

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

İZOLE EDİLMİŞ SIÇAN PANKREAS ADACIK HÜCRELERİNE İN
VİTRO TROMBOSPONDİNİN ETKİSİ

Arş. Gör. Dr. Şefika Nur KURT

Fizyoloji Programı
UZMANLIK TEZİ

ANKARA
2013

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

İZOLE EDİLMİŞ SIÇAN PANKREAS ADACIK HÜCRELERİNE İN
VİTRO TROMBOSPONDİNİN ETKİSİ

Arş. Gör. Dr. Şefika Nur KURT

Fizyoloji Programı
UZMANLIK TEZİ

Prof. Dr. Ersin FADILLIOĞLU
TEZ DANIŞMANI

ANKARA
2013

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın tüm aşamaları boyunca yardımları, yönlendirmeleri ve yoğun desteği için tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Ersin Fadıllıoğlu'na çok teşekkür ederim. Yapmış oldukları tüm katkılardan dolayı sayın Prof. Dr. Tuncay Delibaşı'na ve deneylerim boyunca bana destek olan deney hayvanları, adacık, ELISA ve proteomik laboratuvarı çalışanlarına, anlayışı için H.Ü.T.F Fizyoloji Anabilim Dalı başkanı sayın Prof. Dr. Z.Dicle Balkancı'ya, fizyoloji ailesindeki tüm saygıdeğer hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Desteği ve yardımları için eğim Asım'a, sabrı için kızım Pınar'a ve her zaman yanımda olan aileme çok teşekkür ederim.

Bu tez DPT tarafından desteklenen Pankreas Adacık Hücre İzolasyon Merkezi Altyapı Projesi (2008K120370) kapsamında gerçekleştirilmiştir.

ÖZET

Kurt Ş.N., İzole Edilmiş Sıçan Pankreas Adacık Hücrelerine In Vitro Trombospondinin Etkisi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Uzmanlık Tezi, Ankara, 2013.

Pankreas adacık hücreleri az miktarda antioksidan enzime sahip oldukları için hipoksik hasara çok duyarlıdırlar. Kültür ortamına konan hücrelerin hipoksik hasar nedeniyle canlılıklarını kaybetmesi transplantasyon başarısını düşürmektedir. Bu sorunu ortadan kaldırmak için yapılan endotel hücrelerinin adacık hücre kültürüne eklenmesi adacık hücre canlılık ve fonksiyonunda iyileşmeye neden olmuştur. Ayrıca portal sisteme transplante edilen adacıklar endotel hücreler ile yakın temas halindedirler. Endotelden salınan maddelerin bir kısmı adacık canlılığını artırırken bir kısmı da olumsuz etki etmektedir. Trombospondin(TSP) de adacık endotelinden salınan çok fonksiyonlu bir madde olup adacık hücresi üzerindeki etkisi net olarak bilinmemektedir.

Bu çalışmanın amacı TSP adacık hücre fonksiyon ve canlılığını etkilemesi muhtemel bir endotelial faktör olup olmadığını araştırmaktır.

İzole edilen adacık hücreleri üç gruba ayrıldı. Kontrol grubuna normal kültür ortamı dışında ek bir madde koyulmadı. Endoplasmik retikulum (ER) stresi oluşturulacak grubun kültür ortamlarına 20 µg/ml tunikamisin (TUN) ve son grubun kültür ortamlarına 200pM

TSP eklenerek 24 saat inkübe edildi. Floresein diasetat/ Propidyum iyot (FDA/PI) ile canlılık, glukoz stimülasyonu ile fonksiyon değerlendirildi. Oksidatif stres parametrelerine ve *western blot* ile ER stresine bakıldı.

200 pM TSP'nin canlılığı etkilemediği fakat fonksiyon bozukluğuna neden olduğu sonucuna ulaşıldı. Fonksiyon bozukluğunun oksidatif hasar veya ER stresi nedeniyle meydana gelmediği ortaya çıktı.

Bu sonuçlar, TSP'nin adacık hücrelerinde ekzositoz gibi bir mekanizmayı bozmuş olabileceğini düşündürmektedir. *In vivo* çalışmalar, farklı doz ve inkübasyon süreleri ile çalışmanın sonuçları desteklenebilir. Fonksiyon kaybına neden olan hücresel mekanizmanın aydınlatılması için ek araştırmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: pankreas adacık hücresi, trombospondin, endoplasmik retikulum stresi, oksidatif stres

Destekleyen Kurumlar: DPT projesi No: 2008K120370

ABSTRACT

Kurt Ş.N., In vitro Effects of Thrombospondins on Isolated Pancreas Islet Cells in Rats, Hacettepe University Faculty of Medicine, Thesis in Physiology, Ankara, 2013.

Pancreas islet cells are very sensitive to hypoxic stress because of having small amount of anti-oxidant enzyme. Loss of islet cell viability due to hypoxic damage decreases success of transplantation. Islet- endothelial co-culture prevents the cell death and improves the cell function. Furthermore, transplanted islets to portal system are also in close contact with the endothelial cells. Some of the endothelium derived substance improve the viability of islet cells and some of them cause negative effects. Thrombospondin(TSP) is a multifunctional substance that is released from islet endothelial cells and its effect on islet cell is not clear.

The aim of this study is to investigate whether TSP, which is an endothelial factor, is effective on the islet cell's viability and function.

Isolated islet cells were divided into three groups: in the control group no substance were added to the normal culture medium. In ER stress generated group, 20 µg/ml tunicamycin (TUN) and in the third group 200pM thrombospondin (TSP) was added. Then groups were incubated for 24 hours. We measured islet cell viability with FDA/PI and cell function with glucose stimulation. We explored ER stress with western blot and oxidative stress parameters.

We concluded that 200 pM TSP does not affect the cell viability but cause cell dysfunction. It did not appear to come by endoplasmic reticulum stress or oxidative stress.

According to the results, TSP may cause damage in different mechanisms like exocytosis in the islet cells. The results of this study may be supported with in vivo experiments, various doses of TSP and incubation periods. Additional studies are needed to clarify the cellular mechanisms that cause functional loss.

Keywords: pancreas islet cell, thrombospondin, TSP, endoplasmic reticulum stress, oxidative stress.

Supported by: DPT Project Nr: 2008K120370

İÇİNDEKİLER

	<u>sayfa</u>
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
ŞEKİLLER.....	xiv
TABLolar	xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.1. Pankreasın Endokrin Fonksiyonu	3
2.1.1. Langerhans Adacıklarının Organizasyonu	4
2.1.2. β -Hücreleri	5
2.1.3. α -Hücreleri	12
2.1.4. δ -Hücreleri	13
2.1.5. F Hücreleri	14
2.2. Endotel.....	14
2.2.1. Endotelden Salınan Faktörler	17
2.3.Trombospondinler.....	20
2.3.1. Moleküler Yapısı ve Sınıflaması	20
2.3.2. Moleküler Etkileşimleri	22

2.3.3. Hücresel Etkileri	24
2.3.4. Adacık Hücresi ve Trombospondinler	25
2.4. Endoplasmik Retikulum Stresi.....	26
2. GEREÇ ve YÖNTEM.....	37
3.1. Deney Protokolü	37
3.2. Gerekli Çözeltilerin Hazırlanması	38
3.2.1. İzolasyon Çözeltileri	38
3.2.2. Florasan Boyaların Hazırlanması	39
3.2.3. Trombospondin (TSP)	39
3.2.4. Tunikamisin (TUN).....	39
3.3. Pankreas Adacık Hücresi İzolasyon Protokolü	40
3.4. Pankreas Adacık Hücresi Sayımı	42
3.5. Canlılık Değerlendirilmesi; Adacık Hücrelerinin Floresan Boya ile Boyanması	42
3.5. Oksidatif Hasar Parametrelerinin Değerlendirilmesi	43
3.5.1. Malondialdehid (MDA) Miktarının Tayini.....	43
3.5.2. Protein Karbonil Miktar Tayini.....	44
3.5.3. Katalaz Tayini.....	45
3.5.4. Protein Miktar Tayini	45
3.6. Glukoz Stimülasyonu ile İnsülin Sentezi	45

3.7. Western Blot Yöntemi ve Endoplasmik Retikulum Stres Belirteçleri	47
3.8. İstatistiksel analizler	53
3. BULGULAR	54
4.1. Western Blot Sonuçları	54
4.2. Florasan Boyama (FDA/PI) ile Canlılık Sonuçları.....	56
4.3.İnsülin İndeksi	62
4.4. Oksidatif Stres Parametreleri	63
4. TARTIŞMA	66
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	73
KAYNAKLAR.....	75

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACE	Anjiyotensin dönüştürücü enzim
ADP	Adenozin difosfat
ATP	Adenozin trifosfat
BME	β -merkapt etanol
BSA	Sığır serum albumini
Ca ⁺⁺	Kalsiyum
cGMP	Siklik guanozin monofosfat
CHOP	<i>CCAAT/enhancer-binding homologous protein</i>
DM	Diabetes mellitus
DMSO	Dimetil sülfoksit
DTZ	Ditizon
ECL	<i>Enhanced Chemiluminisance</i>
ECM	Ekstrasellüler matriks
EDHF	Epidermal kaynaklı hiperpolarizan faktör
EGF	Epidermal büyüme faktörü
eIF 2 α	<i>Eukaryotic initiation factor 2</i>
ER	Endoplasmik retikulum
ET	Endotelin
FBS	Fetal sığır serumu
FDA	Florasan diasetat
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
GAD	Glutamik asit dekarboksilaz
GADD34	<i>Growth arrest and DNA damage-inducible protein</i>
GER	Granüllü endoplasmik retikulum
GIP	Gastrik inhibitör peptid
GLP	Glukagon benzeri peptid
GLUT	Glukoz taşıyıcı
Gr	Gram
GSIS	Glukoz stimülasyonu ile uyarılan insülin

	sekresyonu
HBSS	<i>Hank's Buffered Salt Solution Medium</i>
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HRP	<i>Horseradish peroksidaz</i>
K ⁺	Potasyum
MDA	Malondialdehit
Mg	Miligram
ml	Mililitre
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
NO	Nitrik oksit
Nm	Nanometre
p-eIF2 α	<i>Phospho- eukaryotic translation initiation factor 2</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline System</i>
PC	Protein karbonil
PERK	<i>Protein-Kinase-RNA like ER kinase</i>
PI	Propidyum iyot
PP	Pankreatik polipeptit
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (Reaktif oksijen radikali)
rpm	Dakika başına dönüş (<i>revolutions per minute</i>)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SERCA	Sarko/endoplasmik retikulum kalsiyum ATPaz
SRP	(<i>Signal recognition particle</i>) Sinyal tanıma parçacığı
SS	Somatostatin
TBST	<i>Tris buffered saline with tween 20</i>
TCA	Triklorasetik asit
TGF- β	Transforme edici büyüme faktörü-beta
TN	Tunikamisin
TNF- α	Tümör nekrozis faktör
TSP	Trombospondin

TUN	Tunikamisin
UPR	Katlanmamış protein cevabı
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
VEGF	Vasküler endoteliyal büyüme faktörü
XBP-1	X-box binding protein-1

ŞEKİLLER

sayfa

Şekil 2.1. β -hücrelerin komşu hücreler ile etkileşimi.	6
Şekil 2.2. Proinsülininden insülin sentezlenmesi.	8
Şekil 2.3. Trombospondin ailesi	21
Şekil 2.4. CD 36 ve CD 47 reseptörleri ile NO inhibisyonu	23
Şekil 2.5. ERAD (Endoplasmik retikulum aracılı degradasyon)	29
Şekil 2.6. ER stresinin aktive ettiği mekanizmalar	30
Şekil 2.7. ER stresi yolakları.....	32
Şekil 3.1. Pankreas adacık hücrelerinin kültüre konma aşaması	42
Şekil 3.2. Yürütme öncesi proteinlerin jelle yüklenmesi	49
Şekil 3.3. Yürütme sonrası jel görüntüsü	50
Şekil 4.1. PVDF membrandaki aktin ve XBP1 bantlarının görüntüsü	54
Şekil 4.2. Gruplardaki XBP1 /Aktin oranları karşılaştırması.	56
Şekil 4.3. Kontrol grubuna ait izolasyon sonrası inkübasyon öncesi canlılık incelemesi	57
Şekil 4.4. Kontrol grubuna ait izolasyon sonrası inkübasyon öncesi canlılık incelemesi	57
Şekil 4.5. Tunikamisin ile endoplasmik retikulum stresi oluşturulan gruptan adacık örneği.....	58
Şekil 4.6. Tunikamisin ile endoplasmik retikulum stresi oluşturulan gruptan adacık örneği.....	59
Şekil 4.7. 24. Saatte TSP eklenen hücrelerin canlılık durumu	59
Şekil 4.8. Grupların canlılık yüzdeleri	61

Şekil 4.9. İnsülin indeksleri	62
Şekil 4.10. MDA düzeyleri.....	64
Şekil 4.11. Protein karbonil düzeyleri.....	65

TABLolar

	<u>sayfa</u>
Tablo 4.1. Aktin ve XPB1 Bant Hacimleri.....	55
Tablo 4.2. Gruplara göre canlılık ortalamaları.....	60
Tablo 4.3. Grupların insülin indeksleri.....	63
Tablo 4.4. Oksidatif parametreler.....	65

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Adacık hücre transplantasyonundaki önemli sorunlardan biri izole edilen adacıklarda, hipoksiye bağlı meydana gelen canlılık ve fonksiyon kaybıdır. Adacık hücreleri az miktarda antioksidan enzime sahip oldukları için hipoksik hasara çok duyarlıdırlar. Bu nedenle kültüre konan adacıklara endotel hücresi eklenerek transplantasyon öncesi meydana gelen hasar önlenmeye çalışılmaktadır. Ayrıca endotelden salınan birçok maddenin adacık hücre canlılığını desteklediği ortaya çıkmıştır. Fakat endotelden salınan bazı maddeler bu destekleyici etkiye zıt çalışmaktadır. Endotelden salınan maddelerden biri trombospondinlerdir (TSPs). TSP hücre-hücre ve hücre matriks etkileşiminde rol alır. TSP -/- farelerde pankreas beta hücrelerinde azalma gözlenmektedir. TSP aynı zamanda antianjiyogenik bir maddedir.

İzole edilen adacıkların kültürde buldukları süre boyunca canlılıklarını kaybetmesi nedeniyle kültür ortamının iyileştirilmesi gerekmektedir. Kültür ortamında ve transplantasyon sonrasında adacık canlılık ve fonksiyonuna etki eden maddelerden biri TSP olabilir. TSP'in etkisinin araştırılması kültür ortamının iyileşmesini sağlayabilir. Trombospondin adacık hücre ve fonksiyonunu olumsuz etkileyen bir madde olabilir.

Bu çalışmanın amacı trombospondinin adacık hücre fonksiyon ve canlılığını etkilemesi muhtemel bir endotelyal faktör olup olmadığını araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pankreasın Endokrin Fonksiyonu

Pankreas mide, duodenum ve dalak arasında yer alan, uzun ve küçük bir organdır. Pankreasın büyük kısmını egzokrin hücreler kaplar. Egzokrin hücreler ve endokrin hücreler pankreas içinde dağınık yerleşime sahiptir. Pankreasta endokrin ve egzokrin hücreler dışında epitel hücreleri, endotel hücreleri, parasempatik, sempatik ve duysal nöronlar ve hematopoetik hücreler bulunur.

Pankreasın endokrin fonksiyonunu vücut ağırlığının %0.005'inden daha azını oluşturan ve sayıları yaklaşık 1 milyon olan mikroanatomik Langerhans adacıkları yürütür. Bu adacıklarda morfolojilerine ve boyanma özelliklerine göre farklılık gösteren α -, β -, δ - ve PP hücreleri yer alır. α -hücreleri glukagon, β -hücreleri insülin, δ hücreleri somatostatin ve PP hücreleri pankreatik polipeptit salgılar. İnsülin üreten β -hücreleri Langerhans adacığının yaklaşık %70-80'ini oluşturur [1].

Doğumdan hemen sonra adacık oluşumunun hızla azaldığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Bununla birlikte postnatal dönemde de endokrin pankreas yavaş ve istikrarlı bir şekilde kendini yenilemektedir. Bu yenilenme hızı hemen hemen apoptotik hıza eşittir. Adacık kitlesi bireyin değişen ihtiyaçlarını karşılamak için adapte olabilir [2].

B-hücre tanecikleri hücre sitoplazmasındaki insülin paketleridir ve şekli türden türe değişir. B-hücrelerindeki insülin paketleri çinko ile kompleks yapmış polimerlerden oluşur. Glukagon içeren α -hücreleri ve somatostatin içeren δ -hücreleri türler arasında benzer homojen tanecikler içerir [3].

2.1.1. Langerhans Adacıklarının Organizasyonu

Birçok rodentte β -hücreleri adacığın merkezinde ve non- β -hücreler (α , δ ve PP hücreler) ise adacığın dışında yer almaktadır. İnsan adacık hücre organizasyonu rodent adacık hücrelerindeki bu çekirdek-kabuk dağılım modelinden farklıdır. Yapılan çalışmalarda yonca yaprağı modeli, lobüler model ve şerit paterni gibi farklı organizasyonlar ortaya konmuştur [4-6].

En son yayınlanan çalışmalarda 40-60 μm boyutlarındaki küçük adacıkların rodentlerdekine benzer şekilde çekirdek-kabuk organizasyonu gösterdiği, büyük adacıklarda ise buna ek olarak basit (50-100 μm boyutundaki adacıklarda) veya dallanmış (100 μm 'den büyük adacıklarda) boşlukların olduğu görülmüştür. Bu çalışmada boşlukların vasküler yapılar olduğu, α -hücrelerinin (PP ve δ -hücreleri de dahil) endotel hücreleri boyunca yer aldığı ve β -hücre kümelerinin içinde vasküler yapının olmadığı gösterilmiştir. Ayrıca β -hücrelerinin damar duvarına doğru sitoplazmik genişlemeler yaparak endotel hücre yüzeyi ile irtibatlı olduğu bulunmuştur. Bu da homolog (β - β hücre arasındaki) ve heterolog (α - ve β -hücresi arasındaki ve endotel

ve β -hücreleri arasındaki) etkileşimin insülin salgılanmasında önemli rolü olabileceğini akla getirmektedir. Böylece katlanmış epitelyal tabaka modeli ortaya atılmıştır [7].

2.1.2. β -Hücreleri

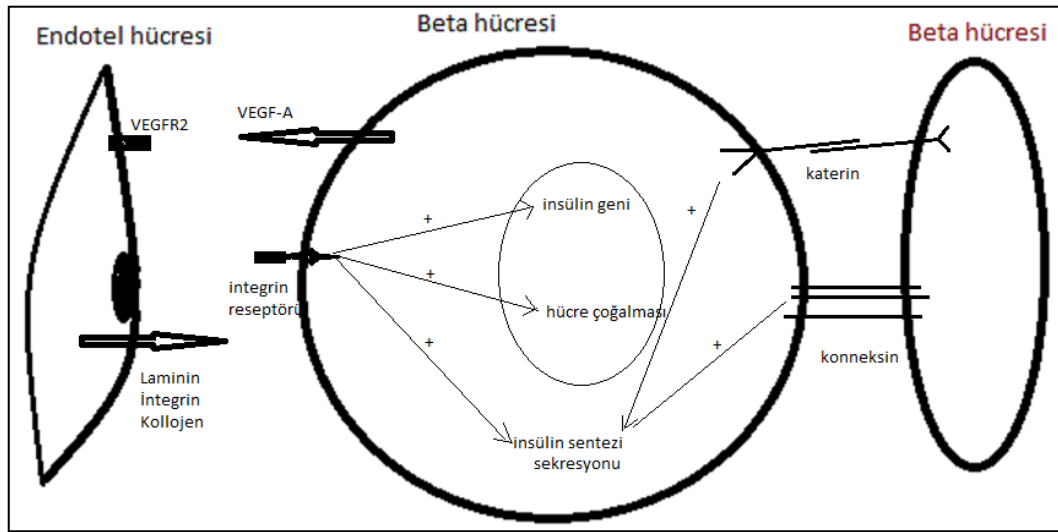
β -hücreleri çok yüzeyle kesik piramitleri andıran, genellikle iyi granüllü hücrelerdir. İki çeşit insülin granülü vardır. Biri, elektron yoğun bir çekirdek ile çevresinde yoğun bir halo izlenimi veren gevşek yerleşimli olgun granüllerdir. Diğeri ise küçük veya hiç halosu olmayan, orta derecede elektron yoğun içerikli ve klatrin kabuklu olgun olmayan granüllerdir. Klatrin kabuğun dökülmesi, granül içeriğinin asidifikasyonu ve insülinin kristalleşmesi olgun olmayan granüllerde proinsülinin insüline dönüştüğünü göstermektedir [8]. Granüllerde temel olarak salgılanan peptit, insülin olmakla birlikte yüz kadar peptit daha bulunmaktadır [9].

Hem β -hücrelerinde hem de β -dışı hücrelerde kalsiyum bağımlı hücresel adezyon molekülleri (katherinler) oldukça fazla iken β -dışı hücrelerde kalsiyum bağımlı olmayan adezyon molekülleri de bulunur. Hücresel adezyon moleküllerinin ekspresyonundaki bu farklılığın organizasyonda rol aldığı düşünülmektedir [10]. Tek tek dağıtılmış sıçan adacık hücreleri yeniden agregre olurken hücre kümeleri orijinal adacıkta olduğu gibi bir düzen alırlar [11].

İzole adacıklar üzerinde yapılan çalışmalar insülin cevabı bakımından adacık hücre duyarlılığının farklı olduğunu

düşündürmektedir. Bu çalışmalarda her bir β -hücresinin farklı eşığe sahip olduğu, dolayısıyla glukoz konsantrasyonu arttıkça daha fazla β -hücresinin cevap verdiği gösterilmiştir [12, 13].

B-hücrelerinin endokrin, nöronal, vasküler, hematopoetik hücreler ve diğer organlar ile etkileşimi β -hücre farklılaşması ve kan glukozunun ayarlanmasında önemli yere sahiptir. Hücre içi ve hücre dışı sinyallerdeki bozukluk β -hücre fonksiyon kaybıyla birlikte kan glukozunda dengesizliklere neden olabilmektedir [14]. Bu sinyallerin aydınlatılması Tip 1 ve Tip 2 diyabet tedavisinde çok önemli gelişmelere neden olabilir [15].



Şekil 1.1. β -hücrelerin komşu hücreler ile etkileşimi.

B-hücresinin endotel hücresi ile etkileşimi β -hücresinden salınan VEGF-A (vasküler endotelyal büyüme faktörü) ve endotelden salınan kollojen, laminin, integrin molekülleri ile olmaktadır. Bir başka β -hücresi ile etkileşimi ise konneksin ve katerin proteinleri ile gerçekleşmektedir.

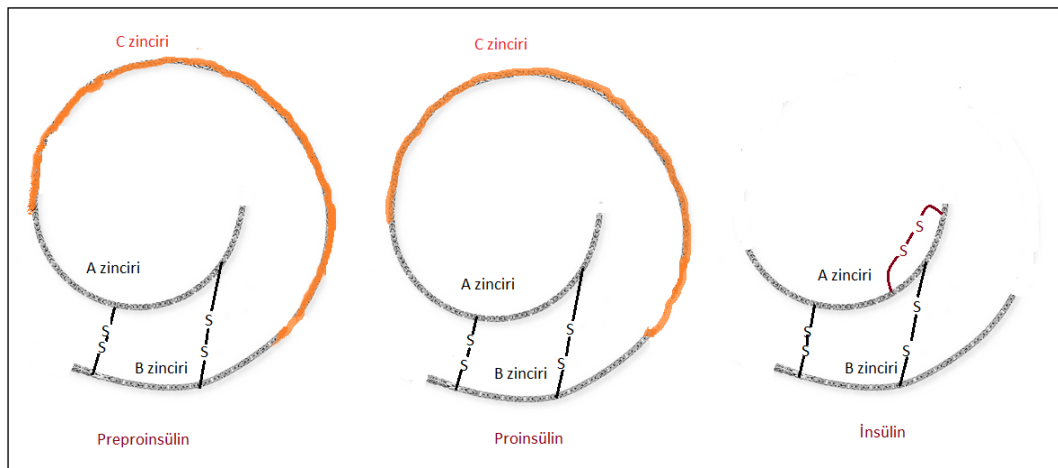
Erişkin pankreas adacıkları yoğun kapiller ağı sayesinde oldukça fazla kanlanan bir dokudur. Endotel hücresi ve β -hücre arasındaki etkileşim dikkat çekicidir. β -hücreler vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF-A) salgılayarak damar gelişimine katkıda bulunurken endotel hücreleri de β -hücre çoğalmasına, insülin gen ekspresyonuna ve insülin sekresyonunda artışa neden olan sinyaller göndermektedirler [16]. Endotel hücrelerinin ürettiği bazal membrandan salınan laminin, integrin, fibronektin ve kollajen bu etkilere neden olmaktadır [17]. Vasküler bazal membranın yakınında yer alan perisitler adacık mikrovaskülaritesini sınırlandırıyor olabilir [18]. (Şekil 2.1)

β -hücrelerinin birbirleri ile iletişimini sağlayan birçok protein mevcuttur. Katherinler, konneksin 36, Eph-Ephrin reseptörleri ve nöral hücre adezyon molekülü (NCAM) bunlardan bazılarıdır. Bu moleküller insülin salınımının düzenlenmesinde önemli rol oynarlar [19-21].

β -hücreleri diğer organlarla da iletişim halindedir. Osteoblastlardan salınan osteokalsin, β -hücre proliferasyonunu tetikleyen cyclin-D2 genini upregüle ederek ve insülin duyarlılığını uyaran adiponektin sentezini artırarak tip 2 diyabet gelişimini engellemektedir [22, 23]. Gebelikte β -hücre kitlesi ve insülin salınımı artar. Bu etki prolaktin, büyüme hormonu ve plasental laktojenin β -hücresi üzerindeki reseptörlerine bağlanması ile olmaktadır [24].

İnsülin, disülfid köprüleri ile birbirine bağlanmış 21 ve 30 amino asit dizisine sahip iki zincirden (A ve B zinciri) oluşan globüler bir proteindir. Disülfid bağları A6 ve A11 arasında, A7 ve B7 arasında, A20 ve B19 arasındadır [25].

Salgı proteinleri ve diğer polipeptit hormonlar gibi insülin de tek zincirli biyosentetik bir öncül olan preprohormon olarak sentezlenir. Preproinsülin dört ayrı fonksiyonel kısımdan oluşur. Sinyal peptidi – amino terminal uçtaki ilk 24 a.a lik kısmı kapsar–, A zinciri, B zinciri ve bunları birbirine bağlayan C-peptitten meydana gelir. Preproinsülin sentezlenirken sinyal tanıma parçacığı (SRP) bağlı durumdadır. Bu durum molekülün granüllü endoplasmik retikulum (GER)'daki SRP reseptörüne yönlendirilmesini sağlar. Bu olay uzamakta olan preproinsülinin ilk 70–80 aminoasiti eklendikten sonra meydana gelir [26]. GER içindeki bir peptidaz sinyal peptidini preproinsülinde ayırarak proinsülinin oluşmasını sağlar.



Şekil 1.2. Proinsülinde insülin sentezlenmesi.

A zinciri, B zinciri ve bunları birbirine bağlayan C zincirinden oluşan proinsülin disülfid bağlarının kurulması ile proinsüline ve C zincirinin ayrılması ile insüline dönüşmektedir.

Proinsülin GER'de katlanır. İnsülinin A ve B zincirleri arasındaki disülfid bağları doğru biçimde oluşturulmuş olan uygun şekilde katlanmış proinsülin, GER'den (diğer bütün sekretuar proteinlerde olduğu gibi) Golgi aygıtına taşınır, burada paketlenir ve böylece sitozoldeki enzimlerden korunmuş olur. Bu tanecikler mikrotübüller yoluyla ATP bağımlı olarak hücre zarına hareket eder ve içeriklerini ekzositoz ile hücre dışına boşaltırlar [27]. Bu sırada klatrin kaplı proinsülin içeren immatür granüller insülin ve C-peptid içeren matür granüllere dönüşür. Proinsülinin insüline dönüşümü endopeptidazlar aracılığıyla olur (Şekil 2.2). Proinsülinin insüline dönüşüm hızını belirleyen en önemli etken glukozdur. İstirahat halinde insülin, β -hücresinin sekretuar granüllerinde depolanır. Ekzositozu uyaran spesifik bir uyaran olmadığında β -hücresinde yıkılır [9].

İnsülin reseptörleri iki α ve iki β alt biriminden oluşan bir tetramerdir ve vücutta pek çok farklı hücrede bulunur. Reseptörün tamamı tek bir alt birimden sentezlenir ve daha sonra ikiye ayrılıp birbirlerine disülfid bağları ile bağlanır. α alt birimleri insülin bağlar ve hücre dışındadır, β alt birimlerinin hücre içi kısımları tirozin kinaz etkinliğine sahiptir. Her iki alt birimin hücreler arası kısmı glukozillenmiştir [28].

β -hücreleri kan glukozundaki değişiklikleri tespit eder ve bu değişime göre insülin sekresyon hızını ayarlar. β -hücrelerinde glukoz alımı düşük afiniteli GLUT-1 aracılığı ile olmaktadır. Hücre içine alınan glukoz, glikokinaz ile glukoz 6 fosfata fosforile olur, glikoliz ve trisiklik asit (TCA) döngüsünün basamakları ATP'nin ADP'ye oranının artması ile sonuçlanır. ATP duyarlı K^+ (potasyum) kanallarının kapanması K^+ geçirgenliğinde azalmaya neden olur. Bu da depolarizasyon ile sonuçlanır ve voltaj bağımlı kalsiyum kanalları açılır. İnsülin granüllerinde ekzositoz meydana gelir [29].

Kalsiyum-kalmodulin kinaz, ekzositoz alanında Golgiden granüllerin mobilizasyonunda önemli rol oynamaktadır. Glukoz ve diğer sekretogoglarla kalsiyumun artması, kalsiyum-kalmodulin kinaz aktivasyonu ve insülin sekresyonu ile koreledir.

İnsülinin fizyolojik etkileri oldukça fazla ve karmaşıktır. Yağ dokusunda glukoz girişini, yağ asidi ve gliserol fosfat sentezini, trigliserit yıkımını, hücre içine K^+ alımını artırır, lipoprotein lipazı etkinleştirir, hormona duyarlı lipazı inhibe eder. Kas dokusunda glukojen sentezini, aminoasit alımını, protein sentezini, keton kullanımını artırır. Karaciğerde lipit ve protein sentezini artırarak ketojenezi inhibe eder. Böylece anabolizan bir etki oluşturarak büyümeyi sağlar [3].

Diabetes mellitus (DM) insülin sekresyonunda, insülin etkisinde veya her ikisindeki bozukluklar sonucu karbonhidrat, yağ ve protein

metabolizmasındaki bozukluğa bağı olarak gelişen kronik hiperglisemi ile karakterize bir hastalıktır.

DM etiyolojik olarak; Tip 1 DM (otoimmün ve idiopatik), Tip 2 DM, gestasyonel diyabet, gençlikte ortaya çıkan erişkin tip diyabet (MODY; *Maturity Onset Diabetes of the Young*) ve diğ er spesifik tipler (pankreatik diyabet, hemakromatoz, endokrinopatiler, genetik defektler, ilaç ve kimyasalların yol açtığı diyabet, infeksiyonlar) olarak sınıflandırılmaktadır [9].

Tip 1 diabetes mellitus, pankreas adacık hücrelerindeki insülin üreten β -hücrelerinin yıkımına bağı görülen otoimmün bir hastalıktır. β -hücrelerinin yıkımına neden olan anti-adacık, anti-GAD (Glutamik asit dekarboksilaz) ve anti-insülin gibi otoantikolar ile birlikte otoreaktivite kazanmış T lenfosit hücreleridir. Adacık hücreleri ile immün hücreler arasındaki bu patolojik etkileşim tip1 DM gelişiminde kritik rol oynar [30].

Tip 1 diyabeti olanlar hayatta kalmak için insülin tedavisine ihtiyaç duyarlar. Tip 1 diyabet kontrol edilemezse, kan şekerinin aşırı yükselmesine bağı “diyabetik ketoasidoz” veya kan şekerinin aniden düşmesi-hipoglisemi- ya da yükselmesi -hiperglisemi- gibi akut komplikasyonlara yol açabilir.

Tip 2 DM diyabetin en yaygın formudur ve görülme sıklığı bazı toplumların 2/3'ünden fazladır. Erişkinlerde çok yaygın olmakla beraber çocuklarda ve gençlerde de görülmektedir. Tip 1 diyabette

görülen hipergliseminin nedeni insülin direnci ve glukoz üretiminin artmış olmasıdır. Tip 2 diyabetli hastaların çoğu obezdir ve kardiovasküler risk altındadırlar. Tip 2 diyabetin tedavisinde en önemli etken hayat tarzının ve beslenme alışkanlığının değiştirilmesidir [31].

2.1.3. α -Hücreleri

α -hücreleri β -hücreleri gibi bol granüllü fakat daha küçük ve şerit şeklindedir. Granüller elektron-yoğun olup daha seyrek ve dar bir halo ile granülleri çevreleyen bir membrana sahiptir [9].

Plazma glukoz seviyelerinin ayarlanmasında önemli bir hormon olan glukagon 29 amino asit içeren lineer bir peptittir ve pankreas α -hücrelerinde sentezlenir. Ayrıca üst gastrointestinal kanal tarafından da üretilmektedir. En son yapılan çalışmalarda α -hücrelerinin yeni bir rolü daha ortaya çıkmıştır. β -hücrelerindeki bir azalma veya hasar durumunda α -hücreleri transdiferansiyasyon ile β -hücrelerine dönüşebilmektedirler [32].

Glukagon, glukojenolitik, lipolitik ve ketojeniktir. Açlık durumunda üretilen glukozun %75'i glukagonun karaciğerdeki işlevleri ile oluşur. Ani ve yoğun fiziksel aktivite sırasında beyne giden yakıt miktarında azalma olmadan iskelet kasına giden yakıt miktarında artış görülür. Glukagon bu gibi durumlara verilen cevapta rol oynayan en önemli faktördür [33].

Glukagonun yedi kez membranı kateden G proteini ile eşleşmiş bir reseptörü vardır. Gs üzerinden adenilat siklazı aktive eder, bu da protein kinaz aracılığıyla fosforilaz A'yı aktive ederek glukojen yıkımında artışa neden olur ve böylece plazma glukozu artar .

Glukagon; insülin, büyüme hormonu ve pankreatik polipeptit salgılanmasını da uyarır. Glukagonun dolaşımdaki yarı ömrü 5-10 dakikadır. Esas yıkım yeri karaciğerdir [34].

2.1.4. δ -Hücreleri

Bol granüllü ve dendritik şekilli δ -hücreleri, α - ve β - hücrelerinden daha küçüktür. δ -hücre granüllerinin elektron yoğunluğu oldukça değişkendir. Her bir granül, granül sınırlayıcı membranı dolduran orta derecede yoğunlukta homojen bir materyal içerir [9].

δ -hücrelerinden salınan somatostatin (SS) ilk defa hipotalamusta bulunmuş olup beynin farklı bölümlerinde de mevcuttur. Beynin değişik bölgelerinde duyuşal girdi, bilişsel işlevler ve lökomotor aktiviteye etki eden bir sinir ileticisi olarak işlev görür. Hipotalamustan salınan SS büyüme hormonunu inhibe edici özelliktedir. Bunun dışında bağırsaktan ve pankreastan da salınır. Nörohormonal regülasyon, endokrin ve parakrin görevleri vardır [35].

Dokularda SS 14 ve SS 28 olmak üzere iki formda bulunur. δ - hücrelerinde iki formu da bulunur ve pankreas hormonlarını parakrin

olarak inhibe eder. Fazla salgılanması hiperglisemiye ve diyabetin diğer bulgularının ortaya çıkmasına neden olur.

2.1.5. F Hücreleri

Her tür için çok farklı şekillerde bulunur. Granüller insanlarda uzunca, oldukça yoğun ve yaklaşık 140 nm çapındadır [9].

Adacık F hücreleri tarafından yapılan insan pankreatik polipeptiti (PP), polipeptit YY ve nöropeptit Y aynı ailedendir. PP ince ve kalın barsaktaki endokrin hücrelerden de salınır, salınımı yemek sonrası parasempatik uyarı ile artar. PP insanda yiyecek emilimini yavaşlatır ve emilimin iniş çıkışlarını daha yumuşak hale getirir [36]. Ayrıca PP reseptörü (Y4) beyinde de bulunur. Beyinde anksiyete ve depresyonda rol aldığı ortaya konmuştur [37].

2.2. Endotel

Endotel, vücuttaki en büyük organlardan biridir. Dolaşım sistemini döşeyen ve tek katlı, yassı, ince, poligonal, yaklaşık 10x30 µm boyutlarında hücrelerden oluşan endotel yaklaşık olarak 1 kg ağırlığında ve 7000 metrekare alana sahiptir [38]. Endotel hücreleri bazal lamınanın üzerinde yerleşmiştir. Kılcal damarlarda bazal lamınanın dışında perisit denen mezenşimal hücreler ile çevrelenmişlerdir.

Hemostazis, immün yanıtların düzenlenmesi, koagülasyon, fibrinoliz, vasküler tonus, vasküler büyüme ve yeniden yapılanma ve dokular ile kan arasındaki metabolik alış verişi düzenlemek gibi bir

çok olayda karmaşık rolü bulunan endotel, dinamik ve yaşamsal önemi olan bir organdır.

Kalpten en küçük kapiller damarlara kadar uzanan tek sıra endotel hücrelerinin en önemli görevi kanın akıcılığını sağlamaktır.

Endotel yarı geçirgen bir bariyerdir. Lipofilik ve düşük molekül ağırlıklı hidrofilik maddeler engellenmeden kan ve dokular arasında hareket edebilirler. Fakat damarlar makromoleküller için seçici olarak geçirgendir. İntravasküler ve ekstravasküler sıvı dengesinin sürdürülebilmesi için bu yarı seçici bariyer gereklidir [39].

Normal endotel, trombositlerin agregasyonunun inhibisyonu, koagülasyonun aktivasyonunun inhibisyonu ve fibrinolizis fonksiyonları ile pıhtılaşmayı önleyici bir yüzey oluşturur. Fakat hasarlandığında veya inflamatuvar durumlarda endotel prokoagülan olabilir [40]. Koagülasyonun önlenmesinde birçok mekanizma rol oynar. Endotelden salınan prostosiklin (PGI_2), nitrik oksit (NO) ve doku faktörü anti-koagülan özelliktedir.

Kan dolaşımını düzenleyen üç temel sistem; merkezi sinir sistemi, hormonlar ve bölgesel vasküler mekanizmadır. Bölgesel vasküler mekanizmayı endotel oluşturmaktadır. Vasküler tonusun kontrolü temel olarak endotel tarafından üretilen vazodilatatörler olan NO, PGI_2 ve endotel kaynaklı hiperpolarize edici faktör (EDHF) ile vazokonstriktör etkili olan endotelin-1 ve superoksit arasındaki denge ile düzenlenir. Süperoksit radikallerin kaynağı inflamatuvar hücreler

olabileceği gibi endotel de olabilir ve bu radikal NO ve PGI₂'yi okside ederek endotel disfonksiyonuna neden olur. Endotelden salınan diğer bir vazokonstriktör ise anjiyotensin dönüştürücü enzimdir (ACE) [41].

İnflamasyon sürecinde lökositler yuvarlanma, adezyon ve transmigrasyon aşamalarından sonra damar dışına çıkarlar. Endotel üzerinde bulunan P-selektin, ICAM, VCAM-1 ve CD36 gibi birçok reseptör adezyonda rol oynar. İnflamasyonda ve koagülasyonda lökosit ve trombosit adezyonu birbirini destekler şekilde gerçekleşmektedir. Trombin ile aktive olan trombositler endotele yapışarak lökosit adezyonunu düzenlemektedir. Birçok bölgedeki endotelde bulunan proteaz ile aktive olan reseptörler (PARs) koagülasyon ve inflamasyonun düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır [42]. İnflamasyon ve immünyetede rol oynayan IL-1, IL-6, IL-8, adezyon molekülleri ve histokompatibilite antijenleri endotel tarafından üretilir.

Endotel hücreleri bazı maddelerin aktivasyonu (anjiyotensin I'in anjiyotensin II'ye dönüşümü) ve inaktivasyonundan (bradikinin, serotonin, trombin, prostaglandinler, norepinefrin) da sorumludur.

Endotel hücresi ile damar duvarındaki diğer katmanlar arasında sıkı bir iletişim vardır. Damar düz kası ve endotel arasında konneksin proteinleri tarafından (özellikle konneksin 37, 43, 40) oluşturulan bağlantı vazodilatasyon için oldukça önemlidir [43].

Vasküler yenilenmede rol oynayan matriks metalloproteazların sentezlenmesi de endotelde gerçekleşmektedir [44].

2.2.1. Endotelden Salınan Faktörler

Nitrik Oksit (NO)

Nitrik oksit sentaz tarafından sentezlenen NO dokuya hızlıca geçebilir ve *soluble* guanilat siklaza bağlanarak cGMP (siklik guanozin monofosfat) oluşumuna neden olur [45]. cGMP hücrede proliferasyon, migrasyon ve canlılık gibi birçok sinyal yolağından sorumludur [46]. NO/cGMP sinyali kardiovasküler sistem için de çok önemlidir. Endotel hücresi tarafından üretilen NO, arterlerdeki düz kas hücrelerine geçer ve gevşemeye neden olur. Böylece damar çapı artar, damar direnci düşer ve kan akımı artmış olur [47]. Damar lümenindeki NO trombosit agregasyonunu engelleyerek homeostazisi düzenler [48]. Ayrıca VEGF, adrenomedullin, östrojen, insülin, lizofosfatidik asit, sfingozin-1-fosfat ve fibroblast büyüme faktörü gibi anjiyogenetik faktörler NO üzerinden damar geçirgenliğini ve anjiyogenezi de artırır [49-51].

NO, VEGF ve bir dizi anjiyogenik faktörün pro-anjiyogenik aktivitesine aracılık eder. Bu etki cGMP aktivasyonu üzerinden gerçekleşir [51, 52]. Tümörde yeni damarlanmalara neden olur. Ayrıca tümör damarlanma ve büyüme hızı *endotelial nitrik oksit sentaz* (eNOS) seviyeleri ile koreledir [53, 54].

Diyabette görülen insülin salınımındaki azalma, hiperglisemi, lipit metabolizmasındaki bozukluk ve obezite NO salınımını azaltarak

endotel fonksiyon bozukluğuna neden olmaktadır. İnsülin NO salınımını artıran ve reaktif oksijen radikallerinin (ROS) oluşumunu azaltan yönde etki gösterir. Hiperglisemi durumlarında yoğun olarak ortaya çıkan protein veya lipidlerin amino guruplarına enzimatik olmayan bir mekanizma ile glukozun bağlanması durumu oksidatif stres ile ROS oluşumuna neden olarak NO'yu azaltır. Ayrıca vasküler inflamasyonu tetikleyerek sitokinlerin fazla miktarda salınımına neden olur. Ortaya çıkan sitokinlerden TNF- α (tümör nekrozis faktör) insülin reseptöründe (IR) serin fosforilasyonunu indüklerken tiroz in fosforilasyonunu inhibe eder ve sonuçta insülin direnci ortaya çıkar.

Diyabetli hastalarda bozulan endotel fonksiyonu, diyabetin ileri evrelerinde ciddi problemler oluşturabilen kardiyovasküler, renal ve enfeksiyöz komplikasyonlar için en önemli faktördür.

Endotelin (ET)

En güçlü vasokonstrüktörlerden birisidir. ET-1, ET-2, ET-3 olmak üzere üç aktif formu vardır. ET-4, sıçan ve farelerde tanımlanan ve insandaki ET-2 analogu olan formudur [55]. Etkisini ET-A ve ET-B adlı G protein ile kenetlenmiş reseptörleriyle gösterir. ET-C insanda olmayan diğer bir reseptör tipidir. ET-1'in ET-A ya, ET-2 ve -3'ün ET-B ye afinitesi daha yüksektir. Bu reseptörler endotel hücresi dışında birçok dokuda yaygın olarak bulunur [56]. Kardiyovasküler hastalıklar ve otoimmün hastalıklar gibi endotel disfonksiyonuyla ilişkili birçok

hastalıkta önemli rol oynadığı gösterilmiştir. ET reseptör antagonistleri bu hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır [57, 58].

ET-1, NO düzeyini azaltarak endotel disfonksiyonuna neden olmaktadır [58].

ET'in vasokonstrüktör etki dışında birçok büyüme faktörü ile ilişkisi vardır ve damar yenilenmesinde ve ekstrasellüler matriks (ECM) oluşumunda rol oynar [59].

Makrofajlarda *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) aktivasyonu, serbest radikallerin salınımı, IL-8 ve TGF- β salınımı gibi etkilere yol açarak inflamasyon cevabında da rol aldığı gösterilmiştir [60].

Prostasiklin (PGI₂)

Araşidonik asitten sentezlenen en büyük metabolik ürünlerden biridir. Endotel hücrelerinden salınan PGI₂ güçlü bir vasodilatatör olmasının yanında trombosit agregasyonunu, ateroskleroz ve trombozisi inhibe eder. NO ile birlikte en önemli kalbi koruyan bir maddedir. Bu etkisini cAMP (siklik adenosin monofosfat) üzerinden gösterir [61].

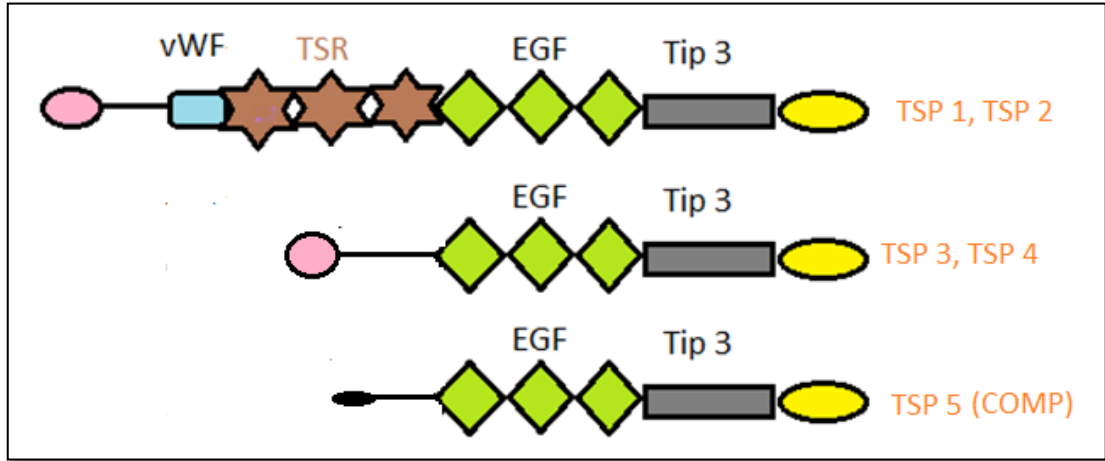
Endotelden salınan diğer maddeler; trombaksan A₂, platelet aktive edici faktör (PAF), serbest radikaller, büyüme faktörleri, interlökinler, plazminojen inhibitörleri, von Willebrand faktör, adezyon molekülleri (VCAM ve ICAM), E-selektin, EDHF ve TSP'lerdir.

2.3.Trombospondinler

Hücre–hücre etkileşimi ve hücre matris etkileşiminde aracı olan trombospondinlerin yara iyileşmesi, anjiyogenez, bağ dokusunun düzenlenmesi ve sinaps oluşumu gibi birçok fonksiyonu vardır. Bu görevlerini sitokinler, büyüme faktörleri, hücre yüzey reseptörlerini etkileyerek yerine getirirler [62].

2.3.1. Moleküler Yapısı ve Sınıflaması

Trombospondinler (TSPs) beş üyesi olan, hücre yüzeyinde ve ECM'de görev alan bir gen ailesidir. Tüm üyeleri multimerik ve kompleks yapıya sahiptir. Karboksi terminal ucu bir dizi epidermal büyüme faktörü (EGF) benzeri yapı, kalsiyum bağlayan bölge (Tip 3 tekrar bölgesi) ve L-Lectin benzeri yapıya sahip globüler karboksi terminal bölgelerini içerir. Bu yapılar trombospondinler için karakteristiktir. Amino terminal ucu çok çeşitlilik gösterir ve TSP'in tipine göre Laminin G (LG) benzeri amino terminal, von Wilibrand tip C (vWF-C), tip 1 tekrar (TSR) ve EGF benzeri bölgelerden herhangi birini veya birkaçını içerebilir (Şekil 2.3) [63].



Şekil 1.3. Trombospondin ailesi

TSP gen ailesi molekül yapısına göre A ve B olarak iki alt tipe ayrılır. Trimerik yapıdaki trombospondin-1 (TSP-1) ve TSP-2 grup A, pentamerik yapıdaki trombospondin-3, -4, -5 (TSP-3, TSP-4, TSP-5) ise grup B olarak adlandırılır [64]. vWF; von Willebrand faktör, TSR; tip 1 tekrar/ properdin benzeri tekrar, EGF; epidermal büyüme faktörü/ tip 2 tekrar, Tip 3; tip 3 tekrar/ Ca⁺⁺ bağlanma bölgesi.

Gelişmekte olan ve yetişkin dokuda bulunan TSP'ler farklıdır. TSP-1, embriyonik dönemin onuncu gününden itibaren dominant olarak salınır. Daha çok nöral tüp, kardiyak bağ doku ve mezenkimal dokudan salınır. Pentamerik TSP'ler embriyonik dokuda oldukça sınırlıdır. TSP-3 beyin ve akciğer, TSP-4 kornea ve iskelet sistemi, TSP-5 eklem kıkırdağında daha çok eksprese olur [64-66].

TSP-1 asıl olarak trombositlerin α -granüllerinde bulunur. Bunun dışında endotel hücresi, damar düz kas hücresi, fibroblast, makrofaj ve keratinositlerde de sentezlenir [67]. Prolifere olan hücrelerde yüksek miktarda salınır ve büyüme faktörleri (PDGF, FGF)

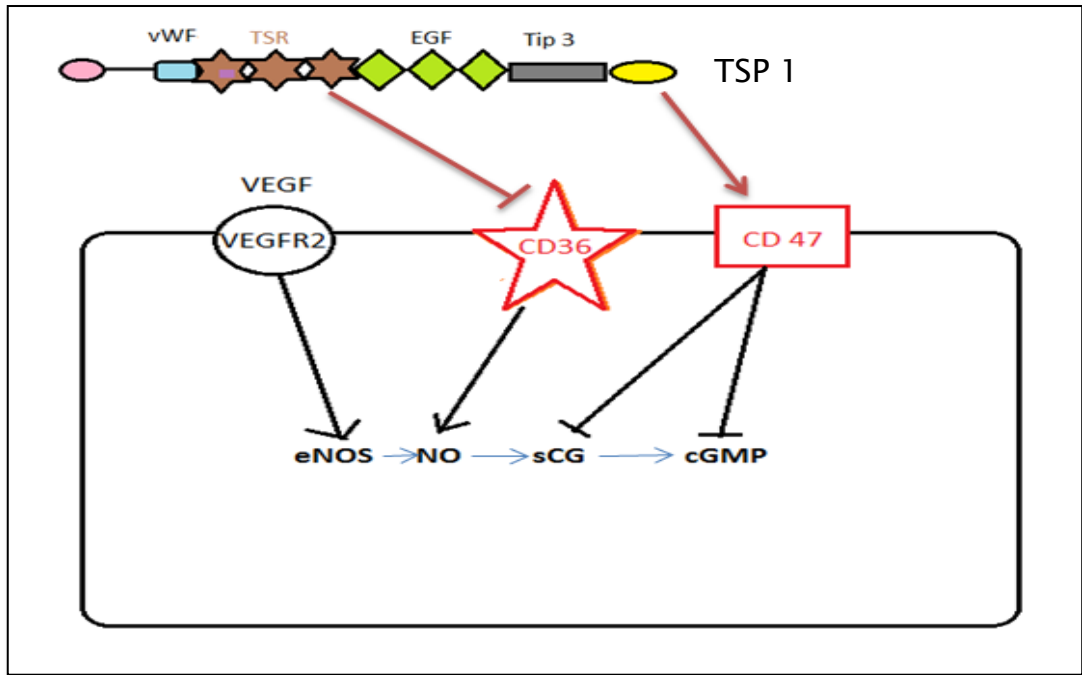
ile salınımı artar, proinflamatuvar sitokinler ($TNF-\alpha$, $IL-1\beta$) ile baskılanır [68, 69].

Doku yaralanmalarını takiben özellikle yara kenarında artış gösterir. Erken bir artışın ardından TSP sentezi durdurulur ve katepsinler, lökosit elastaz ve ADAMTS1 (*A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs*) tarafından parçalanır [70].

2.3.2. Moleküler Etkileşimleri

TSP-1 ve TSP-2 endojen anjiyogenez inhibitörleridir. Ekspresyonları kanser gelişimi sırasında kaybolur ve çok eksprese olmaları tümör dokusunun büyümesini baskılar [71]. Tümör stroması tarafından üretilen TSP diğer dokuların kan akımını azaltarak indirekt olarak tümör dokusunun kanlanmasını artırabilir [72].

Matriksteki yapısal proteinlere ve hücredeki spesifik reseptörlerine bağlanarak hücre dışı ve hücre içi mekanizmalara etki ederler. Kollajen ile etkileşim TSP'lerin C terminal ucundan olur. TSP 1, kollajen 5 ve fibrine bağlanır, fibrin oluşumunu hızlandırır, fibronektin ile birleşerek matrikse dahil olabilir [73-75]. TSP'lerin tip 3 bölgesi çok sayıda Ca^{++} (kalsiyum) iyonu ile etkileşir. Molekülün proteolizise duyarlılığını ve hücreye bağlanmasını değiştirir. TSP1'in bağlanması trombin, katepsin ve plazminin katalitik aktivitesini düşürür [76].



Şekil 1.4. CD 36 ve CD 47 reseptörleri ile NO inhibisyonu

VEGF (vasküler endotelial büyüme faktörü)'nin NO (nitrik oksit) sentezini artırmasına karşılık TSP (trombospondin) bu etkiyi iki reseptör üzerinden engellemektedir. CD 36 reseptörünü bloke ederek eNOS (endotel kaynaklı NO sentaz)'yu inaktive ederken CD 47 reseptörü ile sGC(*soluble* guanilat siklaz) aktivitesini baskılar.

Düz kas ve endotel hücrelerinde NO sinyalinin potent antagonisti TSP1'dir. Bu antagonizmaya iki reseptör aracılık eder; CD 36 ve CD 47 (Şekil 2.4) [77].

Trombosit, monosit ve endotel yüzeyindeki CD 36 TSP1 reseptörü gibi görev yapmaktadır. TSP1 in CD 36 ile etkileşimi TGF- β 'nin aktivasyonu ve inflamatuvar süreç için anahtar rol oynamaktadır [78]. TSP1 eksikliği şiddetli inflamatuvar cevaba neden olmaktadır [79].

Nötrofil fagositozunu düzenlemek, T regülatör hücre çoğalmasını baskılamak gibi yollarla da anti-inflamatuar etki göstermektedir [80].

İntegral membran proteini olan CD 47 membranı beş kez kateder. C-terminal ucu TSP'i bağlar. Kan hücreleri ve damar yapısında yer alan hücrelerde bulunur [81]. TSP1, CD 47 aracılığıyla NO sinyalini inhibe eder. Ayrıca Ca^{++} iyonu üzerinden eNOS ve sGC'yi regüle eder [82, 83].

2.3.3. Hücresel Etkileri

Birbirine zıt gibi görünen etkilerinin olması birçok bağlanma bölgesinin olması ile açıklanabilir.

Hücrelerin matrikse tutunmaları üç fazda gerçekleşir. TSP'ler güçlü adezyonu engelleyerek hücre motilitesini sağlarlar [84]. TSP-2 yokluğunun derideki kollajen liflerinde düzensizlik ve frajilitede artışa neden olduğu bulunmuştur [85].

Anjiyostatik etkisini CD 36 ve CD 47 reseptörleri üzerinden üç yolla gerçekleştirir. VEGF'ye bağlanarak reseptörüne bağlanmasını engeller [86], VEGF reseptörünün formunu değiştirir veya inhibe eder [87, 88]. CD 47 reseptörü olmayan endotel hücresi TSP1'in VEGF reseptör inhibisyonuna dirençlidir [89]. TSP1'in CD 47'ye bağlanması ayrıca integrinlerin de aktive olmasına neden olmaktadır [90].

Martiks proteazları olan plasmin, elastaz, ürokinaz, MMP-9 ve MMP-2'yi inhibe ederek ECM'yi stabilize eder. Bu etkisi anjiyostatik etkisine katkıda bulunur [91].

TSP ailesinin beşinci üyesi olan TSP-5, COMP (*cartilage oligomeric matrix protein*) inflamatuvar süreci ve doku hasarını gösteren ayırıcı bir parametredir [92].

2.3.4. Adacık Hücreleri ve Trombospondinler

Yapılan birçok çalışmada endotel - endokrin aksının yetişkin pankreas adacıklarında olduğu gösterilmiştir.

Bir çalışmada pankreas adacıklarından elde edilen saflaştırılmış endotel hücrelerinin β -hücre proliferasyonunu stimüle ettiği ve bunun adacıktan salınan VEGF gibi stimülatörlerle olabileceği gösterilmiştir [93].

ZDF (zucker diabetic fatty) sıçanlardaki adacıkların mirovaskülarizasyonu üzerine yapılan başka bir çalışmada, diyabetik hale geçmeden önce ve diyabet olduktan sonra TSP düzeyleri ölçülmüş, diyabetik olanlarda 5 kat artış ve endotelde harabiyetle birlikte kalınlaşma gözlenmiştir [94]

Diğer bir çalışma TSP1 olmayan fare ve *wild*-tip farelerden alınan adacıklarda yapılmıştır. TSP-/- adacıklarda vaskülaritede artış gözlenmiştir. TSP 1'in adacık içi damarlanmayı sınırlayarak β -hücre yetmezliğine neden olduğu gösterilmiştir [95]. TSP in bu etkisi adacık

içi damarlanmanın transplantasyon sonrası sınırlı kalmasına da etki ediyor olabilir [96].

Endotel-adacık ko-kültür çalışmaları adacık canlılık ve fonksiyonunda iyileşme ile sonuçlanmıştır.

2.4. Endoplasmik Retikulum Stresi

Endoplasmik retikulum (ER), lipid ve protein sentezinde görevlidir. Nükleusun yakınından hücre zarına kadar uzanan membran topluluğu olan ER, sekretuar veya yapısal protein haline gelecek olan polipeptitlerin sentezlendikten sonra katlanma, glukozillenme, disülfid bağlarının oluşması gibi post-transisyonel modifikasyona uğradığı organeldir [97].

ER sitoplazma içi ağ sistemidir ve bu ağın içi matriks ile doludur. Bir ucu nükleusun porlarına diğer ucu hücre membranına uzanan bu ağ sistemi ortalama bir hayvan hücresindeki zarlı yapıların yarısından fazladır. Pankreasın β -hücresi gibi endokrin organlarda granüllü ER çok iyi gelişmiştir ve hayati öneme sahiptir [98].

Proteinlerin ER'ye alınması eş çevrimsel bir işlemdir. Yani sentez tamamlanmadan ER'ye alınır. ER sinyal dizisi olan protein sentezlenirse, ribozom ER zarına yönlendirilir. Bir mRNA (mesajcı ribonükleik asit), ER sinyal dizisinden yoksun bir proteini kodlarsa ribozom sitozolde serbest kalır ve oluşan protein de sitozole boşaltılır [98].

ER sinyal dizisinin ER ye yönlendirilmesi SRP isimli sinyal tanıma parçacığı ile gerçekleştirilir. SRP- ribozom kompleksi oluşunca protein sentezi ER zarına bağlı bir şekilde devam eder.

ER sinyal dizisi bir de protein yer değiştiricisi (sec 61) tarafından tanınır. Sec 61; polipeptit zincirin zardan geçmesini sağlayan, ortası basık, yuvarlak, üç tane transmembran proteininden oluşan bir gözenektir. Bu gözenek sadece polipeptit zincir bulunan ribozom ER ye tutunduğunda açılır.

ER lümeninde bulunan oligosakkarit transferaz ile dolikolün getirdiği oligosakkarit asparajin amino asitinden proteine bağlanır. ER'de bulunan bir diğer enzim olan ve N bağlı oligosakkaritlerin ucuna glukoz ekleyen glukozil transferaz, aynı zamanda proteinin uygun katlanıp katlanmadığına karar veren bir enzimdir. Tam katlanmamışsa oligosakkarite bir glukoz aktarır. Kalneksin ve kalretikülin, bir glukozlu tam katlanmamış proteini tanır ve ER'de proteini tutuklar ve düzeltmeye çalışır.

Lipit sentezi için özelleşmiş olan steroid hormon sentezlenen leydig hücresi ve lipoprotein üretim yeri olan hepatositler gibi hücrelerde ise düz ER çok iyi gelişmiştir. Detoksifikasyon için gerekli olan sitokrom p450 de hepatositlerin düz ER'sinde bulunur. ER'nin belirli bölgeleri kalsiyum depolamak için özelleşmiştir. Bu özelleşmiş bölgeler de düz ER'dir [98].

ER, protein katlanması ve transportundaki rolü nedeniyle Ca^{+2} bağımlı moleküler şaperonlar açısından da zengindir. GRP78/BiP en iyi bilinen ER şaperonudur. Diğer ER şaperon proteinleri; kalneksin, kalretikülin, ERp57 ve GRP94 tür. Proteinlerin görevlerini yerine getirebilmesi için üç boyutlu şekle sahip olması gerekmektedir. Bu aşamada bir heykeltıraş gibi çalışan şaperon hayati öneme sahiptir. Şaperonların çok önemli görevleri şu şekilde sıralanabilir:

1. Ribozomda üretilen proteinlerin zamansız kıvrılmalarına engel olmaktadır. Proteinler doğru yer ve zamanda şaperon sayesinde katlanırlar.

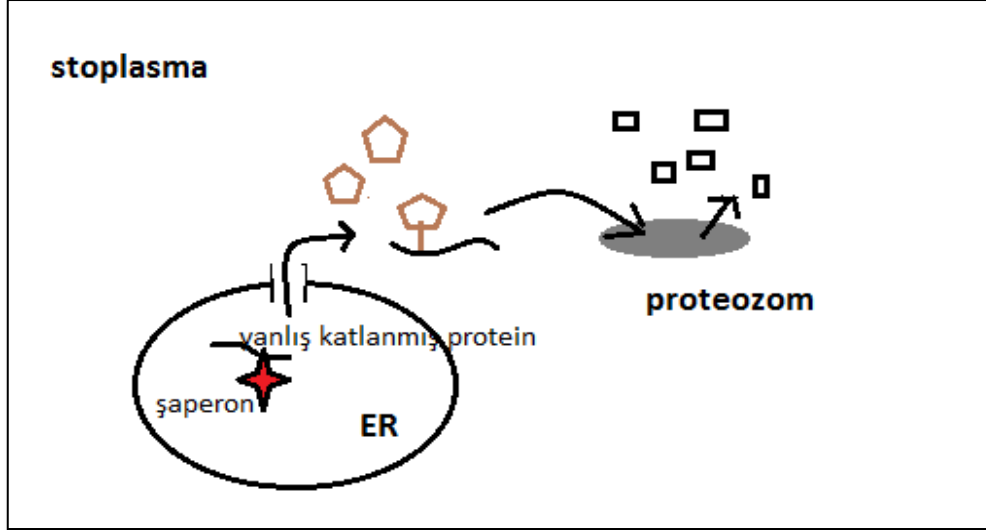
2. Hücrede yanlış şekilde katlanmış proteinler vardır. Şaperon bu yanlış katlanmış olan proteinleri görerek onları düzeltir.

3. Bazı onarılması mümkün olmayan proteinleri ortamdaki uzaklaştırırlar. Bu şekilde hücrenin zarar görmesini engeller.

Yapılan birçok çalışmada 4-fenil bütirat (4-PBA), taurin ve konjuge deoksikolik asit (TUDCA) verilen farelerin ER stresi ile ilişkili hastalıklarında iyileşme gözlenmiştir. Bu maddeler ER şaperonlarının ekspresyonunu artırarak etki etmektedir. Kanser tedavisinde kullanılan bazı ilaçların şaperon desteği sağladığı da bilinmektedir [99-102].

Şaperonlardan gelen tüm yardımlara rağmen proteinlerin %30'u uygun şekilde katlanamaz. Bu durumda ER'ye giriş yaptıkları yoldan (sec 61) deglukozillendikleri ve ubikitinlendikleri sitozole geri

gönderilerek yıkılırlar. Buna ERAD –Endoplasmik Retikulum Aracılı Degredasyon– denir (Şekil 2.5).



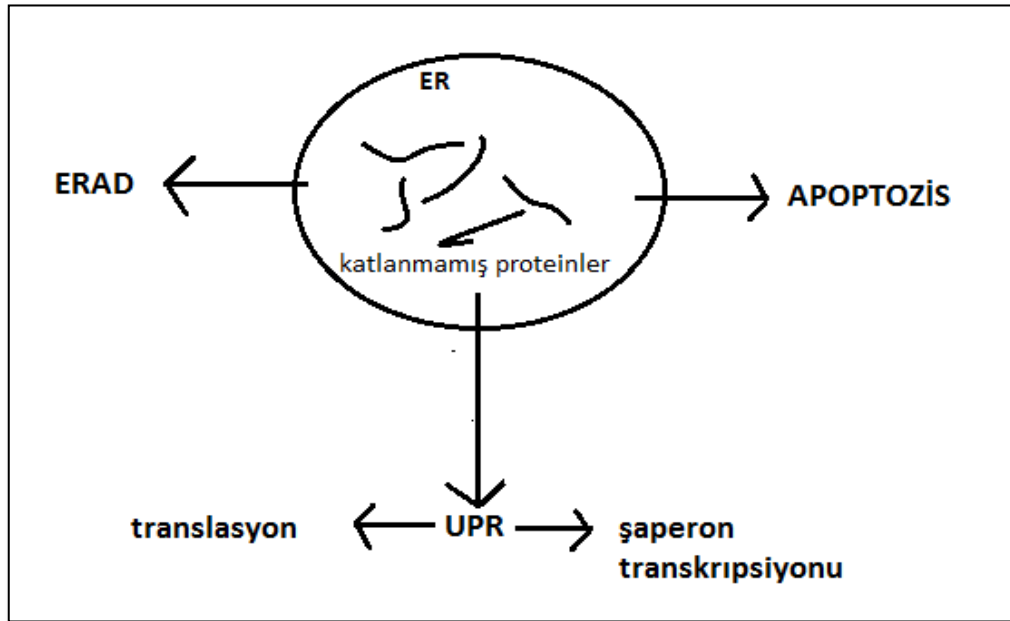
Şekil 1.5. ERAD (Endoplasmik retikulum aracılı degredasyon)

ER lümeninde yanlış katlanmış proteinler ilk olarak sitoplazmaya gönderilir. Burada glukozlarından ayrılarak ubiquitin ile işaretlenir. İşaretli protein proteozomlarca parçalanarak ortamdan uzaklaştırılır.

ER stresi, hücre için gereken proteinlerin oluşturulma ve katlanma kapasitesi arasındaki dengesizliktir. Düzgün katlanmayan proteinlerin birikmesi, Golgiye transfer olamaması ve ER lümeninde Ca^{++} iyonunun birikmesi gibi birçok nedenle meydana gelebilir [103].

Böyle bir durumda ER stresini engelleyebilmek ve ER homeostazisini tekrar eski haline döndürebilmek amacıyla UPR (katlanmamış protein cevabı) yolağı aktif hale geçer ve hücrel defans mekanizmaları aktive olur. UPR; ER de yanlış katlanmış

proteinlerin artması nedeniyle ortaya çıkan sitoprotektif bir yanıttır. Sitolozde yanlış katlanmış proteinler birikmesi ısı şok yanıtını uyarır. Hücreler yanlış katlanmış proteinlerin miktarını sıkı bir şekilde kontrol ederler ve bu mekanizmaya *endoplasmic reticulum quantity control* (ERQC) denir. Şaperonlar gen ekspresyonunu artırarak ve ER lümenine gelecek yeni proteinlerin miktarını azaltarak bu durumla başa çıkmaya çalışırlar. ER stresi engellenemezse hücreler apoptozise uğrarlar (Şekil 2.6).



Şekil 1.6. ER stresinin aktive ettiği mekanizmalar

ER stresi meydana geldiğinde ilk olarak ERAD (endoplasmik retikulum aracılı degradasyon) meydana gelir. Katlanmamış proteinler uzaklaştırılmazsa UPR yolağı devreye girer. UPR (katlanmamış protein cevabı) translasyonda azalma ve şaperon protein transkripsiyonunda artma ile sonuçlanır. Kurtarılamayan hücrelerde apoptozis meydana gelir.

ER stresi meydana geldiği zaman ER stresi ile ilgili hücresel defans mekanizmaları aktive olur (Şekil 2.7). ER stresi cevabı;

1. PERK (*Protein-Kinase-RNA like ER kinase*) aktivasyonu ile protein translasyonunu gösteren eIF2a (*eukaryotic translation initiation factor 2 alpha*) nın fosforilasyonu,

2. IRE (*inositol-requiring 1*) ile XBP-1 (*X-box-binding-protein- 1*) aktivasyonu ve ATF6 (*activating transcription factor 6*) aktivasyonu ile şaperon proteinlerinin fazla ekspresyonunu sağlamak ve böylece ER katlanma kapasitesinin artırılması,

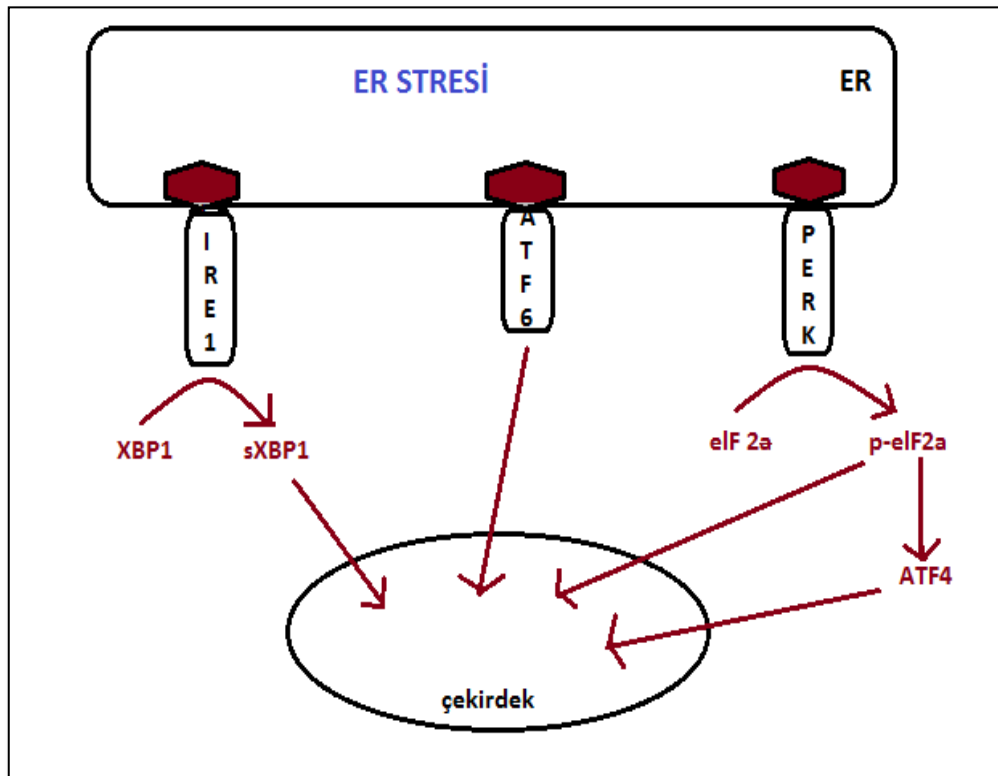
3. katlanmayan ya da yanlış katlanmış proteinlerin ER içinde yıkıma uğratılması; ER aracılı degradasyon (ERAD),

4. CHOP (*CCAAT/enhancer-binding homologous protein*) aktivasyonu ile kurtarılamayan hücrelerin apoptozise gitmesi şeklindedir [104, 105].

Katlanmamış proteinler birikmeye başladığında ilk cevap PERK/eIF2a sinyali ile yeni translasyonun azaltılarak ER'nin protein yükünü hafifletmektir. Heterotrimerik bir protein olan Elf2a, başlangıç kodonu olan met-tRNA'yı ribozoma taşıma işini yapar. PERK ise ER membranında yer alan transmembran serin/treonin kinaz enzimidir. Stres dışında ER şaperonu olan Bip bu enzime bağlanarak inaktif formda kalmasını sağlar. Stres meydana geldiğinde Bip katlanmamış proteinlere bağlanır ve PERK trans-otofosforilasyon ve

oligomerizasyon ile aktifleşmiş olur. Sonuç olarak PERK, eIF2a yı fosfatlar ve p-eIF2a meydana gelir; translasyon inhibe olur [106].

p-eIF2a, transkripsiyon faktörleri olan CHOP ve ATF4 ün ekspresyonlarını artırır. Böylece strese uzun süreli adaptasyonda protein fosfataz gibi davranan GADD (*Growth arrest and DNA damage-inducible protein 34*) genini indükleyerek p-eIF2a'yı defosforile eder [107, 108].



Şekil 1.7. ER stresi yolları

ER stresinin uyardığı UPR, üç yolağı aktive eder. Bu aktivasyon GRP 78/BiP gibi bir şaperon proteininin aktivite kazanması ile meydana gelir. Üç yolak sırasıyla ATF 6 (*activating transcription factor 6*), IRE1 (*inositol-requiring 1*) ve PERK (*Protein-Kinase-RNA like ER kinase*)'tir. ATF6, aktivite kazanarak çekirdeğe gider. IRE1, XBP1 (*X-box-binding-protein-1*)'i aktive eder. PERK,

eIF 2 α (*eukaryotic translation initiation factor 2 alpha*)'yı ve ATF 4'ü uyarır. Bütün bu proteinlerin genom üzerinde çeşitli etkileri vardır.

ER stresine verilen ikinci cevap Bip gibi ER şaperonlarla protein katlanma kapasitesinin artırılmasıdır. Bu cevap IRE1/ATF 6 yolağı ile aktive olur. IRE1, ER membranında yer alan transmembran bir endonükleazdır. PERK'e benzer şekilde şaperonun çekilmesi ile aktive olur(Şekil 2.7). Geçici hiperglisemi, post-prandial hiperglisemi gibi, IRE 1'i aktive ederek proinsülin seviyelerini yükseltirken uzun süreli hiperglisemi IRE1'i sürekli aktive ederek insülinin mRNA ekspresyonunu baskılar. Uzun süreli hiperglisemide XBP1 *spliced* forma dönüşürken geçici hiperglisemide bu dönüşüm olmaz. *Spliced* XBP1 (XBP-1s), kronik hipergliseminin bir göstergesidir denebilir [109].

Sarko/endoplasmik retikulum Ca-ATPaz (SERCA) pompasını inhibe ederek ER stresi meydana getiren ajanlar insülin mRNA seviyesini azaltır fakat insülin transkripsiyonunu etkilemez. Bu aynı zamanda IRE1s artışı ve β -hücre apoptozisi ile birlikte [110].

ER stresi ile indüklenen transkripsiyon faktörlerinden biri de ATF 6'dır. ATF 6, 90 kDa ağırlığında 670 aminoasitten oluşan transmembran bir proteindir [111]. ER stresi sırasında ER membranından ayrılarak Golgiye transfer olur. Golgide bir proteaz ile ikiye bölünür, ayrılan parçalardan N-terminal ucu olan kısım nükleusa gider ve burada şaperon proteinlerinin transkripsiyonunu artırır (Şekil 2.7) [112, 113].

İnsülinin promotor aktivitesinde inhibisyon bu üç yoldan (ATF6, IRE1, ve PERK) sadece ATF 6 da görülür, IRE1-XBP1 ve PERK-eIF2 α -ATF4 'da görülmez. Adenovirus ATF6 aktivitesini artırarak insülin transkripsiyonunu azaltmaktadır [114].

Katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlere ait küçük birimlerin yıkımı ERAD ile kontrol edilirken, büyük agregatlar lizozomal yıkımla kontrol edilir [115].

ER stresi ile ilişkilendirilen bazı hastalıklar arasında nörodejeneratif hastalıklar, AML (amiyotrofik lateral skleroz), Parkinson, alzheimer, Huntington, iskemi/reperfüzyon hasarı olan hastalıklar, metabolik hastalıklar içerisinde diyabet, obezite ve inklüzyon cisimcik miyoziti sayılabilir.

Preproinsülin olarak sentezlenen insülin için sentez sonrası modifikasyonlar oldukça önemlidir. ER'de proinsüline dönüştürülerek stabilite ve biyoaktivitesi için gerekli disülfid bağları oluşturulur. Bundan dolayı ER stresi nedeniyle katlanmamış olarak kalan insülin β -hücre disfonksiyonu olarak karşımıza çıkar [116].

β -hücre disfonksiyonu ve insülin direnci diyabet patogenezindeki en büyük komponentlerdir. Diyabet patogenezinde birçok etken yer alır, bunlardan biri de birçok çalışma ile gösterilmiş olan endoplasmik retikulum stresidir.

Willcot-rallison sendromu; nadir görülen, otozomal resesif geçişli, PERK gen mutasyonu sonucunda infantil Tip 1 diyabet yapan bir hastalıktır. Aynı bozukluk PERK-/- farelerde de görülmektedir. Endokrin ve ekzokrin pankreas gelişimi normal olmakla beraber doğum sonrası β -hücre kaybı görülmektedir [117].

ER'deki kalsiyum kanalları ile ilgili gende mutasyon sonucu görülen Wolfram sendromu olarak adlandırılan β -hücre kaybı ile giden ve genç yaşta başlayan Tip 2 DM'a neden olan, optik atrofi ve diabetes insipidusun da eşlik ettiği diğer bir hastalıktır [118].

Yapılan bir çalışmada GLP-1 reseptör agonisti olan exendin-4'ün ATF4 ve CHOP ekspresyonunu artırarak ve GADD34'ü uyararak p-eIF2a düzeylerini düşürdüğü böylece ER stresine dayanıklılığı artırdığı bulunmuştur. Bu çalışma GLP-1 sinyalinin ER stresi cevabını düzenleyerek β -hücre canlılığını iyileştirdiğini göstermektedir [119].

CHOP'ta heterozigot bozukluğun farelerde 10-12 haftalık olduklarında diyabet gelişmesine neden olduğu bulunmuştur. Diğer ER stresi cevap mekanizmalarındaki eksikliği modelleyen hayvan çalışmalarında da benzer sonuçlar ortaya çıkmıştır [120].

ER lümeninde yer alan şaperonlar ve katlanma ile ilgili enzimler Grp78 (BiP), Grp94, protein disulfid izomeraz (PDI), kalneksin ve kalretikulindir [98].

Modern hayat tarzı, enerjiden zengin gıda tüketimi ve fiziksel aktivitenin azalması Tip 2 diabetes mellitus (DM) görülme sıklığını artırmıştır. Tip 2 DM, mortalite, morbidite ve yaşam kalitesinin azalmasının en büyük sebebidir. Obezite ve aşırı beslenme gibi artan metabolik yüke adaptasyon için pankreas adacıklarında β -hücre kitlesi hiperplazi, neogenez ve hipertrofi gibi yollarla artırılır [121, 122]. Adaptasyon gerçekleşmediğinde β -hücre fonksiyonu bozulur ve hücre ölümü gerçekleşir. Sonuçta glukoz toleransı bozulur ve tip 2 DM meydana gelir. Yapılan birçok araştırma β -hücre kaybının gliko/lipotoksisite, oksidatif stres ve ER stresinin oluşturduğu iç içe geçmiş bir cevap sonucu meydana geldiğini göstermektedir [123–125]

2. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. DeneY Protokolü

Deneyde 48 adet 250–300 gr, 3–4 aylık *Sprague Dawley* dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar etik kurallara uygun olarak hazırlanmış ünitelerde bakılıp uygun yem ve su ile beslendi. Deneyler Ankara Dışkayı Yıldırım Beyazıt Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Hayvan Dene

yeri Yerel Etik Kurulu'ndan (Protokol No: 2013/28) izin alınmasından sonra, Pankreas Hücre Araştırmaları Laboratuvarı'nda yapıldı.

Her grupta onaltı sıçan olacak şekilde 3 grup oluşturuldu; kontrol 0.saat (kontrol-0), kontrol 24.saat(kontrol-24), trombospondin(TSP) ve tunikamisin(TUN) grupları. Bir seferde en fazla 24 hayvandan pankreas izolasyonu yapılabildiği için deneyler 2 kez tekrarlandı. İzole edilen hücreler, maddeler (TSP ve TUN) eklendikten sonra flasklara konularak 24 saat kültür ortamında bekletildi. İlk gün elde edilen hücreler (Western Blot çalışılacak olanlar hariç) 24 saat sonunda –80 °C 'ye kaldırılarak saklandı. İkinci gün elde edilen hücrelerin hepsi 24. saatin sonunda –80 °C 'ye kaldırıldı. Toplamda 21000 hücre elde edildi ve her grup için izole edilen adacıklar 10 flaskta (700 X10 adacık) toplandı. Her gruptan 3 flask (700X3 adacık) Western Blot için kullanıldı. Diğer adacıklardan glukoz stimülasyonu, canlılık analizi ve oksidatif hasar parametreleri olan malondialdehit (MDA), katalaz ve protein karbonil çalışıldı.

Kontrol grubuna hiçbir madde eklenmedi. ER stresörü olarak kullanılan tunikamisin 20µg/ml ve trombospondin 200 pM olacak şekilde flasklara eklendi ve 24 saat kültür ortamında bekletildi.

3.2. Gerekli Çözeltilerin Hazırlanması

3.2.1. İzolasyon Çözeltileri

HBSS (+)/Serumlu HBSS; *Hank's Buffered Salt Solution Medium* (500ml, Celgro, 99595041) içine 50 ml fetal sığır serumu (FBS, Lonza, 1SB002H3), 5 ml penisilin/ streptomisin (Biological, 1140757), 5 ml L-glutamin (Cibco, 1113811) eklenerek +4 °C'de saklandı.

RPMI; *Roswell Park Memorial Institute Medium* (500ml, Celgro, 99595041) içine 50 ml FBS, 5 ml Penisilin/streptomisin, 5 ml L-glutamin eklenerek +4 °C'de saklandı.

RPMI 1640 (-); 500 ml'lik *RPMI 1640 without L-Glutamine* solüsyonunun içerisinden 10 ml alındı. Geriye kalan 490 ml solüsyonun üzerine 5 ml L-Glutamine ve 5 ml Pen-Strep-Amp ilave edilerek +4 °C'de saklandı.

Kollajenaz; 200 mg'lık *kollagenaz V* (Sigma, 011M1260V) üzerine 50 ml HBSS ilave edilerek hazırlandı. 0,22 µm'lik filtrelerden geçirilerek -20 °C'de saklandı.

3.2.2. Florasan Boyaların Hazırlanması

Ditiazon (DTZ, D5130, Sigma); 10 mg DTZ ile 5 ml dimetil sülfoksit (DMSO) karıştırılıp üzerine 25 ml HBSS eklendi, 0,4 µm'lik filtreden geçirildikten sonra - 20 °C'de saklandı.

Stok *Propidium Iodide* (PI) çözeltisi (750 µM) : 5 mg PI, 10 ml PBS (*Phosphate Buffered Saline System*) (pH 7,4) solüsyonu içerisinde çözülerek hazırlandı. +4 °C'de alüminyum folyo sarılı kapta 3 ay süre ile saklanabilir.

Stok florasan diasetat (FDA) çözeltisi (24 µM): 1 mg FDA, 100 ml asetonda çözüldü. -20 °C'de alüminyum folyo sarılı kapta 3 ay süre ile saklanabilir.

3.2.3. Trombospondin (TSP)

Thrombospondin human (Sigma, SRP4805, 10µg), 20 mM sodyum fosfat (pH=6) ve 300 mM NaCl içeren tampon (hazırlandıktan sonra 0,2 mikronluk filtreden geçirerek steril hale getirildi) içinde çözüldü. Molekül ağırlığı 140 kDa olan TSP nin konsantrasyonu 0,16 mg/ ml ve molaritesi 1,14 µM olarak bulundu. On kat sulandırmak için 562,5 µL tampon eklenerek dilue TSP elde edildi. Dilue TSP nin molaritesi 114 nM oldu. 5 ml lik kültür flaskına eklendiğinde konsantrasyonunun 200 pM olması için her flaska 9 µL TSP eklendi.

3.2.4. Tunikamisin (TUN)

Tunicamycin from Streptomyces (Sigma, T7765, 10MG) 1 ml DMSO solüsyonu konularak çözüldü. +4 °C'de saklandı.

Konsantrasyon 20µg/ml olacak şekilde RMPI ile dilüe edilerek kullanıldı. Her basamakta filtreden geçirilerek sterilizasyon sağlandı.

3.3. Pankreas Adacık Hücresi İzolasyon Protokolü

Her sıçan için 0,3/0,3 ml ketamin/ksilazin anestezisi i.m olarak verildi. Abdominal bölge traşlanarak batikon ile silindi. Baş aşağıda olacak şekilde steril yeşillerin altına yatırıldı. İç organlara zarar vermeden abdominal bölge önce linea alba üzerinden düz bir kesi ile daha sonra yanlara doğru V şeklinde açıldı. Karaciğer gazlı bez arasına alınarak göğüs kafesine doğru ekarte edildi. Duedonuma açılan ampulla water kleplendi. Ana safra kanalı belirlendi. Karaciğere yakın noktadan duktusa çentik atılarak içinde 10 ml kollajenaz V olan enjektör, PE50 kateteri ile duktusa yerleştirildi. Pens ile sabitlendi. Sıvı yavaşça duktusa verilerek pankreas şişirildi. İşlem bitince göğüs kafesi altından kalp kesilerek ötenazi yapıldı. Hızla pankreas diğer dokulardan ayrıldı. 50 ml'lik falkonlara konularak tüm işlemler bitene kadar buz içinde bekletildi. İşlemler yaklaşık bir saat sürdü.

Pankreas dokusu 37 °C'de 18 dakika çalkalamalı su banyosuna (GFL 1083, Almanya) konuldu. Falkon tüpü sallanarak doku homojenize edildi. Daha sonra yıkama işlemine geçildi. Üzerine 25 ml'ye kadar HBSS (+) eklendi. 5 saniye hızlı bir şekilde sallanarak karıştırıldı. 1300 rpm de 3 dakika santrifüj (Rotina 420R, Almanya) yapıldı. Süpernatant atılıp pellet parçalandı. Bu işlem üç kez

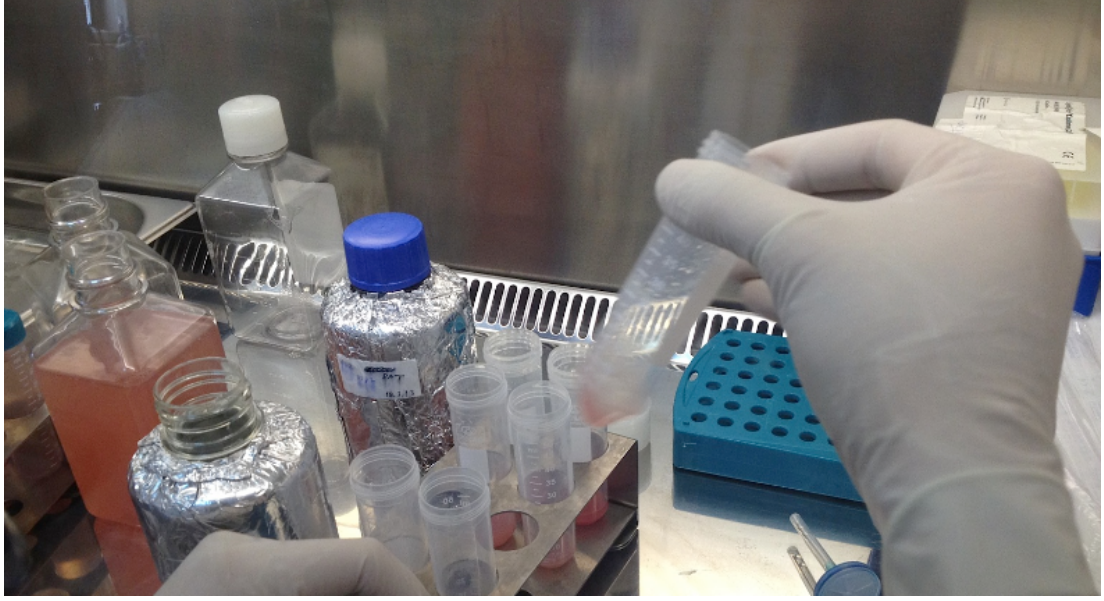
tekrarlandı. Üçüncüde HBSS eklendikten sonra 0,5 µm'lik elekten geçirildi. Falkon bir kez yıkandı ve santrifüj yapıldı.

Ekzokrin dokunun endokrin dokudan ayrılması amacı ile dansite solüsyonları kullanıldı. Santrifüjden sonra süpernatant dökülerek pellet kırıldı. Üzerine 5 ml ficoll 1100 (Biochrom L6113) eklenip karıştırıldı. 10 ml RPMI (-) yavaşça eklenerek adacıkların bu iki solüsyon arasında toplanması amaçlandı. 2400 rpm'de 20 dakika Frensiz santrifüj yapıldı. Pastör pipeti ile 2-3 falkondaki adacık içinde 25 ml RPMI (+) bulunan falkonlara alındı ve 50 ml'ye tamamlandı.

Elde edilen adacık hücreleri fikolden arındırılmak amacıyla 2 kez yıkandı. Yıkama işlemi 1300 rpm'de 3 dakika santrifüj yaparak ve süpernatantın vakumlu sistemle dikkatli bir şekilde atılması ile gerçekleştirildi.

Son yıkamadan sonra kültür sıvısı 3 ml'ye kadar vakumlandı ve adacıklar petri kaplarına aktarıldı. Glukoz stimülasyonu ve canlılık analizi için örnekler alındı. Kalan adacıklar *handpicking* yöntemi ile sayıldı. Her 700 adacık 5 ml'lik flasklara alınarak toplamda her grup için 10 flask kullanıldı.

Trombospondin (200pM) ve tunikamisin (20 µg/ml) eklendikten sonra kontrol grubu ile birlikte 37°C'de ve RPMI içinde 24 saat kültüre kaldırıldı (Şekil 3.1).



Şekil 2.1. Pankreas adacık hücrelerinin kültüre konma aşaması

3.4. Pankreas Adacık Hücresi Sayımı

DTZ, adacık hücrelerindeki insülin granülleri içinde bulunan çinko elementine bağlanarak kahverengi-kırmızı renk oluşturan bir maddedir. Böylece ekzokrin hücrelerden ayrılması sağlanır. Sayım için petri kabına konan hücreler üzerine 100 μ L DTZ eklendi. 10'luk büyütmeye ayarlanan ışık mikroskobu altında sayılan hücreler 100 ml'lik pipetlerle toplandı ve içinde RPMI olan tüplere konuldu.

3.5. Canlılık Değerlendirilmesi; Adacık Hücrelerinin Floresan Boya ile Boyanması

Küçük petri kabının içerisine 918 μ L PBS (pH 7,4) solüsyonu koyuldu. Üzerine 90 μ L adacık örneği koyuldu. 20 μ L FDA stok solüsyonundan, 20 μ L'de PI stok solüsyonundan ilave edilerek karanlık ortamda 5 dakika saklandı ve floresan mikroskobunda 40 X

büyütmeye canlılık belirlendi. Kullanılan floresan boyaların yeni derişimleri 0,46 μM FDA ve 14,34 μM PI olur.

PI, canlı olmayan hücrelerin çekirdeğini boyayarak kırmızı renk verirken FDA, hücre sitoplazmasını boyayarak canlı hücrelerde mavi ışık altında yeşil floresan renk verir.

3.5. Oksidatif Hasar Parametrelerinin Değerlendirilmesi

48 sıçandan elde edilen hücreler 3 grup ve 30 ayrı flaskta toplandı. Bir kısmı Western Blot için kullanıldıktan sonra trombospondin ve tunikamisin gruplarından yedişer, kontrol grubundan altı örnek olmak üzere toplam 20 örnek üzerinden oksidan parametreler değerlendirildi. Örnekler santrifüj yapılarak medyumları alındıktan sonra üzerine 700 μL Tris Buffer (pH: 7.4) eklenerek mekanik homejenizatör ve sonifikatör ile homojenize edildi. 500 μL homojenat temiz ependorflara alındıktan sonra kalan örnek 12000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Yaklaşık 100–200 μL olan süpernatantlar ependorfa alındı. Homojenattan MDA, protein karbonil ve doku proteini çalışıldı. Süpernatandan katalaz ve doku proteini analizleri yapıldı.

3.5.1. Malondialdehid (MDA) Miktarının Tayini

Lipit peroksidasyon indeksi olarak kullanılan MDA miktarı 90–100 $^{\circ}\text{C}$ 'de tiobarbitürik asit reaktif ürünlerinin elde edilmesi prensibine göre çalışıldı [126]. Homojenize edilen örnekler % 10'luk triklorasetik asit (TCA) eklenerek iyice karıştırıldı. Karışım kapaklı

tüpler içinde 90–100 °C’de 15 dakika inkübe edildikten sonra tüplerin hemen soğuması sağlandı. 3000xg’de 10 dakika santrifüj edilmesinden sonra süpernatant kısmı alındı. Süpernatant üzerine 2:1 oranında %0.675’lik tiobarbitürik asit eklenerek iyi karıştırıldıktan sonra kapakları kapalı olacak şekilde 90–100°C’de 15 dakika tekrar inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hızla soğumaları sağlandı ve 532 nm’de köre karşı okutuldu.

3.5.2. Protein Karbonil Miktar Tayini

Protein oksidasyonu protein karbonil miktarı ölçümleri ile değerlendirildi. Metot karbonil gruplarının 2,4–dinitrofenilhidrazin ile reaksiyona girmesi sonrası ortaya çıkan 2,4–dinitrofenilhidrazon oluşması prensibine göre çalışıldı [127]. Homojenize edilmiş örnekler %20 TCA eklenmesi sonrası iyice karıştırıldı ve 11000x g’de 10 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant dikkatlice dökülerek pellet elde edildi ve bu pellet üstüne 2 M HCl içinde hazırlanmış olan 10 nM 2,4–dinitrofenilhidrazin eklendi. İyice karıştırıldı ve oda ısısında 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon %20 TCA eklenerek durduruldu. 11000xg’de 4 dakika santrifüj yapıldı ve süpernatant dikkatlice dökülerek pellet etanol–etil asetat karışımı ile üç kere yıkandı. Her yıkama sonrası 11000xg’de 4 dakika santrifüjden sonra süpernatantı dikkatlice döküldü. Son aşama sonrası pellet üstüne 100 mM NaOH eklenerek oluşan 2,4–dinitrofenilhidrazonun 37 °C’de 15 dakika çözülmesi sağlandı. 11000xg’de 5 dakika santrifüj ile çözünmeyenleri

çökertildi ve süpernatant ile ölçüm yapıldı. Ölçüm 360 nm'de köre karşı okutuldu.

3.5.3. Katalaz Tayini

Hidrojen peroksit (H_2O_2) bulunan ortamda katalaz yardımı ile H_2O_2 'in azalması, su ve oksijene dönüşmesi prensibine göre çalışıldı [128]. H_2O_2 maksimum ışımayı verdiği 240 nm'de zamana karşı ölçüm yapılarak katalaz aktivitesi hız biriminde tespit edildi.

3.5.4. Protein Miktar Tayini

Süpernatant ve homojenattan protein miktarı Lowry yöntemi kullanılarak tespit edildi [129].

3.6. Glukoz Stimülasyonu ile İnsülin Sentezi

Bu deney için her flasktan üç örnek alındı. Adacıklar kültürden çıkarıldıktan sonra 1 kere 50 ml lik falcon tüpte RPMI (+) ile 2 kere 50 ml glukozsuz RPMI (-) ile yıkanarak medyum uzaklaştırıldı. 6 kuyucuklu petri kaplarına 3,3 mM'lık 5 ml glukozlu besiyerinden ilave edildi. Üzerine 40 µm por çapı olan mesh yerleştirildikten sonra 25 adet 150 µm boyutunda adacık koyuldu. 37 °C'de CO₂ inkübatöründe ağzı kapalı olarak 1 saat inkübe edildi.

1 saat inkübasyondan sonra 3,3 mM'lık glukozlu besiyeri eklenen hücreler besiyerleri ile birlikte, numaralandırılmış endorf tüp içerisine alındı. 1800 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Tüplerden 900 µL süpernatant dikkatlice temiz bir endorf tüpüne aktarıldı.

Daha önceden 3,3 mM'lık glukozsuz RPMI eklenmiş olan 6 kuyucuklu petri kabının ikinci bölümüne 40 µm por çaplı mesh yerleştirildi. 25 adet adacık hücresi meshin üzerine konuldu. 1 saat 37 °C'de CO₂ inkübatöründe ağzı kapalı olarak inkübe edildi. İnkübasyondan sonra adacık hücrelerinin bulunduğu wellerden hücreler besiyerleri ile birlikte, numaralandırılmış ependorf tüp içerisine alınarak -20 °C'ye kaldırıldı.

6 kuyucuklu petri kabının üçüncü bölümüne 5 ml 16,7 mM derişiminde glukoz içeren besiyeri eklendi. İçerisine 40 µm por çapı olan *mesh* yerleştirildi. 37 °C'de CO₂ inkübatörüne ağzı kapalı olarak yerleştirildi. Her 15 dakikada bir çalkalanarak 1 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra adacık hücrelerinin bulunduğu yerden hücreler, besiyerleri ile birlikte, numaralandırılmış ependorf tüp içerisine alındı. 1800 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. *High* glukoz olarak işaretlenmiş ependorf tüp içerisine 900 µL örnek alınarak -20 °C'ye kaldırıldı.

İnsülin miktar tayini *enzim linked immunosorbent assay* (ELİSA) yöntemi ile yapıldı. 90 *well plate* (Millipore 2101938) içerisine primer ve sekonder antikorlar konularak hazırlanan örnekler 1,5 saat karıştırıcıda (shaker; Heidolph 1000, Almanya) bekletildi. Standartlar 10µg/ml, 20 µg/ml ve 40 µg/ml BSA (Andresco, 0332-25 gr) kullanılarak hazırlandı. 450nm'de köre karşı Elisa cihazında (Epoch, USA) okutuldu.

3.7. Western Blot Yöntemi ve Endoplasmik Retikulum Stres Belirteçleri

24 saat kültür ortamında kalan hücreler *laminar flow* altında flasklardan 50ml'lik falkonlara aktarıldı. Bu işlem sırasında flaska yapışan hücreler PBS ile yıkanarak toplandı. Her grupta yaklaşık 2000 hücre olacak şekilde üç ayrı tüpe alınan hücreler iki kez PBS solüsyonu ile yıkandı. Yıkama işlemi 1300 rpm'de 3 dakika santrifüjle çöktürme işlemini takiben kültür medyumunun atılarak yerine PBS solüsyonu eklenmesiyle gerçekleştirildi. Serumlu RPMI alınarak yerine serumsuz PBS konulmasıyla hücre dışı proteinlerin uzaklaştırılması amaçlanmıştır.

Son yıkamada ependorf tüplere alınan PBS solüsyonu içindeki hücreler protein elde etme işlemi boyunca buz içinde tutuldu.

Hücreden Protein Elde Etme ve Miktar Tayini

4000 rpm'de 4 dakika santrifüj yapılarak hücreler çöktürüldü. PBS solüsyonu tamamen uzaklaştırıldı. Hücre zarını parçalamak amacıyla kullanılan Lysis Buffer (CellLyticMcell lysis reagent Sigma) (her grup için 100 µL, toplamda 300 µL) içine 30 µL proteaz inhibitörü ve 30 µL fosfataz inhibitörü konularak karıştırıldı. Bu sayede açığa çıkan sitoplazmik proteinlerin ve fosfatlı bileşiklerin parçalanması önlenmiş oldu. Bu karışım her üç grup hücreye paylaştırıldı. Hücre ekstraktlarının üzerine yaklaşık 110 µL lizis kokteyli konuldu. 15 dakika karıştırarak bunun içinde bekletildi. Daha sonra

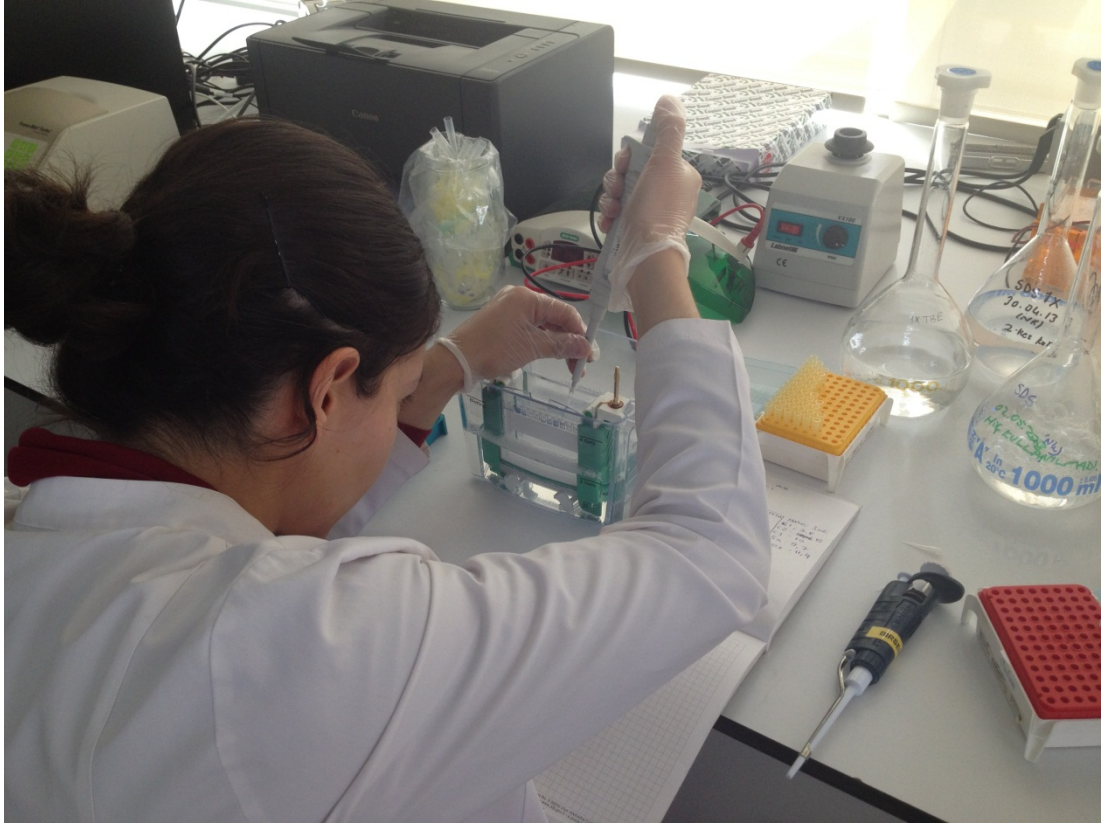
parçalanmamış hücreler de olabileceği düşünülerek sonifikasyon (Bandelin electronic , Germany) işlemi uygulandı. Her grup 3 kez 3'er saniye sonifike edildi.

14000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek süpernatant ile hücre membran parçaları ve diğer artıkların ayrışması sağlandı. Sitoplazmik proteinlerin toplandığı süpernatant alınarak temiz ependorflara konuldu.

Protein miktar tayini için *bradford* yöntemi kullanıldı. 1ml *comassie blue* (Thermo scientific, USA) üzerine 15 µL örnek eklendi, vortekslendi ve 15 dk beklendi. Spektrofotometrede (pharmospec 1700 Shimadzu) 595 nm dalga boyunda köre karşı okutuldu. Çıkan sonuçlar 1 µg/ml nin üzerinde olması nedeniyle 1,5 kat sulandırıldı. daha önce sığır serum albumini (BSA) ile oluşturulan standart eğrisine göre absorbansa karşılık gelen konsantrasyon değerleri hesaplandı. Her kuyucukta 20 µg protein olacak şekilde yüklenmesi gereken hacimler MS Excel'de hesaplandı.

Yüklenecek proteinlerin görünür hale gelmesini sağlayan *sample buffer* ve proteinleri negatif yükle kaplayarak jelde yürümesini sağlayan %5'lik β-merkapt etanol (BME) karışımı hazırlandı. 1:1 oranında örnekle karıştırıldı. 2 kat protein miktarı seyreltilmiş oldu. Bu deneyde 4X *sample buffer* kullanıldığı için seyreltme 4/3 oranında oldu ve son yükleme miktarı da ona göre hesaplandı.

Son olarak örnekler 5 dakika 95°C derecede tutularak proteinler primer yapıya dönüştürüldü. Böylece proteinler yürütmeye hazır hale gelmiş oldu.

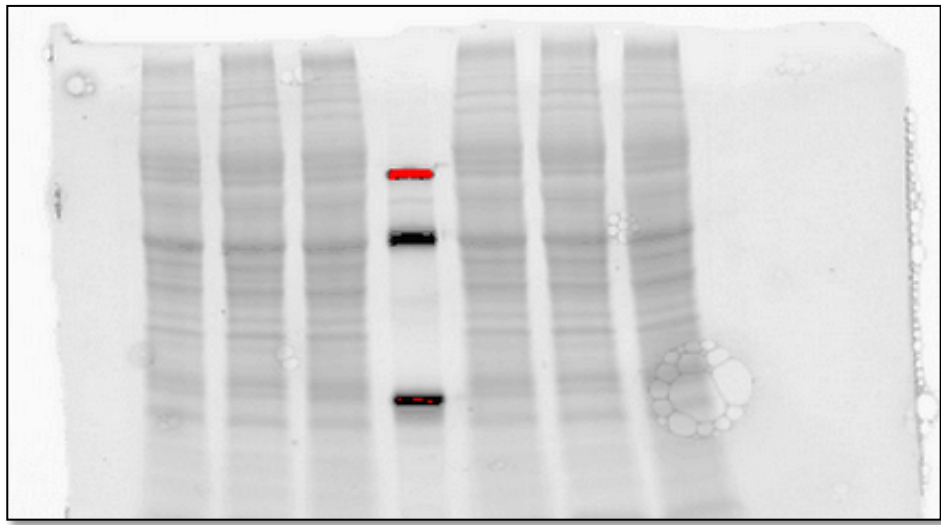


Şekil 2.2. Yürütme öncesi proteinlerin jele yüklenmesi

Yürütme (Running)

Yürütme için sodyum dodesil sülfat (SDS) solüsyonu 2 jel seviyesine kadar tankın içine dolduruldu. Jel (Biorad, USA 10well) yeşil bant ve tarak dikkatlice çıkarıldıktan sonra yürütme aparatına yerleştirildi ve aparatın içi de SDS ile dolduruldu. Kuyucuklar SDS solüsyonu ile yıkanarak akrilamit kalıntılarından arındırıldı. İlk kuyucuk boş bırakıldı. Daha sonra sırayla belirteç (3 μ L), kontrol

(20 μ L), tunikamisin (18 μ L) ve trombospondin (18 μ L) gruplarından örnekler sırayla iki kez yüklendi (Şekil 3.2). Son kuyucuk da boş bırakıldı. Önce 140 voltta 5 dakika daha sonra 200 voltta yarım saat yürütme işlemi gerçekleştirildi. Proteinlerin jelin sonuna kadar yürüdüğü görülünce yürütme durduruldu. Ve jel görüntüsü alındı (Şekil 3.3).



Şekil 2.3. Yürütme sonrası jel görüntüsü

Transfer

Jelden membrana transfer işlemi için *semi-dry* transfer sistemi kullanıldı (Transblat Turbo Biorad, USA). Membran (Biorad PVDF,10 well) altta jel üstte olacak şekilde hazırlandı, iki ıslak spanç arasına yerleştirilerek kapalı sisteme transfer işlemi için konuldu ve yedi dakikada transfer işlemi gerçekleşti. Membranın ön yüzü, sol üst köşeye bir çentik atılarak işaretlendi. Tekrar jel görüntüsü alınarak

proteinlerin membrana aktarılmış olduğu doğrulandı. Jel boş olarak görüntülendi.

Bloklama

50 ml tris bazlı sodyum-tween 20 (TBS-T) içine 2,5 gram yağsız süt tozu konularak %5'lik süt tozu hazırlandı. Protein transfer edilen membran küçük bir kaba alınarak içine yaklaşık 20 ml kadar %5'lik süttozu konuldu. 1 saat karıştırıcıda bekletildi. Böylece membranda proteinin olmadığı bölgeler süt tozu ile kapatılmış oldu. Transfer olan proteinlerin yerlerinde kalması sağlandı.

Primer Antikor Eklenmesi

Bloklama işlemi bitince membran ikinci belirtecin tam önünden ikiye kesildi. Her iki membran parçası ön yüzü işaretlemek amacıyla sol üst köşeden bir miktar kesildi. İlk olarak XBP1 (SantaCruz, sc-7160) ve P-eIF2a (Cell Signalling, Ser51) antikorları 1/ 200 oranında %5'lik süt tozunun içinde hazırlandı. Membranlar şeffaf poşete yerleştirildi, üç tarafı kapatıldı. Primer antikorlar membranların ön yüzüne gelecek şekilde eklendikten sonra dördüncü kenar da kapatılarak +4 °C derecedeki karıştırıcıya konuldu. Bir gece burada kaldı.

Daha sonra aynı şekilde aynı membranlara aktin (Cell Signalling, 1/10000) ve daha sonra da CHOP (Cell Signalling, 2895S, 1/100)-

eIF2a (Cell Signalling, 9722S, 1/1000) antikorları membranların ön yüzüne eklenerek görüntülendi.

Sekonder Antikor Eklenmesi

2. gün karıştırıcıdan alınan membranlar 3'er kez 5 dakika (3X5') *Tris Buffered Saline with Tween 20* (TBST) solüsyonunda yıkandı. Böylece bağlanmayan primer antikorlar uzaklaştırılmış oldu. Daha sonra 1/5000 oranında sekonder antikor hazırlandı. Aktin ve XBP1 için *anti-mouse* antikor (Cell Signalling, 7076S, 1/5000), CHOP ve P-eIF2a rabbit kaynaklı olduğu için *anti-rabbit* antikorları kullanıldı (Cell Signalling, 7074S, 1/5000). 4 ml süt tozu içine 0,8 µL sekonder antikor ve belirteçlerin görünür hale gelmesi için 0,4µL *strep tagtin* (1/10000) membranların ön yüzüne eklendi. Sekonder antikor kendisine *horse radish peroksidaz* (HRP) enzimi bağlı olan ve substrat ile tepkimeye girerek ışımaya meydana getiren, primer antikora bağlanan bir antikordur.

Şeffaf poşet içine konan antikorlar 1 saat oda ısısında karıştırıcıda (shaker) bekletildi. Fazla sekonder antikorları uzaklaştırmak amacı ile 3X5' TBST solüsyonunda tekrar yıkandı.

Görüntüleme

HRP ile reaksiyona girerek ışımaya meydana getiren substrat (ECL; *enhanced chemiluminescence*) temiz bir yüzeye her membran parçası için 1,5 ml olacak şekilde damlatıldı. Membranların önyüzü ECL ile

temas edecek şekilde konuldu ve 5 dakika beklendi. Görüntüleme cihazı (ChemiDoc MP, Biorad, USA) çalıştırılarak chemi Hi Sensitive ayarlandı. 3 dakika boyunca görüntü alındı.

Biorad Analiz programı kullanılarak elde edilen bantların hacimleri hesaplandı.

Western blot yöntemi, boyutları belli proteinlerin doku veya hücrede bulunup bulunmadığı ayrıca bantların aktine oranlanması ile de proteinlerin miktarı hakkında bilgi verir.

3.8. İstatistiksel analizler

SPSS programı ile yapılan analizlerde ölçülebilen parametrelerin önce *Shapiro Wilks* testi ile dağılımlarına bakıldı. Veri analizlerinde dağılımların homojen olması dolayısı ile parametrik testler kullanıldı. Tek yönlü varyans analizi ve post hoc testlerden *Tukey* ile değerlendirildi. $P < 0,05$ olan sonuçlar anlamlı olarak kabul edildi ve sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verildi.

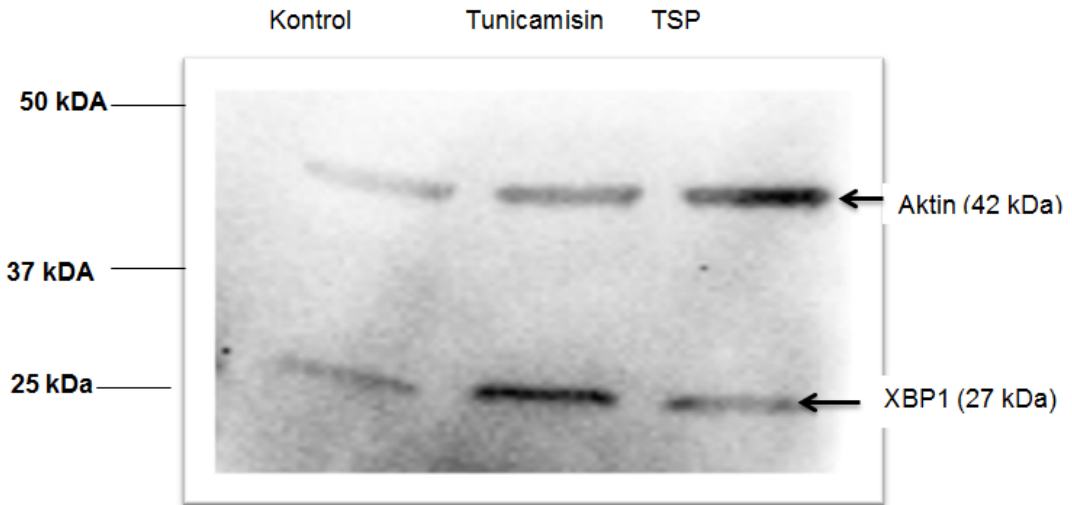
3. BULGULAR

4.1. Western Blot Sonuçları

Tunikamisin ile hücrelerde ER stresi oluşturulduktan sonra western blot yöntemi ile ER stresi belirteçlerine bakıldı. Belirteç olarak XBP1, eIF 2a/p-eIF 2a ve CHOP antikoları kullanıldı.

Yapılan deneylerde eIF 2a/p-eIF 2a ve CHOP'a ait bantlar birkaç farklı konsantrasyonda kullanılmasına ve yöntemdeki modifikasyonlara rağmen görülemedi.

XBP1'e ait bant görüntüsü Şekil 4.1'de görülmektedir.



Şekil 3.1. PVDF membrandaki aktin ve XBP1 bantlarının görüntüsü

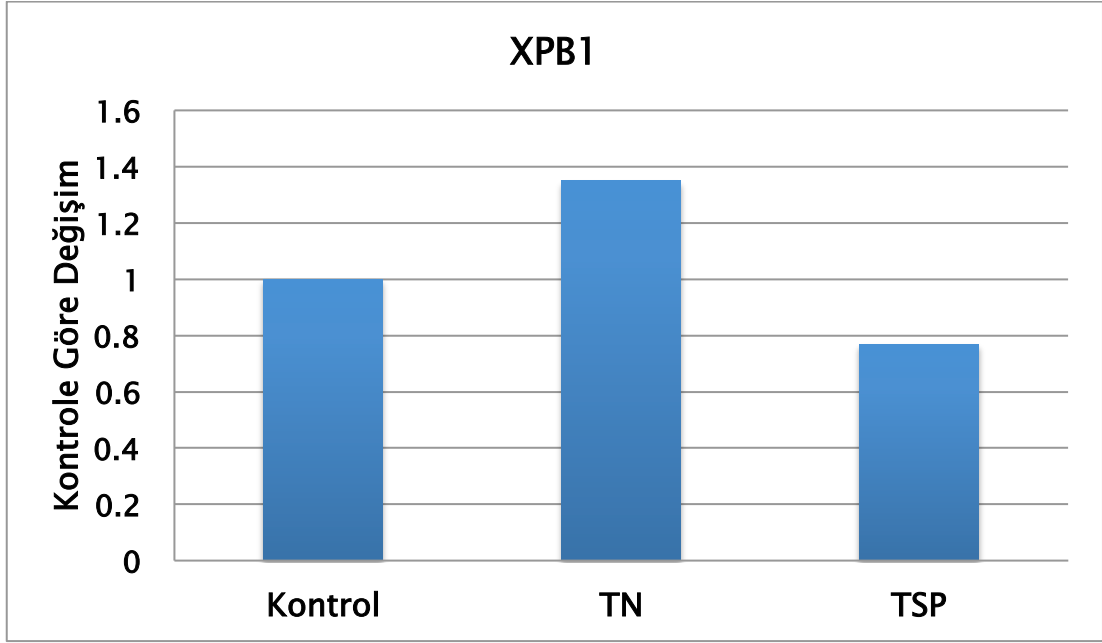
Aktin 42 kDA(kilo Dalton) ve XBP1 27 kDA' görülmektedir. Gruplara göre bant kalınlıkları değişiklik göstermektedir.

Şekil 4.1’de görülen membran görüntüsünde, belirteçler ile belirlenmiş seviyedeki bantlara ait büyüklükler gösterilmektedir. Proteinlerin boyutları aktin için 42 kDa ve XBP1 için 27 kDa dur. Bant seviyeleri aktin ve XBP1 için beklenen bölgelerde görülmektedir.

Tablo 3.1. Aktin ve XBP1 Bant Hacimleri

Band No.	Gruplar	Aktin	XBP1	XBP1 /Aktin
Lane 1	Kontrol	416856	223014	0.5349905
Lane 2	TN	761232	549428	0.721761565
Lane 3	TSP	1266648	521400	0.411637645

Her grupta ortaya çıkan aktin ve XBP1 için bant hacimleri analiz edilmiştir. Buna göre kontrol grubunda XBP1in aktine oranı (223014/416856) 0,5 iken; ER stresörü olan tunikamisinin verildiği grupta bu oran (549428/761232) 0,7’ye çıkmıştır. TSP verilen grupta oran (521400/1266648) 0,4 olarak bulunmuştur (Tablo 4.1).



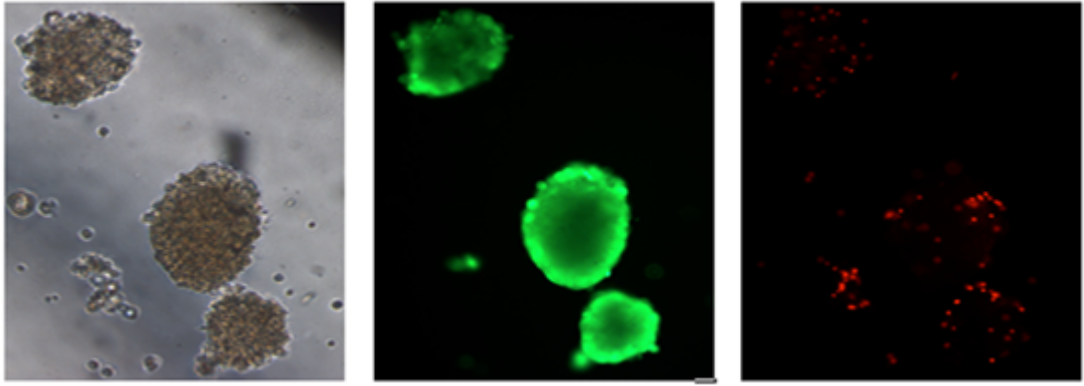
Şekil 3.2. Gruplardaki XPB1 /Aktin oranları karşılaştırması.

XPB1; *X box binding protein 1*, TN; tunikamisin, TSP; trombospondin.

Şekil 4.2’de belirtildiği üzere, XPB1 /Aktin’in kontrol grubundaki değeri 1 kabul edilerek yapılan oranlamada, tunikamisinin kontrolün 1,4 katı ve trombospondin kontrolün 0,7 katı olduğu görülmektedir.

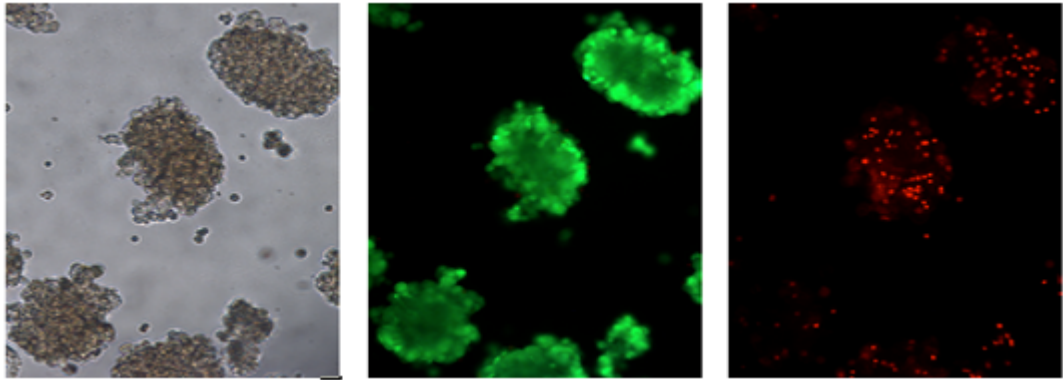
4.2. Florasan Boyama (FDA/PI) ile Canlılık Sonuçları

Kontrol, tunikamisin (20µg/ml) ve trombospondin (200pM) gruplarından 0. ve 24. Saatlerde alınan hücre örneklerinden PI/FDA ile yapılan canlılık analizi sonuçları Şekil 4.3 - 4.7 ile Tablo 4.2’de gösterilmektedir.



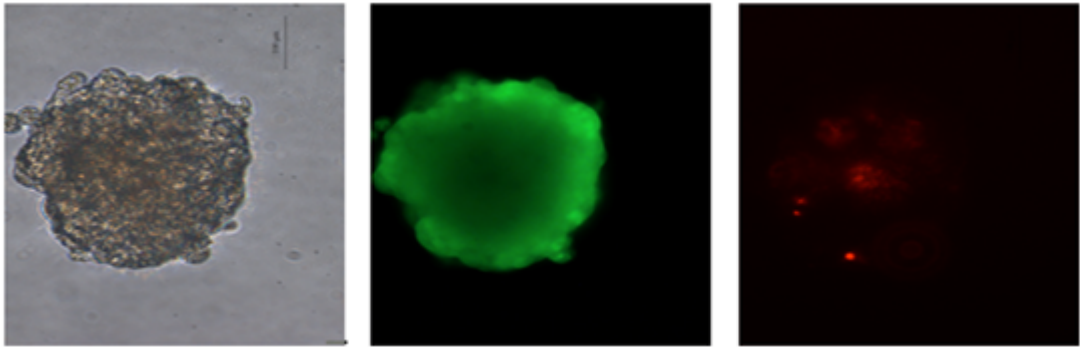
Şekil 3.3. Kontrol grubuna ait izolasyon sonrası inkübasyon öncesi canlılık incelemesi

Şekil 4.3'teki ilk kare boyama öncesi, ikincisi FDA ve üçüncüsü de PI boyamaya ait ışımaları göstermektedir. Resimde yer alan üç adacık için elde edilen FDA ışımalarına göre canlılık yüzdeleri %94,4 ile %91 arasında değişmektedir.



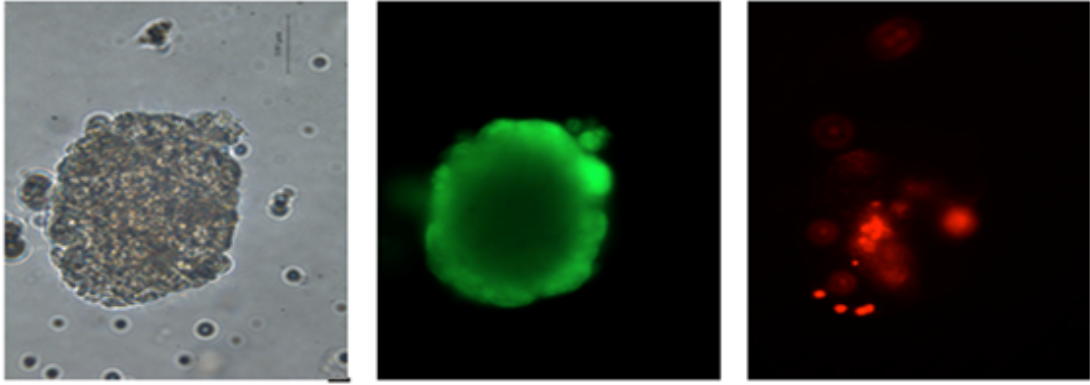
Şekil 3.4. Kontrol grubuna ait izolasyon sonrası inkübasyon öncesi canlılık incelemesi

Şekil 4.4'teki ilk kare boyama öncesi, ikincisi FDA ve üçüncüsü PI boyamaya ait ışımaları göstermektedir. Resimde yer alan dört adacık için elde edilen FDA ışımalarına göre canlılık yüzdeleri %92 ile %87 arasında değişmektedir.



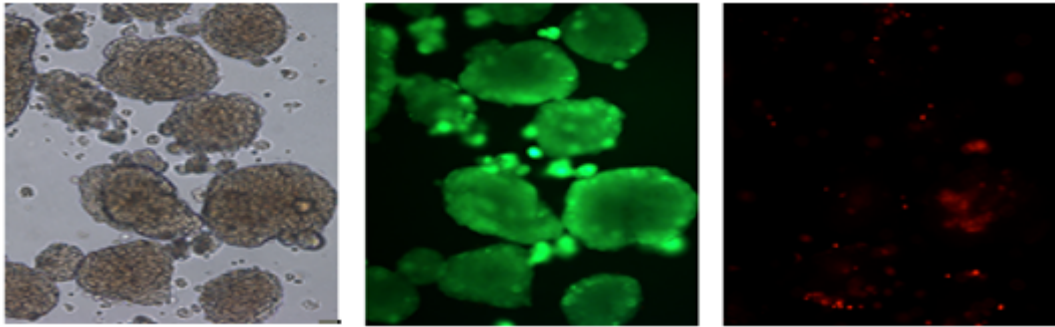
Şekil 3.5. Tunikamisin ile endoplazmik retikulum stresi oluşturulan gruptan adacık örneği

Şekil 4.5'teki adacık örneğine ait resmin ilk karesi boya olmadan, ikincisi FDA boyamasının ışımalarını ve üçüncüsü PI boyaması ışımalarını göstermektedir. Canlılık yüzdesi %80 FDA ışımaları olarak ölçülmüştür.



Şekil 3.6. Tunikamisin ile endoplazmik retikulum stresi oluşturulan gruptan adacık örneği

Şekil 4.6'da yer alan resmin ilk karesi boya olmadan, ikincisi FDA boyamasının ışımalarını ve üçüncüsü PI boyaması ışımalarını göstermektedir. Canlılık yüzdesi %72,7 FDA ışımaları olarak ölçülmüştür.



Şekil 3.7. 24. Saatte TSP eklenen hücrelerin canlılık durumu

Şekil 4.7'de yer alan ilk resim boyama öncesi, ikinci resim FDA boyamasının ışımalarını ve üçüncü resim ise PI boyamasının ışımalarını

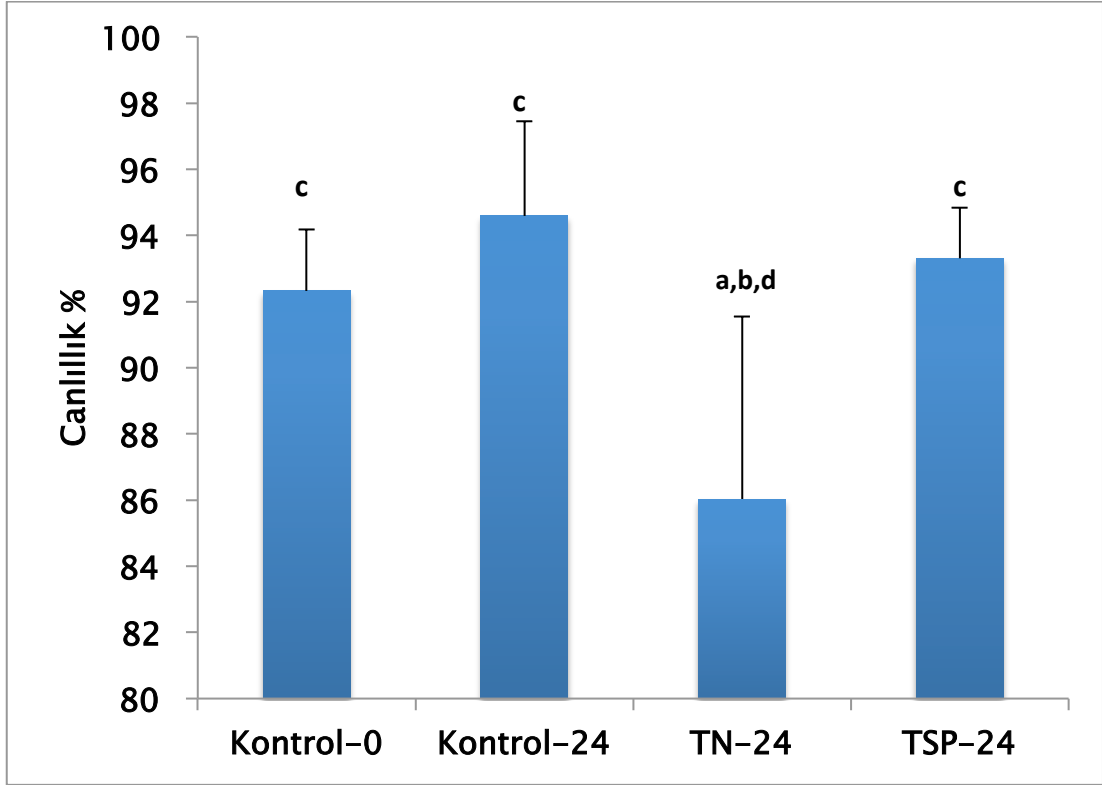
içermektedir. Canlılık yüzdesi FDA ışına oranına göre hesaplanmış ve bu örneklerde %96,4 ile %85,5 arasında değişmektedir.

Tablo 3.2. Gruplara göre canlılık ortalamaları.

	% canlılık ortalama \pm standart deviasyon
Kontrol-0	92,3 \pm 1,9 ^c
Kontrol-24	94,6 \pm 2,9 ^c
TN-24	86,0 \pm 5,5 ^{a,b,d}
TSP-24	93,3 \pm 1,5 ^c

Her grup için n=10. a; P<0,05 Kontrol-0'dan farklı, b; P<0,05 Kontrol-24'den farklı, c; P<0,05 TN-24'den farklı, d; P<0,05 TSP-24'den farklı.

Kontrol grubunda canlılık ortalama %93 iken ER stresör olarak bilinen tunikamisinde 86,0 \pm 5,5'ya düşmüştür. Trombospondin grubunda ise canlılık kontrole oldukça benzer (93,3 \pm 1,5) bulunmuştur (Tablo 4.2).



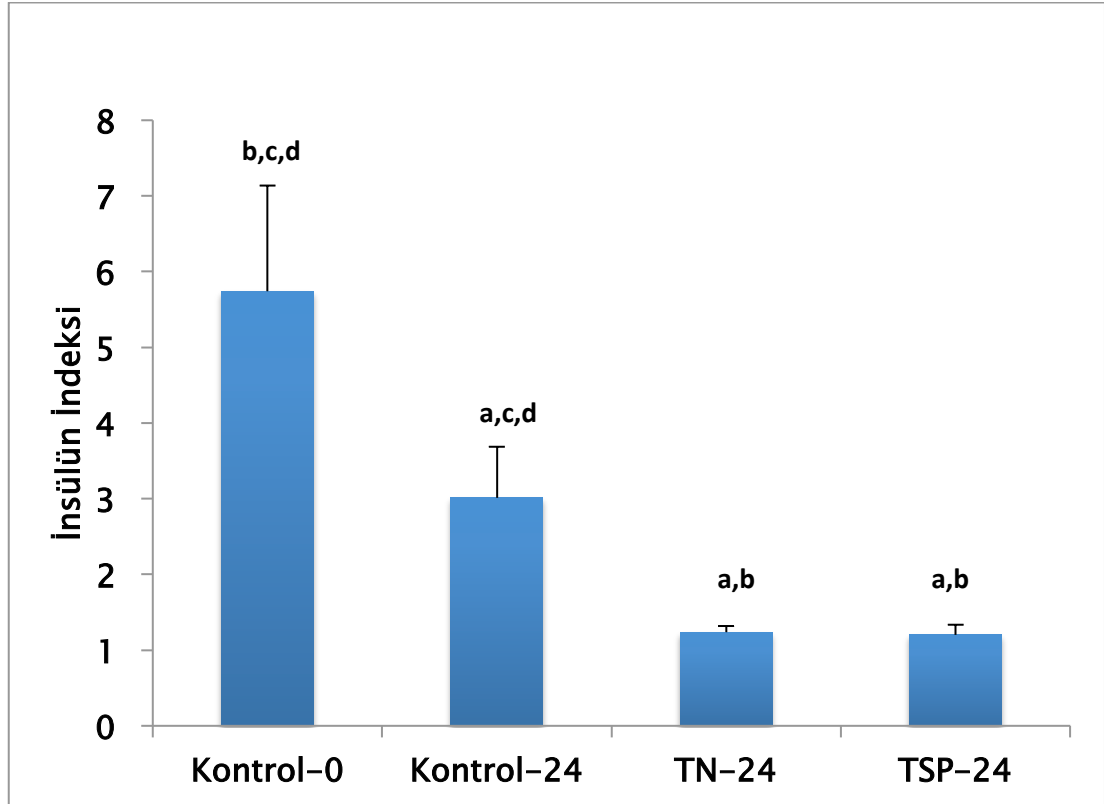
Şekil 3.8. Grupların canlılık yüzdeleri

Adacıkların izolasyon gününe göre üç farklı kültür ortamında 0. ve 24 saatlerdeki inkübasyonları sonrası FDA/PI boyaması ile canlılık yüzdeleri. a; $P < 0,05$ Kontrol-0'dan farklı, b; $P < 0,05$ Kontrol-24'den farklı, c; $P < 0,05$ TN-24'den farklı, d; $P < 0,05$ TSP-24'den farklı. Her grup için $n=10$.

Şekil 4.8'e göre 24.saatte bakılan TN grubu canlılık yüzdesi ($86,0 \pm 5,5$), 0.saat ($92,3 \pm 1,9$) ve 24. saatte ($94,6 \pm 2,9$) bakılan kontrol canlılık yüzdesinden ve TSP-24 canlılık yüzdesinden ($93,3 \pm 1,5$) anlamlı olarak farklı bulunmuştur. ER stresine neden olan tunikamisin canlılığı azaltırken, trombospondin canlılık üzerine etki etmemektedir.

4.3.İnsülin İndeksi

Yüksek ve düşük glukoz düzeylerinde sentezlenen insülin miktarlarının oranlanması ile insülin indeksi elde edilmiştir. Buna göre (Şekil 4.9 ve Tablo 4.3) 0.saat kontrol grubundaki insülin indeksi ($5,74 \pm 1,40$) 24.saattekinden ($3,01 \pm 0,67$) daha fazla bulunmuştur ($P<0,05$). TN ve TSP verilen adacıkların 24.saatteki insülin indeksi ($1,24 \pm 0,08$ ve $1,20 \pm 0,13$) kontrol grubundakilere göre oldukça düşük bulunmuştur ($P<0,05$).



Şekil 3.9. İnsülin indeksleri

Yüksek ve düşük glukoz uygulamasında salgılanan insülin düzeylerinin oranlanması ile elde edilen insülin indeksi sonuçları. a; $P<0,05$ Kontrol-0'dan farklı, b; $P<0,05$ Kontrol-24'den farklı, c; $P<0,05$ TN-24'den farklı, d; $P<0,05$ TSP-24'den farklı. Her grup için $n=5$.

Tablo 3.3. Grupların insülin indeksleri.

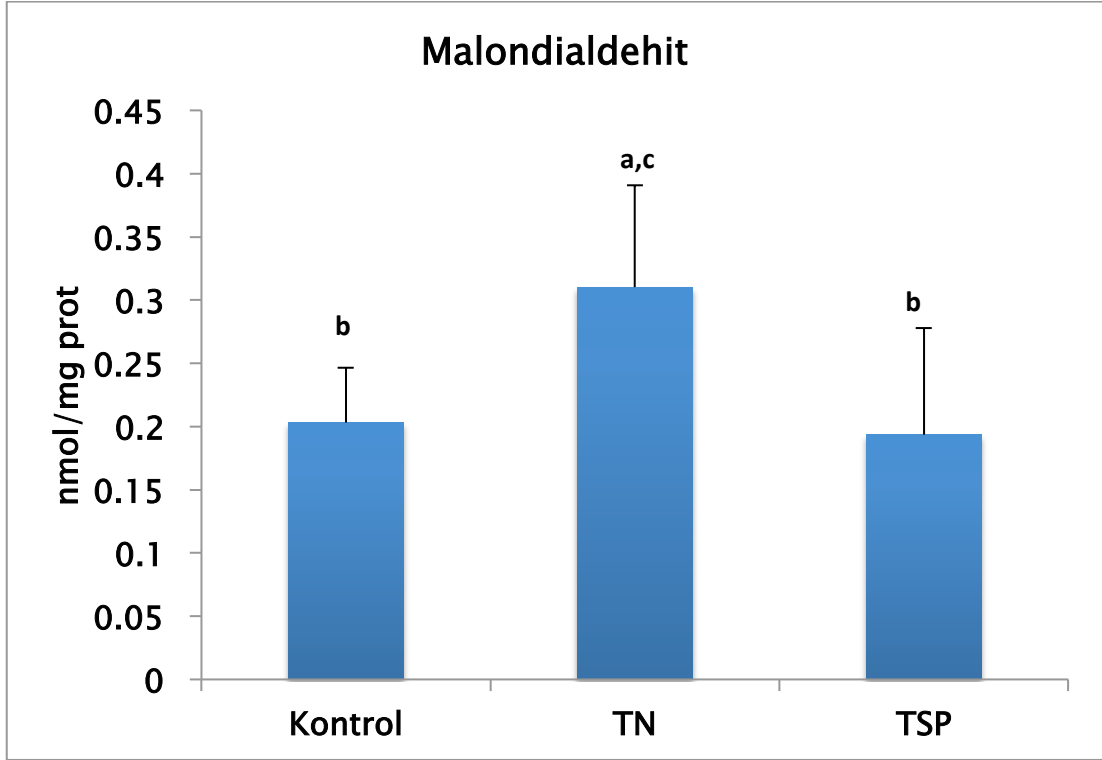
	İnsülin İndeksi
Kontrol-0	5,74 ± 1,40 ^{b,c,d}
Kontrol-24	3,01 ± 0,67 ^{a,c,d}
TN-24	1,24 ± 0,08 ^{a,b}
TSP-24	1,20 ± 0,13 ^{a,b}

Her grup için n=5. a; P<0,05 Kontrol-0'dan farklı, b; P<0,05 Kontrol-24'den farklı, c; P<0,05 TN-24'den farklı, d; P<0,05 TSP-24'den farklı.

4.4. Oksidatif Stres Parametreleri

Kontrol, tunikamisin ve trombospondin verilen gruplardan alınan hücrelerle malondialdehit (MDA), protein karbonil (PC) ve katalaz düzeyleri protein miktarlarına göre oranlanarak hesaplandı.

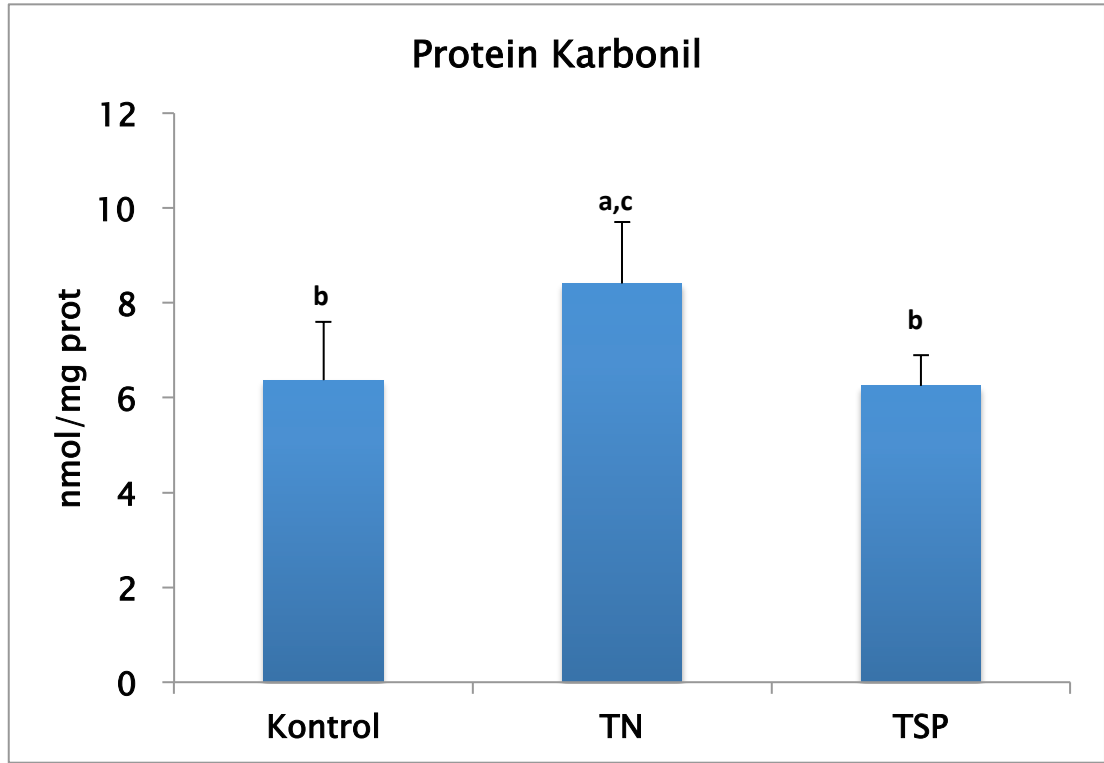
MDA düzeyi, TN verilen grupta (0,310 ± 0,081) TSP verilen gruptan (0,194 ± 0,084) ve kontrolden (0,203 ± 0,043) daha fazla bulunmuştur (P<0,05). TSP grubu ile kontrol grubu arasında fark gözlenmemiştir (Şekil 4.10 ve Tablo 4.4).



Şekil 3.10. MDA düzeyleri

Üç farklı kültür ortamındaki adacık hücrelerindeki malondialdehit düzeylerinin toplam protein miktarına oranları. a; $P < 0,05$ Kontrolden farklı, b; $P < 0,05$ TN'den farklı ve c; $P < 0,05$ TSP'den farklı. Kontrol grubu için $n=6$, TN (tunikamisin) ve TSP (trombospondin) gupları için $n=7$.

PC düzeylerinde de benzer sonuçlar görülmektedir. Tablo 4.4 ve Şekil 4.11'de gösterildiği gibi TN verilen grupta ($8,41 \pm 1,29$) kontrol grubu ($6,37 \pm 1,23$) ve TSP ($6,25 \pm 0,65$) verilen gruba göre PC düzeyi fazla bulunmuştur ($P < 0,05$).



Şekil 3.11. Protein karbonil düzeyleri

Her grup için protein karbonil düzeylerinin toplam proteine oranı. a; $P < 0,05$ Kontrolden farklı, b; $P < 0,05$ TN'den farklı ve c; $P < 0,05$ TSP'den farklı. Kontrol grubu için $n=6$, TN (tunikamisin) ve TSP (trombospondin) grupları için $n=7$.

Tablo 3.4. Oksidatif parametreler

	Malondialdehit (nmol/mg prot)	Protein Karbonil (nmol/mg prot)
Kontrol	0,203 ± 0,943 ^b	6,37 ± 1,23 ^b
TN	0,310 ± 0,081 ^{a,c}	8,41 ± 1,29 ^{a,c}
TSP	0,194 ± 0,084 ^b	6,25 ± 0,65 ^b

Kontrol grubu için $n=6$, TN (tunikamisin) grubu ve TSP (trombospondin) grubu için $n=7$. a; $P < 0,05$ Kontrolden farklı, b; $P < 0,05$ TN'den farklı ve c; $P < 0,05$ TSP'den farklı.

4. TARTIŞMA

Tip 1 diyabet patogeneğinde gösterilen mekanizmalardan birisi de proinflatuar sitokinler (IL-1B, TNF-a, IFN-gama) nedeniyle meydana gelen ER stresinin β -hücre ölümüne neden olmasıdır. ER stresi meydana gelen adacık hücrelerinde katlanmayan ya da yanlış katlanmış protein birikimi nedeniyle insülinin sentezlenmesini engelleyen mekanizmalar devreye girer. Böylece hem fonksiyon hem de canlılık kaybına neden olmaktadır.

ER stresini indükleyen birçok madde mevcuttur. Deneysel olarak en çok tercih edilen maddeler tunikamisin ve taptsigargindir (Tg) [130]. Tg, SERCA'yı inhibe ederek Ca^{+2} geri alımına engel olur ve ER'da biriken Ca^{+2} ER'da strese neden olur. Tunikamisin de N-glikolizasyonu inhibe ederek ER stresine neden olmaktadır [131]. Bizim çalışmamızda da ER stresör olarak tunikamisin kullanılmıştır.

Tunikamisin dozu olarak çeşitli çalışmalarda farklı konsantrasyonlar tercih edilmiştir. İzole fare pankreas adacık hücreleri ile yapılan bir çalışmada 5 μ g/ml TUN kullanılmıştır [132]. Bu çalışmada her petride 25-30 adacık bulunmaktadır. Yine izole fare adacıkları ile ER stresi oluşturulan bir deney modelinde 1 μ g/ml TUN dozu tercih edilmiştir [133].

Bizim çalışmamızda 20 μ g/ml TUN kullanılmıştır. Bu değerler kültüre konan hücre sayısı ile ilişkili olarak tercih edilmektedir. Çalışma öncesi yaptığımız ön denemelerde TUN dozu olarak 1 μ g/ml,

2µg/ml [134], 5µg/ml, 10 µg/ml ve 20 µg/ml dozları denendi ve en net bantlar 20 µg/ ml de elde edildiği için bu doza karar verildi.

ER stresi parametrelerini göstermek için kullanılan birçok gösterge vardır. Bunlardan bazıları PERK, İRE1, ATF 6, ATF 4, CHOP, XBP1, p-elf 2α ve BiP'dir (GRP 78). ER stresi aktivasyon yolağı göz önüne alındığında PERK'in aktive olması elf 2α'nın p-elf 2α'ya dönüşümünü ve ATF 4'ü, İRE1'in aktive olması XBP1'i ve ATF 6'nın aktive olması da şaperon (BiP) artışını uyarır. CHOP aktivasyonu apoptotik süreci gösterir. Yaptığımız çalışmada ER stresi belirteci olarak CHOP, XBP1 ve p-elf 2a tercih edildi. Bütün yolakları içine alacak bir araştırmanın daha sağlıklı olması nedeniyle bizim çalışmamızda ER stresi mekanizmasında yer alan üç yoldan her birine ait birer belirteç seçildi.

Seçilen belirteçlerin antikor konsantrasyonlarını referans makalelerden alındı [133, 135]. Fakat yapılan ön çalışmalar antikor konsantrasyonunu belirlemede daha etkili oldu. Daha önce yapılan çalışmalarda primer antikorlar için 1:100-1:1000 arası, sekonder antikorlar için 1:2000 oranında kullanılması tavsiye edilmektedir. Bizim çalışmamızda CHOP ve XBP1 için 1:200, elf 2a/ p-elf 2a için 1:500 oranında primer antikor kullanıldı. Sekonder antikor oranı arka planın daha net olması için 1:5000 olarak ayarlandı.

Adacık hücre canlılığı TUN verilen grup için diğer gruplardan düşük bulundu. Yapılan birçok çalışma da ER stresinin hücre canlılığı

üzerinde olumsuz etkilerini göstermiştir [136, 137]. Pankreas adacık hücrelerinde olduğu gibi [138] renal ve alveolar epitel hücrelerinde Tg ve TUN verilerek yapılan bir çalışmada canlılık sonuçları benzer bulunmuştur [139]. ER stresi meydana gelen hücrede apoptotik yol uyarılarak ve bazı proteinlerin ekspresyonlarındaki artış nedeniyle hücre ölümü görülmektedir [140].

Yaptığımız çalışmada TUN verilen hücrelerde insülin salınımında azalma meydana geldi. ER stresinin fonksiyon kaybına neden olduğunu gösteren benzer çalışmalar mevcuttur [141]. ER stresi, ATF 6 üzerinden insülin gen ekspresyonunu azaltarak [114] ve sentez basamağını etkileyerek [142] fonksiyon kaybına neden olmaktadır.

ROS birçok hastalıkta olduğu gibi diyabet ve komplikasyonlarında da rol almaktadır [143]. Yüksek ROS miktarı diyabetik nefropatide epitel disfonksiyonu, interstisyel makrofaj filtrasyonu ve yağ hücresi apoptozisi ile ilişkili bulunmuştur [144, 145]. Oksidan - antioksidan mekanizma parametreleri arasında süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH), katalaz, MDA ve PC yer almaktadır. Anti-inflamatuar bir enzim olan SOD seviyesi boy-kilo indeksi ve insülin direnci ile yakından ilgilidir. Adipositlerde yapılan bir araştırma Tg ile oluşturulan ER stresinin SOD seviyelerini düşürdüğünü göstermiştir [130]. Adacık hücrelerinde yapılan bir çalışmada ROS'un ER stresi üzerindeki etkisi de gösterilmiştir [141]. SOD gibi diğer anti-oksidan enzimler olan GSH ve katalaz da pankreas

adacık hücrelerinde az miktarda bulunmaktadır. Pankreas adacık hücreleri oksidatif hasara çok duyarlıdır. Bizim çalışmamızda enzim miktarının az olması dolayısıyla hücre sayısının ölçüm için yeterli olmaması nedeniyle bu enzimlerden sadece katalaza bakıldı fakat aktivite ölçülemedi.

Yaptığımız çalışmada TUN ile ER stresi oluşturulan hücrelerde lipit peroksidasyon indeksi olan MDA ve protein oksidasyonunu gösteren PC'de artış gözlenmiştir. Hiperglisemi, obesite ve inflamasyon durumlarda hücrede oksidatif stres ve ER stresi uyarılmakta bu da hücresel hasar ve patolojiler ile sonuçlanmaktadır [146]. ER stresi ve oksidatif stres bağlantısı çeşitli hücrelerde (pankreas beta hücresi, hepatosit, düz kas hücresi) yapılan araştırmalarda gösterilmiştir [147, 148].

Son yıllarda yapılan çalışmalarla pankreas adacık endotel hücrelerinin parakrin etkileşim ile adacık kitlesini ve fonksiyonunu düzenlediği gösterilmiştir. Trombospondin, temelde trombosit granüllerinde bulunan fakat endotelden salınımı gösterilmiş olan multifonksiyonel bir moleküldür. Adacık endotelinden salınan TSP1'in damarlanma ve fonksiyon üzerinde önemli etkileri mevcuttur. Ekstrasellüler matrikse bağlanan bir glikoprotein olan trombospondin aynı zamanda protein yapıdaki ilk anjiyogenez inhibitörüdür [149]. VEGF ve MMP-9 gibi proanjiyogenetik faktörleri inhibe ederek ve bu

faktörlerin endotel üzerindeki reseptörlerini bloke ederek anti-anjiyogenik etkisini göstermektedir [150].

TSP'nin adacık fonksiyonunu araştıran ve TSP-/- farelerde yapılan bir çalışmada 10-12 haftalık ve 1 yaşında insülin salınımının azaldığı ve 1 yaşından sonra bu fonksiyon bozukluğunun kalıcı olduğu gösterilmiştir [151]. Bu çalışmada TSP'nin olmaması pankreas gelişiminde önemli rolü olan TGF- β 'nin azalmasına yol açarak pankreasta morfolojik ve fonksiyonel değişikliklere neden olduğunu savunulmaktadır. Bu çalışmanın aksine yaptığımız çalışmada TSP'nin kontrol hücrelerine göre insülin sekresyonunu azalttığını bulduk. Bu farklılığın nedeni deney modellerinin ayrı olması (in vivo/ in vitro) ve bizim çalışmamızda TSP'in diğer faktörlerden izole olarak verilmiş olması olabilir. TSP ile ilgili yapılan birçok çalışma in vivo olarak tasarlanmış ve bu çalışmalarda TSP-/- kemirgenler kullanılmıştır.

Ayrıca TSP'in insülin sekresyonunu azaltarak fonksiyon kaybına neden olmasının oksidatif stres veya ER stresi ile olmadığı sonucuna ulaştık. Buradaki sonuçlar insülin sentezinde artışla beraber salınımında bir bozukluk olabileceğini düşündürmektedir. Ekzositoz aşamasında bir bozukluk meydana gelmiş olabilir. TSP'lerin sitokinleri ve büyüme faktörlerini baskıladığı bilinmektedir [152]. Ayrıca adipositlere yağ asiti alımını düzenleyen reseptör, TSP1'in bağlandığı CD 36'dır [153]. Bunun dışında hücrel adezyon, migrasyon ve yara iyileşmesi gibi hücrel birçok mekanizmada rol alan multifonksiyonel

bir molekül olan TSP'in henüz aydınlatılmamış birçok fonksiyonu olabilir [154–156].

Bizim çalışmamızda TSP dozu olarak 200pM tercih edildi. TSP in plazma konsantrasyonu yaklaşık 200 pM dir [157]. Bu çalışmada doz ayarlaması için TSP'in 100, 200 ve 500 pM konsantrasyonlarında denemeler yapıldı. Dozlar arasında herhangi bir farklılık görülemediği için plazma konsantrasyonunda kullanılmasının yerinde olacağı düşünüldü. Bizim tercih ettiğimiz 200 pM ise plazmanın en fazla iki katına yakın bir doz olduğundan dolayı fizyolojik düzeylerde kalınmış olmasını sağladı.

Yaptığımız çalışmada TSP'in pankreas adacık hücre canlılığını etkilemediği bulundu. TSP'in kanser hücresinde otofajiyi uyardığı ve anjiyogenezi inhibe ederek tümörün büyümesini engellediği birçok çalışmada gösterilmiştir [158, 159]. Fakat normal sağlıklı bir hücrede plazma düzeyindeki TSP'in canlılık üzerinde olumsuz bir etkisi gösterilmemiştir. Yara iyileşmesinde [160] olduğu gibi plazma konsantrasyonundaki TSP kompanzatuvar mekanizmalar ile dokunun yeniden şekillenmesini desteklemektedir.

ER stresinin akut aktivasyonu hücreyi koruyucudur fakat bu sürecin uzaması hücre ölümüne neden olmaktadır [161, 162]. TSP1 ve TSP4'ün ER içerisinde bulunduğu ve ER stresine adaptasyonu desteklediği gösterilmiştir [163]. TSP'ler kardiyak dokunun yeniden şekillenmesini destekler ve enfarktüse cevapta rol alırlar [164]. TSP in

bulunmadığı durumlarda yaşlanmayla meydana gelen kardiyak hastalıklarda ve strese cevapta artış gösterilmiştir [164]. Bu sonuçlar TSP'lerin koruyucu ER stresi cevabını uyardığını fakat ER stresi belirteçlerinde artışa yol açmadığını göstermektedir. Bizim çalışmamızda da pankreas adacık hücrelerinin kültürüne eklenen plazma düzeyindeki TSP'in ER stresi belirtecini (XBP1) artırmadığı sonucuna ulaşıldı.

Nanomolar düzeyindeki TSP1 in düz kas hücrelerinde oksidatif parametrelerde artışa neden olduğu ve bunun CD 47 üzerinden gerçekleştiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır [165]. Bir başka çalışmada sinaptogenez ve santral sinir sistemi onarımında rol alan ve astrositlerden salınan TSP1'in oksidatif stres ile azaldığı tespit edilmiştir [166]. Fakat pankreas adacık hücrelerinde TSP'lerin ROS'larını artırdığına dair bir çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca TSP'in nanomolar düzeyinde verilmiş olması da bunda etkili olabilir. Bizim çalışmamızda 200 pM olarak kullanılan TSP, pankreas adacık hücrelerinde MDA ve PC düzeylerinde bir değişiklik meydana getirmedi.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada pankreas adacık kültürüne eklenen trombospondinin adacık hücre canlılığını olumsuz etkilemediği fakat fonksiyon kaybına neden olabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Fonksiyon kaybının oksidatif stres veya ER stresi ile değil ekzositozda veya farklı bir mekanizmada bozukluk nedeniyle olabileceği düşünülmüştür.

Endotelden salınan birçok faktör diğer endokrin organlar gibi pankreas adacık hücrelerini de yakından ilgilendirmektedir. Özellikle beta hücrelerinin organizasyonu göz önüne alındığında endotel-endokrin aksının önemsenmesi gerektiği anlaşılmaktadır. Endotel hücresi ile yapılan ko-kültür çalışması adacık hücrelerinin canlılık ve fonksiyonunu olumlu etkilemektedir. Endotelden salınan hangi faktörün buna neden olduğunun bulunması ve varsa olumsuz etkenlerin tespit edilmesi gerekmektedir. Son yıllarda yapılan birçok çalışmada trombospondinin özellikle anjiyogenezi baskılaması ve adacık hücrelerine etkileri üzerinde durmaktadır. Multifonksiyonel olan bu molekülün NO üzerindeki inhibisyonu da oldukça dikkat çekicidir.

Ayrıca kültür ortamının iyileştirilmesi pankreas adacık hücre nakillerinin sonuçlarındaki iyileşme için şarttır. Bu sebeple endotel kaynaklı TSP in kültür ortamındaki etkisi araştırılmıştır.

Hücrelerin kültür ortamındaki inkübasyon süresi 48 saate çıkarılabilir. Böylece bu çalışmada gözlenemeyen p-eIF 2a ve CHOP

gibi ER stresi belirteçleri da görülebilir ve TSP etkisi daha net anlaşılabilir.

TSP dozu olarak daha yüksek konsantrasyonlar kullanılarak nanomolar düzeyleri de denenebilir. Böylece bazı durumlarda artış gösteren TSP'nin pankreas adacık hücresi üzerinde olumsuz etkileri olup olmadığı araştırılabilir.

Pankreas adacık hücrelerinde ER stresi meydana getirmek için tunikamisin dışında tapsigargin, yüksek glukoz ve yağ asiti gibi farklı bir indükleyici ajan kullanılması sonuçların daha sağlıklı olmasını sağlayabilir.

Deneylerin *in vivo* olarak da yapılması çıkan sonuçların karşılaştırılması açısından oldukça faydalı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Di Gialleonardo, V., ve ark., *Imaging of beta-cell mass and insulinitis in insulin-dependent (Type 1) diabetes mellitus*. *Endocr Rev*, 2012. **33**(6): p. 892–919.
2. Clayton, P.T., ve ark., *Screening for medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency using electrospray ionisation tandem mass spectrometry*. *Arch Dis Child*, 1998. **79**(2): p. 109–15.
3. *Ganong's review of medical physiology*. 2010, McGraw-Hill Medical: New York. Sf 148–150.
4. Orci, L. ve R.H. Unger, *Functional subdivision of islets of Langerhans and possible role of D cells*. *Lancet*, 1975. **2**(7947): p. 1243–4.
5. Erlandsen, S.L., ve ark., *Pancreatic islet cell hormones distribution of cell types in the islet and evidence for the presence of somatostatin and gastrin within the D cell*. *J Histochem Cytochem*, 1976. **24**(7): p. 883–97.
6. Orci, L., *The microanatomy of the islets of Langerhans*. *Metabolism*, 1976. **25**(11 Suppl 1): p. 1303–13.
7. Bosco, D., ve ark., *Unique arrangement of alpha- and beta-cells in human islets of Langerhans*. *Diabetes*, 2010. **59**(5): p. 1202–10.
8. Orci, L., *The insulin factory: a tour of the plant surroundings and a visit to the assembly line. The Minkowski lecture 1973 revisited*. *Diabetologia*, 1985. **28**(8): p. 528–46.

9. Joslin, E.P. ve C.R. Kahn, *Joslin's diabetes mellitus*. 14th ed. 2005, Philadelphia, Pa.: Lippincott Williams & Willkins. xiv, 1209 p. Sf 23,24,25,37,38.
10. Rouiller, D.G., V. Cirulli, ve P.A. Halban, *Uvomorulin mediates calcium-dependent aggregation of islet cells, whereas calcium-independent cell adhesion molecules distinguish between islet cell types*. Dev Biol, 1991. **148**(1): p. 233–42.
11. Halban, P.A., ve ark., *Spontaneous reassociation of dispersed adult rat pancreatic islet cells into aggregates with three-dimensional architecture typical of native islets*. Diabetes, 1987. **36**(7): p. 783–90.
12. Pipeleers, D., *The biosociology of pancreatic B cells*. Diabetologia, 1987. **30**(5): p. 277–91.
13. Salomon, D. ve P. Meda, *Heterogeneity and contact-dependent regulation of hormone secretion by individual B cells*. Exp Cell Res, 1986. **162**(2): p. 507–20.
14. Bernardo, A.S., C.W. Hay, ve K. Docherty, *Pancreatic transcription factors and their role in the birth, life and survival of the pancreatic beta cell*. Mol Cell Endocrinol, 2008. **294**(1–2): p. 1–9.
15. D'Amour, K.A., ve ark., *Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells*. Nat Biotechnol, 2006. **24**(11): p. 1392–401.

16. Nikolova, G., B. Strilic, ve E. Lammert, *The vascular niche and its basement membrane*. Trends Cell Biol, 2007. **17**(1): p. 19–25.
17. Jabs, N., ve ark., *Reduced insulin secretion and content in VEGF-a deficient mouse pancreatic islets*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2008. **116 Suppl 1**: p. S46–9.
18. Clee, S.M., ve ark., *Positional cloning of Sorcs1, a type 2 diabetes quantitative trait locus*. Nat Genet, 2006. **38**(6): p. 688–93.
19. Carvell, M.J., ve ark., *E-cadherin interactions regulate beta-cell proliferation in islet-like structures*. Cell Physiol Biochem, 2007. **20**(5): p. 617–26.
20. Konstantinova, I., ve ark., *EphA-Ephrin-A-mediated beta cell communication regulates insulin secretion from pancreatic islets*. Cell, 2007. **129**(2): p. 359–70.
21. Wellershaus, K., ve ark., *A new conditional mouse mutant reveals specific expression and functions of connexin36 in neurons and pancreatic beta-cells*. Exp Cell Res, 2008. **314**(5): p. 997–1012.
22. Ferron, M., ve ark., *Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(13): p. 5266–70.
23. Lee, N.K., ve ark., *Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton*. Cell, 2007. **130**(3): p. 456–69.

24. Huang, C., F. Snider, ve J.C. Cross, *Prolactin receptor is required for normal glucose homeostasis and modulation of beta-cell mass during pregnancy*. *Endocrinology*, 2009. **150**(4): p. 1618–26.
25. Culina, S., V. Brezar, ve R. Mallone, *Insulin and type 1 diabetes: immune connections*. *Eur J Endocrinol*, 2013. **168**(2): p. R19–31.
26. Okun, M.M., E.M. Eskridge, ve D. Shields, *Truncations of a secretory protein define minimum lengths required for binding to signal recognition particle and translocation across the endoplasmic reticulum membrane*. *J Biol Chem*, 1990. **265**(13): p. 7478–84.
27. Rothman, J.E. ve L. Orci, *Molecular dissection of the secretory pathway*. *Nature*, 1992. **355**(6359): p. 409–15.
28. Bender, S.B., ve ark., *Mineralocorticoid receptor-mediated vascular insulin resistance: an early contributor to diabetes-related vascular disease?* *Diabetes*, 2013. **62**(2): p. 313–9.
29. Bennett, K., C. James, ve K. Hussain, *Pancreatic beta-cell KATP channels: Hypoglycaemia and hyperglycaemia*. *Rev Endocr Metab Disord*, 2010. **11**(3): p. 157–63.
30. Brezar, V., ve ark., *Beyond the hormone: insulin as an autoimmune target in type 1 diabetes*. *Endocr Rev*, 2011. **32**(5): p. 623–69.

31. Taylor, J.R., E. Dietrich, ve J. Powell, *Lorcaserin for weight management*. Diabetes Metab Syndr Obes, 2013. 6: p. 209–16.
32. Habener, J.F. ve V. Stanojevic, *alpha-cell role in beta-cell generation and regeneration*. Islets, 2012. 4(3): p. 188–98.
33. Triplitt, C.L., *Examining the mechanisms of glucose regulation*. Am J Manag Care, 2012. 18(1 Suppl): p. S4–10.
34. Crockford, P.M., ve ark., *Glucagon: a "contaminant" comes of age*. Can Med Assoc J, 1971. 105(9): p. 963–8.
35. Lucey, M.R., *Endogenous somatostatin and the gut*. Gut, 1986. 27(4): p. 457–67.
36. Field, B.C., O.B. Chaudhri, ve S.R. Bloom, *Bowels control brain: gut hormones and obesity*. Nat Rev Endocrinol, 2010. 6(8): p. 444–53.
37. Holzer, P., F. Reichmann, ve A. Farzi, *Neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide in the gut-brain axis*. Neuropeptides, 2012. 46(6): p. 261–74.
38. Brodsky, S.V. ve M.S. Goligorsky, *Endothelium under stress: local and systemic messages*. Semin Nephrol, 2012. 32(2): p. 192–8.
39. Siflinger–Birnboim, A. ve A.B. Malik, *Regulation of endothelial permeability by second messengers*. New Horiz, 1996. 4(1): p. 87–98.

40. Bombeli, T., M. Mueller, ve A. Haerberli, *Anticoagulant properties of the vascular endothelium*. Thromb Haemost, 1997. **77**(3): p. 408–23.
41. Katusic, Z.S., *Superoxide anion and endothelial regulation of arterial tone*. Free Radic Biol Med, 1996. **20**(3): p. 443–8.
42. Yipp, B.G., ve ark., *Synergism of multiple adhesion molecules in mediating cytoadherence of Plasmodium falciparum–infected erythrocytes to microvascular endothelial cells under flow*. Blood, 2000. **96**(6): p. 2292–8.
43. Takano, H., K.A. Dora, ve C.J. Garland, *Spreading vasodilatation in resistance arteries*. J Smooth Muscle Res, 2005. **41**(6): p. 303–11.
44. Kalebic, T., ve ark., *Basement membrane collagen: degradation by migrating endothelial cells*. Science, 1983. **221**(4607): p. 281–3.
45. Roy, B. ve J. Garthwaite, *Nitric oxide activation of guanylyl cyclase in cells revisited*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(32): p. 12185–90.
46. Thomas, D.D., ve ark., *The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling*. Free Radic Biol Med, 2008. **45**(1): p. 18–31.
47. Isenberg, J.S., ve ark., *Thrombospondin-1 inhibits endothelial cell responses to nitric oxide in a cGMP-dependent manner*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(37): p. 13141–6.

48. Radomski, M.W., R.M. Palmer, ve S. Moncada, *An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(13): p. 5193–7.
49. Shindo, T., ve ark., *Hypotension and resistance to lipopolysaccharide-induced shock in transgenic mice overexpressing adrenomedullin in their vasculature*. Circulation, 2000. **101**(19): p. 2309–16.
50. Fukumura, D., ve ark., *Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(5): p. 2604–9.
51. Rikitake, Y., ve ark., *Involvement of endothelial nitric oxide in sphingosine-1-phosphate-induced angiogenesis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(1): p. 108–14.
52. Babaei, S., ve ark., *Role of nitric oxide in the angiogenic response in vitro to basic fibroblast growth factor*. Circ Res, 1998. **82**(9): p. 1007–15.
53. Jadeski, L.C. ve P.K. Lala, *Nitric oxide synthase inhibition by N(G)-nitro-L-arginine methyl ester inhibits tumor-induced angiogenesis in mammary tumors*. Am J Pathol, 1999. **155**(4): p. 1381–90.
54. Jadeski, L.C., ve ark., *Nitric oxide promotes murine mammary tumour growth and metastasis by stimulating tumour cell*

- migration, invasiveness and angiogenesis*. Int J Cancer, 2000. **86**(1): p. 30–9.
55. Marasciulo, F.L., M. Montagnani, ve M.A. Potenza, *Endothelin-1: the yin and yang on vascular function*. Curr Med Chem, 2006. **13**(14): p. 1655–65.
56. Rubanyi, G.M. ve M.A. Polokoff, *Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology*. Pharmacol Rev, 1994. **46**(3): p. 325–415.
57. Feldstein, C. ve C. Romero, *Role of endothelins in hypertension*. Am J Ther, 2007. **14**(2): p. 147–53.
58. Iglarz, M. ve M. Clozel, *Mechanisms of ET-1-induced endothelial dysfunction*. J Cardiovasc Pharmacol, 2007. **50**(6): p. 621–8.
59. Abraham, D., M. Ponticos, ve H. Nagase, *Connective tissue remodeling: cross-talk between endothelins and matrix metalloproteinases*. Curr Vasc Pharmacol, 2005. **3**(4): p. 369–79.
60. Abraham, D. ve O. Distler, *How does endothelial cell injury start? The role of endothelin in systemic sclerosis*. Arthritis Res Ther, 2007. **9 Suppl 2**: p. S2.
61. Triggle, C.R., ve ark., *The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways*. Can J Physiol Pharmacol, 2012. **90**(6): p. 713–38.

62. Adams, J.C. ve J. Lawler, *The thrombospondins*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(10): p. a009712.
63. Adams, J. ve J. Lawler, *Extracellular matrix: the thrombospondin family*. Curr Biol, 1993. **3**(3): p. 188–90.
64. Adams, J.C., *Thrombospondins: multifunctional regulators of cell interactions*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2001. **17**: p. 25–51.
65. Arber, S. ve P. Caroni, *Thrombospondin-4, an extracellular matrix protein expressed in the developing and adult nervous system promotes neurite outgrowth*. J Cell Biol, 1995. **131**(4): p. 1083–94.
66. Iruela-Arispe, M.L., ve ark., *Differential expression of thrombospondin 1, 2, and 3 during murine development*. Dev Dyn, 1993. **197**(1): p. 40–56.
67. Raugi, G.J., ve ark., *Thrombospondin: synthesis and secretion by cells in culture*. J Cell Biol, 1982. **95**(1): p. 351–4.
68. Morandi, V., ve ark., *Proinflammatory cytokines (interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha) down regulate synthesis and secretion of thrombospondin by human endothelial cells*. J Cell Physiol, 1994. **160**(2): p. 367–77.
69. Hugo, C., ve ark., *Thrombospondin 1 is expressed by proliferating mesangial cells and is up-regulated by PDGF and bFGF in vivo*. Kidney Int, 1995. **48**(6): p. 1846–56.

70. Iruela-Arispe, M.L., *Regulation of thrombospondin1 by extracellular proteases*. *Curr Drug Targets*, 2008. **9**(10): p. 863–8.
71. Kazerounian, S., K.O. Yee, ve J. Lawler, *Thrombospondins in cancer*. *Cell Mol Life Sci*, 2008. **65**(5): p. 700–12.
72. Rice, A.J., M.A. Steward, ve C.M. Quinn, *Thrombospondin 1 protein expression relates to good prognostic indices in ductal carcinoma in situ of the breast*. *J Clin Pathol*, 2002. **55**(12): p. 921–5.
73. Bale, M.D. ve D.F. Mosher, *Effects of thrombospondin on fibrin polymerization and structure*. *J Biol Chem*, 1986. **261**(2): p. 862–8.
74. Mumby, S.M., G.J. Raugi, ve P. Bornstein, *Interactions of thrombospondin with extracellular matrix proteins: selective binding to type V collagen*. *J Cell Biol*, 1984. **98**(2): p. 646–52.
75. Leung, L.L. ve R.L. Nachman, *Complex formation of platelet thrombospondin with fibrinogen*. *J Clin Invest*, 1982. **70**(3): p. 542–9.
76. Bein, K. ve M. Simons, *Thrombospondin type 1 repeats interact with matrix metalloproteinase 2. Regulation of metalloproteinase activity*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(41): p. 32167–73.

77. Isenberg, J.S., ve ark., *CD47 is necessary for inhibition of nitric oxide-stimulated vascular cell responses by thrombospondin-1*. J Biol Chem, 2006. **281**(36): p. 26069–80.
78. Biernacka, A., M. Dobaczewski, ve N.G. Frangogiannis, *TGF-beta signaling in fibrosis*. Growth Factors, 2011. **29**(5): p. 196–202.
79. Lawler, J., ve ark., *Thrombospondin-1 is required for normal murine pulmonary homeostasis and its absence causes pneumonia*. J Clin Invest, 1998. **101**(5): p. 982–92.
80. Grimbirt, P., ve ark., *Thrombospondin/CD47 interaction: a pathway to generate regulatory T cells from human CD4+ CD25- T cells in response to inflammation*. J Immunol, 2006. **177**(6): p. 3534–41.
81. Kaur, S., ve ark., *Thrombospondin-1 inhibits VEGF receptor-2 signaling by disrupting its association with CD47*. J Biol Chem, 2010. **285**(50): p. 38923–32.
82. Ramanathan, S., ve ark., *Thrombospondin-1 and angiotensin II inhibit soluble guanylyl cyclase through an increase in intracellular calcium concentration*. Biochemistry, 2011. **50**(36): p. 7787–99.
83. Miller, T.W., J.S. Isenberg, ve D.D. Roberts, *Thrombospondin-1 is an inhibitor of pharmacological activation of soluble guanylate cyclase*. Br J Pharmacol, 2010. **159**(7): p. 1542–7.

84. Murphy-Ullrich, J.E., *The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state?* J Clin Invest, 2001. **107**(7): p. 785–90.
85. Kyriakides, T.R., ve ark., *Mice that lack thrombospondin 2 display connective tissue abnormalities that are associated with disordered collagen fibrillogenesis, an increased vascular density, and a bleeding diathesis.* J Cell Biol, 1998. **140**(2): p. 419–30.
86. Greenaway, J., ve ark., *Thrombospondin-1 inhibits VEGF levels in the ovary directly by binding and internalization via the low density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1).* J Cell Physiol, 2007. **210**(3): p. 807–18.
87. Zhang, X., ve ark., *Thrombospondin-1 modulates vascular endothelial growth factor activity at the receptor level.* FASEB J, 2009. **23**(10): p. 3368–76.
88. Kaur, S. ve D.D. Roberts, *CD47 applies the brakes to angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptor-2.* Cell Cycle, 2011. **10**(1): p. 10–2.
89. Sun, J., ve ark., *Thrombospondin-1 modulates VEGF-A-mediated Akt signaling and capillary survival in the developing retina.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. **296**(5): p. H1344–51.
90. Calzada, M.J., ve ark., *Alpha4beta1 integrin mediates selective endothelial cell responses to thrombospondins 1 and 2 in vitro*

- and modulates angiogenesis in vivo.* Circ Res, 2004. **94**(4): p. 462–70.
91. Krady, M.M., ve ark., *Thrombospondin-2 modulates extracellular matrix remodeling during physiological angiogenesis.* Am J Pathol, 2008. **173**(3): p. 879–91.
92. Liao, Q., ve ark., *COMP is selectively up-regulated in degenerating acinar cells in chronic pancreatitis and in chronic-pancreatitis-like lesions in pancreatic cancer.* Scand J Gastroenterol, 2003. **38**(2): p. 207–15.
93. Johansson, M., ve ark., *Islet endothelial cells and pancreatic beta-cell proliferation: studies in vitro and during pregnancy in adult rats.* Endocrinology, 2006. **147**(5): p. 2315–24.
94. Li, X., ve ark., *Islet microvasculature in islet hyperplasia and failure in a model of type 2 diabetes.* Diabetes, 2006. **55**(11): p. 2965–73.
95. Olerud, J., ve ark., *Improved vascular engraftment and graft function after inhibition of the angiostatic factor thrombospondin-1 in mouse pancreatic islets.* Diabetes, 2008. **57**(7): p. 1870–7.
96. Johansson, A., ve ark., *Angiostatic factors normally restrict islet endothelial cell proliferation and migration: implications for islet transplantation.* Transpl Int, 2009. **22**(12): p. 1182–8.
97. Kaufman, R.J., *Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional*

- and translational controls*. *Genes Dev*, 1999. **13**(10): p. 1211–33.
98. Alberts, B., *Molecular biology of the cell*. 5th ed. 2008, New York: Garland Science.
99. Ozcan, U., ve ark., *Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes*. *Science*, 2006. **313**(5790): p. 1137–40.
100. Ozcan, L., ve ark., *Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance*. *Cell Metab*, 2009. **9**(1): p. 35–51.
101. Bown, C.D., ve ark., *Regulation of ER stress proteins by valproate: therapeutic implications*. *Bipolar Disord*, 2002. **4**(2): p. 145–51.
102. Kudo, T., ve ark., *A molecular chaperone inducer protects neurons from ER stress*. *Cell Death Differ*, 2008. **15**(2): p. 364–75.
103. Mori, K., *Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum*. *Cell*, 2000. **101**(5): p. 451–4.
104. Oyadomari, S., E. Araki, ve M. Mori, *Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic beta-cells*. *Apoptosis*, 2002. **7**(4): p. 335–45.
105. Kaufman, R.J., ve ark., *The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. **3**(6): p. 411–21.

106. Harding, H.P., Y. Zhang, ve D. Ron, *Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase*. Nature, 1999. **397**(6716): p. 271–4.
107. Novoa, I., ve ark., *Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha*. J Cell Biol, 2001. **153**(5): p. 1011–22.
108. Novoa, I., ve ark., *Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression*. EMBO J, 2003. **22**(5): p. 1180–7.
109. Lipson, K.L., ve ark., *Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE1*. Cell Metab, 2006. **4**(3): p. 245–54.
110. Pirot, P., ve ark., *Global profiling of genes modified by endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta cells reveals the early degradation of insulin mRNAs*. Diabetologia, 2007. **50**(5): p. 1006–14.
111. Haze, K., ve ark., *Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(11): p. 3787–99.
112. Wang, Y., ve ark., *Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response*. J Biol Chem, 2000. **275**(35): p. 27013–20.

113. Yoshida, H., ve ark., *ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF- κ B (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(18): p. 6755–67.
114. Seo, H.Y., ve ark., *Endoplasmic reticulum stress-induced activation of activating transcription factor 6 decreases insulin gene expression via up-regulation of orphan nuclear receptor small heterodimer partner*. Endocrinology, 2008. **149**(8): p. 3832–41.
115. Hetz, C., ve ark., *XBP-1 deficiency in the nervous system protects against amyotrophic lateral sclerosis by increasing autophagy*. Genes Dev, 2009. **23**(19): p. 2294–306.
116. Kim, M.K., ve ark., *Endoplasmic reticulum stress and insulin biosynthesis: a review*. Exp Diabetes Res, 2012. **2012**: p. 509437.
117. Harding, H.P., ve ark., *Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in perk^{-/-} mice reveals a role for translational control in secretory cell survival*. Mol Cell, 2001. **7**(6): p. 1153–63.
118. Inoue, H., ve ark., *A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome)*. Nat Genet, 1998. **20**(2): p. 143–8.

119. Yusta, B., ve ark., *GLP-1 receptor activation improves beta cell function and survival following induction of endoplasmic reticulum stress*. Cell Metab, 2006. 4(5): p. 391-406.
120. Oyadomari, S., ve ark., *Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes*. J Clin Invest, 2002. 109(4): p. 525-32.
121. Liu, Y.Q., T.L. Jetton, ve J.L. Leahy, *beta-Cell adaptation to insulin resistance. Increased pyruvate carboxylase and malate-pyruvate shuttle activity in islets of nondiabetic Zucker fatty rats*. J Biol Chem, 2002. 277(42): p. 39163-8.
122. Chen, C., ve ark., *Mechanism of compensatory hyperinsulinemia in normoglycemic insulin-resistant spontaneously hypertensive rats. Augmented enzymatic activity of glucokinase in beta-cells*. J Clin Invest, 1994. 94(1): p. 399-404.
123. Robertson, R.P., *Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes*. J Biol Chem, 2004. 279(41): p. 42351-4.
124. Butler, A.E., ve ark., *Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes*. Diabetes, 2003. 52(1): p. 102-10.
125. Eizirik, D.L., A.K. Cardozo, ve M. Cnop, *The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus*. Endocr Rev, 2008. 29(1): p. 42-61.

126. Esterbauer, H. ve K.H. Cheeseman, *Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal*. *Methods Enzymol*, 1990. **186**: p. 407–21.
127. Levine, R.L., ve ark., *Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins*. *Methods Enzymol*, 1990. **186**: p. 464–78.
128. Bergmeyer, H.U., *Methods of enzymatic analysis*. 2d English ed. 1974, Weinheim
New York: Verlag Chemie ;
Academic Press.
129. Lowry, O.H., ve ark., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. *J Biol Chem*, 1951. **193**(1): p. 265–75.
130. Kamiya, T., H. Hara, ve T. Adachi, *Effect of endoplasmic reticulum (ER) stress inducer thapsigargin on the expression of extracellular-superoxide dismutase in mouse 3T3-L1 adipocytes*. *J Clin Biochem Nutr*, 2013. **52**(2): p. 101–5.
131. Yamaguchi, S., ve ark., *Endoplasmic reticulum stress and N-glycosylation modulate expression of WFS1 protein*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **325**(1): p. 250–6.
132. Taniguchi, S., ve ark., *Hydrogen sulphide protects mouse pancreatic beta-cells from cell death induced by oxidative stress, but not by endoplasmic reticulum stress*. *Br J Pharmacol*, 2011. **162**(5): p. 1171–8.

133. Chan, J.Y., T.J. Biden, ve D.R. Laybutt, *Cross-talk between the unfolded protein response and nuclear factor- κ B signalling pathways regulates cytokine-mediated beta cell death in MIN6 cells and isolated mouse islets*. Diabetologia, 2012. 55(11): p. 2999–3009.
134. Schuiki, I., L. Zhang, ve A. Volchuk, *Endoplasmic reticulum redox state is not perturbed by pharmacological or pathological endoplasmic reticulum stress in live pancreatic beta-cells*. PLoS One, 2012. 7(11): p. e48626.
135. Chiang, C.K., ve ark., *Endoplasmic reticulum stress signal impairs erythropoietin production: a role for ATF4*. Am J Physiol Cell Physiol, 2013. 304(4): p. C342–53.
136. McKenzie, M.D., ve ark., *Proapoptotic BH3-only protein Bid is essential for death receptor-induced apoptosis of pancreatic beta-cells*. Diabetes, 2008. 57(5): p. 1284–92.
137. Chambers, K.T., ve ark., *The role of nitric oxide and the unfolded protein response in cytokine-induced beta-cell death*. Diabetes, 2008. 57(1): p. 124–32.
138. Peng, L., ve ark., *Dynamin-related protein 1 is implicated in endoplasmic reticulum stress-induced pancreatic beta-cell apoptosis*. Int J Mol Med, 2011. 28(2): p. 161–9.
139. Banerjee, S., ve ark., *Klotho Ameliorates Chemically Induced Endoplasmic Reticulum (ER) Stress Signaling*. Cell Physiol Biochem, 2013. 31(4–5): p. 659–72.

140. Baldwin, A.C., ve ark., *A role for aberrant protein palmitoylation in FFA-induced ER stress and beta-cell death*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2012. **302**(11): p. E1390–8.
141. Chung, S.S., ve ark., *Mechanism for antioxidative effects of thiazolidinediones in pancreatic beta-cells*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2011. **301**(5): p. E912–21.
142. Srinivasan, S., ve ark., *Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis is partly mediated by reduced insulin signaling through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and increased glycogen synthase kinase-3beta in mouse insulinoma cells*. Diabetes, 2005. **54**(4): p. 968–75.
143. Shao, D., ve ark., *Suppression of XBP1S mediates high glucose-induced oxidative stress and extracellular matrix synthesis in renal mesangial cell and kidney of diabetic rats*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e56124.
144. Chen, J., J.K. Chen, ve R.C. Harris, *Angiotensin II induces epithelial-to-mesenchymal transition in renal epithelial cells through reactive oxygen species/Src/caveolin-mediated activation of an epidermal growth factor receptor-extracellular signal-regulated kinase signaling pathway*. Mol Cell Biol, 2012. **32**(5): p. 981–91.
145. Susztak, K., ve ark., *Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the*

- onset of diabetic nephropathy*. *Diabetes*, 2006. **55**(1): p. 225–33.
146. Williams, L.M., *Hypothalamic dysfunction in obesity*. *Proc Nutr Soc*, 2012. **71**(4): p. 521–33.
147. Solinas, G. ve M. Karin, *JNK1 and IKKbeta: molecular links between obesity and metabolic dysfunction*. *FASEB J*, 2010. **24**(8): p. 2596–611.
148. Summers, S.A., *Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity*. *Prog Lipid Res*, 2006. **45**(1): p. 42–72.
149. Good, D.J., ve ark., *A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(17): p. 6624–8.
150. Rodriguez-Manzaneque, J.C., ve ark., *Thrombospondin-1 suppresses spontaneous tumor growth and inhibits activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(22): p. 12485–90.
151. Drott, C.J., ve ark., *Sustained beta-cell dysfunction but normalized islet mass in aged thrombospondin-1 deficient mice*. *PLoS One*, 2012. **7**(10): p. e47451.
152. Kong, P., ve ark., *Thrombospondin-1 regulates adiposity and metabolic dysfunction in diet-induced obesity enhancing*

adipose inflammation and stimulating adipocyte proliferation.

Am J Physiol Endocrinol Metab, 2013.

153. Hajri, T., ve ark., *CD36-facilitated fatty acid uptake inhibits leptin production and signaling in adipose tissue.* Diabetes, 2007. **56**(7): p. 1872–80.
154. Murphy-Ullrich, J.E. ve D.F. Mosher, *Localization of thrombospondin in clots formed in situ.* Blood, 1985. **66**(5): p. 1098–104.
155. Agah, A., ve ark., *The lack of thrombospondin-1 (TSP1) dictates the course of wound healing in double-TSP1/TSP2-null mice.* Am J Pathol, 2002. **161**(3): p. 831–9.
156. Reed, M.J., ve ark., *Differential expression of SPARC and thrombospondin 1 in wound repair: immunolocalization and in situ hybridization.* J Histochem Cytochem, 1993. **41**(10): p. 1467–77.
157. Roberts, D.D., ve ark., *The matricellular protein thrombospondin-1 globally regulates cardiovascular function and responses to stress via CD47.* Matrix Biol, 2012. **31**(3): p. 162–9.
158. Kaur, S., ve ark., *Thrombospondin-1 signaling through CD47 inhibits self-renewal by regulating c-Myc and other stem cell transcription factors.* Sci Rep, 2013. **3**: p. 1673.

159. Kalas, W., ve ark., *Thrombospondin-1 receptor mediates autophagy of RAS-expressing cancer cells and triggers tumour growth inhibition*. *Anticancer Res*, 2013. **33**(4): p. 1429–38.
160. Matsuba, M., A.E. Hutcheon, ve J.D. Zieske, *Localization of thrombospondin-1 and myofibroblasts during corneal wound repair*. *Exp Eye Res*, 2011. **93**(4): p. 534–40.
161. Hamada, H., ve ark., *Dilated cardiomyopathy caused by aberrant endoplasmic reticulum quality control in mutant KDEL receptor transgenic mice*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(18): p. 8007–17.
162. Zhang, K. ve R.J. Kaufman, *From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response*. *Nature*, 2008. **454**(7203): p. 455–62.
163. Veliceasa, D., ve ark., *Transient potential receptor channel 4 controls thrombospondin-1 secretion and angiogenesis in renal cell carcinoma*. *FEBS J*, 2007. **274**(24): p. 6365–77.
164. Schroen, B., ve ark., *Thrombospondin-2 is essential for myocardial matrix integrity: increased expression identifies failure-prone cardiac hypertrophy*. *Circ Res*, 2004. **95**(5): p. 515–22.
165. Csanyi, G., ve ark., *Thrombospondin-1 regulates blood flow via CD47 receptor-mediated activation of NADPH oxidase 1*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012. **32**(12): p. 2966–73.

166. Chen, J.K., ve ark., *Oxidative stress-induced attenuation of thrombospondin-1 expression in primary rat astrocytes*. J Cell Biochem, 2011. 112(1): p. 59-70.