2 farklı promoter bölge içeren tek bir gen tarafından kodlandığı bulunmuştur: upstream promoter (genin yukarı kısmı, 5' yönü) bölgesi β hücrelerine özgü, downstream promoter (genin aşağı kısmı, 3' yönü) bölge ise hepatositlere özgüdür^{14,77}.

Glukokinazın 2 izoformu bulunmaktadır:

- 1.Nöroendokrin hücrelerde (pankreatik hücreler, nöronal dokular, enterositler) : B tipi (GKB)
- 2.Karaciğerde hepatositlerde : L tipi (GKL)

Bu iki izoform molekülün N terminal ucundaki 13-15. aminoasitlerinde farklılık gösterir. Kinetik ve fonksiyonel özellikleri aynıdır^{9,14}.

Glukokinazın upstream promoter bölgesinin başlangıçta sadece pankreatik β hücrelerinde eksprese edildiği düşünülmüştü. Ancak daha sonra yapılan çalışmalarda, upstream promoterden glukokinaz ekspresyonunun, beyin ve gutun nöronal/nöroendokrin (NE) hücrelerinde olduğu gibi hipofiz kortikotropeslerinde de olduğu kanıtlandı^{68,78,79}. Bu bölgelerde ekspresyon için gerekli tüm düzenleyici elementler 294 bp'lik DNA parçasından ibarettir^{68,79,80}. Upstream promoterin detaylı analizleri sonucunda, bu bölgenin birbirinden farklı, çeşitli regülatör elementleri içerdiği bulunmuştur, ki bunlardan biri Pal elementleri olarak adlandırılan

oldukça önemli bir sınıftır^{80,81}. Ayrıca retinoik asitin de pankreatik adacıklarda glukokinaz ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir⁸². Retinoik asidin β hücre fonksiyonundaki fizyolojik rolü belirlenememiştir, daha ileriki çalışmalarda sinyal transdüksiyon yolağına katıldığı ve regülatör bir element olarak rol oynadığı düşünülmüştür¹⁰. Glukokinaz aktivitesindeki ufak bir değişiklik insülin salgısı eşik değerini ve pankreatik adacıklarda glukokinaz ekspresyonu üzerinde etkili olan çeşitli hormonların ve diğer ajanların etkilerini değiştirebilir¹⁰.

Karaciğerde, glukokinaz gen transkripsiyonu insülin tarafından stimüle edilirken, glukagon tarafından cAMP yolunun aktivasyonu ile baskılanır^{9,19,77,83}, hepatik glukokinaz, gen transkripsiyon basamağında kontrol edilmesinin yanı sıra post-translasyonel basamakta glukokinaz regülatör proteini (GKRP) tarafından da regüle edilir¹⁰. Diabetik ratlara insülin verilmesinin glukokinaz gen transkripsiyon hızını arttırdığı gösterilmiştir. Glukoz geri beslemesinin ilk birkaç saatindeki glukokinaz mRNA'nın artışının insülinin gen transkripsiyonu üzerindeki etkisinden kaynaklandığı söylenmektedir. Transkripsiyon hızı ile sitozolik glukokinaz mRNA seviyeleri arasında bir korelasyon mevcuttur^{15,20,83}.

Glukokinaz gen ekspresyonunun negatif efektörü ikincil mesajcısı cAMP olan glukagondur⁴⁷. İnsülin ve glukagon glukokinaz gen ekspresyonunun en önemli regülatörleridir. Bu hormonların etkileşimi iki şekilde gerçekleşmektedir:

- 1- Genin nükleer transkripsiyonu öncelikle mRNA miktarını artırır ve devamında glukokinaz protein sentez hızını artırır ki, bu hızlı cevaptır.
- 2- Transkripsiyon hızının ve mRNA seviyesinin azalmasından sonra enzim aktivite seviyelerinin durağan durumları sitozolde proteinin stabilizasyon veya destabilizasyonu için devam eder¹⁵.

İnsülin ve glukagon, glukokinaz mRNA seviyelerinin düzenlenmesinde transkripsiyonel/post-transkripsiyonel basamaklarda birbirleriyle zıt görev yaparlar⁸³. Ayrıca, glukokortikoidler ve tiroid hormonlarının, in vivo glukokinaz sentezinin insülin aracılığıyla indüklenmesinde bulunmaları esastır^{16,20}. İnsülin, in vivo hepatik glukokinaz sentezini,

glukokinaz mRNA'sını arttırarak düzenler; bu etki glukokortikoidlerin veya tiroid hormonlarının eksikliği ile ve de cAMP'nin zıt etkisi ile azaltılır⁸³.

Hücreye spesifik ekspresyon ve regülasyondan sorumlu olan hepatik (downstream) glukokinaz promoter bölgesi hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Transgenik ratlarda füzyon gen çalışmalarının sonucu, hepatositlerde transkripsiyon başlangıç bölgesinin yanındaki korunmuş diziler, karaciğerde pozisyon bağımsız ekspresyon için ya da insülin tarafından düzenlenmek için gerekli değildir. Ayrıca DNaz I hipersensitive (DNaz'a karşı aşırı duyarlı bölgeler) haritalama çalışmalarına göre downstream glukokinaz promoteri, regülasyonda diğer birçok çalışılmış hepatik genden çok daha karmaşıktır^{84,85}. Glukokinaz geninin kromatin yapısı, DNaz I hipersensitive (Hss) bölgelerinin tanımlanmasıyla gelişim boyunca incelenmiştir. Hss bölgeleri, cap bölgelerinin -8 kb ile +4 kb bölümleri arasında bulunur. 5 tane Hss bölgesi bulunmuştur; 4 tanesi karaciğere özgü cap bölgelerinde bulunurken, spesifik olmayan bir bölge ise ilk intronda bulunmaktadır. Bu 5 bölge, fetusta mevcuttur, fakat cap bölgesinin upstreaminde yer alan 2 proksimal bölgenin etkinliği doğumdan sonra artmaktadır⁸⁶.

Sterol regülatör element-bağlayıcı protein-1c (SREBP-1c), hepatositlerde hepatik glukokinaz transkripsiyonunda aktivatör olarak rol oynamaktadır⁸⁷. Kolesterol ve yağ asit metabolizmasındaki transkripsiyon faktörlerinin yer aldığı ailede bulunan SREBP-1c^{88,89}'nin hepatik glukokinaz gen transkripsiyonunda insülinin etkilerine aracılık ettiği düşünülmektedir^{10,89}. Bunun aksine transgenik hayvanların karaciğerinde, SREBP-1c'nin overekspresyonunun glukokinaz mRNA seviyelerini etkilemediği gözlenmiştir⁹⁰. Ancak bu sonuca rağmen SREBP-1c'nin hepatik glukokinaz ekspresyonundaki rolünün belirlenmesi, downstream glukokinaz promoterinin insülin ve diğer hormonlar tarafından nasıl regüle edildiğinin anlaşılmasında yardımcı olabilir¹⁰. Son yıllarda yapılan çalışmalarla hepatik glukokinaz promoterinde 2 tane fonksiyonel SREBP-1c cevap elementi tanımlanmıştır. SREBP-1c'nin, SREa ve SREb olarak adlandırılan bu yapılara bağlanarak hepatik glukokinaz promoterini aktive ettiği ve insülinin etkilerine bu şekilde aracılık ettiği düşünülmektedir⁸⁹.

Peroksizomal proliferator-aktif edici reseptör (PPAR)- γ , karaciğerde glukokinaz ekspresyonunu aktive eden faktörlerden biridir. PPAR- γ , ligand-bağımlı aktivasyon bölgesini (AF-2) de içeren nükleer hormon reseptör ailesinin bir üyesidir⁹¹. PPAR- γ , PPAR cevap elementi olan PPRE (peroksizomal proliferatör cevap elementi)' ye bağlanarak hedef gen transkripsiyonunu aktive eder. PPAR- γ agonistleri, pankreatik β hücrelerinde periferik insülin duyarlılığını ve glukoz sensing yeteneğini arttırmırlar. Karaciğerde glukokinaz, PPAR- γ 'nın direkt hedefidir, PPRE'ye bağlanarak glukokinaz transkripsiyonunu aktive eder⁹².

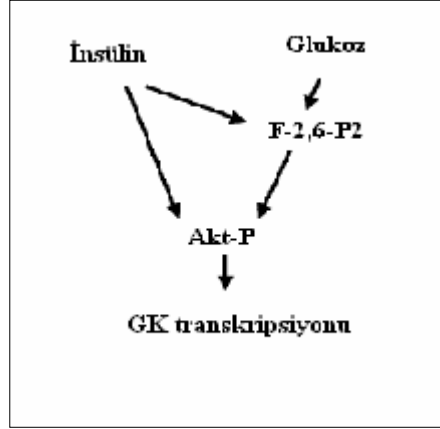
Hepatik glukokinaz gen ekspresyonu, insülin yokluğunda yüksek konsantrasyonlardaki fruktoz-2,6-bifosfat (F-2,6-P₂) seviyeleriyle kontrol edilebilir. Aslında bu etki şaşırtıcıdır, çünkü hepatik gen ekspresyonları insülin bağımlı gerçekleşir^{17,19,87,93}. Glukokinaz gen ekspresyonunun indüklenmesi için insülin tarafından sinyalin, fosfatidilinozitol 3-kinaz (PI₃-K) üzerinden protein kinaz B (Akt)'ye iletilmesi gerekmektedir⁹³. Akt'nin aktivasyonu (fosforilasyonu) glukokinaz gen ekspresyonunun indüksiyonunu doğurur. Akt fosforilasyonundaki değişiklikler, hepatik F-2,6-P₂ artışıyla paraleldir. F-2,6-P₂ seviyeleri ve Akt fosforilasyonu insülinin indüklediği glukokinaz gen ekspresyonunda rol alıyor olabilir. Bununla ilgili 2 olası yol kabul edilebilir:

1-İnsülin ve F-2,6-P₂, Akt'nin düzeylerine göre belli bir noktada birleştikleri

farklı upstream yollarında görev alırlar.

2- F-2,6-P₂ Akt aktivasyonu ve glukokinaz gen ekspresyonunun artışı için

insülin sinyal yoluna aracılık eder⁹⁴.



Şekil 10. Hepatik GK gen ekspresyonunun stimülasyonunda F-2,6-P₂ 'nin rolü ⁹⁴

2.4.3. Glukoz Alımı Ve Homeostazında Glukokinazın Önemi

2.4.3.1. Pankreas β hücre Glukokinazının Rolü

Glukokinaz, β hücrelerinde insülin sekresyonunun kontrolünde çok önemli bir role sahiptir. Bu hücrelerde glikoliz hızının neredeyse tüm kontrolü, glukokinaz kullanımı ve glukoz metabolizmasına bağlı olan insülin sekresyonunun elindedir¹⁰. Glukokinaz, β hücrelerinde enterik hormonlar ve asetilkolin tarafından insülin salınımına olanak sağlar.⁹

β hücrelerinde azalmış glukokinaz aktivite seviyesi büyük bir olasılıkla hiperglisemiden kaynaklanır ve azalmış gen ekspresyonunun sonucu olarak MODY-2 (maturity onset diabetes of the young, tip 2) meydana gelir. Glukokinazın β hücrelerinde glukoz alıcısı olarak görev yaptığı kanıtlanmıştır. Glukokinazın glukoz tarafından indüklenen insülin sekresyonunda baskın bir role sahip olduğu açıktır¹⁰.

Glukokinazın β hücrelerindeki rolünü anlamak için enzimin feedback yoluyla kontrol edilemediği bilinmelidir. 0-25 mmol/l aralığında glukozun primer metabolik etkilerine dayanan derecelenmiş sigmoidal bir konsantrasyon verir, ancak bu fizyolojik hücresel cevap (özellikle sitozolik Ca^{+2} ve GSIR (glukozun uyardığı insülin salınımı))' daki artış 5 mmol/l glukozda kontrol edilir. Bu, adenin nükleotid kontrollü K^{+} kanalı ve voltaj düzenleyici Ca^{+2}

kanalı ile ilgilidir. Fizyolojik, farmakolojik ya da mutasyonel olarak sistemin bu 3 gerekli bölümünden birinin ortadan kalkması, GSIR için başlangıcı değiştirebilir. Fizyolojik başlangıç 5 mmol/l glukozdadır, glukoz, birincil uyarandır ve standart koşullarda glukokinaz kapasitesi %25-30 olduğunda, glukokinaz tarafından ayarlanır. Glukoz diğer yakıtlarla ya da nöro-endokrin modifiye edicilerle birlikte kullanıldığında başlangıç noktası düşüktür. β hücrelerinde glukoz $S_{0.5}$ 'i düşürmek, k_{cat} 'ı yükseltmek, glukokinaz ekspresyonunu arttırmak başlangıç noktasını sola kaydırır ve maksimal cevabı genişletir, ancak ATP için K_m artışı içeren ters yöndeki modifikasyonlar sağa kaydırır ve GSIR'ı düşürür⁹.

Glukokinaz, β hücrelerinde glukoz ve enerji metabolizmasında hız belirleyici olarak görev almakta ve bu eşsiz regülatör rolünden dolayı diabetes mellitus genine aday olarak kabul edilmektedir⁶¹.

2.4.3.2. Hepatik Glukokinazın Rolü

Glukokinaz, hepatik glukoz metabolizması için gereklidir. Aslında plazma glukoz konsantrasyonu üzerinde nispeten küçük bir etkisi vardır. Hepatik glukokinaz hasarı, etkileri, sadece hiperglisemik durumlar altında ortaya çıkar. Glukoz turn-overındaki hata, glukoz atımında, hepatik glikojen sentezinde ve insülin sekresyonunda görünür hale gelir.

Hepatik glukokinaz eksikliğinde, glukoz konsantrasyonundaki değişimlere cevabı düzenleyen genlerin yapısında bozulmalar meydana gelir. Bu durumdan yola çıkılarak hepatik glukokinazın karaciğerde de, β hücrelerinde olduğu gibi glukoz alıcısı olarak rol aldığı gözlenmiştir.

Hepatik glukokinaz, nöronal regülatörün fonksiyonu için veya insülin sekresyonunu kontrol etmede görevli olan faktörün salınımı için gereklidir.

β hücrelerinin yanı sıra karaciğerde de glukokinaz ekspresyonundaki değişim, MODY-2 patogeneziye katkıda bulunmaktadır.

Yapılan çalışmalarda elde edilen kanıtlar, hepatik glukokinaz hiperglisemi boyunca, hepatik glukoz kullanımının belirlenmesinde önemli bir rol oynadığını

proteininin affinitesi fruktoz 6-P tarafından arttırılırken, fruktoz 1-P varlığı bu duruma ters etki yapar^{12,97,100}. Fruktoz 1-P ile tedavi edilen rat hepatositleri glukokinaz aktivite artışını tetikler, F-1-P'nin glukokinaz regülatör proteinine bağlanması, glukokinaz regülatör proteininde konformasyonel değişikliklere neden olur, bu durumda glukokinaza affinitesini azaltır¹². Glukokinaz regülatör proteini, açlık durumunda glukokinazın hücre içindeki yerine karar verir ve nükleustaki enzimleri bir tarafa ayırır^{97,101}. Bu mekanizma, yemekten sonra oluşan ekstraselüler glukoz veya fruktoz konsantrasyonuna cevap olarak, enzimin sitoplazmaya hızlı bir şekilde geçişini sağlar^{97,102}.

Glukokinazın hepatosit nükleusuna translokasyonu için glukokinaz regülatör proteini gereklidir^{103,104}. Glukokinaz regülatör proteinine bağlandıktan sonra, metabolik çevrede serbest kalmasını gerektirecek bir durum olana kadar, glukokinaz nükleusta kalır. Nükleusta oluşan sinyal mekanizması, glukokinazın nükleustan dışarı çıkmasını sağlar. Glukokinaz, glikojen sentezinin aktivasyonunda önemli bir role sahiptir ki, glikojen sentezi glukokinazın sitozolde translokasyonu sırasında gerçekleşir^{105,106}. Glukokinazın nükleustan sitoplazmaya translokasyonu, yüksek glukoz konsantrasyonu varlığında gerçekleşir^{101,103}. Glukokinaz regülatör proteinin fizyolojik rolü, glukokinazın fonksiyonel rezervlerinin yemekten sonra hızlı bir şekilde salınabilmesini sağlamaktır¹². Glukokinaz regülatör proteini, sadece karaciğerde işlevseldir, pankreatik β hücrelerinde rol oynamaz^{12,97}.

N-asetilglukozamin, mannoheptüloz, palmitoil Co-A ve glukokinaz regülatör proteini, glukokinaz aktivitesini glukoz ile ilgili olarak, rekabete dayalı bir biçimde engeller^{67,98}. N-asetilglukozamin ve mannoheptüloz glukoz ile analogtur ve bunların glukokinazın açık ve kapalı konformasyonlarının katalitik bölgesine bağlandığı düşünülmektedir, oysa palmitoil Co-A ve glukokinaz regülatör proteini, farklı olarak allosterik bölgelere bağlanır⁹⁸. Glukokinaz regülatör proteini, allosterik bölgeye bağlanarak katalitik bölgenin glukozla olan ilgisinde değişikliklere neden olur⁶⁷.

2.4.5. Glukokinaz Aktivatörleri

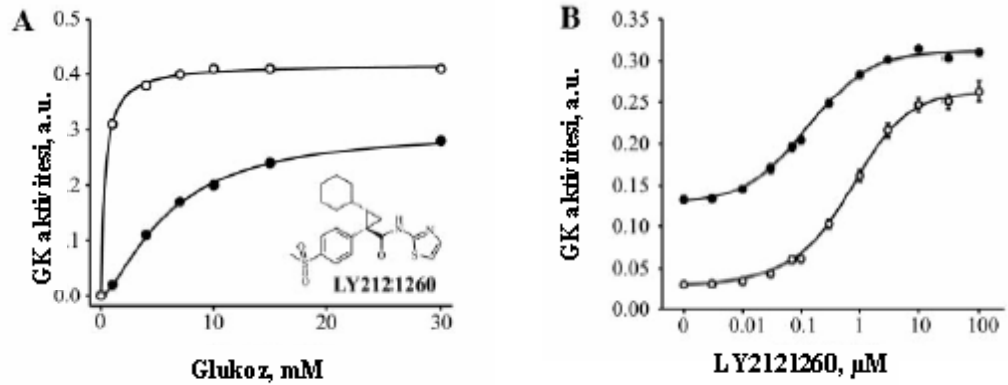
Glukokinaz enzim aktivitesini artıran kimyasal bileşenler, glukokinaz aktivatörleri (GKA) adını almaktadır. GKA₁, GKA₂, RO-28-1675 ve bileşik A olarak tanımlanan bu aktivatörler glukokinazı direkt olarak aktive ederler. Glukokinaz aktivatörlerindeki en ufak bir değişiklik, glukokinazın glukoza olan ilgisini etkilemektedir^{76,98,107}.

Glukokinaz aktivatörlerinin türediği en önemli bileşik RO-28-0450'dir, rasemik bir bileşiktir, R ve S enantiomerleri sentezlenir. R enantiomeri, RO-28-1675'tir, güçlü bir glukokinaz aktivatörüdür. S enantiomeri olan RO-28-1674 inaktiftir¹⁰⁷. RO-28-1675, doza bağımlı olarak, glukokinazın glukoz S_{0,5}'ini azaltırken, enzimin V_{max}'ını artırır^{107,108}. Hill katsayısı ve ikinci substrat olan ATP'ye enzimin ilgisinde bir değişikliğe neden olmaz^{107,108}. RO-28-1675'in oral dozları kan glukoz seviyesini düşürür^{97,107,108}, plazma insülin seviyelerini artırır¹⁰⁸, inaktif stereoizomer RO-28-1674'ün herhangi bir etkisi yoktur. RO-28-1675, pankreatik adacıklarda GSIR (glukozun uyardığı insülin salınımı) için gerekli olan glukozun eşik değeri konsantrasyonunu düşürür^{69,108}, β hücrelerinde glukoz metabolizmasını aktive ederek insülin salınımını teşvik eder^{107,108} ve karaciğerde glukoz kullanımını stimüle eder¹⁰⁷. RO-28-1675, pankreatik adacıklarda sadece glukoz ortamda bulunduğu zaman sitozolik Ca⁺² miktarlarının artışı stimüle eder⁹⁷.

GKA₁ ve GKA₂, hepatositlerde glukoz metabolizmasında, glukoz fosforilasyonu, glikoliz ve glikojen sentezinin düzenlenmesinde güçlü aktivatörlerdir. GKA₁ ve GKA₂, glukokinazın glukoza olan ilgisini 4-11 kat arttırmaktadırlar. Glukokinaz regülatör proteininden bağımsız bir mekanizmayla etki gösterirler⁹⁸. Hepatosit metabolizmasının glukoza olan ilgisini arttırırlar. GKA₁ ve GKA₂, glukokinazın nükleustan sitoplazmaya translokasyonuna neden olur^{97,98}, ancak glukokinazın glukokinaz regülatör proteininden ayrılmasına bir etkileri olmaz⁹⁸. GKA₁, glukokinazın ilgisini yarışmalı inhibitörlerden olan mannoheptüloza arttırırken, bir başka inhibitör olan palmitoil Co-A ve glukokinaz regülatör proteinine olan ilgisini etkilemez. Rat karaciğerinde, insan karaciğerinde ve insan β

hücrelerinde aynı benzer aktiviteyi gösteren glukokinaz aktivatörleri mukayese edildiğinde GKA₂'nin GKA₁'den daha güçlü bir etkiye sahip olduğu gözlenmiştir⁹⁸.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda farklı glukokinaz aktivatörleri de keşfedilmiştir. 2-(S)-cyclohexyl-1-(R)-(4-methanesulfonylphenyl)-cyclopropanecarboxylic acid thiazol-2-ylamide (LY2121260), bu aktivatörlerden biridir. Bu aktivatör glukokinaz aktivitesini, enzimin allosterik bölgesine bağlanarak artırır. LY2121260, pankreatik hücrelerde insülin sekresyonunu glukozla bağımlı olarak stimüle eder ve hepatositlerde glukoz kullanımını artırır¹⁰⁹.



Şekil 12. GK'nın LY2121260 ile aktivasyonu. **A.** Farklı glukoz konsantrasyonlarında, 10μM LY2121260 yokluğunda (●) ve varlığında (○) gözlenen GK aktiviteleri. **B.** 2mM (○) ve 10 mM (●) glukoz konsantrasyonunda GK'nın LY2121260 tarafından doza bağımlı aktivasyon eğrisi¹⁰⁹

2.4.6. Tiroid Hormonları ve Glukokinaz

Tiroid hormonları, glukoz turnoverını hızlandırmak suretiyle kan glukoz düzeyinin regülasyonuna katkıda bulunurlar. Tiroid hormonlarının, karaciğerde glukoz kullanım hızını stimüle eden mekanizması, farklı tiroid durumlarının glukokinaz gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin incelenmesiyle belirlenmiştir¹⁵. Tiroid hormonlarının fizyolojik oranları, in vivo ve in vitro koşullarda hepatik glukokinazın indüksiyonunda

esansiyel faktördür^{15,16}. Ratlarda plazma triiodotironin konsantrasyonu, doğumdan sonra 5. ile 25. gün arasında maksimal düzeye gelinceye kadar derece derece artmaktadır¹¹⁰.

Tiroid hormonları glukokinaz gen transkripsiyon hızını, fizyolojik döngüsel konsantrasyonları dahilinde hızlıca artırır^{15,17-19}. Döngüsel triiodotironin seviyeleri, artan karbonhidrat tüketimi ile birlikte gözlenir, bu durum glukokinaz aktivitesinin indüksiyonunu provoke eder²¹. Tiroid hormonlarının, glukoz kullanımının regülasyonunda oldukça önemli bir etkisi vardır. Rat karaciğerinde glukokinaz ekspresyonu, sentezi ve degradasyonu insülin, glukagon, glukokortikoidler ve tiroid hormonlarını içeren çoklu hormonal kontrol altındadır^{15,16}. Transkripsiyonal evrede insülin tarafından indüklenir¹⁷ ve pretranslasyonel evrede ikincil mesajcı cAMP yoluyla glukagon tarafından baskılanır^{15,17-20}. Ayrıca besin alımından sonra ve besin alımının devamında glukokinaz aktivitesinin maksimal cevabı sadece glukokortikoidlerin^{15,20} ve tiroid hormonlarının varlığında meydana gelir^{16,22}.

Karaciğerde metabolizmanın regülasyonunda tiroid hormonlarının görevlerinden biri, lipogeneze katılan enzimlerin düzenlenmesinin indüksiyonunda görev almaktır¹¹¹⁻¹¹⁴. Glikolizin ilk basamağında glukozun fosforilasyonu ve glukozun yağ asitlerine dönüşümü için gerekli olan glukokinaz aynı zamanda lipogenik bir enzim olarak görülebilir. Bu nedenle tiroid hormonlarının glukokinaz indüksiyonu üzerinde etkileri beklenir. Aslında glukokinaz gen ekspresyonunun regülasyonu tiroid hormonları tarafından ayarlanan insülin ile sağlanır^{15,22}. Tiroid hormonları, glukokinazın insülin tarafından regülasyonuna izin verir. T₃, hepatik glukokinaz transkripsiyonunu direkt stimüle eder¹⁵. Tiroid hormonları, insülin sekresyonunu direkt olarak etkilemezler¹¹⁵.

T₃'ün subfizyolojik konsantrasyonları glukokinaz gen ekspresyonunda anlamlı bir artışa neden olur. Bu da tiroid hormonlarının fizyolojik döngüsel konsantrasyonlarının genin değişiminde ve dolayısıyla glukoz kullanımının regülasyonunda önemli bir rolü olduğunu desteklemektedir. T₃, glukokinaz gen ekspresyonu üzerindeki etkisini sadece transkripsiyon seviyesinde gösterir¹⁵.

Tiroid hormonunun, in vivo glukokinaz gen transkripsiyon artışına etkileri farklı mekanizmalarla açıklanmıştır¹⁵:

1- T₃, diğer hormonların (veya reseptörlerinin) seviyelerini etkileyerek glukokinaz üzerine etki eder, böylece glukokinaz ekspresyonunu indirekt olarak regüle etmiş olur. Farklı durumlarla da karşılaşılabilmektedir, örneğin hipotiroid ratlarda düzenlenen insülin seviyeleri aktivitesine etki etmez.

2- T₃, selüler seviyede indirekt mekanizmalar yoluyla etkisini gösterebilir ki bu şöyledir, T₃ responsive (cevap) genlerinin transkripsiyonunu etkinleştiren aracı polipeptidlerin sentezini indükleyen ikinci mesajcı sistemleri aktive ederek bu etkisini gösterir.

Glukokinaz transkripsiyon ve aktivasyonunun hormonal kontrolü, karaciğer ve pankreasta farklılık gösterir. Karaciğerde T₃'ün enzim üzerinde stimüle edici etkisi bilinmektedir. Tiroidektomi uygulanan ratlarda glukokinaz aktivite ve mesajında azalma söz konusudur^{15,20,22}. T₃'ün hepatik glukokinaz üzerindeki stimülatör etkisinin aksine, RIN-m5F hücrelerinde glukokinaz enzim aktivitesi üzerine etki yapmamakta ve glukokinaz mRNA seviyelerinin azalmasına neden olmaktadır^{115,116}. T₃'ün glukokortikoidlerin indüklediği glukokinaz aktivitesine izin veren etkisi hepatositlerde gözlenirken, pankreasta böyle bir durum söz konusu değildir¹¹⁵.

T₃'ün glukokinaz aktivitesi ve mRNA'sı üzerindeki etkilerinde retinoik asitin (vitamin A'nın aktif metaboliti) de varlığından bahsedilebilir²¹. Glukokinaz mRNA birikiminin triiodotironin ve retinoik aside cevabı, insüline olan cevabından farklıdır¹¹⁷. Triiodotironin ve retinoik asit varlığında hepatositlerde, glukokinaz mRNA yarı ömrü ($t_{1/2}$, 27-38 dak), insülin varlığındaki yarı ömrüne ($t_{1/2}$, 90 dak) göre daha hızlıdır¹¹⁷. Bu durum, transdüksiyon yollarının farklı olduğunu desteklemektedir. Karaciğer glukokinaz gen ekspresyonunun, triiodotironin veya retinoik asit tarafından indüklenmesi olasıdır^{21,116}. Bu bileşikler kendi reseptörleri tarafından, özellikle transkripsiyonel seviyede etki ederler²¹.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı araştırma laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1.Kullanılan Gereçler

3.1.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada Sağlık Bakanlığı Hıfsızsihha kurumu hayvan yetiştirme bölümünden sağlanan 200-250 gr ağırlığındaki Sprague Dawley erkek ratlar kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Aletler

Santrifüj (Damon IEC,B-20 A soğutmalı, BHG Hermle Z 380)

Homojenizatör (Virtis -Virtishear)

Spektrofotometre (Shimatzu UV-1601)

Ultrasantrifüj (Sorvell)

Tiroit ölçümü (Tosoh)

HbA1c (olympus)

Hassas Terazi (Shimadzu, AX 220)

pH-metre (Jenway 3510)

Glucometre II (Ames)

Glucostix (Ames)

Vortex (Heidolph Reax 2000)

Manyetik Karıştırıcı

Kuartz küvet

Sıvı Azot Tankı

Deep Freezer

Otomatik mikro pipetler

Biyokimya anabilim dalı araştırma laboratuvarında biyokimyasal analizler için bulunan gerekli malzemeler kullanıldı.

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Streptozotosin, Folin & ciocaltu's fenol reaktifi, BSA (Bovine serum albumin), EDTA, Glisilglisin, Magnezyum sülfat, ATP (disodyum tuzu), NADP⁺, Glukoz, Potasyum klorür, Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, N-asetilsistein; Sigma kullanıldı.

Sodyum Karbonat, Sodyum Hidroksit, Na-K tartarat, Bakır Sülfat; Merck kullanıldı.

Ketamin Hidroklorid (ketalar); Eczacıbaşı kullanıldı.

İnsülin; Nova Nordiks kullanıldı.

3.2. Uygulanan Yöntemler

3.2.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması

Ratlarda diabet oluşturmak amacıyla streptozotosin (55mg/kg) distile suda eritilerek intraperitoneal olarak uygulandı. Uygulamadan iki, üç gün sonra poliüri, polidipsi, glikozüri gözlemlendi. Kan glukozu 300 mg/dl ve üzerindeki ratlar diabetik olarak kabul edildi. Çalışma her grupta 10 adet olmak üzere toplam 60 adet rat kullanılması planlanmıştır. 8 grup oluşturuldu.

Grup 1: Kontrol (K): Ratlar standart şartlarda 5 hafta boyunca izlendi.

Grup 2: Diabet (D): İntraperitoneal tek doz streptozotosin (55mg/kg) enjekte edilerek ratlarda diabet oluşturuldu ve 5 hafta boyunca izlendi.

Grup 3: Diabet + İnsülin (D+İ): Ratlara intraperitoneal tek doz streptozotosin (55mg/kg) enjekte edilerek diabet oluşturuldu ve 5 hafta boyunca insülin (7-10U/kg/gün,sc) verilerek izlendi.

Grup 4: Tiroidektomi (T): Tiroidektomi (21 gün sonra) takiben 5 hafta boyunca standart şartlarda takip edildi.

Grup 5: Diabet + Tiroidektomi (D+T): Tiroidektomi takiben 21gün sonra intraperitoneal tek doz (55mg/kg) streptozotosin ile diabet oluşturuldu ve 5 hafta boyunca takip edildi.

Grup 6: Diabet + Tiroidektomi + İnsülin (D+T+İ); Tiroidektomi + Diabet oluşturulan ratlara 5 hafta boyunca insülin (7-10U/kg/gün,sc) verilerek izlendi.

Grup 7: Tiroidektomi + Diabet + İnsülin + Yarım doz T_4 (T+D+İ+ $T_4/2$): Tiroidektomiyi takiben 21 gün sonra intraperitoneal tek doz streptozotosin (55mg/kg) enjekte edilerek diabet oluşturuldu ve 5 hafta boyunca insülin (7-10U/kg/gün,sc) ve yarım doz T_4 (2,5µg/kg) verilerek izlendi.

Grup 8: Tiroidektomi + Diabet + İnsülin + Tam doz T_4 (T+D+İ+ T_4): Tiroidektomiyi takiben 21 gün sonra intraperitoneal tek doz streptozotosin (55mg/kg) enjekte edilerek diabet oluşturuldu ve 5 hafta boyunca insülin (7-10U/kg/gün,sc) ve tam doz T_4 (5 µg/kg) verilerek izlendi.

Daha sonra hayvanlara ketalar anestezisi verilerek karaciğer dokuları alındı. Dokular sıvı nitrojenle dondurularak -70 derecede çalışma süresine kadar saklandı.

NOT: Tiroidektomi için gerekli olan cerrahi operasyon Prof Dr. Atilla Engin tarafından yapıldı.

3.2.2. Metodların Uygulanması

3.2.2.1. Doku Protein Tayini

Metot: Lowry metoduyla, sığır serum albümini standart kabul edilerek çalışıldı¹¹⁸.

Reaktifler: Sodyum Karbonat, Na-K tartarat, Bakır sülfat, Sodyum hidroksit, Folin& ciocaltu's fenol reaktifi, Bovin Serum Albümin (BSA) kullanıldı.

Metodun Uygulanışı: Standart, Bovin Serum Albümin 1 mg/ml olacak şekilde hazırlandı. 10 µl süpernatant + 90 µl distile su + 2 ml reaktif karışımı ilave edildi ve 20 dakika oda ısında bekletildi. Sonra 200µl folin eklendikten sonra vortexlenen karışım 40 dakika oda ısında beklendikten sonra 750 nm'de köre karşı spektrofotometrede okutuldu.

Hesaplama; $DU/DS \times \text{Std kons.} = \text{mg/ml}$ olarak verilir.

DU = numune optik dansitesi

DS = standart optik dansitesi

Std. Kons. = standart konsantrasyonu

3.2.2.2. Serum Tiroid ve HbA1c Tayini

Serum tiroid düzeyi Tosoh Immunoassay Sistemi (kemiluminisans immunassay) ile ölçüldü. HbA1c düzeyi ise Olympus Otoanalizörü ile, hemolize tam kanın türbidimetrik inhibisyon immunassay esasına göre tayin edildi.

3.2.2.3. Karaciğer Dokusunda Glukokinaz Enzim Aktivitesi Tayini^{119,120,122,123,125}

Prensip : Glukokinaz tarafından fosfatlanan glukoz, glukoz-6-fosfat olarak, deney ortamına eklenen glukoz-6-fosfat dehidrogenaz tarafından kullanılırken NADP de redükte olur. NADP 340 nm’de takip edilir. Bu miktar glukokinaz enzim aktivitesi ile ilişkilendirilir.

Karaciğer Dokusunun Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler¹²¹

0.15 M KCl pH 7.0 olacak şekilde :

0.004 M MgSO_4 , 0.004 M EDTA, 0.004 M N-asetilsistein içerir.

Glukokinaz Metodu İçin Karaciğer Dokusunun Elde Edilmesi

Her bir rat karaciğer homojenatı (%33, w/v) 2 hacim tampon ile Virtishear homojenizatöründe hazırlanır.

Bu ham homojenat 40000 X g de 25 dakika santrifüj edildikten sonra üst faz 125000 X g de 60 dakika daha santrifuj edilir. Üst faz glukokinaz enzim tayini yapmak için Walker ve Parry metoduna göre kullanılır¹¹⁹. Değişik miktarlarda substrat ve tampon içeren çözeltiye farklı miktarlarda süpernatant ilave edilerek maksimum absorbans bulunur.

Glukokinaz Metodunda Kullanılan Çözeltiler

Glisilglisin tamponu, 0.25 M pH 7.5

Magnezyum sülfat, 0.075 M

ATP (disodyum tuzu), 0.075 M pH 7.0 de nötralize edildi

NADP⁺, 0.0075 M

Glukoz, 0.75 M

Potasyum klorür, 1.0 M

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz 40 ünite/ml olacak şekilde seyreltildi.

Karaciğer Dokusunda Glukokinaz Aktivite Tayini

Numunenin eklendiği karışımın içeriği;

0.3 ml glisilglisin tamponu,

0.15 ml magnezyum sülfat,

0.1 ml ATP,

0.1ml NADP⁺,

0.15 ml potasyum klorür,

0.1 ml glukoz,

0.4 ünite glukoz-6-fosfat dehidrogenaz.

Bilinen miktar enzim (80 veya 50 µL) daha önce hazırlanmış olan çözeltileri içeren

Kuartz tüplere eklendi ve total hacim tampon ile 1.5 ml'ye oda sıcaklığında tamamlandı.

340 nm'de numuneye, tampona karşı 10 dakikada 20 okuma yaptırıldı.

340 nm'de gözlenen aktivite artışı 1 µmol/dakikada fosforile olan glukozun glukokinaz aktivitesine karşılık gelmektedir. Bu süreçte sadece 1 mol NADP⁺ , 1 mol glukoz fosforilasyonu için redükte olmaktadır.

6-fosfoglukonat dehidrogenaz aktivitesinin varlığı herbir fosforile olan glukoz için 2 mol NADP⁺ redükte etmektedir.

Ham doku hazırlanması ayrıca düşük-Km hekzokinaz aktivitesi kapsamaktadır. Bunun için de bir düzeltme yapılır ve 0.2 ml 0.00375 M glukoz, karışım içeren kuartz tüplere eklenir ve bulunan aktivite değeri çıkarılır (anlamlı değer bulunmadı) .

ATP hariç tüm çözeltileri içeren tüplerde gözlenen çok düşük optik dansite artışı için, numunelerde düzeltme yapılabilir ¹¹⁹ .

1 ünite aktivite = 1 μ mol glukoz/dakika da normal koşullardaki fosforilasyonunu katalizleyen enzim miktarıdır.

Spesifik aktivite = unite/mg protein'dir, sonuçlar mU/mg.protein olarak verildi.

3.2.2.4. Sonuçların Analizi

Elde edilen veriler, bilgisayarda (SPSS 11,0 for Windows) istatistik paket programı kullanılarak analiz edildi. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata (SD) olarak verildi. Değerler karşılaştırılırken Mann Whitney U testi kullanıldı.

4. BULGULAR

Bu çalışmada, streptozotosin ile diabet oluşturulmuş ratlarda, tiroid hormonlarının, glukokinaz enzim aktivitesi üzerine olası etkilerini incelemeyi amaçladık. Tüm gruplara ait ağırlık (g), kan glukoz (mg/dl), HbA1c (%), serum serbest T₃-T₄ (ng/ml) ve karaciğer doku glukokinaz enzim aktivitesi (mU/mg protein) değerlerinin istatistiksel sonuçları (ortalama±standart hata) Tablo 4,5,6'da sunulmuştur.

Tablo 4.Ratların ağırlık (g), kan glukoz (mg/dl) ve HbA1c (%) değerleri

Gruplar	AĞIRLIK (g)	KAN GLUKOZU (mg/dl)	HbA1c (%)
Kontrol n=10	235.4 ± 35.3 ^b	108.3 ± 5.6	4.8 ± 0.3
DM n=10	174.2 ± 23.2 ^{ac}	500.1 ± 0.0 ^a	12.1 ± 0.6 ^{ac}
DM + I n=7	259.3 ± 24.6 ^{abc}	110.0 ± 13.3 ^{bc}	4.2 ± 0.0 ^{abc}
T n=10	338.5 ± 36.4 ^{abc}	105.8 ± 12.4 ^{bc}	4.6 ± 0.2 ^{bc}
T + DM n=8	235.6 ± 22.7 ^b	487.4 ± 35.7 ^a	6.0 ± 0.8 ^{ab}
T+ DM+ I n=9	239.5 ± 33.0 ^b	109.2 ± 9.0 ^{bc}	5.3 ± 0.8 ^{ab}
T+ DM+ I+T ₄ /2 (2.5µg/kg) n=4	225.0 ± 5.7 ^b	92.7 ± 4.0 ^{bc}	4.7 ± 0.1 ^{bc}
T+ DM+ I+T ₄ (5µg/kg) n=6	232.3 ± 2.5 ^b	92.6 ± 3.0 ^{bc}	4.9 ± 0.1 ^{bc}

a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (p<0.05)

b: DM grubu ile karşılaştırıldığında (p<0,05)

c: T+ DM grubu ile karşılaştırıldığında (p<0,05)

DM: Diabetes Mellitus, İ: insülin, T: Tiroidektomi

Tablo 5. Ratların serum serbest T₃ ve T₄ değerleri (ng/ml)

Gruplar	Serum Serbest T ₃ Seviyeleri (ng/ml)	Serum Serbest T ₄ Seviyeleri (ng/ml)
Kontrol n=10	3.8 ± 0.6 ^{bc}	1.5 ± 0.2 ^{bc}
DM n=10	1.3 ± 0.3 ^a	0.59 ± 0.2 ^a
DM + I n=7	4.3 ± 0.8 ^{bc}	2.2 ± 0.3 ^{bc}
T n=10	1.4 ± 0.08 ^a	0.7 ± 0.2 ^a
T+ DM n=8	1.4 ± 0.3 ^a	0.3 ± 0.2 ^{ab}
T+ DM+ I n=9	2.6 ± 0.9 ^{bc}	0.5 ± 0.2 ^a
T+ DM+ I+ T ₄ /2 (2.5µg/kg) n=4	2.55 ± 0.09 ^{abc}	3.3 ± 0.2 ^{abc}
T+ DM+ I+ T ₄ (5µg/kg) n=6	3.5 ± 0.2 ^{bc}	3.7 ± 0.2 ^{abc}

a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (p<0.05)

b: DM grubu ile karşılaştırıldığında (p<0,05)

c: T+ DM grubu ile karşılaştırıldığında (p<0,05)

DM: Diabetes Mellitus, İ: insülin, T: Tiroidektomi

Tablo 6. Karaciğer dokusu glukokinaz enzim aktivitesi değerleri (mU/mg protein)

Gruplar	GK enzim aktivitesi (mU/mg protein)
Kontrol n=10	20.91 ± 4.46 ^{a,b}
DM n=10	10.89 ± 2.89 ^{a,b,c}
DM+İ n=7	14.69 ± 3.21 ^{a,b}
T n=10	17.63 ± 4.22 ^{a,b}
T+DM n=8	17.74 ± 5.33 ^b
T+DM+İ n=9	30.58 ± 4.54 ^{a,b,c}
T+DM+İ+T ₄ /2 (2,5µg/kg) n=4	33.86 ± 9.01 ^{a,b,c}
T+DM+İ+T ₄ (5µg/kg) n=6	62.29 ± 15.87 ^{a,b,c}

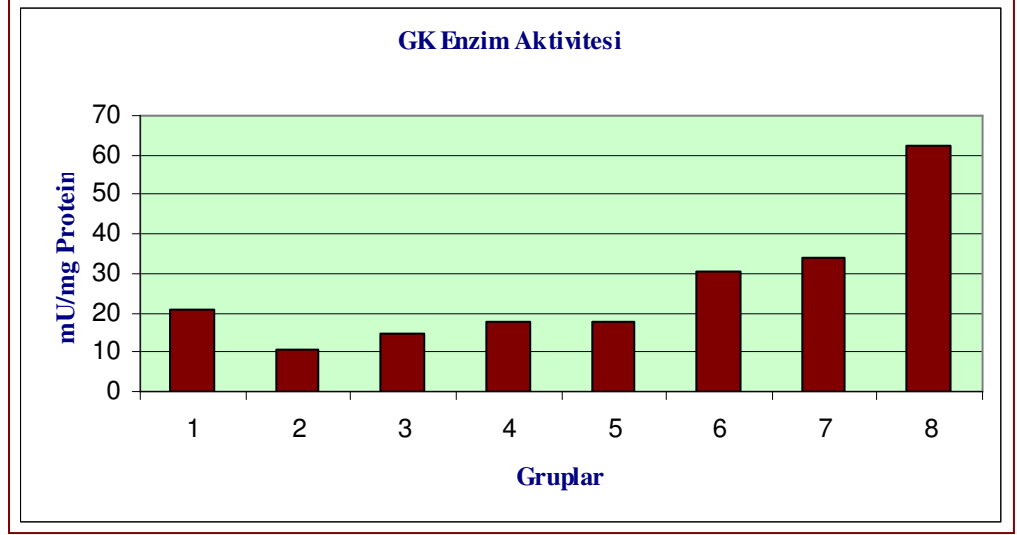
a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (p<0.05)

b: DM grubu ile karşılaştırıldığında (p<0,05)

c: T+ DM grubu ile karşılaştırıldığında (p<0,05)

DM: Diabetes Mellitus, İ: insülin, T: Tiroidektomi

Grafik 1.Karaciğer dokusu glukokinaz enzim aktivitesi değerleri (mU/mg protein)



1:Kontrol, 2:DM, 3:DM+İ, 4:T, 5:T+DM, 6:T+DM+İ, 7:T+DM+İ+T₄/2, 8:T+DM+İ+T₄

DM: Diabetes Mellitus, İ: insülin, T: Tiroidektomi

5. TARTISMA VE SONUC

Bu çalışmada, tiroidektomi yapılan ve streptozotosin (stz) ile kimyasal olarak diabet oluşturulan ratların karaciğer dokularında glukokinaz enzim aktiviteleri ölçülerek, tiroid hormonlarının enzim aktivitesi üzerine olası etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

İntraperitoneal streptozotosin enjekte edilen ratlarda iki üç gün içinde diabet semptomları olan poliüri, polidipsi, polifaji ve glukozüri gözlenmeye başlandı. Kan glukoz düzeyleri 400 mg/dl ve üzeri olması ile diabetin olduğu saptandı. Bu durum HbA1c düzeylerinin yüksek olması ile de desteklendi.

Diabetes Mellitusta tiroid hormon konsantrasyonlarında farklılıklar olduğu görülmüş ve diabetin tiroid fonksiyonlarında değişikliklere neden olabileceği düşünülmüştür³⁻⁵. Deneysel olarak streptozotosin ve alloxan ile diabet oluşturulmuş hayvanlarda T₃ seviyesinin önemli derecede düşüş gösterdiği ve bu düşüşün insülin tedavisi ile normale döndüğü belirtilmiştir^{4,5}. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, diabette tiroid hormonlarının karbohidrat metabolizmasındaki bazı anahtar enzim aktivitelerinde değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir³.

Glukokinaz, glukoz homeostazında ve karbohidrat metabolizmasının regülasyonunda önemli rol oynayan bir enzimdir. Glukokinazın, Matschinsky ve Ellerman'ın yaptığı çalışma sonucunda, insülin üreten pankreatik β hücrelerinde moleküler glukoz alıcısı olarak rol oynadığı, karaciğerde glukozun glikojen formunda depolanmasında enzimatik bir adım olarak görev yaptığı bildirilmiştir^{9,66}. Pankreatik glukokinaz, plazma glukoz düzeyleri tarafından kontrol edilirken^{14,72} karaciğer glukokinazı insülin tarafından regüle edilir^{14,18}. Hepatik glukokinazın, glukoz kullanımı ve glikojen sentezinde oldukça güçlü etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Glukokinaz ekspresyonundaki ufak bir değişikliğin, kan glukoz konsantrasyonunda ölçülebilir bir bozunmaya yol açtığı bildirilmiştir^{10,13}. Yapılan çalışmalar, glukokinaz overekspresyonunun, intraselüler glukoz 6-fosfat düzeylerini arttırdığını ve bu durum sonucunda hem glikoliz hem de glikojen sentezinin tetiklendiğini desteklemektedir.¹⁰

Rat karaciğerinde glukokinaz ekspresyonu, sentezi ve degradasyonu insülin, glukagon, tiroid hormonları ve glukokortikoidleri içeren çoklu hormonal kontrol altındadır^{15,16}. Transkripsiyonel evrede insülin tarafından indüklenir¹⁷ ve pretranslasyonel evrede cAMP yoluyla glukagon tarafından baskılanır^{15,17-20}. Ayrıca besin alımından sonra glukokinaz aktivitesinin maksimal cevabı sadece tiroid hormonlarının ve glukokortikoidlerin varlığında meydana gelir^{16,22}. Diabetik ratlara insülin verilmesinin glukokinaz gen transkripsiyon hızını arttırdığı gösterilmiştir. Glukoz geri beslemesinin ilk birkaç saatindeki glukokinaz mRNA'sının artışının insülinin gen transkripsiyonu üzerindeki etkisinden kaynaklandığı söylenmektedir. Transkripsiyon hızı ile sitozolik glukokinaz mRNA seviyeleri arasında bir korelasyon mevcuttur^{15,20,83}.

Spence ve arkadaşlarının²² yaptığı in vitro çalışmada, tiroidektomize ratlardan elde edilen karaciğer hücreleriyle oluşturulan kültür ortamındaki hepatositler, önce T₃ ile tedavi edilmiş ve daha sonra insülin veya deksametazon eklenmiştir. Bu üçlü etkiyle hepatositlerde artan glukokinaz aktivitesi gözlenmiştir. Bu etki, insülin veya deksametazonun tek başlarına olan etkilerinden çok daha fazladır. Bu bulgular, hepatositlerde glukokinaz enzim aktivitesi regülasyonunun kompleks bir çoklu hormonal kontrol altında olduğunu desteklemektedir.

Karaciğerde metabolizmanın regülasyonunda tiroid hormonlarının görevlerinden biri, lipogeneze katılan enzimlerin düzenlenmesinde görev almaktır¹¹¹⁻¹¹⁴. Glikolizin ilk basamağında glukozun fosforilasyonu ve glukozun yağ asitlerine dönüşümü için gerekli olan glukokinaz, aynı zamanda lipogenik bir enzim olarak da kabul edilebilir. Bu nedenle de tiroid hormonlarının glukokinaz indüksiyonu üzerinde etkileri olasıdır.

Glukokinaz gen ekspresyonunun regülasyonunda tiroid hormonlarının rolü olabileceğine ilişkin az sayıda literatür bulunmaktadır^{15,22}. T₃'ün subfizyolojik konsantrasyonları, glukokinaz gen ekspresyonunda anlamlı bir artışa neden olur. T₃ etkisini transkripsiyon seviyesinde gösterir¹⁵.

Yapılan çalışmalar sonucunda, karaciğerde T_3 'ün glukokinaz üzerinde stimüle edici etkisi olduğu düşünülmektedir. Tiroidektomi uygulanan ratlarda glukokinaz aktivite ve mesajında azalma gözlenmiştir^{15,20,22}. Biz de çalışmamızda, bu literatür bilgisiyle uyumlu olarak tiroidektomi uygulanmış olan grupta enzim aktivitesinin azaldığını gözlemledik.

Narkewicz ve arkadaşlarının¹²⁴ yaptığı çalışmada, glukokinaz aktivitesinin ve mRNA'sının, rat karaciğerinde ilk olarak doğumdan yaklaşık 14 gün sonra ortaya çıktığı, ve yüksek karbohidrat diyetini takiben, aktivitesinin çok hızlı bir şekilde arttığı ve karaciğer glukokinazının normal gelişimi için tiroid hormonları ve glukokortikoidlerin de gerekli olduğu belirtilmiştir.

Hoppner ve arkadaşları¹⁵ tiroid hormonlarının rat karaciğerinde, glukokinaz gen transkripsiyonuna etkilerini incelemişlerdir. Öncelikle aç bırakılan ratlarda glukokinaz mRNA düzeylerinin minimum seviyede olduğu ancak, karbohidrat bakımından zengin bir beslenmeden sonra glukokinaz mRNA'sının hızlı bir şekilde yükseldiği gözlenmiştir. Beslenmeden birkaç saat sonra ötiroid ratlarda insülin düzeyleri, tiroidektomi uygulanmış olan ratların insülin seviyelerine kıyasla daha yüksektir. Hipotiroidik ratlara intramusküler insülin enjeksiyonu yapılarak insülin seviyeleri artırılmıştır, ancak buna rağmen glukokinaz aktivitesinde herhangi bir düzelme gözlenmemiştir. T_3 verilmesi ile kısa bir zamanda glukokinaz mRNA seviyelerinde bir artışın söz konusu olduğu ve zamana bağlı olarak artışın devam ettiği bildirilmiştir. Bu bulgular, bizim diabetik tiroidektomili grubumuzda insülin tedavisinin etkin olmadığını gösteren sonuçlarımızla uyum içerisinde görünmektedir.

Bizim çalışmamızda streptozotosin ile diabet oluşturulmuş ve tiroidektomi yapılan ratların karaciğer dokularında glukokinaz enzim aktivitesi incelenmiştir. Diabetik grupta glukokinaz enzim aktivitesinde kontrole göre anlamlı bir düşüş gözlenmiş, insülin tedavisinden sonra bu değişikliklerin bir miktar düzeldiği görülmüştür. Buna karşın tiroidektomili diabetik ratlarda insülin tedavisinin enzim aktivitesini regüle etmediği saptanmıştır. İnsülin verilmiş tiroidektomili diabetik gruba farklı dozlarda (5µg/kg ve 2,5

$\mu\text{g/kg}$) tiroid hormonu uygulanmasıyla, enzim aktivitesinin doza bağı olarak regüle edilebileceği düşünülmektedir.

Bu bulgular sonucunda tiroidektomize edilmiş diabetik rat karaciğer dokusu glukokinaz enzim aktivitesindeki değişiklikler üzerine insülinin düzeltici etkisine, tiroid hormonlarının olası katkısının olabileceği düşünülmektedir.

6.ÖZET

Çalışmamızda, streptozotosin ile diabet oluşturulmuş ve tiroidektomi yapılan ratların karaciğer dokularında glukokinaz enzim aktivitesi incelendi.

Beş haftalık diabetik ratların karaciğer dokusunda, glukokinaz enzim aktivitesinde kontrol grubuna göre anlamlı bir düşüş gözlemlendi. ($p<0,05$) İnsülin tedavisinden sonra bu değişikliklerin bir miktar düzeldiği izlendi.

Beş haftalık tiroidektomili diabetik ratların karaciğer dokusunda insülin tedavisinin glukokinaz enzim aktivitesini regüle etmediği gözlemlendi. Ancak insülin verilmiş tiroidektomili diabetik ratlara farklı dozlarda ($5\mu\text{g/kg}$ ve $2,5\mu\text{g/kg}$) tiroid hormonu uygulanmasıyla enzim aktivitesinin regüle edildiği saptandı.

Sonuç olarak bu çalışmada, diabetik rat karaciğer dokusunda, glukokinaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişikliklerin insülin tedavisi ile normale dönüşünde tiroid hormonlarının olası etkilerinin olabileceği düşünüldü.

7.SUMMARY

In our study, our aim was to investigate the glucokinase enzyme activities of liver tissues of streptozotocin diabetic, thyroidectomized and insulin and thyroid hormone treated rats.

Our results showed that the glucokinase enzyme activities were decreased in 5 week-old diabetic rat liver tissues when compared with control group. Moreover it was observed that the enzyme activities were slightly regulated by insulin treatment.

On the other hand, no changes were observed on the enzyme activities of 5-week-old thyroidectomized diabetic rat liver tissues after the insulin treatment but they were regulated by the various doses of thyroid hormone treatments.

As a result we can conclude that the normalised diabetic induce changes in liver tissues of glucokinase enzyme activities after the insulin treatment may the depend on the possible contributions of thyroid hormones.

8.KAYNAKLAR

1. Burtis, C.A., Ashwood E.R.: Tietz Textbook of Clinical Chemistry. W.B. Saunders Company. (1998)
2. Sack, B.S.: Implications of the Revised Criteria for Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, Clinical Chemistry, 43, 2230-32. (1997)
3. Koh, H., Tsushima, M., Harano, Y.:Effect of carbohydrate intake on serum 3,5,3' Triiodothyronine response to glucose ingestion and its relation to glucose tolerance in lean non-insulin dependent diabetic patients, Arzneim-Forsch./ Drug Res, 49, 30-34. (1999)
4. Kim, S.R., Tull, E.S., Talbott, E.O., Vogt, M.T., Kuller, L.H.: A Hypothesis of Synergism: The Interrelationship of T3 and Insulin to Disturbances in Metabolic homeostasis, Med. Hypothesis. Dec., 59, 660-66. (2002)
5. Takiguchi, Y., Satoh, N., Hashimoto, H., Nakashima, M.: Reversal Effect of Thyroxine on Altered Vascular Reactivity in Diabetic Rats, J. Cardiovasc. Pharmac., 13, 520-24. (1984)
6. Noyan, A.: Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji, 12. Baskı, 1007-17, Ankara. (2000)
7. Duckworth, W.C.: İnsülin Degradation: Mechanisms, Products and Significance, Endocrine Reviews, 9, 319-45. (1988)
8. Jolly, S.R., Kane, W.J., Bailie, M.B., Abrams, G.D., Lucchesi, B.R.: Canine myocardial reperfusion injury: its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase, Cric. Res., 54 (3), 277-85. (1984)
9. Matschinsky, F.M., Magnuson, M.A., Zelent, D., Jetton, T.L., Doliba, N., Han, Y., Taub, R., Grimsby, J.: The network of glucokinase-expressing cells in glucose

- homeostasis and the potential of glucokinase activators for diabetes therapy, *Diabetes*, 55, 1-12. (2006)
10. Postic, C., Shiota, M., Magnuson, M.A.: Cell-specific roles of glucokinase in glucose homeostasis, *Recent. Prog. Horm. Res.*, 56, 195-217. (2001)
 11. Parsa, R., Decaux, J.F., Bossard, P., Robey, B.R., Magnuson, M.A., Granner, D.K., Girard, J.: Induction of the glucokinase gene by insulin in cultured neonatal rat hepatocytes. Relationship with DNase-I hypersensitive sites and functional analysis of a putative insulin-response element, *Eur. J. Biochem.*; 236, 214-21. (1996)
 12. Grimsby, J., Coffey, J.W., Dvornozniak, M.T., Magram, J., Li, G., Matschinsky, F.M., Shiota, C., Kaur, S., Magnuson, M.A., Grippo, J.F.: Characterization of glucokinase regulatory protein-deficient mice, *J. Biol. Chem.* 275, 7826-31. (2000)
 13. Ferre, T., Riu, E., Bosch, F., Valera, A.: Evidence from transgenic mice that glucokinase is rate limiting for glucose utilization in the liver, *FASEB J.*, 10, 1213-8. (1996)
 14. Magnuson, M.A.: Glucokinase gene structure: functional implications of molecular genetic studies, *Diabetes*, 39, 523-27. (1990)
 15. Hoppner, W., Seitz, H.J.: Effect of thyroid hormones on glucokinase gene transcription in rat liver, *J. Biol. Chem.*, 264 (34), 20643-7. (1989)
 16. Sibrowski, W., Muller, M.J., Seitz, H.J.: Effect of different thyroid states on rat liver glucokinase synthesis and degradation in vivo, *J. Biol. Chem.*, 256 (18), 9490-4. (1981)
 17. Iynedjian, P.B., Gjinovci, A., Renold, A.E.: Stimulation by insulin of glucokinase gene transcription in liver of diabetic rats, *J. Biol. Chem.*, 263(2), 740-4. (1988)

18. Magnuson, M.A., Andreone, T.L., Printz, R.L., Koch, S., and Granner, D.K.: Rat glucokinase gene: structure and regulation by insulin, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86, 4838–42. (1989)
19. Iynedjian, P.B., Jotterand, D., Nouspikel, T., Asfari, M., Pilot, P.R.: Transcriptional induction of glucokinase gene by insulin in cultured liver cells and its repression by the glucagon-cAMP system, *J. Biol. Chem.*, 264 (36), 21824-9. (1989)
20. Sibrowski, W., Seitz, H.J.: Hepatic glucokinase turnover in intact and adrenalectomized rats in vivo, *Eur. J. Biochem.*, 113 (1), 121-9. (1980)
21. Decaux, J.F., Juanes, M., Bossard, P., Girard, J.: Effects of triiodothyronine and retinoic acid on glucokinase gene expression in neonatal rat hepatocytes, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 130(1-2), 61-7. (1997)
22. Spence, J.T., Pitot, H.C.: Hormonal regulation of glucokinase in primary cultures of adult rat hepatocytes, *J. Biol. Chem.*, 254 (24), 12331-6. (1979)
23. Bendich, A., Machlin, L. J., Scandurra, O., Burton, G. W., Wayner, D. D. M.: The antioxidant role of vitamin C, *Adv.Free Rad.Biol.Med.*, 2, 419-44. (1986)
24. Bennet, P.H.: Definition, Diagnosis, and Classification of Diabetes Mellitus and Impaired Glucose Tolerance, *Joslin's Diabetes Mellitus*, Thirteenth edition, 194. (1994)
25. Bingöl, G.: *Biyokimya*, 4. Baskı, 345-48, Taş kitab., Ankara. (1983)
26. Berne, R.M., Levy, M.N.: *Principles of physiology*, 504-10, USA. (1990)
27. Bloom, A., Ireland, J.: *A colour atlas of diabetes*, Second ed., 13-300, Wolfe publishing, Spain. (1992)

28. Bothwell, T.H., Charlton, R.W.: A general approach to the problems of iron deficiency and iron overload in the population at large, *Semin. Hematol.*, 19, 54-67. (1982)
29. Bhagavan, N.V.: *Medical biochemistry*, 2. Baskı, 500-797, Bartlett pub., England. (1992)
30. Chance, B., Sies, H., Boveries, A.: Hydroperoxide metabolism in mammalian organs, *Physiol. Rev.*, 59, 527-605. (1979)
31. Cavarocchi, N.C., O'Brein, J.F.: Superoxide generation during cardiopulmonary bypass: Is there a role for vitamin E?, *J. Of Surgical Research*, 40, 519-27. (1986)
32. Chaudhri, G., Clark, I.A., Hunt, N.H., Cowden, W.B., Ceredig, R.: Effect of antioxidants on primary alloantigen-induced T cell activation and proliferation, *J. Immunol.*, 137 (8), 2646-52. (1986)
33. Montgomery, R.: *Olgu Sunumlu Yaklaşım Biyokimya*, 6. Baskı, 571-574, Palme Yayıncılık, Ankara. (2000)
34. Koolman, J., Roehm K.H.: *Color Atlas of Biochemistry*, Second Edition, New York, 161- 234. (2005)
35. Peter F.H., Karam J.H., Saler P.R.: *Pancreatic Hormones and Diabetes Mellitus in "Basic and Clinical Endocrinology"* Third Edition, Prentice-Hall International Inc. Toronto, 592-650. (1992)
36. Virji, M.A.G., Vassalli, J.D.: Plasminogen activator of islets of Langerhans. Modulation by glucose and correlation with insulin production, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77, 875. (1984)
37. Flier, J.S., Haris, M., Hollenberg, A.N.: Leptin, nutrition and the thyroid: the why, the wherefore, and wiring, *The journal of clinical investigation*, 105 (7). (2000)

38. Nelson, W.E., Vaughan, V.C., Behrman, R.E.: Nelson Textbook of Pediatrics, Thirteenth Edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia. (1987)
39. Karam, J.H.: Basic and Clinical Endocrinology: Pancreatic Hormones and Diabetes Mellitus, Beşinci Baskı, Greenspan FS, Strewler GJ(ed) Appleton-Lange, Stamford, 595-663. (1997)
40. Kayaalp, O.: Tıbbi Farmakoloji, Cilt 3, Feryal Matbacılık, Dördüncü Baskı, 2354-2420, Ankara. (1993)
41. Hansen, D., Bennedbaek, F., Hansen, L.K.: Thyroid function, morphology and autoimmunity in young patients with insülin-dependent diabetes mellitus, Europ. J. Endoc., 140, 512-18. (1999)
42. Comportı, M.: Lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury, Lab. Invest., 53, 599-623. (1985)
43. Gedik, O.: Diabetes mellitus, Mezuniyet sonrası eğitim kursu kitabı, Hacettepe üni. Yayınları, 7. (1997)
44. Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V,W,: Harper's Illustrated Biochemistry, Twenty-Sixth Edition, 439-448. (2003)
45. Cecil, Textbook of Internal Medicine 2, 18 th. Edition, 1315-18. (1988)
46. Francis, S., Greenspan: Basic and Clinical Endocrinology, Third Edition. (1991)
47. Esterbauer, H., Schaur, R.J.: Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes, Free. Radic. Biol. Med., 11, 81-128. (1991)

48. Janoff, A., et. al.: Proteases, antiproteases and oxidants: pathways of tissue injury during inflammation. In: Cotran, R.S., Kaufman, N., Majno, G., eds. *Current Topics in inflammation and Infection*, Baltimore: Williams & Wilkins Company, 62. (1982)
49. Oppenheimer, J.H.: Thyroid hormone action at the cellular level. *Science*, 203(4384), 971- 79. Review. (1979)
50. Latham, K.R., Ring, J.C., Baxter, J.D.: Solubilized nuclear “receptors” for thyroid hormones, *J. Biol. Chem.*, 251(23), 7388-97. (1976)
51. Jump, D.B., Oppenheimer, J.H.: Thyroid hormone receptor-containing fragment released from chromatin by deoxyribonuclease I and micrococcal nuclease, *Science*, 209 (4458), 811- 13. (1980)
52. Burman, K.D., Lukes, Y., Wright, F.D., Wartofsky, L.: Reduction in hepatic triiodothyronine binding capacity induced by fasting, *Endocrinology*, 101(4), 1331-34. (1977)
53. Schussler, G.C., Orlando, J.: Fasting decreases triiodothyronine receptor capacity, *Science*, 199(4329), 686-88. (1978)
54. Silva, J.E., Larsen, P.R.: Pituitary nuclear 3,5,3'-triiodothyronine and thyrotropin secretion: an explanation for the effect of thyroxine, *Science*, 198(4317), 617-20. (1977)
55. Cárdenas, M.L., Cornish-Bowden, A., Ureta, T.: Evolution and regulatory role of the hexokinases, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1401(3), 242–64. (1998)
56. Wilson, J.E.: Hexokinases, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 126, 65–198. (1995)
57. Colowick, S.P.: The hexokinases. In *The Enzymes*. Vol. 9. Boyer PD, Ed. New York, Academic, 1–48. (1973)

58. Wilson, J.E.: The hexokinase gene family. In *Glucokinase and Glycemic Disease: From Basics to Novel Therapeutics*. Front Diabetes. Vol. 16. Matschinsky, F.M., Magnuson, M.A., Eds. Basel, Karger, 18–30. (2004)
59. Pilkis, S.J., Weber, I.T., Harrison, R.W., Bell, G.I.: Glucokinase: structural analysis of a protein involved in susceptibility to diabetes, *J. Biol. Chem.*, 269(35), 21925-8. (1994)
60. Champe, P.C., Harvey, R.A.: *Lippincott Biyokimya*, 2. Baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul 377. (1997)
61. Matschinsky, F., Liang, Y., Kesavan, P., Wang, L., Froguel, P., Velho, G., Cohen, D., Permutt, M.A., Tanizawa, Y., Jetton, T.L.: Glucokinase as pancreatic beta cell glucose sensor and diabetes gene, *J. Clin. Invest.*, 92(5), 2092-8 (1993)
62. Walker, D.G., Rao, S.: The role of glucokinase in the phosphorylation of glucose by rat liver, *Biochem. J.*, 90, 360–68. (1964)
63. Sols, A., Salas, M., Vinuela, E.: Induced biosynthesis of liver glucokinase, *Adv. Enzyme Regul.*, 2, 177–188. (1964)
64. Sharma, C., Manjeshwar, R., Weinhouse, S.: Hormonal and dietary regulation of hepatic glucokinase, *Adv. Enzyme Regul.* 2, 189–200. (1964)
65. Grossbard, L., Schimke, R.T.: Multiple hexokinases of rat tissues: purification and comparison of soluble forms, *J. Biol. Chem.* 241, 3546–60. (1966)
66. Matschinsky, F.M., Ellerman, J.E.: Metabolism of glucose in the islets of Langerhans, *J. Biol. Chem.* 243, 2730–36. (1968)
67. Printz, R., Magnuson, M.A., Granner, D.K.: Mammalian glucokinase, *Annu. Rev. Nutr.* 13, 463–96. (1993)

68. Jeton, T.L., Liang, Y., Pettepher, C.C., Zimmerman, C., Cox, F.G., Horvath, K., Matschinsky, F.M., Magnuson, M.A.: Analysis of upstream glucokinase promoter activity in transgenic mice and identification of glucokinase in rare neuroendocrine cells in the brain and gut, *J. Biol. Chem.*, 269, 3641–54. (1994)
69. Zelent, D., Najafi, H., Odili, S., Buettger, C., Weik-Collins, H., Li, C., Doliba, N., Grimsby, J., Matschinsky, F.M.: Glucokinase and glucose homeostasis: proven concepts and new ideas, *Biochem. Soc. Trans.*, 33, 306-10. (2005)
70. Matschinsky, F.M., Glaser, B., Magnuson, M.A.: Pancreatic beta-cell glucokinase: closing the gap between theoretical concepts and experimental realities, *Diabetes*, 47(3), 307-15. (1998)
71. Meglasson, M.D, Matschinsky, F.M.: New perspectives on pancreatic islet glucokinase, *Am. J. Physiol.*, 246, 1-13. (1984)
72. Bedoya, F.J., Matschinsky, F.M., Shimizu, T., O'Neil, J.J., Apel, M.C.: Differential regulation of glucokinase activity in pancreatic islets and liver of the rat, *J. Biol. Chem.*, 261, 10760–64. (1986)
73. Girard, J., Ferre, P., Foufelle, F.: Mechanisms by which carbohydrates regulate expression of genes for glycolytic and lipogenic enzymes, *Annu. Rev. Nutr.*, 17, 325-52. (1997)
74. Grimsby, J., Matschinsky, F.M., Grippo, J.F.: Discovery and actions of glucokinase activators. In *Glucokinase and Glycemic Disease: From Basics to Novel Therapeutics*. Front Diabetes. Vol. 16. Matschinsky FM, Magnuson MA, Eds. Basel, Karger, 2004, p.360–378

75. Dunten, P., Swain, A., Kammlott, U., Crowther, R., Lukacs, C.M., Levin, W., Reik, L., Grimsby, J., Corbett, W.L., Magnuson, M.A., Matschinsky, F.M., Grippo, J.F.: Crystal structure of human liver glucokinase bound to a small molecule allosteric activator. In *Glucokinase and Glycemic Disease: From Basics to Novel Therapeutics*. Front Diabetes. Vol. 16. Matschinsky FM, Magnuson MA, Eds. Basel, Karger, 2004, p.145–154
76. Kamata, K., Mitsuya, M., Nishimura, T., Eiki, J., Nagata, Y.: Structural basis for allosteric regulation of the monomeric allosteric enzyme human glucokinase, *Structure*, 12(3), 429-38. (2004)
77. Magnuson, M.A., Shelton, K.D.: An alternate promoter in the glucokinase gene is active in the pancreatic beta cell, *J. Biol. Chem.* 264, 15936– 42 (1989)
78. Hughes, S.D., Quaade, C., Milburn, J.L., Cassidy, L., Newgard, C.B.: Expression of normal and novel glucokinase mRNAs in anterior pituitary and islet cells, *J. Biol. Chem.*, 266(7), 4521-30. (1991)
79. Jetton, T.L., Moates, J.M., Lindner, J., Wright, C.V., Magnuson, M.A., Jetton, T.L., Moates, J.M., Lindner, J., Wright, C.V., Magnuson, M.A.: Targeted oncogenesis of hormone-negative pancreatic islet progenitor cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95(15), 8654-9. (1998)
80. Shelton, K.D., Franklin, A.J., Khor, A., Beechem, J., Magnuson, M.A.: Multiple elements in the upstream glucokinase promoter contribute to transcription in insulinoma cells, *Mol. Cell Biol.*, 12(10), 4578-89. (1992)
81. Moates, J.M., Shelton, K.D., Magnuson, M.A.: Characterization of the Pal motifs in the upstream glucokinase promoter: binding of a cell type-specific protein complex correlates with transcriptional activation, *Mol. Endocrinol.*, 10(6), 723-31. (1996)

82. Cabrera-Valladares, G., German, M.S., Matschinsky, F.M., Wang, J., Fernandez-Mejia, C.: Effect of retinoic acid on glucokinase activity and gene expression and on insulin secretion in primary cultures of pancreatic islets, *Endocrinology*. 140(7), 3091-6. (1999)
83. Sিবrowski, W., Seitz, H.J.: Rapid action of insulin and cyclic AMP in the regulation of functional messenger RNA coding for glucokinase in rat liver, *J. Biol. Chem.*, 10;259(1), 343-6 (1984)
84. Postic, C., Niswender, K.D., Decaux, J.F., Parsa, R., Shelton, K.D., Gouhot, B., Pettepher, C.C., Granner, D.K., Girard, J., Magnuson, M.A.: Cloning and characterization of the mouse glucokinase gene locus and identification of distal liver-specific DNase I hypersensitive sites, *Genomics*, 29(3), 740-50. (1995)
85. Moates, J.M., Postic, C., Decaux, J.F., Girard, J., Magnuson, M.A.: Variable expression of hepatic glucokinase in mice is due to a regulational locus that cosegregates with the glucokinase gene, *Genomics*, 45(1), 185-93. (1997)
86. Bossard, P., Parsa, R., Decaux, J.F., Iynedjian, P., Girard, J.: Glucose administration induces the premature expression of liver glucokinase gene in newborn rats, Relation with DNase-I-hypersensitive sites, *Eur. J. Biochem.*, 215(3), 883-92. (1993)
87. Foretz, M., Guichard, C., Fere, P., Foufelle, F.: Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96(22), 12737-42. (1999)
88. Brown, M.S., Goldstein, J.L.: The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor, *Cell*, 89(3), 331-40. (1997)

89. Kim, S.Y., Kim, H.I., Kim, T.H., Im, S.S., Park, S.K., Lee, I.K., Kim, K.S., Ahn, Y.H.: SREBP-1c mediates the insulin-dependent hepatic glucokinase expression, *J. Biol. Chem.*, 279(29), 30823-9. (2004)
90. Sebastian, S., Horton, J.D., Wilson, J.E.: Anabolic function of the type II isozyme of hexokinase in hepatic lipid synthesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 270(3), 886-91. (2000)
91. Picard, F., Auwerx, J.: PPAR (gamma) and glucose homeostasis, *Annu. Rev. Nutr.*, 22, 167-97. (2002)
92. Kim, S.Y., Kim, H.I., Park, S.K., Im, S.S., Li, T., Cheon, H.G., Ahn, Y.H.: Liver glucokinase can be activated by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, *Diabetes*, 53, 66-70. (2004)
93. Iynedjian, P.B., Roth, R.A., Fleischmann, M., Gjinovci, A.: Activation of protein kinase B/cAkt in hepatocytes is sufficient for the induction of expression of the gene encoding glucokinase, *Biochem. J.*, 351 Pt 3, 621-7. (2000)
94. Wu, C., Okar, D.A., Stoeckman, A.K., Peng, L.J., Herrera, A.H., Herrera, J.E., Towle, H.C., Lange, A.J.: A potential role for fructose-2,6-bisphosphate in the stimulation of hepatic glucokinase gene expression, *Endocrinology*, 145(2), 650-8. (2004)
95. Velho, G., Petersen, K.F., Perseghin, G., Hwang, J.H., Rothman, D.L., Pueyo, M.E., Cline, G.W., Froguel, P., Shulman, G.I.: Impaired hepatic glycogen synthesis in glucokinase-deficient (MODY-2) subjects, *J. Clin. Invest.*, 98(8), 1755-61. (1996)
96. Tappy, L., Dussoix, P., Iynedjian, P., Henry, S., Schneider, P., Zahnd, G., Jequier, E., Philippe, J.: Abnormal regulation of hepatic glucose output in maturity-onset diabetes of the young caused by a specific mutation of the glucokinase gene, *Diabetes*, 46(2), 204-8. (1997)

97. Leighton, B., Atkinson, A., Coghlan, M.P.: Small molecule glucokinase activators as novel anti-diabetic agents, *Biochem. Soc. Trans.*, 33(Pt 2), 371-4. (2005)
98. Brocklehurst, K.J., Payne, V.A., Davies, R.A., Carroll, D., Vertigan, H.L., Wightman, H.J., Aiston, S., Waddell, I.D., Leighton, B., Coghlan, M.P., Agius, L.: Stimulation of hepatocyte glucose metabolism by novel small molecule glucokinase activators, *Diabetes*, 53(3), 535-41. (2004)
99. Iynedjian, P.B.: Mammalian glucokinase and its gene, *Biochem. J.*, 293, 1-13. (1993)
100. Veiga-da-Cunha, M., Van Schaftingen, E.: Identification of fructose 6-phosphate and fructose 1-phosphate-binding residues in the regulatory protein of glucokinase, *J. Biol. Chem.* 277, 8466-73. (2002)
101. Brown, K.S., Kalinowski, S.S., Megill, J.R., Durham, S.K., Mookhtiar, K.A.: Glucokinase regulatory protein may interact with glucokinase in the hepatocyte nucleus, *Diabetes*, 46, 179-186. (1997)
102. Agius, L., Peak, M.: Intracellular binding of glucokinase in hepatocytes and translocation by glucose, fructose and insulin, *Biochem. J.*, 296, 785-96. (1993)
103. de la Iglesia, N., Veiga-da-Cunha, M., Van Schaftingen, E., Guinovart, J.J., Ferrer, J.C., Glucokinase regulatory protein is essential for the proper subcellular localisation of liver glucokinase, *FEBS Lett.*, 456(2), 332-8. (1999)
104. Shiota, C., Coffey, J., Grimsby, J., Grippo, J.F., Magnuson, M.A., Nuclear import of hepatic glucokinase depends upon glucokinase regulatory protein, whereas export is due to a nuclear export signal sequence in glucokinase, *J. Biol. Chem.*, 274(52), 37125-30. (1999)

105. Agius, L., Peak, M., Newgard, C.B., Gomez-Foix, A.M., and Guinovart, J.J.: Evidence for a role of glucose-induced translocation of glucokinase in the control of hepatic glycogen synthesis, *J. Biol. Chem.*, 271(48), 30479-86. (1996)
106. Agius, L.: The physiological role of glucokinase binding and translocation in hepatocytes., *Adv. Enzyme Regul.*, 38, 303-31. (1998)
107. Grimsby, J., Sarabu, R., Corbett, W.L., Haynes, N.E., Bizzarro, F.T., Coffey, J.W., Guertin, K.R., Hilliard, D.W., Kester, R.F., Mahaney, P.E., Marcus, L., Qi, L., Spence, C.L., Teng, J., Magnuson, M.A., Chu, C.A., Dvornick, M.T., Matschinsky, F.M., Grippo, J.F.: Allosteric activators of glucokinase: potential role in diabetes therapy, *Science*, 301(5631), 370-3. (2003)
108. Al-Hasani, H., Tschop, M.H., Cushman, S.W.: Two birds with one stone: novel glucokinase activator stimulates glucose-induced pancreatic insulin secretion and augments hepatic glucose metabolism, *Mol. Interv.*, 3(7), 367-70. (2003)
109. Efanov, A.M., Barrett, D.G., Brenner, M.B., Briggs, S.L., Delaunois, A., Durbin, J.D., Giese, U., Guo, H., Radloff, M., Gil, G.S., Sewing, S., Wang, Y., Weichert, A., Zaliani, A., Gromada, J.A.: Novel glucokinase activator modulates pancreatic islet and hepatocyte function, *Endocrinology*, 146(9), 3696-701. (2005)
110. Walker, P., Dubois, J.D., Dussault, J.H.: Free thyroid hormone concentrations during postnatal development in the rat, *Pediatr. Res.*, 14(3), 247-9. (1980)
111. Magnuson, M.A., Nikodem, V.M.: Molecular cloning of a cDNA sequence for rat malic enzyme. Direct evidence for induction in vivo of rat liver malic enzyme mRNA by thyroid hormone, *J. Biol. Chem.*, 258(20), 12712-7. (1983)

112. Dozin, B., Magnuson, M.A., Nikodem, V.M.: Tissue-specific regulation of two functional malic enzyme mRNAs by triiodothyronine, *Biochemistry*, 24(20), 5581-6. (1985)
113. Dozin, B., Magnuson, M.A., Nikodem, V.M.: Thyroid hormone regulation of malic enzyme synthesis. Dual tissue-specific control, *J. Biol. Chem.*, 261(22), 10290-2. (1986)
114. Siddiqui, U.A., Goldflam, T., Goodridge, A.G.: Nutritional and hormonal regulation of the translatable levels of malic enzyme and albumin mRNAs in avian liver cells in vivo and in culture, *J. Biol. Chem.*, 256(9), 4544-50. (1981)
115. Fernandez-Mejia, C., Davidson, MB.: Regulation of glucokinase and proinsulin gene expression and insulin secretion in RIN-m5F cells by dexamethasone, retinoic acid, and thyroid hormone, *Endocrinology*, 130(3), 1660-8. (1992)
116. Garcia-Flores, M., Blazquez, E., Zueco, J.A.: Effects of triiodothyronine and bovine growth hormone on glucose transporter isoform-2 (GLUT-2) and glucokinase (GK) gene expression in pancreatic islets of fetal and adult rats, *Pflugers Arch.*, 442(5), 662-7. (2001)
117. Bossard, P., Decaux, J.F., Juanes, M., Girard, J.: Initial expression of glucokinase gene in cultured hepatocytes from suckling rats is linked to the synthesis of an insulin-dependent protein, *Eur. J. Biochem*, 223(2), 371-80. (1994)
118. Lowry, O.H.: Protein measurement with the folin phenol reagent, *J Biol Chem*, 193, 265- 275. (1951)
119. Walker, D.G., Parry, M.J. : Glucokinase, *Methods in Enzymology Vol.9* ,ed. by W.A. Wood, Academic Press, Newyork and London, p381. (1966)

120. Walker, D.G.: On the Presence of Two Soluble Glycose-phosphorylating Enzymes in Adult Liver and the Development of One of These After Birth, *Biochim. Biophys. Acta.*, 77, 209-226. (1963)
121. Morton, R.K.: Methods of Extraction of Enzymes from Animal Tissues, *Methods of Enzymology*. Vol:1, ed. by W.A. Wood, Academic Press, Newyork and London, 25-51. (1955)
122. Vinuela, E., Salas, M., Sols, A.: Glucokinase and Hexokinase in Liver in Relation to Glycogen Synthesis, *The Journal of Biological Chemistry*, 238(3). (1963)
123. Salas, J., Salas, M., Vinuela, E., Sols, A.: Glucokinase of Rabbit Liver, *The Journal of Biological Chemistry*, 240(3). (1965)
124. Narkewicz, M.R., Iynedjian, P.B., Ferre, P., Girard, J.: Insulin and tri-iodothyronine induce glucokinase mRNA in primary cultures of neonatal rat hepatocytes., *Biochem J.*, 271(3), 585-9. (1990)
125. DiPietro, L.David, Sidney Wienhouse, : Hepatic Glucokinase in the Fed, Fasted, and Alloxan-Diabetic Rat, *The Journal of Biological Chemistry*, 235(9), 2542-45. (1960)

9.ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Ankara’da doğdum. İlkokulu Anıttepe İlkokulunda, ortaokulu Bahçelievler Ortaokulunda, lise eğitimimi ise Ayrancı Lisesinde tamamladım. 1999 yılında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde üniversite öğrenimime başladım ve 2003 yılında mezun oldum. 2004 yılında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim dalında yüksek lisansa başladım.