T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

STREPTOZOTOSİN İLE İNDÜKLENEN PANKREATİK BETA HÜCRE HASARINDA ÇİNKO TAKVİYESİNİN HMGB1/TLR4/MAPK METABOLİK YOLAĞI ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ŞAHİN YEŞİLDAĞ

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. ELVAN YILMAZ AKYÜZ

BESLENME VE DİYETETİK ANA BİLİM DALI
BESLENME VE DİYETETİK DOKTORA PROGRAMI

DOKTORA TEZİ
OCAK/2024

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca her zaman yanımda olan, bu tez çalışma sürecinde de desteklerini esirgemeyen, akademik anlamda tecrübelerini her zaman paylaşan değerli tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Elvan YILMAZ AKYÜZ'e, akademik olarak ideallerimi gerçekleştirmemde büyük emeği ve aynı zamanda çalışma konumun seçiminden başlayarak diğer tüm süreçte de destekleri olan ve bana olan inancını ve güvenini her zaman hissettiğim ikinci tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Eylem TAŞKIN GÜVEN'e, bu tez çalışmasının analizlerinde ve istatistiksel değerlendirmelerinde desteklerini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Salih Tunç KAYA'ya, hayatımı güzelleştiren sevgili Ahmet Efe YEŞİLDAĞ'a ve eşim Leyla YEŞILDAĞ'a, her zaman ve her koşulda yanımda olan, beni yetiştirip bugünlere getiren, beni ben yapan, fedakâr, hakkı ödenmez sevgili annem Emine YEŞİLDAĞ ve tüm aile bireylerime de teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje Numarası: 2022/030.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR iv
İÇİNDEKİLER v
TABLOLAR LİSTESİ viii
ŞEKİLLER LİSTESİ ix
SİMGELER VE KISALTMALAR xi
ÖZET xiv
ABSTRACT xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. DİABETES MELLİTUS 4
2.1.1. Diabetes Mellitus Tanımı ve Tarihçesi 4
2.1.2. Diabetes Mellitus'un Epidemiyolojisi 4
2.1.3. Diabetes Mellitus'un Tanısı 5
2.1.4. Diabetes Mellitus'un Sınıflandırılması 5
2.1.4.1. Tip 1 diyabet 6
2.1.4.2. Tip 2 diyabet 6
2.1.4.3. Diğer nedenlere bağlı spesifik diyabet tipleri 6
2.1.4.4. Gestasyonel diabetes mellitus 6
2.1.5. Diabetes Mellitus'un Kronik Komplikasyonları 7
2.1.5.1. Mikrovasküler komplikasyonlar 7
2.1.5.2. Makrovasküler komplikasyonlar 8
2.1.6. Diabetes Mellitusun Tedavisi 9
2.1.6.1. Farmakolojik olmayan tedavi 9
2.1.6.2. Farmakolojik tedavi 10
2.1.6.3. Beta hücre replasman tedavisi 10
2.1.7. İnsülin Biyosentezi ve Salınımı 12
2.1.7.1. İnsülin biyosentezi 12
2.1.7.2. İnsülin salınımı 13
2.2. ÇİNKO 14
2.2.1. Çinko Absorpsiyonu, Taşınma ve Depolama 15
2.2.2. Çinko Taşıcı Proteinleri ve Metalotiyoninler 16
2.2.3. Çinko Durumunun Değerlendirilmesi 17
2.2.4. Çinko Gereksinimi 17
2.2.5. Çinko Eksikliği 18

2.2.6. Çinko Toksisitesi 18
2.2.7. Çinkonun Kaynakları 19
2.3. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ ve ANTİOKSİDANLAR 20
2.4. ÇİNKO, REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ VE DİABETES MELLİTUS 21
2.5. HASARLA İLİŞKİLİ MOLEKÜLER ÖRÜNTÜLER 23
2.6. YÜKSEK HAREKETLİ GRUP AİLESİ PROTEİNLERİ 24
2.6.1. Yüksek Hareketli Grup Protein 1 24
2.6.2. Yüksek Hareketli Grup Protein 1'in İşlevleri 26
2.6.3. Hücre Dışı Yüksek Hareketli Grup Protein 1 Reseptörleri ve Etkileşimleri 27
2.6.3.1. İleri glikasyon son ürünleri reseptörü 28
2.6.3.2. Toll benzeri reseptörler 29
2.6.4. YÜKSEK HAREKETLİ GRUP PROTEİN 1 ve DİABETES MELLİTUS 31
2.7. PROGRAMLANMIŞ HÜCRE ÖLÜMÜ 32
2.7.1. Programlanmış Hücre Ölümü ve Diabetes Mellitus 35
3. GEREÇ VE YÖNTEM 37
3.1. DENEY GRUPLARININ OLUŞRULMASI 37
3.1.1. Hücre Kültürü 37
3.1.2. Deney Gruplarının Oluşturulması 37
3.1.2.1. Streptozotosin uygulaması 38
3.1.2.2. Çinko klorür takviyesi uygulaması 38
3.1.2.3. Kutu A takviyesi uygulaması 39
3.1.2.4. Çinko klorür ve kutu A uygulaması 39
3.1.3. Hücrelerin Toplanması 39
3.2. PROTEİN İFADE DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ 40
3.3. BİYOKİMYASAL ÖLÇÜMLER 41
3.3.1. Oksidatif Stresin Saptanması 41
3.3.1.1. Total oksidan seviyenin ölçülmesi 41
3.3.1.2. Total antioksidan seviyenin ölçülmesi 42
3.3.1.3. Oksidatif stres indeksinin hesaplanması 42
3.4. İNSÜLİN SALGISINDAKİ DEĞİŞİMİN TAYİNİ 42
3.4.1. Pankreatik Beta Hücrelerinin Glukoz ile İnsülin Salınımının İndüklenmesi 42
3.4.2. İnsülin Salınım Analizi 43
3.5. HÜCRE İÇİ KALSİYUM, ÇİNKO VE HMGB1 BELİRLENMESİ 43
3.5.1. Kalsiyum İçeriği Tayini 43
3.5.2. Çinko İçeriği Tayini 43
3.5.3. Yüksek Hareketli Grup Protein 1 Tayini 44
3.6. APOPTOTİK HÜCRE SAYISININ BELİRLENMESİ 44

3.7. MİTOKONDRİYAL MEMBRAN POTANSİYELİ ÖLÇÜMÜ 45
3.8. HÜCRE CANLILIĞI ÖLÇÜMÜ 46
3.9. VERİ ANALİZİ 46
4. BULGULAR 47
4.1. MİTOKONDRİYAL MEMBRAN POTANSİYELİ 47
4.2. OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİ 48
4.2.1. Total Antioksidan Seviyelerindeki Değişim 48
4.2.2. Total Oksidan Seviyelerindeki Değişim 49
4.2.3. Grupların Oksidatif Stres İndeksi 50
4.3. APOPTOTİK HÜCRE SAYISI 52
4.4. HÜCRE CANLILIĞININ DEĞERLENDİRİLMESİ 53
4.5. İNSÜLİN SALINIM DÜZEYLERİ 53
4.6. YÜKSEK HAREKETLİ GRUP PROTEİN 1, ÇİNKO VE KALSİYUM KONSANTRASYONLARI 55
4.6.1. Yüksek Hareketli Grup Protein 1 55
4.6.2. Çinko 56
4.6.3. Kalsiyum 57
4.7. PROTEİN İFADELERİNDEKİ DEĞİŞİM 58
5. TARTIŞMA 62
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 73
KAYNAKLAR 75

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1: Diyabet tanısı için kriterler 5

Tablo 2.2: İnsan vücudunun doku çinko içeriği 15

Tablo 2.3: Çinko için diyetle alınması önerilen miktar 18

Tablo 2.4: Gıdanın yenilebilir 100 gramının ortalama çinko içeriği 19

Tablo 2.5: Antioksidanlar ve temel fonksiyonları 21

Tablo 3.1: Çalışmada oluşturulan deney grupları 37

Tablo 4.1: Deney gruplarının mitokondriyal membran potansiyeli değerleri 47

Tablo 4.2: Deney gruplarının total antioksidan seviyeleri 49

Tablo 4.3: Deney gruplarının total oksidan seviyeleri 50

Tablo 4.4: Deney gruplarının oksidatif stres indeks değerleri 51

Tablo 4.5: Deney gruplarının farklı glukoz koşullarında insülin salınım düzeyleri 54

Tablo 4.6: Deney gruplarının yüksek hareketli grup protein 1 değerleri 55

Tablo 4.7: Deney gruplarının çinko değerleri 56

Tablo 4.8: Deney gruplarının ortalama kalsiyum değerleri 57

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: İnsülinin peptid yapısının biyosentezi 12

Şekil 2.2: İnsülin hekzomer yapısı 13

Şekil 2.3: Glukoz uyarılı insülin salınımı sinyal yolları 14

Şekil 2.4: HMGB1 proteinin yapısı 25

Şekil 2.5: HMGB1'nin üç redoks formu ve işlevleri 26

Şekil 2.6: İleri glikasyon son ürünleri için reseptörün şematik gösterimi 28

Şekil 2.7: TLR yapısının şematik gösterimi 29

Şekil 2.8: İntrinsik apoptozun moleküler mekanizması 33

Şekil 2.9: Ekstrinsik apoptozun moleküler mekanizması 35

Şekil 4.1: Deney gruplarının mitokondriyal membran potansiyeli 48

Şekil 4.2: Deney gruplarının total antioksidan seviyeleri 49

Şekil 4.3: Deney gruplarının total oksidan seviyeleri 50

Şekil 4.4: Deney gruplarının oksidatif stres indeks değerleri 51

Şekil 4.5: Çinko ve kutu A takviyelerinin beta hücre apoptozu üzerindeki etkisi 52

Şekil 4.6: Çinko ve kutu A takviyelerinin beta hücre apoptozu üzerindeki etkisi 52

Şekil 4.7: Çinko ve kutu A takviyelerinin beta hücre canlılığı üzerine etkisi 53

Şekil 4.8: Deney gruplarının farklı glukoz koşullarında insülin salınım düzeyleri 54

Şekil 4.9: Deney gruplarının yüksek hareketli grup protein 1 değerleri 55

Şekil 4.10: Deney gruplarının çinko değerleri 56

Şekil 4.11: Deney gruplarının kalsiyum değerleri 57

Şekil 4.12: Deney gruplarının bazı protein ifadelerindeki değişim 58

Şekil 4.13: Deney gruplarının HMGB1 protein ifadesindeki değişim 58

Şekil 4.14: Deney gruplarının TLR2 protein ifadesindeki değişim 59

Şekil 4.15: Deney gruplarının TLR4 protein ifadesindeki değişim 60

Şekil 4.16: Deney gruplarının ERK1/2 protein ifadesindeki değişim..... 60

Şekil 4.17: Deney gruplarının JNK protein ifadesindeki değişim..... 61

SİMGELER VE KISALTMALAR

AGE : Gelişmiş Glikasyon Son Ürün

AMPK : AMP ile Aktive Olan Protein Kinaz

APOPTOZ : Programlanmış Hücre Ölümü

AR/EAR : Ortalama Tahmini Gereksinim

ATP : Adenozin Trifosfat

CAT : Katalaz

CPE : Karboksipeptidaz E

DAMP : Hasarla İlişkili Moleküler Örüntü

DM : Diabetes Mellitus

DSÖ : Dünya Sağlık Örgütü

eCIRP : Hücre Dışı Soğukla İndüklenebilir RNA Bağlayıcı Protein

ER : Endoplazmik Retikulum

ERK1/2 : Hücre Dışı Sinyalle Düzenlenen Kinaz 1/2

GLUT1 : Glikoz Taşıyıcı 1

GPx : Glutatyon Peroksidaz

GSH : Glutatyon

HMG : Yüksek Hareketli Grup

HMGB1 : Yüksek Hareketli Grup Protein 1

HSP : Isı Şoku Proteinleri

IAEA : Uluslararası Atom Enerjisi Kurumu

IAP : Apoptoz İnhibitörü

IFN : İnterferon

IkappaB : İnhibitör KappaB

IKKβ : IκB kinaz-β

IL-1 : Interlökin-1

IRAK : IL-1R ile İlişkili Kinaz

IRF : İnterferon Düzenleyici Faktör

JNK : c-Jun N-Terminal Kinaz

K_{ATP} : ATP'ye Duyarlı Potasyum

LRR : Lösin Tekrarlamalı Alanlar

MAL : TIR Alanı İçeren Adaptör Protein

MAPK : Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz

MMP : Mitokondriyal Membran Potansiyeli

MT : Metalotiyonin

MyD88 : Miyeloid Farklılaşma Faktörü 88

NF-κB : Nükleer Faktör Kappa B

NOD : Obez Olmayan Diyabetik

OSI : Oksidatif Stres İndeksi

p38 MAPK : p38 Mitojen Aktive Edici Protein Kinaz

PAMP : Patojenle İlişkili Moleküler Örüntü

PC1/3 : Proprotein Konvertaz 1/3

PI3K : Fosfatidilinositol 3-Kinaz

PKC : Protein Kinaz C

PRR : Örüntü Tanıma Reseptör

RAGE : İleri Glikasyon Son Ürünleri İçin Reseptör

ROT : Reaktif Oksijen Türleri

SOD : Süperoksit Dismutaz

STZ : Streptozotosin

TAK1 : Transforme Edici Büyüme Faktörü B Aktif Protein Kinaz 1

TAS : Total Antioksidan Seviyesinin

TBK1 : TANK Bağlayıcı Kinaz-1

TIR : Toll-İnterlökin-1 Reseptörü

TLR : Toll Benzeri Reseptör

TNF : Tümör Nekroz Faktörü

TOS : Toplam Oksidan Durumu

TRAF6 : Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü İle İlişkili Faktör 6

TRAM : Trif ile İlişkili Adaptör Molekül

TRIF : TIR Domain İçeren Adaptör Protein Uyaran IFN Beta

UNICEF : Birleşmiş Milletler Çocuklara Yardım Fonu

VGCC : Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanalları

ΔΨm : Mitokondriyal Membran Potansiyeli

STREPTOZOTOSİN İLE İNDÜKLENEN PANKREATİK BETA HÜCRE HASARINDA ÇİNKO TAKVİYESİNİN HMGB1/TLR4/MAPK METABOLİK YOLAĞI ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Amaç: Streptozotosin ile indüklenen pankreatik beta hücre hasarında çinko takviyesinin HMGB1/TLR4/MAPK metabolik yolağı üzerinden insülin salınımına etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada insan pankreatik beta (β) hücre hattı (1.1B4) kullanılarak Kontrol (K), Diyabet (D), Diyabet+Çinko (DZ), Diyabet+Kutu A (DB) ve Diyabet+Çinko+Kutu A (DZB) olmak üzere beş grup oluşturulmuştur. Diyabet oluşturmak için, β hücresi 20 mM streptozosin (STZ) ile 4 saat muamele edildikten sonra 24 saat 30 μM çinko ve/veya 100 ng/L kutu A ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası total antioksidan (TAS) ve oksidan seviyesi (TOS), apoptotik hücre ölümü, mitokondri membran potansiyeli (MMP), hücre canlılığı analizi ve insülin salınımları ölçülmüştür. Ayrıca yüksek hareketli grup protein 1 (HMGB1), toll benzeri reseptör (TLR)-2/4, ERK1/2 ve JNK protein ifadeleri western blot yöntemiyle analiz edilmiştir.

Bulgular: STZ, beta hücrelerinde MMP, TAS, TLR2 ve ERK1/2'yi azaltırken çinko takviyesi bu azalmayı düzeltmiştir. Ayrıca, çinko takviyesi STZ'nin etkilerine karşı HMGB1 konsantrasyonunu ve apoptotik hücre sayısını azaltmıştır. TLR2 miktarındaki artışların "DZ", "DB" ve "DZB" gruplarında β hücre sağkalımını arttırdığı bulunmuştur. Bu sağkalım ERK1/2 miktarının artışı, JNK'nin azalması ile ilişkili bulunmuştur. Çinko ve kutu A'nın birlikte takviyesi hipo-/hiperglisemi koşullarında insülin sekresyonunda anlamlı düzeyde artış sağlamıştır.

Sonuç: STZ'nin pankreatik β hücrelerindeki hasarı TLR2/MAPK yolağının baskılanmasından kaynaklanmaktadır. Çinko takviyesinin HMGB1 ile sinerjik etki göstermesi TLR2/MAPK yolağındaki bu proteinlerin artışını sağlayarak koruyucu olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Apoptotik Hücre Ölümü, Çinko Takviyesi, Diyabet, İnsülin, Yüksek Hareketli Grup Protein 1

THE INVESTIGATION EFFECT OF ZINC SUPPLEMENTATION ON PANCREATIC BETA CELL DAMAGE-INDUCED BY STREPTOZOTOCIN THROUGH HMGB1/TLR4/MAPK METABOLIC PATHWAY

ABSTRACT

Aim: This study aims to investigate the effect of zinc supplementation on insulin release through the HMGB1/TLR4/MAPK metabolic pathway in streptozotocin-induced pancreatic beta cell damage.

Materials and Methods: In this study, five experimental groups were created using the human pancreatic beta (β) cell line (1.1B4): Control (K), Diabetes (D), Diabetes+Zinc (DZ), Diabetes+Box A (DB), and Diabetes+Zinc+Box A (DZB). To induce diabetes, β cells were treated with 20 mM streptozotocin (STZ) for 4 hours, followed by incubation with 30 μM zinc and/or 100 ng/L box A for 24 hours. After incubation, total antioxidant (TAS), oxidant status (TOS), apoptotic cell death, mitochondrial membrane potential (MMP), cell viability analysis, and insulin secretions were measured. Additionally, HMGB1, toll-like receptor (TLR)-2/4, ERK1/2, and JNK protein expressions were determined by western blot method.

Results: STZ decreased MMP, TAS, TLR2, and ERK1/2 in β cells, while zinc supplementation reversed this decrease. In addition, it reduced HMGB1 concentration and the number of apoptotic cells against the effects of STZ. It was found that increases in TLR2 levels increased β cell survival in the “DZ”, “DB” and “DZB” groups. The increase in ERK1/2 levels in this survival was found to be associated with a decrease in JNK. Zinc and box A supplementation together led to a significant increase in insulin secretion under hypo-/hyperglycemia conditions.

Conclusion: STZ's damage to pancreatic β cells is caused by suppression of the TLR2/MAPK pathway. Zinc supplementation may be protective by increasing these proteins in the TLR2/MAPK pathway through its synergistic effect with HMGB1.

Key Words: Apoptotic Cell Death, Diabetes, High Mobility Group Box 1, Insulin, Zinc Supplement

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetes Mellitus (DM), insülin salgılamasında ya da aktivitesinde ortaya çıkan bozulmalar sonucunda, kan şekerinin kontrolsüz yükselmesi ve besin metabolizması anormallikleri ile karakterize bir hastalıktır (1). Diyabet, yaygınlığı ve komplikasyonları nedeniyle toplum sağlığını tehdit eden önemli bir halk sağlığı sorunudur (2). DM'nin küresel yükü ve çeşitliliği her geçen gün artmaktadır (3). DM, genellikle yıkıcı mikro ve makrovasküler komplikasyonlara sebep olmaktadır. Bu komplikasyonlar mortalite, göz hastalıkları, böbrek yetmezliği ve genel olarak düşük yaşam kalitesine yol açmaktadır (4). Tip 1, tip 2, gestasyonel ve diğer nedenlere bağlı spesifik diyabet olarak sınıflandırılan diyabetin en sık görünen tipleri ise tip 1 ve tip 2 diyabettir (5,6). Fonksiyonel hücre kütlesinin kaybı tip 1 ve tip 2 diyabete yol açan anahtar mekanizmadır. Beta hücre yetmezliğinin arkasındaki mekanizmaları anlamak, hastalığı önlemek veya geri döndürmek için çok önemlidir (7).

Çinko (Zn^{+2}), hücre bölünmesi, apoptosiz, immün fonksiyonu gibi olaylarda görevli 300'den fazla proteinin kofaktörü ve 1000'den fazla transkripsiyon faktörü olan eser bir elementtir (8). Pankreas beta hücreleri, çinko içeriği açısından en yüksek hücreler arasında yer alır (9). Çinko, beta hücrelerinde insülinin doğru işlenmesi, depolanması, salgılanması ve faaliyeti için gereklidir. İnsülin, beta hücrelerinin salgı granüllerinde depolanır. Salgı granüllerde iki çinko iyonu, altı insülin monomerini koordine ederek olgunlaşmış insülin kristallerinin dayandığı heksamerik yapıyı oluşturur (10). Glukoz, çinkonun sitozolik konsantrasyonunda artışlara neden olur, bu da daha sonra insülinin işlenmesini ve/veya depolanmasını ve çinko ile birlikte kristalleşmesini kolaylaştırır. Sürekli hiperglisemiye bağlı sitozolik çinko oranındaki kronik artış, beta hücrelerinde fonksiyon bozukluğuna ve beta hücre ölümüne yol açabilir (11). Beta hücre kaybında Reaktif Oksijen Türleri (ROT) rol oynar (12). Beta hücre mitokondrilerinde metabolik süreçlerin bir sonucu olarak üretilen ROT'lar, bazı stres tepki yolunu aktive edebilir. Ayrıca mitokondriyal yapıyı ve işlevi etkilemekte, beta hücre kayıplarına yol açmaktadır (13). Serbest ROT'ların yarattığı hasarlar mitokondriyal membran potansiyeli kaybına yol açarak apoptotik hücre ölüm yolağını tetikleyebilir (14). Pankreas adacıkları düşük bir antioksidan kapasiteye sahiptir (15) ve bu durum pankreatik beta hücrelerinin DM gibi ROT miktarının arttığı

patojilere/hastalıklara zemin hazırlamaktadır. Dolayısıyla antioksidan savunmayı arttıracak stratejiler tedavi için umut verici olabilir. Bu tez çalışmamızda, bu düşünce ile çinko takviyesinin DM etkisini HMGB1 üzerinden etkilerini araştırmayı amaçlanmıştır. Çünkü birlikte çinko takviyesinin serum toplam antioksidan kapasitesini önemli ölçüde artırdığı bildirilmektedir (16).

Yüksek Hareketli Grup Protein 1 (High Mobility Group Box 1; HMGB1), tüm hücre tiplerinde bulunan yüksek oranda korunmuş, hücrelerin hem içinde hem de dışında işlev gören çok yönlü bir nükleer proteindir (17). Tip 1 ve tip 2 diyabet patofizyolojisi ve ilişkili metabolik bozukluklarda inflamasyonun artması, bu hastalıkların önlenmesi ve kontrolü için inflamasyon yollarını hedef haline getirmiştir (18). HMGB1'in kan ve dokudaki seviyelerinin birçok inflamatuar ve otoimmün hastalıkta yükseldiği ve bu hastalıkların yeni tedavilerinde hedef molekül olabileceği bildirilmiştir (19). Tip 1 diyabetli çocuklarda serum HMGB1 seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu gösterilmiştir (20). Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda HMGB1 ile çinko arasında bir ilişkinin olabileceği ifade edilmektedir (21-24). Hücre dışına salgılanan HMGB1, inflamatuar ve ağrı sinyallerini yaymak için hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanarak etki etmektedir (25). HMGB1 ve çinko bağlantılı çalışmalar az olmakla birlikte, Siddigui ve ark. (21) yakın zamanda yaptıkları bir çalışmada, sepsiste HMGB1'in güçlü inflamatuar etkilerinin fizyolojik pH'ta plazma sialoglikoproteinler tarafından tutularak kontrol altına alındığını, fakat sepsisin geç aşamalarında ortaya çıkan düşük pH ve düşük çinko seviyelerinde tetiklendiğini saptamıştır. Plazma pH ve çinko konsantrasyonlarındaki bir azalmanın, HMGB1 salınımını arttırarak inflamasyonu başlatabileceği gösterilmiştir. Ayrıca çinkonun HMGB1'in sialoglikoproteinle birleşmesinde güçlü bir rolü olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte çinkonun HMGB1'in kendi kendine birleşme derecesini modüle ederek dimer veya tetramer oluşumunda rol oynadığı bildirilmektedir. Bu konuda Anggayasti ve ark. (26) yaptıkları çalışmada çinko takviyesinin HMGB1 tetramerlerinin oluşumunu teşvik ettiğini saptamışlardır. Aynı çalışmada, HMGB1 tetramerlerinin İleri Glikasyon Son Ürünleri İçin Reseptör (Receptor for Advanced Glycation Endproducts; RAGE) ve Toll Benzeri Reseptörlere (Toll-like Receptor; TLR) bağlanarak inflamatuar tepkileri destekleyebileceği öne sürülmektedir. Çevresel elementlere maruziyet ile tip 1 diyabet riski ilişkisini araştıran bir çalışmada, tip 1 diyabet insidansı ile çinko arasında negatif ilişki olduğu

sonucuna varılmıştır. Çinkonun hastalığın başlangıcına karşı olası koruyucu bir rol oynayabileceği düşünülmüştür (27). Çinko yetersizliği, genellikle yetersiz alıma bağlı gelişmekte olan ülkelerde görülen önemli bir sağlık sorunudur. Özellikle yüksek miktarda tahıl tüketimine dayalı bir beslenme modelinde çinko alımının ve biyoyararlanımının azalması bu sorunu arttırmaktadır (28). Ülkemizdeki topraklar çinko bakımından fakirdir ve bu topraklarda yetişen tahıllar yüksek fitat içeriğine sahiptir (29). Türkiye'de günlük enerjinin büyük bir kısmı tahıllardan sağlanmaktadır. Ulusal çalışmalarda toplumun büyük bir kısmının günlük çinko gereksinimini karşılayamadığı bildirilmiştir (30,31). Dahası DM, hiperglisemiye bağlı olarak idrar ile çinko atımını arttırır ve serum çinko seviyesini azaltır (32,33). Ülkemizde çinkonun yetersiz tüketimi ve diyabetin yaygın görülmesi nedeniyle çinko ve diyabet arasındaki ilişkileri araştıran çalışmalara daha fazla ihtiyaç vardır. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada sepsiste çinko ve pH azalmasının HMGB1'in sekresyonunu arttırdığı görülmüştür (21). Bu bilgi ile diyabet ile çinko arasında ters bir ilişki olduğu söylenebilir (22,23). Özellikle ülkemiz gibi çinko eksikliği olan topraklarda yaşamayla diyabet olma riski arasında pozitif ilişki gösterilmiştir (28,34). Çinkonun TLR4/Interlökin-1 (IL-1) yolağı üzerinde etkisinin olduğu bildirilmektedir. Çinko bu sinyal yolağında Mitojenle Aktive Olan Protein Kinazı (MAPK) inhibe ederek Nükleer Faktör Kappa B (NF_kB) üretimini inhibe eder (24). Diyabetik hastalarda yapılan çalışmalarda HMGB1 miktarının arttığı bilinmektedir. Dolayısıyla HMGB1'in inhibe edilmesi diyabete ve onun komplikasyonlarına karşı koruyucudur (35-37). Bu bilgiler ışığında yapılan bu tez çalışmasında DM, HMGB1 üzerinden pankreatik beta hücre ölümlerine neden olduğu, çinko takviyesinin ise HMGB1/TLR4 yolağını baskılaması ile diyabetik etkilerin azalmasına aracılık edebileceği öne sürülmektedir. Yapılan literatür araştırmasına göre çinkonun HMGB1 üzerinden diyabetin beta hücreleri üzerine koruyucu etkisini ve bunun mekanizmasını araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu tez çalışmasında çinkonun pankreatik beta hücre hasarında HMGB1/TLR4/MAPK metabolik yolağı üzerine etkisinin araştırılmasıyla diyabetin mekanizmasına ve önlenmesine yönelik yeni bilgiler elde edilmesi amaçlanmıştır. Bunun yanı sıra HMGB1'in yeni bir rolü olarak pankreas hücrelerinin insülin salgılamasında uyarıcı bir faktör olabileceği konusundaki literatür eksikliğine katkı sağlayacağı ve yeni çalışmalara öncülük edeceği düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DİABETES MELLİTUS

2.1.1. Diabetes Mellitus Tanımı ve Tarihçesi

Diabetes mellitus, insülin salgılamasında ya da aktivitesinde ortaya çıkan bozulmalar sonucunda, kan şekerinin kontrolsüz yükselmesi ve besin metabolizması anormallikleri ile karakterize bir hastalıktır (1). DM benzeri aşırı susama, sürekli idrara çıkma ve şiddetli vücut ağırlığı kaybı gibi klinik özellikler 3000 yılı aşkın süredir bilinmektedir (38). Diabetes mellitusun tanımlamalarına Çin, eski Hindistan literatürlerinde, Mısır papirüsleri ile eski Yunan ve Arap hekimlerinin eserlerinde rastlanmıştır (39). "Diabetes" terimi ilk defa Araetus tarafından ikinci yüzyılda kullanılmıştır. On yedinci yüzyılda Thomas Willis'ın hastaların idrar ve kanının tatlılığını yeniden keşfetmesiyle birlikte melitus kelimesini eklemiştir (40). Fransız Claude Bernard'ın 19. yüzyılda karaciğerin glikojenik etkisi üzerine önemli çalışmaları olmuş, Oskar Minkowski ve Joseph von Mering 1889 yılında, köpeklerin pankreasını çıkararak ciddi ve ölümcül DM hastalığını oluşturmuşlardır. 20. yüzyılın başında ise Frederick Banting ve Charles Best pankreas adacıklarından insulini izole ederek tip 1 diyabet hastalarına uygulamışlardır. Bu tıbbi keşif milyonlarca kişinin hayatını kurtarmış, diyabet tedavisinde yeni bir çağın başlamasına öncülük etmiştir (39).

2.1.2. Diabetes Mellitus'un Epidemiyolojisi

Diabetes mellitus'un küresel yükü ve çeşitliliği her geçen gün artmaktadır (3). Kentleşme, nüfusun yaşlanması, küresel şişmanlık prevalansındaki artış, düşük kaliteli diyetler ve fiziksel hareketsizlik gibi toplumsal belirleyiciler diyabet yükünün artmasını teşvik etmektedir (41). 2019'da küresel diyabet mellitus prevalansı %9,3 olarak kaydedilirken (463 milyon kişi), gelecek yıllarda bu oranın 2030'da %10,2'ye (578 milyon) ve 2045'te %10,9'a (700 milyon) yükselmesi öngörülmektedir (42). Ülkemizde 1998 yılında diyabet prevalansı %7,2 (43) iken 2010'da %13,7'ye yükseldiği gösterilmiştir (44). Diabetes mellituslu kişilerin sayısı küresel olarak artmaya devam ederek sağlık sistemleri ve toplum üzerinde sürdürülemez talepler oluşturarak önemli bir

halk sağlığı yükü oluşturmaktadır (41). Diyabetin küresel olarak önemli bir ekonomik yükü bulunmaktadır. Diyabetin 2015 yılı için küresel maliyeti 1,31 trilyon dolardır (45). Bu maliyetin 2030'a yılına kadar 2,1 trilyon dolara yükseleceği tahmin edilmektedir. Ayrıca diyabetin uluslararası hedeflerinin karşılanması durumunda bile küresel ekonomik yükün azalmayacağı düşünülmektedir (46).

2.1.3. Diabetes Mellitus'un Tanısı

Diabetes mellitus'un tanısı için açlık kan glukozu düzeyi, 75 g oral glukoz tolerans testinin ikinci saatindeki kan glukozu düzeyi ve hemoglobin A1C gibi kan glukozu parametreleri kullanılır. Amerikan diyabet derneği, diyabet tanısı için Tablo 2.1'de verilen dört kriterden herhangi birinin yeterli olduğunu bildirmiştir (47).

Tablo 2.1: Diyabet tanısı için kriterler (47)

Parametre	**Kesişim Değeri**
Açlık plazma glukozu*	≥ 126 mg/dL
Oral glukoz tolerans testi sırasında 2 saatlik plazma glukozu**	≥ 200 mg/dL
Hemoglobin A1C***	≥ %6,5
Klasik hiperglisemi veya hiperglisemik semptomları olan bir hastada, rastgele bir plazma glukozu	≥ 200 mg/dL

*Açlık plazma glukozu için en az 8 saat açlık gereklidir; **Test, suda çözünmüş 75 g susuz glikoz eşdeğeri içeren bir glikoz yükü kullanılarak Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından tarif edildiği şekilde yapılmalıdır; ***Test, uluslararası standardize edilmiş yöntemlerle ve diyabet kontrolü ve komplikasyon çalışması testine göre standardize edilmiş bir yöntem kullanılarak laboratuvarda gerçekleştirilmelidir.

2.1.4. Diabetes Mellitus'un Sınıflandırılması

Amerikan Diyabet Derneği, DM tedavisini belirlemek için sınıflandırmanın önemli olduğunu bildirmektedir (48). Diabetes mellitus tip 1, tip 2, gestasyonel ve diğer nedenlere bağlı spesifik diyabet olarak sınıflandırılır (5). En sık görünen tipleri ise tip 1 ve tip 2 diyabettir (6).

2.1.4.1. Tip 1 diyabet: Pankreas beta hücrelerinin immün aracılı yıkımına bağlı olarak mutlak insülin eksikliği ile karakterize otoimmün hastalıktır. Bu hastalıkla yaşayan çoğu insan için insülin replasmanı uzun süre boyunca tek tedavi olmuştur (49) (50). Tip 1 diyabetli bireylerde yeterli bir glukoz homeostazının sağlanmasının ihtiyatlı bir yolu da bireylerde geri kalan beta hücrelerini hipergliseminin indüklediği apoptozise karşı korumaktır. Bu bağlamda, gelecekte beta hücre apoptoz yolaklarını yavaşlatan ve hatta önleyen terapötik uygulamalar umut vaat edebilir (51).

2.1.4.2. Tip 2 diyabet: İnsülin direnci ve metabolik sendrom çerçevesinde otoimmün olmayan ilerleyici beta hücre insülin sekresyonu kaybı olarak gelişir (48). DM'nin iki ana tipi arasından daha sık görülen tipidir. Genellikle insulin direnci ile pankreas beta hücre fonksiyon bozukluğuna bağlı ilerlemiş kan glukozu düzenlemesi sorunudur (52). Fonksiyonel hücre kütlesinin kaybı tip 1 ve tip 2 diyabete yol açan anahtar mekanizmadır. Beta hücre yetmezliğinin arkasındaki mekanizmaları anlamak, hastalığı önlemek veya iyileştirmek için çok önemlidir (7). Toplumda bu kadar çok görülen diyabet hastalığının patofizyolojik mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamış olmasından dolayı tedavisi hala kesin olarak bulunamamıştır.

2.1.4.3. Diğer nedenlere bağlı spesifik diyabet tipleri: Pankreas ekzokrin eksikliğini içeren hastalıklar (örn. pankreatit, kistik fibroz, hemokromatoz), endokrinopatiler (örn. cushing sendromu, akromegali, feokromositoma), ilaç veya kimyasal kaynaklı (örn. glukokortikoidler, nöroleptikler, interferon alfa, pentamidin), beta hücre fonksiyonunun genetik kusurları, insülin etkisinin genetik kusurları veya enfeksiyonlar nedeniyle ortaya çıkan diyabet tipleridir (48,50).

2.1.4.4. Gestasyonel diabetes mellitus: Gebelik öncesi belirgin bir diyabeti olmayan kadınlarda, gebeliğin son iki trimesterinde teşhis edilen diyabetus mellitus alt tipidir (48). Prevalansı hızla artmakta olan bu metabolik bozukluğun hem anne hem de fetüs sağlığı üzerinde önemli sağlık riskler oluşturur. Yaşam tarzı ve farmakolojik müdahaleler içeren tedaviler kısa vadeli faydalar göstermiş olsa da, intrauterin antidiyabetik ilaçlara maruz kalmanın yavrular üzerindeki uzun vadeli etkisi belirsizliğini korumaktadır (53).

2.1.5. Diabetes Mellitus'un Kronik Komplikasyonları

Diyabet, genellikle yıkıcı makrovasküler (kalp damar hastalıkları) ve mikrovasküler (diyabetik böbrek hastalığı, diyabetik retinopati ve nöropati vb.) komplikasyonlara sebep olmaktadır. Bu komplikasyonlar mortalite, göz hastalıkları, böbrek yetmezliği ve genel olarak düşük yaşam kalitesine yol açmaktadır (4). Ayrıca bireylerin kalp damar hastalıkları, kanser, kronik alt solunum yolu hastalıkları, beyin damar hastalıkları, grip, zatürre ve böbrek hastalıklarına bağlı ölüm oranlarını arttırmaktadır (54). Diyabet, yaygınlığı ve komplikasyonları nedeniyle toplum sağlığını tehdit eden önemli bir halk sağlığı sorunudur. Diyabet hastalarında kan şekeri kontrolünün sağlanmasıyla hastalığa bağlı gelişen komplikasyonların etkili bir şekilde azaltılabileceği vurgulanmaktadır (2).

2.1.5.1. Mikrovasküler komplikasyonlar:

a) Nefropati: Diyabetik nefropati, tip 1 ve tip 2 diyabetik hastaların yaklaşık %40'ını etkilemektedir. Böbrek hastalıklarından bağımsız bir şekilde kalıcı proteinüri ile tanımlanan bu durum, özellikle kardiyovasküler nedenlerden ölüm riskini arttırır. Diyabetik nefropatinin gelişiminde önemli ana risk faktörleri arasında genetik yatkınlık ile birlikte yüksek kan glukozu ve kan basıncı yer alır (55,56). Diyabetik nefropatinin kesin nedeni bilinmemektedir, ancak insülin direnci ve otoimmün süreçler nefropati gelişimine sebebiyet verebilir (57).

b) Retinopati: Diyabetik retinopati, global görme kaybının önde gelen nedenleri arasında yer alan DM'nin en sık görülen komplikasyonudur (58)**.** Hiperglisemi, retinadaki kan damarlarında ilerleyici hasara bağlı olarak kanamaya, retina dekolmanına ve körlüğe neden olabilir (4). Etiyolojisi ve patolojisi kapsamlı bir şekilde incelenmiş olmasına rağmen tedavi seçenekleri çok azdır (58)**.** Diyabetli bireyler arasında 2020 yılı diyabetik retinopatinin küresel prevalansı %22,2 olarak tahmin edilmiş olup, bu prevalansın 2045 yılına kadar yüksek kalacağı ön görülmektedir (59).

c) Nöropati: Diyabetik nöropati, diyabet prevalansındaki artışla birlikte yaygınlığı endişe verici şekilde artan bir komplikasyondur. Birkaç diyabetik nöropati tipi olmasına rağmen distal simetrik polinöropati en yaygın görülen ve üzerinde çalışılan tiptir. Yüksek oranda alt ekstremite amputasyonu ve mortalite ile ilişkili olan diyabetik ayak ülserasyonu ve charcot nöropatik osteoartropatisi için önemli bir risk faktörüdür. Bunlarla birlikte diyabetik nöropatiyi önlemenin odak noktası glisemik kontrol, yaşam tarzı değişikliği ve ayak bakımıdır (60).

d) Diyabetik ayak: Diyabetik ayak ülserleri, diabetes mellitusun yaygın bir komplikasyonu olarak önemli morbidite, mortalite ve sağlık harcamalarından sorumludur (61). Diyabetik ayak ülserleri, nöropati, yaralanmalar ve periferik arter darlığı oluşturan hastalıklara bağlıdır. Diyabetik nöropati ayak deformitesine yol açarak yürüme ile artan deri basıncına yol açar. Ayak ülseri geliştiğinde, uzuv invaziv enfeksiyon açısından yüksek risk altındadır. Diabetes mellutus hastasının ayağında deri ülserasyonu gelişimi ciddi bir tıbbi durumdur ve hemen iyileşmezse uzuv kesilmesine yol açabilir (62). Diyabetik ayak ülserinde standart bakım uygulamaları olmasına rağmen mevcut yara iyileşme sonuçları ile istenen sonuçlar arasında hala önemli bir fark bulunmaktadır (61).

2.1.5.2. Makrovasküler komplikasyonlar: Diyabetle ilişkili makrovasküler komplikasyonlar kardiyovasküler, serebrovasküler ve periferik arter hastalıklarını içerir (5). Periferik arter hastalıkları ise iyileşmeyen yaralara, kangrene ve sonunda ampütasyona neden olabilir (56). Makrovasküler komplikasyonların gelişimine arter duvarlarındaki kronik enflamasyonların yol açtığı ateroskleroz sürecinin neden olduğu düşünülmektedir (63). Makrovasküler komplikasyonlar diyabetik bireylerde morbidite ve mortalite üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Bu komplikasyonların önlenmesi için kardivasküler risk faktörleri kontrol altına alınmalıdır (5).

a) Kardiyovasküler hastalıklar: Koroner arter hastalıkları, kan glukozu homeostazı ile yakından ilişkilidir. Kan glukozu düzenlemesi kötü olan hastalarda koroner arter hastalıkları riski yüksektir. İnsülin direnci, ateroskleroz gelişiminin ilk evrelerinde önemli rol oynar. Bununla birlikte diyet gibi değiştirilebilir risk faktörleri, hiperglisemi, yüksek kolesterol koroner kalp hastalıklarının gelişimine neden olur (64).

b) Serebrovasküler hastalıklar: Serebrovasküler hastalıklar, beyin ve damarları arasındaki kan akışındaki birçok bozuklukları kapsamaktadır. Bu durum kan damarlarının patlamasından veya tıkanmasından kaynaklanır (64). Beyni besleyen damarların tıkanması ya da yırtılmasına bağlı aniden oluşan inme durumu serebrovasküler hastalığın en yaygın belirtisidir. Subaraknoid kanamalar, arteriyel diseksiyonlar, subkortikal infarktlar ve lökoensefalopati ile serebral otozomal dominant arteriyopati, arteriyovenöz malformasyonlar, venöz sinüs trombozu, moyamoya hastalığı ve vaskülit serebrovasküler hastalıkları beynin kan damarlarını etkilemektedir (65).

c) Periferik arter hastalıklar: Kan damarlarının daralmasına bağlı uzuvların ve iç organların yetersiz kanlanmasından kaynaklanır. Diyabetli kişilerde yaş, diyabet süresi ve nöropati varlığına göre periferik vasküler hastalık riski artar (56). Aterosklerotik hastalık uzuv amputasyonları için temel risk faktörüdür (64).

2.1.6. Diabetes Mellitusun Tedavisi

Dibetes mellitus tiplerinin tedavilerinin hepsinde tıbbi beslenme tedavisi, fiziksel aktivite, izlem, ilaç tedavisi ve kendi kendine yönetim yer almalıdır (1). Diyabet tedavisinin genel hedefleri, akut dekompansasyonu önlemek, geç dönem hastalık komplikasyonlarının ortaya çıkmasını önlemek veya geciktirmek, mortaliteyi azaltmak ve iyi bir yaşam kalitesini sürdürmektir (66).

2.1.6.1. Farmakolojik olmayan tedavi: Diyet modifikasyonu ve fiziksel aktivite tedavisi farmakolojik olmayan yaklaşımlardır (67). Tedavi planına bağlılığın bu yaklaşımın başarısını sağlamada büyük bir rol oynamaktadır (68). Tedavinin genel hedeflerine ulaşmak için diyet önerileri bireye özgü planlanmalıdır. Bunlarla beraber tedavi hedeflerine ulaşılmasında hastanın diyabet eğitimi önemlidir (66). Tip 2 diabetes mellitus tedavisinin temelini genellikle düşük kalorili diyet ve düzenli egzersiz program oluşturur. Hastanın yaşam tarzı değişikliklerine uyum sağlayamaması, diyete uymasına ve düzenli egzersiz yapmasına rağmen metabolik kontrol sağlanamadığı durumlarda farmakolojik tedaviye başlanmalıdır (66).

2.1.6.2. Farmakolojik tedavi: Yaşam tarzı değişikliğinin tek başına yeterli olmadığı durumlarda diyabet yönetiminde kullanılan insülin, metformin, sülfonilüreler gibi ilaçlar farmakolojik temelli yaklaşımlar arasında yer alır (67). Tip 1 diyabetin temel tedavisi insülin uygulamasıdır. Bu uygulamada hastaların kan şekeri düzeylerinin kontrolünü ve insülin dozlarının ayarlanmasını içerir. Bu uygulama hastalara daha fazla esneklik ve daha iyi bir yaşam kalitesi sağlar (66).

2.1.6.3. Beta hücre replasman tedavisi: Yetişkin insanlarda beta hücre kütlesi, mevcut beta hücrelerinin replikasyonu veya kök hücrelerden yeni adacık oluşumu ve beta hücre apoptoz hızı ile düzenlenir. Bu nedenle, diyabetli hastalarda eksik olan beta hücre kütlesi yeni beta hücresi oluşumunu artırarak veya beta hücresi apoptozunu inhibe ederek onarılabilir (69). İnsan pankreatik adacıkları sınırlı rejeneratif yeteneğe sahiptir (70). Endojen beta hücre rejenerasyonunu inceleyen çalışmalar, beta hücre eksikliği olan diyabetin tedavisi için çok sayıda strateji geliştirmiştir. Kemirgen modellerinde bazı tedavi stratejileri başarılı olsa da bunların çoğu insanlarda başarısız olmuştur. Bu başarısızlığın altında Tip 1 diyabetin otoimmünolojik özellikleri yer almaktadır (71). Beta hücre kütlesinin yeniden oluşturulması için tedavi edici müdahaleleri arasında kök hücrelerden elde edilen yeni beta hücrelerin nakledilmesi, rezidual beta hücre proliferasyonunun uyarılması, beta olmayan hücrelerin beta benzeri hücrelere yeniden programlanması ve genetik mühendislik kullanılarak hayvanlardan adacık elde edilmesi yer almaktadır (70).

a) Pankreas ve pankreas adacık nakli: Tüm organ pankreas ve pankreas adacık nakilleri, genellikle tip 1 diabetes mellituslu hastalar arasında, özellikle de tekrarlayan ciddi hipoglisemi veya böbrek nakli gerektiren renal yetmezlik gibi komplikasyonlarla mücadele eden bir hasta grubunda gerçekleştirilmektedir. Pankreas nakli genellikle böbrek nakli ile aynı anda gerçekleştirilir, ancak özellikle istikrarsız tip 1 diyabeti olan hastalarda yalnızca pankreas nakli düşünülebilir. Pankreas nakli insülin bağımsızlığını geri kazanmada oldukça başarılı olmakla birlikte, büyük cerrahi ve immünsüpresyon gibi önemli riskler taşır (72). Uluslararası pankreas nakli kayıtlarına göre pankreas transplantasyonu yönteminde hasta sağkalımı ve greft fonksiyonunda önemli ölçüde iyileşme sağlandığı bildirilmiştir (73).

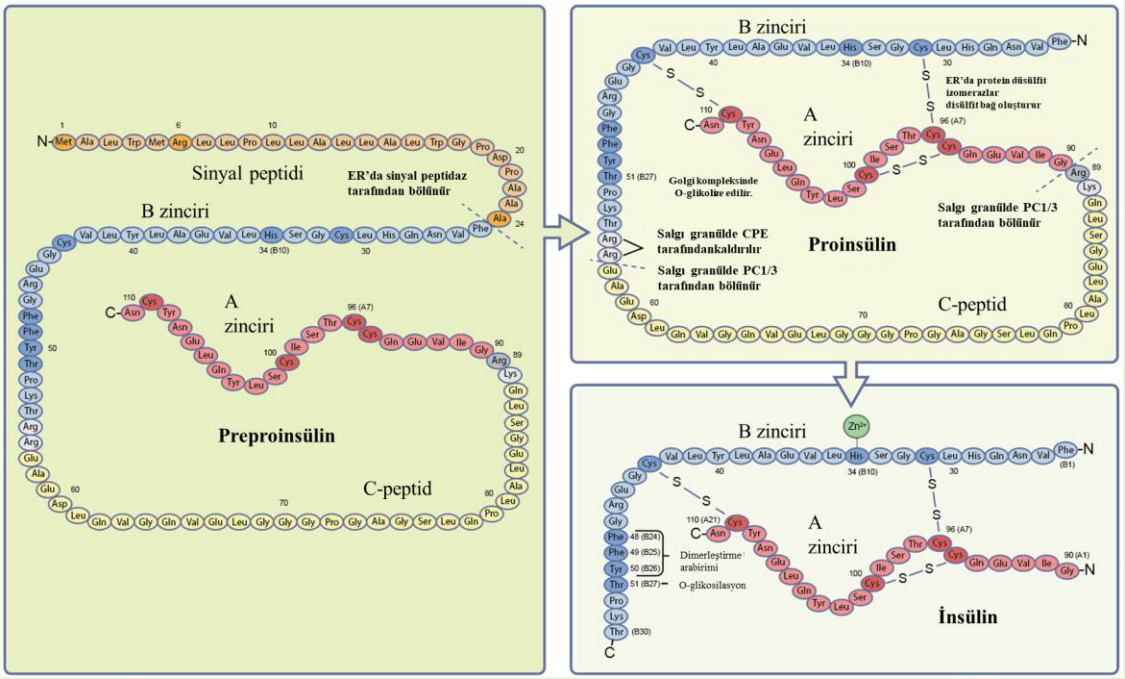
Adacık naklinde ise beyin ölümü gerçekleşen kadavra donörlerinden izole edilen insan adacıkları nakledilmektedir. Adacık infüzyonu için cerrahi prosedür nispeten küçüktür ve

radyolojik kılavuzluk altında portal vene transhepatik perkütan infüzyon yoluyla gerçekleştirilir. Genellikle şiddetli hipoglisemisi olan istikrarsız tip 1 diyabet için yapılır. Adacık nakli hipogliseminin yönetiminde başarılı sonuçları sağlamasına rağmen insüline bağımlı bir durumdan kurtulmak için birden fazla pankreas donörü gerekebilir (72). Donör eksikliği ve immünosüpresan kullanımına bağlı sorunlar adacık transplantasyonunun klinik alanda yaygın olarak kullanılmasını engellemektedir (74). Adacık nakli, eksojen insülin gereksinimlerinden yüksek oranda kurtulma sağlamaktadır. Adacık nakilleri faz I/II değerlendirmesinden faz III değerlendirmesine geçmiştir. Adacık üretimi, işlenmesi, nakil işlemi ve immünosüpresif korumada ortaya çıkacak yeniliklerin bu alanda ilerlemeyi hızlandıracağı bildirilmiştir (75). Donör organların eksikliği pankreas ve adacık nakli tedavisini uygulayacak hastaları sınırlar. Ayrıca, nakil yapılan adacıklarda zaman içinde sayısal olarak azalma olması çoğu nakil yapılan hastanın insülin tedavisine tekrar geri dönmesine neden olmaktadır (69).

b) Kök hücre Tedavisi: Diyabet tedavisi için kök hücre bazlı terapi özellikle tip 1 diyabet için umut verici bir potansiyel terapötik yöntem olarak kabul edilmiştir. Ancak, kök hücre tedavisinde (i)İnsan pluripotent kök hücrelerinden fonksiyonel beta benzeri hücrelerin üretimi, (ii) insan pluripotent kök hücrelerinden farklılaşma verimliliğinin geliştirilmesi, (iii) nakli yapılan hücrelerin otoimmünden korunması, (iv) nakil için yeterli sayıda hücre tipinin üretimi, ve (v) İnsülin bağımsızlığının nasıl sağlanacağı gibi engeller çözülmesi gereken başlıca sorunlar arasında yer alır (76). Adacık nakli için donör azlığı nedeniyle embriyonik kök hücreler, indüklenmiş pluripotent kök hücreler, ksenogenik doku ve diğer çeşitli potansiyel kaynaklar ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır (77). Kök hücre replasman tedavileri, adacık nakli gibi sınırlı sayıda olma engelini kaldırır, ancak yine de bağışıklık reddi ile karşı karşıya kalırlar. Adacık naklinde tedarikle ilgili sınırlamaları ele almak için, kadavratik adacıkların yerine geçebilecek insan embriyonik kök hücrelerinden türetilmiş beta hücreleri araştırılmaktadır. Allojenik insan embriyonik kök hücrelerinden türetilen insülin üreten organoidlerin nakli, yakın zamanda faz I ve faz II klinik deneylerine girmiştir. İnsan embriyonik kök hücresi türevli beta hücreleri organoidlerin makrokapsülleme cihazları ve mikrokapsülleme teknolojileriyle bağışıklık koruyucu stratejiler test edilmektedir. Bununla birlikte mezenkimal kök hücrelerinde çalışılmış olup mezenkimal kök hücreleri in vitro fonksiyonel beta hücrelerine farklılaşma yeteneği zayıf olduğu ve in vivo olarak beta hücrelere dönüşemediği bildirilmiştir (78).

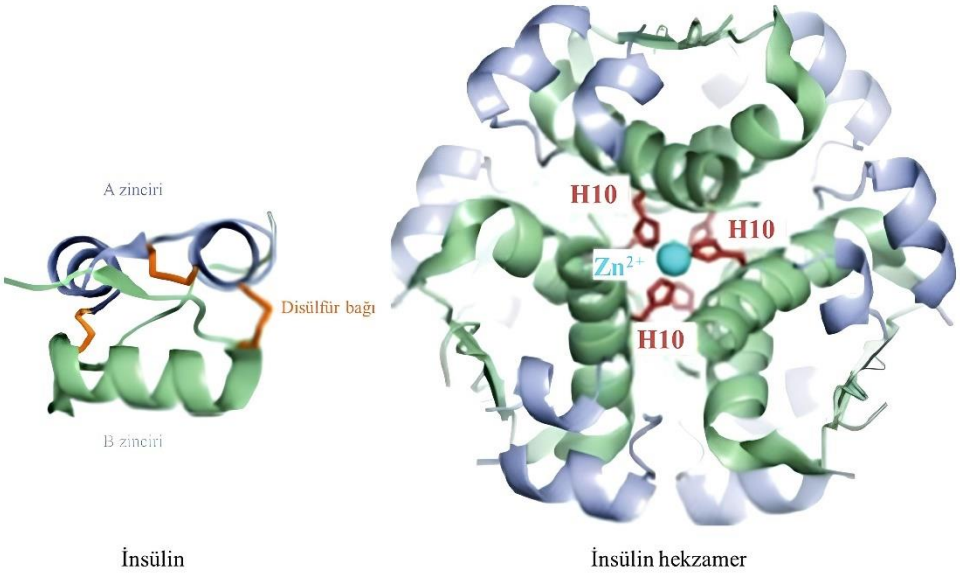
2.1.7. İnsülin Biyosentezi ve Salınımı

2.1.7.1. İnsülin biyosentezi: Pankreas beta hücreleri, normal koşullarda insülin sekresyonu ile kan glukozu düzeyi arasında bir sensor görevi üstlenir. Beta hücreleri, insülin salgılayarak kan glukozunun düzenlemesinde önemli rol oynar (79). İnsülin peptidinin biyosentezi, mRNA'nın preproinsüline çevrilmesiyle başlar. Şekil 2.1'de gösterildiği gibi preproinsülin N-terminalden başlayarak bir sinyal peptidi, ardından B zinciri, bağlantı peptidi (C-peptid) ve C-terminalde A zinciri içeren 110 amino asitlik bir polipeptittir. Preproinsülinin Endoplazmik Retikuluma (ER) translokasyonu ile sinyal peptidi sinyal peptidazı tarafından çıkarılır, böylece preproinsülin proinsüline dönüşür. Daha sonra B ve A zincirleri arasında protein disülfit izomerazlar yardımıyla üç disülfit köprüsü oluşturulur. Proinsülin, ER'den golgi ve trans-golgi ağı yoluyla salgı granüllerine taşınır. Salgı granüllerinde Protein Konvertaz 1/3 (Protein Convertase 1/3; PC1/3) ve Karboksipeptidaz E (Carboxypeptidase E; CPE) enzimleri olgun insülin oluşturmak için dibazik kalıntıları işler. Bu bölümde C-peptid bölünmesi, proinsülinin B ve A zincirlerinden oluşan olgun insüline dönüşmesine yol açar. Olgun insulin hekzamer yapıda beta hücrelerinin salgı granüllerinde depolanır (80).



Şekil 2.1: İnsülinin peptid yapısının biyosentezi (80)

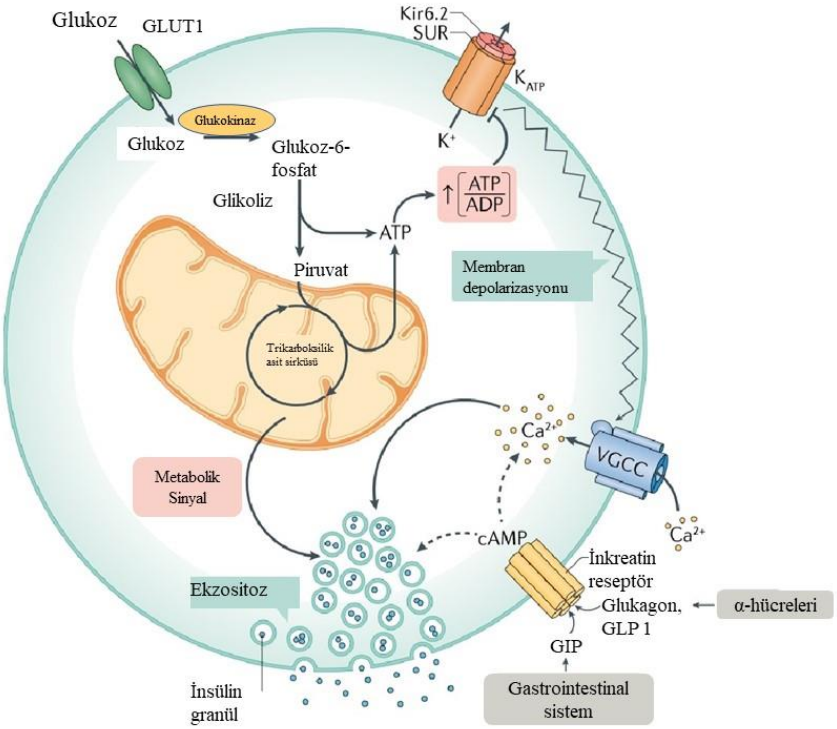
İnsülinin biyolojik aktif formu monomerik olmasına rağmen beta hücrelerinde Şekil 2.2'de gösterildiği gibi kompakt bir hekzamerik yapıda bulunur. Bu yapı çinko iyonlarının stabilize ettiği insülinin depo şeklidir. İnsülin hekzameri, iki çinko iyonu içerir. Hekzamer yapıdaki her bir çinko iyonu, yapıda bulunan üç insülin alt biriminin B zincirinin His10 kalıntısı ile etkileşim kurar. İnsülin heksameri kan dolaşımına ulaştıktan sonra öcelikle dimer ve daha sonra bir monomerik yapıya ayrışır (81).



Şekil 2.2: İnsülin hekzomer yapısı (81)

2.1.7.2. İnsülin salınımı: İnsülin salınımına Şekil 2.3'de gösterildiği gibi glikozla uyarılan bir tetikleme yolu (düz oklar) ve amplifikasyon yolları (kesikli oklar) aracılık eder. Beta hücrelerine glikoz alımı, Glikoz taşıyıcı 1 (Glucose transporter 1; GLUT1) taşıyıcıları aracılığıyla gerçekleşir. Beta hücrelerinde glukoz metabolizmasının hızı glukozun glikolitik yola girişini ve trikarboksilik asit döngüsü yoluyla Adenozin Trifosfat (ATP) oluşumunu belirleyen glukokinaz tarafından kontrol edilir. Glukoz metabolizmasına bağlı ATP/ADP oranın artması ATP'ye duyarlı potasyum kanallarının (K_{ATP}) kapanmasına yol açar. Bu durum beta hücrelerinde membran depolarizasyonuna yol açarak Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanallarının (VGCC) açılmasını sağlar. Bu da hücre içindeki ani kalsiyum artışı insülin salgı granüllerinin ekzositozunu aktive eder (82,83).

Amplifikasyon yolu bu süreci destekler ve hücre içindeki depolama havuzundan da granüllerin hücre yüzeyine taşınmasını sağlayarak daha fazla insülin salınımını tetikler. Amplifikasyon yolu, hücre içi kalsiyumun maksimum seviyelerinde bile aktive edilir ve büyük ölçüde KATP'den bağımsız mekanizmalar tarafından yönlendirilir (82).



Şekil 2.3: Glukoz uyarılı insülin salınımı sinyal yolları (82)

2.2. ÇİNKO

Çinko, hücre bölünmesi, apoptosiz, immün fonksiyonu gibi olaylarda görevli 300'den fazla proteinin kofaktörü ve 1000'den fazla transkripsiyon faktörü olan eser bir elementtir. Bir antioksidan ve antiinflamatuar ajan olup, bağışıklık hücrelerinin ikinci bir habercisi olmasının yanında hücre aracılı bağışıklığı modüle edebilmektedir (8). Vücut ağırlığı 70 kg olan sağlıklı bir insan vücudunda 2-3 g çinko bulunur. Bu çinkonun %99'u hücreler içinde yer alır. Çoğu vücut dokusu 10-200 µg/g konsantrasyonda çinko içerir. Plazmanın toplam çinko içeriği genellikle 100 µg/dL olup, bu değer yaşa, cinsiyete, hamileliğe ve günün saatine göre değişir. Plazmadaki çinko miktarı toplam vücut çinko içeriğinin <%1'ini temsil etmesine rağmen tüm hücrelerin erişebildiği elementin birincil kaynağı olarak işlev görür (84). Sağlıklı bireylerde açlık plazma çinko konsantrasyonları

oldukça dar sınırlar içinde homeostatik olarak yaklaşık 80-100 µg/dL aralığında korunur (85). Yetişkin sağlıklı bir insanda bulunan çinkonun Tablo 2.2'de belirtildiği gibi yaklaşık %49,7'si kas dokusunda, %36,7'si kemikte, %3,4'ü karaciğer, %4,2'si deride ve geri kalan %6'ı diğer dokularda bulunur (86).

Tablo 2.2: İnsan vücudunun doku çinko içeriği (86)

Doku	Ağırlık (g) *	Çinko Kons. (µg/g yaş doku)	Toplam Çinko İçerik (g)	Toplam Vücut Çinko * (%)
Göz	7,5	1,3	<0,01	<0,01
Karaciğer	1500	58	0,09	3,4
Kalp	331	26,5	0,01	0,3
Beyin	1407	11	0,02	0,6
Akciğer	840	16	0,01	0,5
Böbrekler	266	55	0,01	0,6
Bağırsak	2100	15,5	0,03	1,3
Mide	130	13,4	<0,01	0,1
Kemik	9458	100	0,95	36,7
Kas	25100	51	1,28	49,7
Kan plazması	3437	1,25 [µg/mL]	<0,01	0,2
Tüm Kan	5509	6,81 [µg/mL]	0,04	1,5
Saç ve Tırnak	53,8	247	0,01	0,5
Deri	3405	32	0,11	4,2
Dalak	139	14,7	<0,01	0,1
Pankreas	119	33,3	<0,01	0,2
			Σ 2,6	**100**

*****Vücut ağırlığı 60-70 kg bir yetişkin için hesaplanmıştır.

2.2.1. Çinko Absorpsiyonu, Taşınma ve Depolama

Çinko homeostazı eksojen çinko emilimi ve endojen çinkonun gastrointestinal sekresyon ve atılımı ile ağırlıklı olarak gastrointestinal sistem yoluyla sağlanır. Fakat bu süreçlerin vücut çinko havuzlarını modüle edebilmesi sınırlıdır. Bunlarla birlikte diyetle alınan çinkonun miktarı ve şekli, diyet promotörleri (hayvansal protein ve düşük molekül ağırlıklı organik bileşikler), diyet inhibitörleri (fitat ve takviye olarak demir ve kalsiyum) ve fizyolojik durumlar (hamilelik, emzirme, prematüre bebek) çinko emilimini etkilemektedir (87). Sistemik ve hücresel çinko homeostazı, ZIP ve ZnT çinko taşıyıcıları tarafından dikkatlice kontrol edilir. Bu taşıyıcı proteinlerden Zip4, ince bağırsakta çinko emilimindeki vazgeçilmez işlevi nedeniyle birincil derecede önemli taşıyıcıdır. Çinko

eksikliğine yanıt olarak Zip4 protein ekspresyonu jejunum ve duodenumda artmaktadır (88). Diyet ile alınan çinko, ince bağırsak epitel hücrelerinde ZIP4 tarafından alınır ve bazolateral membrana iletilir veya metallotiyoneine bağlanır. Bazolateral membrandan ZNT1 ile portal vene taşınır ve periferik dokulara iletilir (89). Diyet çinko miktarı yetersiz olduğunda, homeostatik denge için endojen çinko kaybında belirgin bir azalma meydana gelir. Vücutta çinko dengesi yeniden sağlanamazsa, çinko havuzları kullanılır. Bu havuzların yeri bilinmemektedir, ancak tüm hücreler muhtemelen metallotiyonine bağlı çinko, golgi ve diğer organellerde depolanan çinko rezervine sahiptir. Plazmada bulunan çinko da yetersiz alımlara karşı çinko havuzunun küçük bir parçasıdır (90).

2.2.2. Çinko Taşıcı Proteinleri ve Metalotiyoninler

Çinko homeostazı, çinko taşıyıcı proteinler olan ZnT (çinko taşıyıcı, SLC30) ve ZiP (Zrt-/Irt-benzeri protein, SLC39) ile metal tamponlayıcı proteinler olan metalotiyonin (MT) protein aileleri tarafından korunur (91). İnsan hücrelerinde ZnT ailesinin 10 üyesi (ZnT1–10) ve Zip ailesinin 14 üyesi vardır (92). Hücre içi serbest ve iyonik çinkonun seviyesi ZİP ve ZnT çinko taşıyıcıları tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir ve düzenlenir (93). ZIP taşıyıcı proteinleri, sitozol çinko konsantrasyonunu hücre dışı ve hücre içi bölmelerden sitozole doğru çinko taşıyarak arttırır. ZnT taşıyıcıları ise tersine bir şekilde çinkoyu sitozolden hücre dışı ve hücre içi bölmelere taşıyarak sitozoldeki çinko konsantrasyonunu azaltır. Hücre içi çinko konsantrasyonları ve fizyolojik durum çinko taşıyıcı proteinlerin ekspresyonu belirler (94). Çinko taşıyıcılarındaki kusurlar, insülin sentezi, olgunlaşması ve salgılanmasındaki anormalliklerle ilişkilendirilmektedir. İnsan pankreas beta hücrelerinde ZnT3, ZnT5, ZnT7, ZnT8, Zip6, Zip7, Zip8 ve Zip14 olarak sekiz çinko taşıyıcının eksprese edildiği bilinmektedir (95). İnsan beta hücrelerinde ZIP6, ZIP7, ZIP9, ZIP13 ve ZIP14'ün çinko regülasyonu ve homeostazı için önemli olduğu bildirilmektedir. Beta hücrelerinin normal fizyolojisi ile çinko konsantrasyonları arasındaki ilişkileri araştırmak için özellikle ZIP6 ve ZIP7 önemli hedeflerdendir (96).

Beta hücrelerinde çinko akışlarının nasıl kontrol edildiğini bilmek, anormal çinko homeostazının diyabet gelişimine katkıda bulunması ve pankreatik β-hücresinin diğer hücre tiplerinden daha yüksek çinko içermesi nedeniyle önemlidir. Çinko taşıyıcı 8 (ZnT8) langerhans'ın pankreas adacıklarında bol miktarda ve spesifik olarak ifade edilir (97). ZnT8, pankreas beta hücrelerinin salgı keseciklerinde lokalize çinko taşıyıcı

proteindir. Bu taşıyıcı protein çinkonun insülin içeren keseciklere doğru taşınmasında önemli rol oynar (98). Çinko takviyesi, beta hücrelerindeki ZnT8 protein ifadesini arttırır (99).

Metalotiyoninler (MT), sistein gruplarından zengin düşük molekül ağırlığına sahip proteinlerdir. Metal iyonlarının homeostazında ve antioksidan mekanizmalarda rol alırlar. İnsanlarda, toplam 11 fonksiyonel MT izoformu için MT2, MT3 ve MT4'e ek olarak sekiz farklı aktif MT1 geni vardır. Bazı MT'ler hücrelere spesifik eksprese olurken, MT1 ve MT2'nin ekspresyonu tüm hücrelerde gerçekleşir. MT gen ekspresyonu pankreas beta hücrelerinde metal maruziyetiyle hücreleri hasara karşı korumak için düzenlenir. Beta hücrelerinde MT1 inhibisyonu GSIS (glikozla uyarılan insülin sekresyonu)'yi güçlendirir ve glukoz toleransını geliştirir, MT1 aşırı ekspresyonunun ise salgılayıcı yanıtı zayıflatır (100). MT'ler çinko ile yüksek afiniteli bağ yaparak hücre içi çinko deposu olarak hizmet ederler. Gerektiği durumlarda hücre içine serbest çinko sağlayarak çinkonun fizyolojik rollerine aracılık ederler. MT ekspresyonu çinko konsantrasyonu artmasıyla indüklenir ve böylece çinko homeostazı korunur (101).

2.2.3. Çinko Durumunun Değerlendirilmesi

Bir popülasyondaki çinko eksikliği riskinin en iyi tahmini ve yüksek riske sahip belirli alt grupları belirlemek için tahmini ortalama gereksinimin (Estimated Average Requirement; EAR) altında çinko alımı olan bireylerin yaygınlığı, düşük serum çinko konsantrasyonları ile beş yaş altı bodur çocukların yüzdesinin birlikte kullanılması önerilmektedir (102). DSÖ/UNICEF/IAEA/INCH kuruluşları bireylerin çinko durumunun değerlendirilmesinde tek biyokimyasal gösterge olarak serum çinko konsantrasyonun değerlendirilmesini önermektedir. Çinko, serumda albümine (%70), a-2-makro-globuline (%18), transferrin ve seruloplazmin proteinlerine bağlı taşınır. Çok küçük bir miktar (%0,01), özellikle histidin ve sistin olmak üzere amino asitlerle kompleks oluşturur. Sağlıklı kişilerde serum çinko konsantrasyonları 78 ila 98 mg/dL arasında korunur (103).

2.2.4. Çinko Gereksinimi

Türkiye Beslenme ve Sağlık Araştırması 2017 verilerine göre toplum genelinde çinko öğesi alım miktarının EAR değerinin altında tüketen bireylerin sıklığı %65,9 iken, EAR seğerinin üstünde tüketenlerin sıklığı %34,1'dir (31).

Türkiye beslenme rehberi 2022 göre cinsiyet ve yaş kategorisine göre önerilen çinko alım miktarları Tablo 2.3'de verilmiştir (104).

Tablo 2.3: Çinko için diyetle alınması önerilen miktar (104)

Yaş	Erkek (mg)	Kadın (mg)	Gebelik (mg)	Emzirme (mg)
7-11 ay*	2,9	2,9		
12-23 ay*	4,3	4,3		
2-3 yıl	4,3	4,3		
4 yıl	5,5	5,5		
5-6 yıl	5,5	5,5		
7-10 yıl	7,4	7,4		
11-14 yıl	10,7	10,7		
15-17 yıl	14,2	11,9		
18+ yıl	9,4-16,3	7,5-12,7	1,6**	2,9**

* Yeterli Alım (AI); **Gebelik ve emziklilik için yetişkin kadın gereksinim değerlerine eklenecek miktar.

2.2.5. Çinko Eksikliği

Çinko, insan vücudunda sentezlenmeyen iki değerlikli bir katyondur ve yeterli düzeyde tutulması için dışarıdan alınması gerekir. Çinko eksikliği, gelişmekte olan bölgelerde yaygın olarak yetersiz beslenmeye bağlı görülürken, gelişmiş bölgelerde yaşlanma ve birçok kronik hastalık ile ilişkilidir. Bireylerde çinko eksikliği, alımın azalması, emilim bozukluğu, metabolik talebin artması veya atımın artmasından kaynaklanabilir. Çinko eksikliği ayrıca kalıtsal olarak bireylerde ortaya çıkabilir (105). Dünya nüfusunun yaklaşık %17,3'ü yetersiz çinko alımından müzdariptir. Yetersiz çinko alımının ülkeye özgü tahmini prevalansı, ulusal gıda arzının toplam enerji, çinko içeriği ve hayvansal kaynaklı gıdalardan elde edilen çinko yüzdesi ile negatif, gıda arzının fitat/çinko molar oranı ile pozitif korelasyon göstermektedir. Beş yaş altındaki çocuklardaki bodurluk yaygınlığı yetersiz çinko alımı yaygınlığı ile yakından ilişkilidir (106).

2.2.6. Çinko Toksisitesi

Çinkonun çevresel birçok kaynağı bulunduğundan toksisitesi sık görülür. Çinko toksisitesine soluma, oral ve dermal olarak üç şekilde maruziyet yol açmaktadır. Genel olarak mesleki sebeplerle solunumuna maruz kalma, besin takviyelerinin aşırı kullanımı,

hatalı hazırlanmış total parenteral beslenme gibi durumlara bağlı toksisite vakaları raporlanmıştır (107). Çinko toksisitesi olan hastalar şelatlayıcı ajanlara, diğer farmakolojik tedavilere, koruyucu akciğer ventilasyonuna, ekstrakorporeal membran oksijenasyonuna ve destekleyici bakıma ihtiyaç duyar (108).

2.2.7. Çinkonun Kaynakları

Ülkemiz coğrafyasında üretilen ve tüketilen işlenmiş-işlenmemiş tarımsal ürünlerin besin ögeleri bileşimlerinin ileri laboratuvar analiz teknikleri ile belirlendiği TürKomp Ulusal Gıda Kompozisyon Veri Tabanı verilerine göre bazı gıdaların çinko içerikleri Tablo 2.4'te verilmiştir (109).

Tablo 2.4: Gıdanın yenilebilir 100 gramının ortalama çinko içeriği (109)

Grup	Çinko (mg /100 g)	Grup	Çinko (mg /100 g)
Süt ve Süt Ürünleri		**Bitkisel Besin Kaynakları**	
Taze kaşar peynir	3,35	Kabak çekirdeği	10,35
Ezine peyniri	2,19	Ayçiçeği çekirdeği	8,11
Van otlu peynir	1,68	Haşhaş tohumu	5,41
Beyaz peynir	1,63	Susam tohumu	5,13
Erzincan tulum peyniri	1,32	Keten tohumu	3,95
Süt (inek)	1,31	Kavrulmuş badem	3,74
Süt (manda)	0,54	Siyez buğday	3,62
Süt (insan)	0,52	Kırmızı mercimek	3,60
		Pırasa	3,47
Et, Balık ve Yumurta		Yer fıstığı	3,18
Dana karaciğer	6,52	Mısır (kuru)	3,17
Keçi eti (but)	4,15	Nohut	3,16
Sığır eti (but)	3,67	Ceviz içi	3,00
Koyun eti (but)	3,13	Buğday	2,81
Yumurta sarısı (tavuk)	2,80	Yeşil mercimek	2,69
Hindi eti, but, derisiz	2,58	Kuru fasulye (dermason)	2,51
Hamsi	1,89	Yulaf	2,31
Piliç eti (but)	1,66	Kavrulmuş fındık	2,00
Bıldırcın yumurtası	1,35	Antep fıstığı	1,40
Alabalık (yetiştirme)	1,19	Bezelye	1,13
Tavuk yumurtası	1,14	Bamya	1,02
Levrek (yetiştirme)	0,54	Pirinç	0,65

2.3. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ ve ANTİOKSİDANLAR

Reaktif oksijen türleri (ROT), yapısında eşleşmemiş elektron çifti ve en az bir oksijen atomu barındıran moleküllerdir. Bununla birlikte süperoksit anyon, hidroksil ve hidroperoksil radikalleri ile singlet oksijen ve serbest nitrojen radikallerinin yapısında oksijen bulunmamasına rağmen ROT olarak gruplandırılırlar (110). ROT'lar hücre içinde metabolik süreçler sonucunda üretilir (111). Bu metabolik süreçlerde rol alan ksantin oksidaz, lipoksijenazlar gibi enzimler normal işlevlerinin sonucu ROT üretimine neden olurlar (112). Çevresel etmenler, yoğun egzersiz, yanlış beslenme modelleri bu üretimi arttırır. Normal fizyolojik koşullarda vücutta ROT üretimi ile giderilmesi arasında bir istikrar vardır (110). Vücutta yüksek ROT konsantrasyonlarına uzun süre maruz kalmak proteinlerde, lipidlerde ve nükleik asitlerde spesifik olmayan hasara yol açabilirken, düşük-orta düzeyde ROT konsantrasyonlarına maruz kalmak hücre sinyal kaskadlarının düzenlenmesi için gereklidir (113).

İnsan vücudu, ROT'ların oluşturduğu oksidatif hasara karşı hücreleri korumak için güçlü bir antioksidan sistemine sahiptir (111). Antioksidanlar kararlı moleküller olarak saldırgan serbest radikale bir elektron vererek nötralize eder ve böylece hasar verme kapasitesini azaltır. Antioksidanlar, radikal süpürücü, hidrojen veya elektron verici, peroksit parçalıyıcı, tekli oksijen sönümleyici, enzim inhibitörü, sinerjist ve metal şelatlayıcı ajanlar olarak işlev görürler (114). Tokoferoller, askorbik asit, karotenoidler, flavonoidler, amino asitler gibi gıdalarda bulunan doğal antioksidanlar ile glutatyon (GSH), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz (CAT) gibi antioksidan enzimler ROT kaynaklı oksidatif strese karşı koyar (111,112). Vücudun antioksidan savunma sistemlerinde önemli rol oynayan antioksidanlar ve temel fonsiyonları Tablo 2.5'te verilmiştir (115).

Tablo 2.5: Antioksidanlar ve temel fonksiyonları (115)

Ana Antioksidanlar	**Temel fonksiyonları**
Enzimatik antioksidanlar	
SOD	$2O_2^{\cdot -} + 2H^+ \leftrightarrow O_2 + H_2O_2$ katalizler
CAT	$H_2O_2 \rightarrow O_2 + H_2O$ katalizler
GPx	H_2O_2 ve lipid hidroperoksitlerin parçalanmasını H_2O ve lipid alkolüne katalizler
Vitamin antioksidanlar	
Vitamin C	Serbest radikalleri temizler
Vitamin E	Zarların lipid peroksit radikallerini temizler
Vitamin D	Antioxidantların düzeyini ayarlar
Vitamin B_9	NOX4/Vav2/NLRP3 sinyalini engeller
Diğer antioksidanlar	
GSH	Serbest radikalleri temizler
CoQ10	Mitokondriyal disfonksiyonunu düzeltir
NAC	Glutatyon düzeyini düşürür
LA	Pirüvat dehidrogenaz kompleksi için kofaktördür
İz elementler	Redoks döngü reaksiyonlarına dahil olurlar

SOD, süperoksit dismutaz; CAT, katalaz; GPx, glutatyon peroksidaz; NOX4, nikotinamid adenin nükleotid fosfat oksidaz 4; NLRP3, nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon alanı-, lösin zengin tekrarlayan alan ve pyrin alanı içeren 3; CoQ10, koenzim Q10; NAC, N-asetilsistein; LA, lipoik asit.

2.4. ÇİNKO, REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ VE DİABETES MELLİTUS

Çinko, beta hücrelerinde insülinin doğru işlenmesi, depolanması, salgılanması ve faaliyeti için gereklidir. İnsülin, beta hücrelerinin salgı granüllerinde depolanır. Salgı granüllerde iki çinko iyonu, altı insülin monomerini koordine ederek olgunlaşmış insülin kristallerinin dayandığı heksamerik yapıyı oluşturur. Yoğun çinko konsantrasyonu çekirdek granülünün iç kısmında milimolar seviyelere ulaşır (10). İnsülin granüllerinde yaklaşık 20 mM konsantrasyonunda çinko olduğu ve glukozla uyarılan insülin sekresyonundan sonra hücreler arası sıvıda çinko konsantrasyonun 400-500 µM aralığına yükseldiği gösterilmiştir (116). Glukoz, çinkonun sitozolik konsantrasyonunda artışlara neden olur, bu da daha sonra insülinin işlenmesini ve/veya depolanmasını ve çinko ile kristalleşmesini kolaylaştırır. Sürekli hiperglisemiye bağlı sitozolik çinko oranındaki kronik artış, beta hücrelerinde fonksiyon bozukluğuna ve beta hücre ölümüne yol açabilir (11).

Beta hücre kaybında ROT'lar önemli rol oynar (12). Reaktif oksijen türlerinin hem eksojen hem de endojen faktörler nedeniyle hücre içinde biriktiği bilinmektedir. Bu reaktif türleri normal fizyolojik koşullarda hücrelerin antioksidan savunma sistemleri

tarafından bir denge durumunda tutulur. Ancak oksidanlar lehine bir dengesizlik olduğunda oksidatif stres olarak tanımlanan bir durum ortaya çıkmaktadır. ROT'lar protein, lipit ve DNA gibi tüm biyomoleküllerde oksidatif hasar oluşturarak oksidatif stres kaynaklı hücresel apoptozise yol açabilmektedir (117). Hücresel apoptozisin erken evrelerinde mitokondriyal yapı ve işlevinde değişikler ortaya çıkmaktadır (118). Beta hücre mitokondrilerinde metabolik süreçlerin bir sonucu olarak üretilen ROT'lar, bazı stres tepki yolunu aktive edebilir.

Reaktif oksijen türleri mitokondriyal memebran proteini olan UCP2 (Uncoupling Protein 2)'yi aktive ederek beta hücresinde ATP sentezinin ve içeriğinin azalmasına yol açar. Ayrıca mitokondriyal fosfolipitlerdeki çoklu doymamış yağ asitlerini oksitleyerek zar bütünlüğünü bozar. Bu değişikler mitokondriyal yapıyı ve işlevi etkilemekte, beta hücre kayıplarına yol açmaktadır (13). Kompleks I, III ve IV tarafından üretilen mitokondriyal membran potansiyeli (ΔΨm), hücresel sağlığın ve canlılığın korunması için gerekli olup oksidatif fosforilasyon sırasında önemli rolü bulunur. Mitokondriyal membran potansiyelinde sınırlı dalgalanmalar olmasına rağmen hücredeki ΔΨm ve ATP seviyeleri nispeten sabit tutulur. Mitokondriyal membran potansiyelinin normal seviyelere kıyasla düşüşü veya yükselişi istenmeyen hücre kaybına neden olabilir (119). Serbest reaktif oksijen türlerinin yarattığı hasarlar mitokondriyal membran potansiyeli kaybına ve sonuç olarak apoptozise yol açabilmektedir (14). Diyabetik bireylerden alınan pankreas beta hücrelerinde ΔΨm değişiklikliği ile glukoza yanıt olarak insülin sekresyonunun azaldığı bildirilmiştir (120). Cu, Zn-süperoksit dismutaz 1 (SOD1), glutatyon peroksidaz 1 (GPx1) ve katalaz (CAT) enzimlerini düşük bir kapasitede içeren pankreas adacıklarında GPx1 ve SOD enzimlerinn baskılanmasıyla beta hücre kütlesinin ve serum insülin düzeyinin azaldığı bildirilmiştir (15). Beta hücrelerin antioksidan kapasitesinin düşük olması onları oksidatif hasara karşı savunmasız hale getirmektedir. Randomize kontrollü bir çalışmada 3 ay boyunca yüksek dozda A ve E vitaminine ek olarak çinko takviyesinin tip 2 diyabetli yetişkin bireylerde glisemik kontrolü, beta hücre fonksiyonunu ve insülin sekresyonunu geliştirebileceği bildirilmiştir (121). Dahası, çinko takviyesinin serum toplam antioksidan kapasitesini ve glutatyon düzeyini önemli ölçüde artırdığı saptanmıştır. Oksidatif strese bağlı hastalıklarda çinko desteği kullanılması önerilir (16). Reaktif oksijen türlerinin etkileri birkaç antioksidan sistemle dengelenebilir. Bunlardan biri de çinko iyonları tarafından indüklenen sitozolik proteinler olan metalotiyoninlerdir. Yapılan bir çalışmada çinko ile zenginleştirilmiş içme suyunun

farelerin pankreas adacıklarında metalotiyonin üretimini önemli ölçüde artırdığı ve düşük doz streptozotosin ile indüklenen diyabeti önlediği saptanmıştır (122).

Tip 1 diyabetli hastalarda pankreas adacık hücre nakli umut verici bir tedavidir. Adacık izolasyonundan kısa bir süre sonra ve transplantasyonun ilk birkaç günü içinde nakledilen adacıkların apoptozu gibi birçok faktör beta hücrelerinin yaklaşık %60'ında fonksiyonel kayba yol açmaktadır. Bu kaybın yarısı hücre naklinin ilk üç günü içinde gerçekleşir. Beta hücrelerini apoptoza yatkın hale getiren veya buna karşı koruyan faktörleri ve nedenleri anlamak uzun vadede tedavinin başarılı olabilmesi için şarttır (123,124). Yapılan son çalışmalarda çinkonun bu yönden katkı sağlayabileceği gösterilmiştir. Bu konuda Okamato ve ark.'nın yaptıkları çalışmada, diyabetli sıçanlara intraportal adacık nakli sonrası yüksek çinko diyeti uygulanmasının kontrol grubuna göre kan glukozu kontrolünü geliştirdiği ve çinko açısından zengin bir ortamın nakil edilmiş adacık sağ kalım oranını arttırdığını saptanmıştır. Çinko desteğinin intraportal adacık transplantasyonunun klinik sonuçlarını iyileştirmenin basit bir yolu olabileceği düşünülmüştür (125). Bunlara ek olarak donör sıçanlarda çinko desteğinin adacık nakli sonuçları üzerindeki etkilerinin incelendiği bir başka çalışmada, yüksek çinko diyeti tüketen donör sıçanlardan bağış alan sıçan grubunda diğer gruplara göre serum ve pankreas çinko seviyelerinin anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca adacık nakli yapıldıktan iki gün sonra diğer gruptaki sıçanlara göre kan glukozu seviyesinin referans aralığında korunduğu bildirilmiştir (126).

2.5. HASARLA İLİŞKİLİ MOLEKÜLER ÖRÜNTÜLER

Hasarla İlişkili Moleküler Örüntüler (Damage-Associated Molecular Pattern, DAMP), hasarlı veya ölmekte olan hücreler tarafından üretilen veya salınan endojen tehlike molekülleridir. Bu moleküller Örüntü Tanıma Reseptörlerinin (Pattern Recognition Receptor; PRR) bir ligandı olarak doğuştan gelen bağışıklık sistemini uyarır. DAMP'lar, organizmanın savunmasına katkıda bulunurken aynı zamanda patolojik inflamatuar yanıtları da teşvik etmektedir (127).

DAMP'lar, hücre içinde fizyolojik bir role sahip olan, ancak hücre dışı ortama salgılandıklarında ek fonksiyonlar kazanan örüntülerdir. Hücre dışına salgılandıklarında vücuttaki potansiyel tehlikeyi işaret eder, inflamatuar tepkiyi uyarır ve rejenerasyon sürecini teşvik eder (128). HMGB1, Hücre Dışı Soğukla İndüklenebilir RNA Bağlayıcı Protein (extracellular Cold-İnducible RNA-Binding Protein, eCIRP), histonlar, Isı Şoku

Proteinleri (Heat Shock Proteins, HSP), hücre dışı RNA'lar ve hücresiz DNA'lar hücrelerden salınan özgül DAMP'lar arasında yer alır. Nekroz veya nekroptoza bağlı oluşan membrane hasarında pasif olarak DAMP'lar salınır. Bununla birlikte DAMP salınımına apoptoz, piroptoz, ferroptoz ve NETosis gibi hücre ölümü türleri de neden olabilir. Bazı DAMP'lar, canlı hücrelerden sekretuar lizozomların veya eksozomların eksitositozuyla ve ayrıca hücre yüzeyindeki kanal gözeneklerinin aktifleştirilmesi yoluyla aktif bir şekilde dışarıya taşınabilir (129). DAMP'lerin inflamasyondaki roller nedeniyle inflamatuar hastalıkların klinik yönetiminde bu örüntülerin baskılanmasının umut verici bir strateji yaklaşımı olarak kabul edilmektedir. Histonlar, Genomik DNA, HMGB1, HSP'ler, F-aktin, Siklofilin A, S100'ler, mitokondriyal DNA, mitokondriyal transkripsiyon faktörü A gibi birçok DAMP üyesi tanımlanmış olup bunların sağlık ve hastalıktaki rolleri kısmen anlaşılmıştır (128).

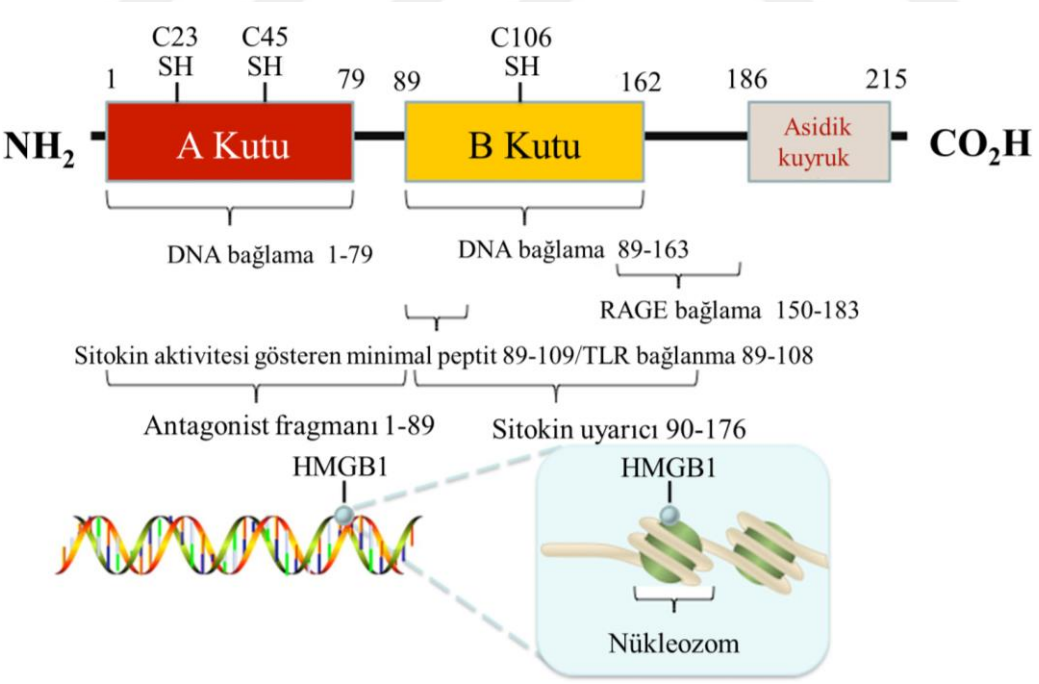
2.6. YÜKSEK HAREKETLİ GRUP AİLESİ PROTEİNLERİ

Yüksek Hareketli Grup (High Mobility Group, HMG) proteinlerinin memelilerde HMGA, HMGB ve HMGN olarak üç ailesi bulunmaktadır. HMG aileleri embriyonik gelişim evrelerinde, transkripsiyonun düzenlenmesi ve DNA onarımının yönetilmesi gibi yaygın gerçekleşen biyolojik süreçlerde rol alır. HMGA, HMGB ve HMGN aileleri birbirinden farklıdır. Bu ailelerin DNA'ya bağlama motifleri, etkiledikleri substratlar ve bu substratlarda oluşturdukları hücresel süreçler farklıdır (130). Bu ailelerden HMGN'ler kromatinlere değişken ve geri dönüşlü olarak bağlanırken HMGA'lar transkripsiyon faktörleri ve kofaktörlerin multiprotein komplekslerine bağlınır. Diğer taraftan HMGB''ler ise nükleozomlara ve transkripsiyon faktörlerine bağlanır. HMG'lerin aktif veya inaktif kromatin bölgelerini oluşturmada genomun genel işlevleri ve sınırlı sayıda gen üzerinde özgül kontrol işlevleri bulunmaktadır. HMG'ler, kromatin bağlama bölgeleri için histon H1 ile rekabet eder ve kromatinin dinamiklerini etkiler. HMG-H1-nükleozom etkileşim ağı, kromatin yapısına esneklik ve daha önemlisi hızlı çevresel değişikliklere yanıt olarak gen transkripsiyonunu sağlayabilirler (131).

2.6.1. Yüksek Hareketli Grup Protein 1

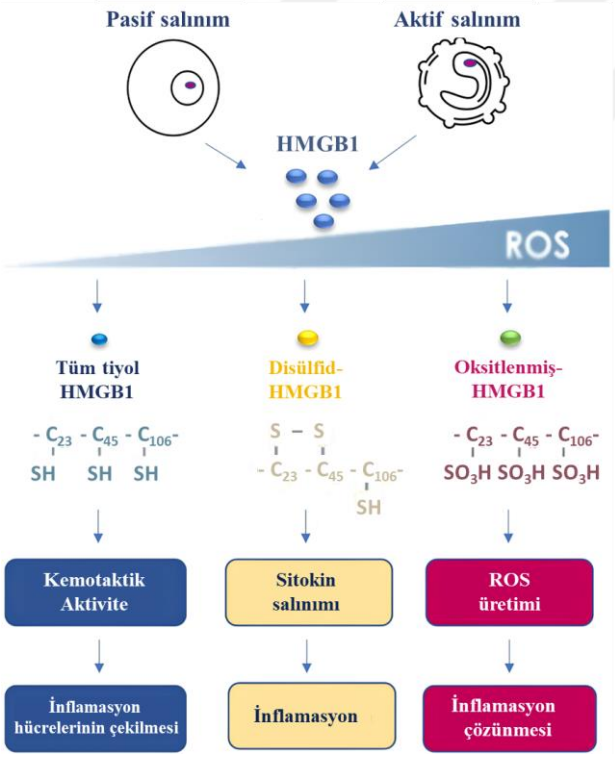
Yüksek hareketli grup proteinleri arasında en yaygın görülen ve üzerinde en çok çalışılan proteinler HMGB ailesine ait proteinlerdir (132). HMGB'ler DNA şaperonu olarak kromatindeki çeşitli süreçlerde görev yapmaktadır. Bu süreçler arasında

transkripsiyon, replikasyon, rekombinasyon, DNA onarımı ve genomik stabilite yer alır. HMGB ailesinin HMGB1-4 olmak üzere dört üyesi olup, hepsinin yapısında iki HMG kutu içerir. Yapılarında asidik kuyruk bulunma veya uzunluğuna göre DNA etkileşimi ve fonksiyonları bakımından birbirinden farklılık gösterir (133). Yüksek Hareketli Grup Protein 1 (HMGB1), Şekil 2.4'te gösterildiği gibi yapısal olarak 215 amino asitlik 30 kilodalton (kDa) molekül ağırlığında bir proteindir (134). HMGB1 proteini, kutu A (Box A) ve kutu B (Box B) olarak adlandırılan iki pozitif yüklü DNA bağlama alanı ve 30 tekrarlı glutamik ile aspartik asit kalıntısı içeren negatif yüklü bir C-terminal alanından oluşur. Kutu A, HMGB1 proteinin antiinflamatuar aktivitesinden sorumludur. Kutu B ise proinflamatuar aktivite, göç arttırıcı ve hücre farklılaştırma aktivitesi yanında RAGE için bir bağlanma bölgesi taşır. Oksidatif stres yanıtında HMGB1 fonksiyonunu düzenleyen üç redoks-duyarlı sistein kalıntısı 23, 45 ve 106 konumlarda bulunmaktadır. HMGB1'in nükleozomlarla gevşek ve geçici olarak etkileşimde olması nükleus içinde uzamsal ayrımı düzenlemek ve nükleer homeostazı sağlamak için önemlidir (135,136).



Şekil 2.4: HMGB1 proteinin yapısı (136)

Yüksek Hareketli Grup Protein 1 proteininin indirgenmiş, disülfür bağı oluşturmuş ve oksitlenmiş olarak üç yapısal düzenlemesi (post-translasyonel değişim) bulunmaktadır. HMGB1, hücre dışı boşluğa salındığında başlangıçta tamamen indirgenmiş bir durumdadır, ancak oksidatif ortamla beraber disülfid-HMGB1 haline gelerek bir inflamatuar faktör olarak işlev görmeye başlar. HMGB1, lökosit kaynaklı büyük miktarda ROT'a maruz kaldığında ise sülfonatlanmaktadır (137). HMGB1'in 23, 45 ve 106'ıncı pozisyonlarında korunmuş üç sistein (C) bulundurur. HMGB1 yapısında C23 ve C45 pozisyonlarındaki sistein grupları arasında disülfür bağı kurulabiliyorken, C106 pozisyonundaki düşük tiyol (sülfür içeren grup) konformasyon korunmaktadır. HMGB1'in tüm-tiyol-HMGB1, disülfür-HMGB1 ve oksitlenmiş HMGB1 redoks durumları sistein tarafından oluşturulur. HMGB1'in her redoks durumunun Şekil 2.5'te gösterildiği gibi farklı bir işlevi vardır (138).



Şekil 2.5: HMGB1'nin üç redoks formu ve işlevleri (138)

2.6.2. Yüksek Hareketli Grup Protein 1'in İşlevleri

Yüksek hareketli grup protein 1, tüm hücre tiplerinde bulunan yüksek oranda korunmuş, hücrelerin hem içinde hem de dışında işlev gören çok yönlü bir nükleer

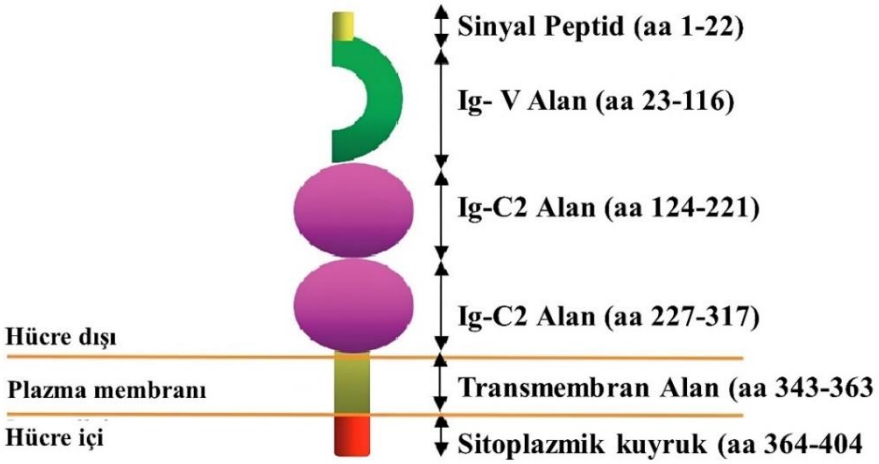
proteindir (17). HMGB1'in işlevini ve aktivitesini post-translasyonel modifikasyonları (sisteinlerin asetilasyonu, fosforilasyonu, metilasyonu ve redoks durumu), hücredeki konumu (çekirdek, sitoplazma, hücre dışı) ve belirli hücre, doku ve organlardaki etkileri belirler (139). HMGB1, normal koşullarda çekirdek içinde yoğun miktarda bulunur ve çekirdeğe bağlanır. HMGB1, kromatini bağlar ve hücrede oluşan hasar sinyalleriyle birlikte sitozele doğru salınır. HMGB1'in nükleer konsantrasyonun sitoplazmaya oranı yaklaşık 1/30 civarındadır. HMGB1, DNA'ya A ve B kutuları aracılığıyla genel olarak bağlanarak moleküler bir şaperon işlevselliğini kazanır. Bu durumda nükleozom yapısının dengesinden, gen transkripsiyonu ve kromatin düzenlenmesinde rol oynar (138,140). DNA şaperonu olarak DNA replikasyonu, rekombinasyonu, transkripsiyonu ve onarımına katılır (141).

HMGB1'in çeşitli stres faktörlerini (sitokin, kemokin, ısı, hipoksi, H2O2 ve onkogen vb.) takiben çekirdekten sitozole yer değiştirmektedir (142). Sitoplazmik HMGB1, beta hücre otofajisi/apoptoz kontrol noktası olarak işlev görebilir. Fakat hücre içi HMGB1 fonksiyonlarının daha derin bir şekilde anlaşılmasına yönelik çalışmalar yetersizdir. Bu nedenle hücre içi HMGB1 biyolojisini düzenlemeye yönelik terapötik müdahaleleri değerlendirmek için gelecekteki çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (143,144). Hücre dışı HMGB1, bir dizi hücresel işlemi düzenleyen sitokin ve kemokin aktiviteleri ile bir DAMP görevi görür (142). HMGB1'in doku hasarıyla ve/veya doku onarımı ve rejenerasyonuyla da ilişkili olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle HMGB1'in kesin etki mekanizması ve terapötik potansiyeli hala tam olarak aydınlatılamamıştır (145).

2.6.3. Hücre Dışı Yüksek Hareketli Grup Protein 1 Reseptörleri ve Etkileşimleri

Örüntü tanıma reseptörleri doğuştan gelen bağışıklık sisteminin önemli bileşenleridir. HMGB1'in tanıyan PPR'nin alt aileleri arasında TLR1-9 ve RAGE yer almaktadır (127). Hücre dışına salgılanan HMGB1, inflamatuar ve ağrı sinyallerini yaymak için RAGE, TLR-2, TLR-4, TLR-9, syndecan-1 ve Mac-1 gibi hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanarak etki eder (25). HMGB1'in proinflamatuar sinyali esas olarak RAGE ve TLR'ler tarafından iletilir. İlk yapılan çalışmalarda HMGB1'in sadece RAGE resöptörüne bağlanabileceği belirlenmiştir. Fakat sonraki çalışmalarda HMGB1'in TLR'lerle üzerinde inflamasyonu artttırabileceği kanıtlanmıştır (146).

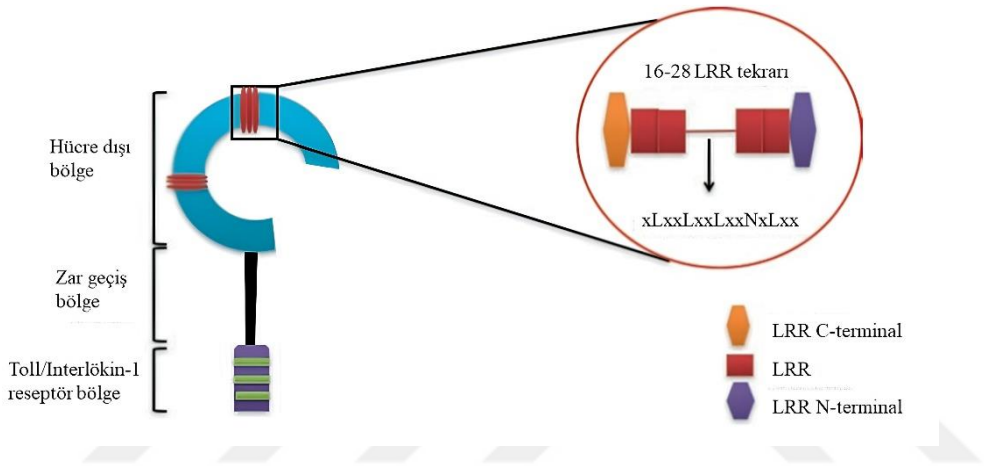
2.6.3.1. İleri glikasyon son ürünleri reseptörü: İleri glikasyon son ürünleri için reseptör, immünoglobulin super ailesinin çok ligandlı bir transmembran reseptörüdür. RAGE (Şekil 2.6), hücre dışı alan (aa 1-342), bir sinyal peptidi (aa 1-22) ve bunu takiben üç immunoglobulin benzeri alan (Ig benzeri V tipi alan), transmembran alan (aa 343-363) ve kısa bir sitoplazmik kuyruğu (aa 364-404) olarak bir dizi farklı protein alanından oluşur (147).



Şekil 2.6: İleri glikasyon son ürünleri için reseptörün şematik gösterimi (147)

İleri glikasyon son ürünleri reseptörü, Gelişmiş Glikasyon Son Ürünleri (Advanced Glycation End Products; AGE), HMGB1, S100'ler ve DNA olmak üzere bir dizi DAMP molekülüne bağlanır ve hücresel tepkiye aracılık eder. RAGE ayrıca bakteriyel endotoksin, solunum virüsleri ve mikrobiyal DNA dahil olmak üzere Patojenle İlişkili Moleküler Örüntü (Pathojen-Associated Molecular Patterns, PAMP'ler) moleküllerinin doğuştan gelen bir bağışıklık sensörü olarak işlev görebilir (148). RAGE ve ligandları, p38 MAPK, Hücre Dışı Sinyalle Düzenlenen Kinaz 1/2 (ERK1/2), Cdc42/Rac ve c-Jun N-Terminal Kinaz (JNK) aktivasyonlarını uyarır ve geniş bir hastalık yelpazesinde (diyabet, inflamatuar, kanser vb.) yer alan çeşitli sinyal olaylarının kaskadlarını tetikler. Kanser ve kronik inflamatuar hastalıkların tedavisinde RAGE ve ona bağlı ligandların baskılanması önemli bir strateji olarak görülmektedir (149).

2.6.3.2. Toll benzeri reseptörler: Toll Benzeri Reseptörler (TLR), genel olarak PAMP'ler olarak adlandırılan bir dizi mikrobiyal ürüne bağlanan ana örüntü tanıma reseptörleri olan tip I transmembran proteinlerin bir ailesidir (150). TLR'ler, doğuştan gelen bağışıklık tepkilere bağlı NF-κB ve İnterferon Düzenleyici Faktörlerin (IRF) transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna yol açar. TLR sinyallemesinin negatif düzenleyicileri otoimmün ve inflamatuar hastalıkları önlemedeki önemi bilinmektedir (151).



Şekil 2.7: TLR yapısının şematik gösterimi (152)

Toll benzeri reseptör (Şekil 2.7), PAMP'ler için ana tanıma alanları olan Lösin Tekrarlamalı Alanlar (LRR) oluşan bir hücre dışı bölge, zar geçiş bölge ve hücre içi Toll-İnterlökin-1 Reseptörü (TIR) olarak üç alandan oluşur. TLR'in hücre dışı bölgesinde at nalı şeklinde yapıları oluşturan 19-25 LRR içerir. TLR'deki LRR bölgesi, zar geçiş bölgeden 'LRR karboksiterminal alanı (LRR CT)' adı verilen bir bölgeyle ayrılmıştır. Genel olarak, hücre dışı bölgeler, ligand bağlanması ve aktivasyonunda önemli olan düzlemsel bir yapıya sahiptir. TLR'lerin transmembran bölgesi reseptörü sabitleme işlevi görür ve ayrıca oligomerizasyonda çok önemli bir rol oynar. TIR alanının dimerizasyonu, TLR'lerin işlev görmesi için bir ön koşuldur ve bu da transmembran bölge tarafından başlatılır (152,153). İnsanlarda 10 tane işlevsel TLR tanımlanmıştır. Bunlardan TLR1, TLR2, TLR4, TLR 5 ve TLR6 plazma zarında bulunur ve hücre dışı ligandları tanır (150). HMGB1'in TLR üyelerinden TLR2, TLR4 ve TLR9 ile etkileşime girmektedir. HMGB1, bu üç TLR aracılığıyla sinyal verir ve NF-κB ve IRF yollarını aktive etmek için Miyeloid Farklılaşma Faktörü 88 (Myeloid Differentiation Factor 88; MyD88) bağımlı yolu aktive

eder (146,154-156). TLR4 beta hücreleri üzerinde ana reseptördür ve HMGB1'in tip 1 diyabet gelişimi sırasında beta hücrelerine seçici olarak hasar vermek için TLR4 aracılığıyla sinyal vermektedir (157). TLR sinyal yollarının sonucunda transkripsiyon faktörü NF-κB aktivasyonu gerçekleşir. NF-κB aktivasyonun gerçekleşebilmesi için IkappaB kinaz alfa ve beta tarafından tetiklenen inhibitör kappaB (IkappaB) proteinlerinin fosforilasyonunu ve bozunmasını gerektirir. Ayrıca, birkaç TLR, antiviral doğuştan gelen bağışıklık tepkilerini ortaya çıkaran IKK ile ilişkili kinazlar TBK1 [TRAF ailesi üyesi ile ilişkili NF-kappaB aktivatörü (TANK) bağlayıcı kinaz-1] ve IKK'yı içeren alternatif yolları aktive eder (158). İnsanlarda TLR'leri aşağı akış kinazlara bağlayan MyD88, Mal (TIR alanı içeren adaptör protein), TRIF (Toll–interlökin-1 reseptör alanı içeren interferon-β indüksiyonunu sağlayan adaptör) veya TICAM-1 (TIR içeren adaptör molekül-1), TRAM (Trif ile ilişkili adaptör molekül) ve SARM (Steril α ve HEAT–Armadillo motifleri) olarak beş adaptör molekül bulunmaktadır (159).

Toll benzeri reseptörler ligandları ile stimülasyon, TLR'lerin homo- veya heterodimerlerinin oluşumunu indükler. MyD88, bazı TLR'lerin 'aşağı akış' sinyalini vermek için gereklidir. TLR'lerin homo/heterodimer yapısı MyD88 etkiler, MyD88, IL-1R ile ilişkili kinaz (IRAK) ailesinin üyeleriyle etkileşime girer. MyD88'den ayrılan IRAK, Tümör Nekroz Faktörü (TNF) reseptörü ile ilişkili faktör 6 (TRAF6)'ya bağlanır. TRAF6 ise kendisi ve transkripsiyon faktörü NF-κB modülatörü NEMO üzerinde "Lys63'e bağlı poliubikuitin zinciri" oluşumunu katalize eder. Bu zincir diğer sinyal moleküllerini TRAF6 ve NEMO'ya bağlanmasını sağlar. Transforming Büyüme Faktörü-B-Aktive Kinaz 1 (TAK1) TRAF6'ya katılır ve ardından IκB kinaz-β (IKKβ) ve mitojenle aktive olan protein kinaz kinaz 6'yı fosforile eder. Daha sonra, IKKα, IKKβ ve NEMO'dan oluşan IKK kompleksi oluşur. Bu fosforilasyonlar, diğer sinyal yollarını etkinleştirir ve bağışıklık yanıtlarının devamını sağlar. NF-κB, sitoplazmada tutulduğu bazal hücrelerinde IκB'ye bağladır. IκB'nin IKK kompleksi tarafından fosforilasyonu, ubikuitin-proteazom sistemi tarafından IκB'nin bozulmasına yol açar ve NF-κB'yi, proinflamatuar sitokinleri kodlayan genlerin ekspresyonunu aktive ettiği çekirdeğe yer değiştirmesi için serbest bırakır (160).

2.6.4. YÜKSEK HAREKETLİ GRUP PROTEİN 1 ve DİABETES MELLİTUS

Tip 1 ve tip 2 diyabet patofizyolojisi ve ilişkili metabolik bozukluklarda inflamasyonun artması, bu hastalıkların önlenmesi ve kontrolü için inflamasyon yollarını hedef haline getirmiştir (18). HMGB1'in kan ve dokudaki seviyelerinin birçok inflamatuar ve otoimmün hastalıkta yükseldiği ve bu hastalıkların yeni tedavilerinde hedef molekül olabileceği bildirilmektedir (19). Bir çalışmada tip 1 diyabetli çocuklarda serum HMGB1 seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu ve tip 1 diyabetli çocuklarda inflamasyon belirteci olarak yüksek HMGB1 seviyesinin kullanılabileceği belirtilmiştir (20). HMGB1'in tip 1 diyabet patogenezindeki rolünün anlaşılmasıyla hastalığın nedenlerinin ortaya çıkarılmasının yanında hastalığın önlenmesi veya müdahalesi için yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesine katkı sağlayabilir (161). Glisirizik asit, resveratrol, niaspan gibi moleküllerin HMGB1 sinyallemesini zayıflatabileceği ve bu durumun yeni tedavi stratejilerini mümkün kılabileceği öne sürülmektedir (162). HMGB1'in otoimmün diyabetin patogenezine katkıda bulunduğu kabul edilmiştir, ancak tip 1 diyabetin başlaması ve ilerlemesi üzerindeki kesin etkisi ve ilgili moleküler mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu konuda Zhang ve ark.'nın yaptıkları çalışmada HMGB1'in RAGE ve TLR-4 reseptörleri üzerinden fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) – Akt – rapamisin (mTOR) sinyallemesini güçlendirerek düzenleyici T hücrelerinin (Treg) stabilitesini ve işlevselliğini bozduğu, bu da Treg kararsızlığına bağlı otoimmün hastalığın gelişmesine yol açabileceği gösterilmiştir. Tip 1 diyabet durumunda otoimmünitenin başlamasını, ilerlemesini ve nüksetmesini önlemek için HMGB1 baskılanmasının etkili bir tedavi olabileceği bildirilmiştir (35). Han ve ark. (163) otoimmün yanıtın HMGB1 düzenlemesinin altında yatan mekanizmaları araştırdıkları çalışmada 8 ve 12 haftalık obez olmayan diyabetik (NOD) fareleri 25 haftalık olana kadar, haftada bir HMGB1 nötralize edici antikor ile tedavi ederek incelemişlerdir. Çalışmada, otoimmünite sırasında HMGB1'in hasarlı pankreas beta hücrelerinden pasif olarak salgılanırken, adacık hücrelerine sızan bağışıklık hücreleri tarafından aktif olarak salgılandığı gözlemlenmiştir. Hücre dışı HMGB1'in farelerde dendritik hücre olgunlaşmasını ve makrofaj aktivasyonunu uyarmada güçlü olduğu, ayrıca HMGB1 blokajının hem 8 hem de 12 haftalık NOD farelerinde pankreas adacık inflamasyonunun ilerlemesini ve diyabet gelişimini önemli ölçüde inhibe ettiği rapor edilmiştir. Benzer şekilde Li ve ark. (157) insanlarda tip 1 diyabet için bir model olan

NOD farelerin izole adacıklarında HMGB1 ile reseptörleri arasındaki ilişkiyi tanımlayan araştırmalarında TLR4'ün beta hücrelerinde ana reseptör olduğunu bildirmişlerdir. Ek olarak hasarlı adacık hücrelerinden HMGB1'in pasif olarak salındığını ve diyabetin erken aşamalarında alfa hücrelerinden ziyade beta hücrelerine seçici olarak zarar vermek için TLR4 aracılığıyla etki ettiğini tespit etmişlerdir.

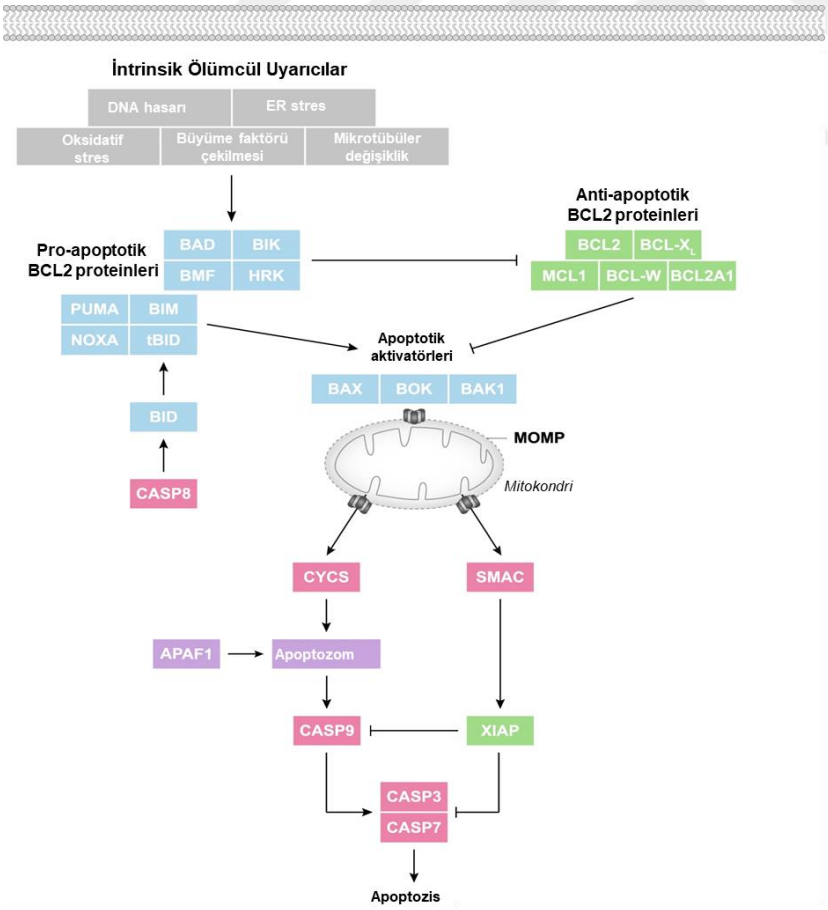
Yüksek hareketli grup protein 1, TLR4'e bağlanarak JNK/p38 Mitojen Aktive Edici Protein Kinaz (p38 MAPK) aktivasyonunu indükler, bu da insülin reseptörü üzerinden insülin direncine yol açabilir (164). HMGB1'in in vivo ve in vitro çalışmalarda glukoz tarafından önemli ölçüde teşvik edildiği, bunun da HMGB1'in NF-κB sinyal yolunu aktive ederek proinflamatuar sitokinleri arttırdığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada HMGB1 inhibisyonu stratejisi ile NF-κB sinyal yolu inhibe edilmiş ve proinflamatuar sitokinler azaltılmıştır (165). Tip 1 diyabetli hastaların tedavisinde beta hücre transplantasyonu önemli bir tedavi yöntemidir. HMGB1'in nakledilen adacık hücreleri tarafından pasif olarak salınmakta, bu da erken dönem adacık kaybına neden olmaktadır. Adacık nakli sonrası HMGB1'in baskılanmasıyla adacık kaybı önlenmektedir. Ayrıca HMGB1 reseptörlerinden TLR2, RAGE ve TLR4 adacık kaybında da önemli rol oynamaktadır (166-168). HMGB1 proteini ile diyabet arasındaki ilişki ile ilgili moleküler mekanizmaları açıklamak adına daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

2.7. PROGRAMLANMIŞ HÜCRE ÖLÜMÜ

Programlanmış hücre ölümü (apoptoz), hücre döngüsü, bağışıklık sisteminin gelişimi, hormona bağlı atrofi, embriyonik gelişim ve kimyasal kaynaklı hücre ölümü gibi çeşitli süreçlerin kritik bir bileşenidir. Bununla birlikte apoptotik yollarda rol alan birçok protein tanımlanmış olmasına rağmen bu proteinlerin etki ve aktivasyon mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır (169). Apoptoz süreci genetik faktörler yanında hücre düzeyinde veya dış bir uyrana yanıt olarak oluşabilir (170). Apoptoza 'ekstrinsik' ve 'intrinsik' olarak iki temel uyarım neden olur (171).

Ekstrinsik yol, hücre yüzeyindeki proapoptotik bir molekül veya reseptöre özgü ligandlar tarafından aktive edilen pro-apoptotik reseptörlerle başlatılır (170). İntrinsik yol, DNA hasarı, Endoplazmik Retikulum (ER), oksidatif stress veya mikrotübüler değişikliklerle birlikte bir dizi hücre dışı veya hücre içi uyaranla etkinleştirilebilir (172). İntrinsik yol, Bcl-2 protein ailesinin pro- ve anti-apoptotik üyeleri arasındaki denge tarafından düzenlenir. Dış mitokondriyal membran bozulduğunda geri dönüşü olmayan

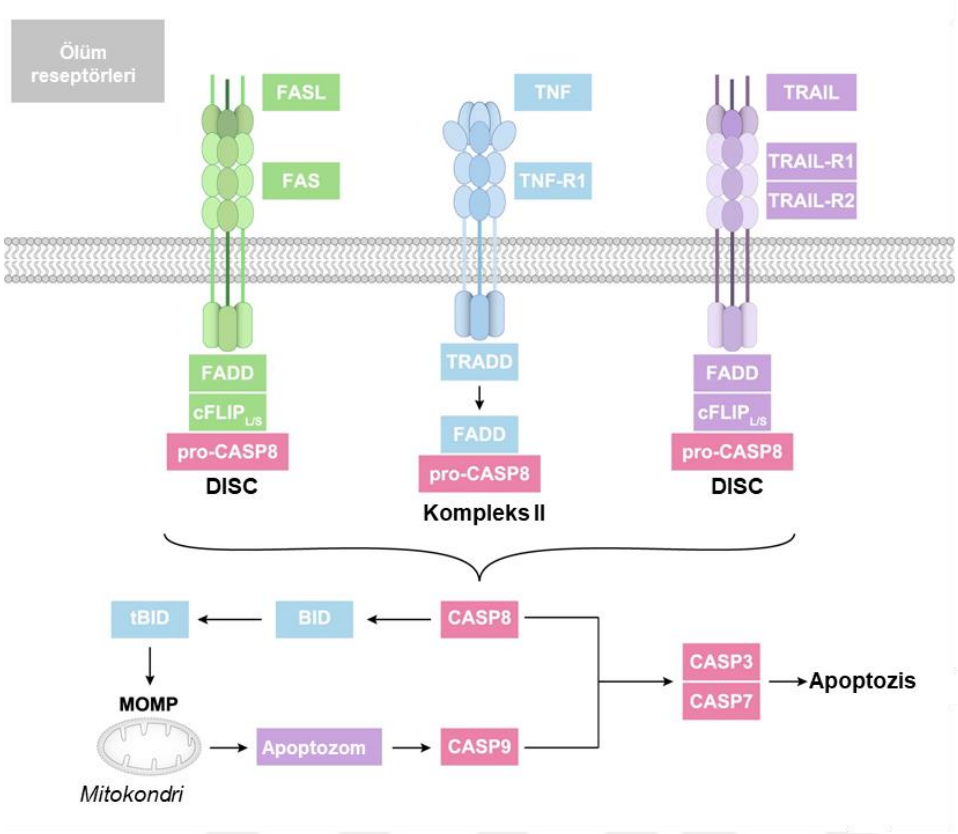
noktaya ulaşır ve sitokrom salınımına ve aşağı yönde kaspaz aktivasyonuna yol açar (171). İntrinsik apoptozun kritik adımı Şekil 2.8'de gösterildiği gibi BCL2 ailesinin pro-apoptotik etkileyicileri olan BAX, BAK ve muhtemelen BOK proteinlerinin aktive edilmesidir. Bu, Mitokondriyal Dış Membran Permeabilizasyonunu (Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization; MOMP) sağlar ve hücreleri ölüme yöneltir. MOMP, mitokondriyal zarlar arası boşluktan Sitokrom C (CYCS) ve İkinci Mitokondri Türevli Kaspaz Aktivatörü (Second Mitochondria-derived Activator of Caspase; SMAC) dahil olmak üzere pro-apoptotik proteinlerin sitozole salınmasıyla sonuçlanır. Sitokrom C, Apoptotik Proteaz Aktive Eden Faktör 1 (Apoptotic protease activating factor 1, APAF1), dATP ve Pro-Kaspaz 9 (Pro-CASP9) ile apoptozomu oluşturarak kaspaz 9 (CASP9)'u aktive eder, bu da ölüm kaspazları kaspaz 3 (CASP3) ve kaspaz 7 (CASP7)'nin aktivasyonuna yol açar. Ölüm kaspazlarının aktivasyonu, Apoptoz İnhibitörü (İnhibitor of Apoptosis; IAP) ailesinin üyelerini parçalayan SMAC tarafından kolaylaştırılır (172).



Şekil 2.8: İntrinsik apoptozun moleküler mekanizması (172)

(BCL2 ile ilişkili hücre ölümü agonisti (BAD); p53 tarafından düzenlenen apoptozun modülatörü (PUMA); BCL2 ile etkileşen ölüm üreten (BIK), BCL2 benzeri 11 (BIM); Bcl2 modifiye edici faktör (BMF); BH3 ile etkileşen alan ölüm agonisti (tBID); BCL2 ile etkileşen protein harakiri (HRK); Phorbol-12-myristate-13-acetate ile indüklenmiş protein 1 (NOXA); apoptoz düzenleyici (BCL2); BCL2 benzeri 1 (BCL-X L); MCL1, BCL2 ailesi apoptoz düzenleyicisi (MCL1); BCL2 benzeri 2 (BCL-W); BCL2 ile ilgili protein A1 (BCL2A1); apoptozu inhibe eden X-bağlantılı apoptoz inhibitörü (XIAP); ikinci mitokondri kaynaklı kaspaz aktivatörü (SMAC); (Apoptotik proteaz active eden faktör 1 (APAF1); sitokrom c (CYCS); mitokondriyal dış membran permeabilizasyonu (MOMP); kaspaz (CASP)- 3, 7, 8, 9).

Ekstrinsik apoptoz Şekil 2.9'de gösterildiği gibi FASL'nin FAS'a veya TRAIL'in TRAIL-R1 veya TRAIL-R2'ye bağlanmasıyla başlatılır. Bu, ölüm reseptörlerinin sitoplazmik kuyruğunda DISC olarak bilinen bir platformun oluşumunu teşvik eder. Ekstrinsik apoptoz, TNF'nin TNF-R1'e bağlanmasıyla da tetiklenir, bu da Kompleks II'n oluşumunu uyarır. DISC kompleksinin yapısında FADD, c-FLIP'ler ve pro-kaspaz 8 (pro-CASP8) yer alır. Kompleks II, TRADD (kompleks IIa) veya RIPK1 (kompleks IIb) ile birlikte FADD ve pro-CASP8'den oluşur. Bu komplekslerin oluşumu, kaspaz 8 (CASP8)'in aktivasyonunu teşvik eder. CASP8 Tip I hücrelerde direk olarak CASP3 ve CASP7'yi aktive eder. CASP8 Tip II hücrelerde indirek olarak (pro-apoptotik BCL2 proteinleri) BH3-only protein BID'nin proteolitik aktivasyonu tetikler. Bu da MOMP yol açarak CASP3 ve CASP7'yi aktive eder (172). Aktive edilmiş bölünmüş kaspaz-3, ekstrinsik ve intrinsik yol arasındaki kavşak noktasıdır (51).



Şekil 2.9: Ekstrinsik apoptozun moleküler mekanizması (172)

(Fas hücre yüzeyi ölüm reseptörü (FAS; APO-1); TNF reseptör süper ailesi üyesi 1A (TNF-R1); TNF süper ailesi üyesi 10 (TRAIL); TNF reseptör süper ailesi üyesi 10a (TRAIL-R1); TNF reseptör süper ailesi üyesi 10b (TRAIL-R2); FAS ligandı (APO-1L; FASL); Ölüm indükleyen sinyalleşme kompleksi (DISC); Fas ile ilişkilendirilmiş ölüm alanı proteini (FADD); Hücresel Flice benzeri inhibisyon protein (c-FLIP); TNF-R1 ile ilişkilendirilmiş ölüm alanı proteini (TRADD); kaspaz (CASP)- 3, 7, 8, 9).

2.7.1. Programlanmış Hücre Ölümü ve Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus'un iki ana formuna yol açan temel mekanizma fonksiyonel beta hücre kütlesi kaybıdır. Tip 1 diyabet, beta hücrelerindeki otoimmüne bağlı işlev bozukluğu ve apoptoz nedeniyle ortaya çıkar (7). Tip 1 diyabetin insülit lezyonundaki bağışıklık hücreleri IL-1β, TNF-α ve İnterferon (IFN)-γ gibi sitokinler üreterek transkripsiyon faktörleri olan NF-κB ve STAT-1 aracılığıyla belirli gen ağlarını etkinleştirir ve beta hücre apoptozunu indükler. NF-κB aktivasyonu nitrik oksit ve kemokinlerin üretimini teşvik eder ve ER'nin kalsiyum içeriğini azaltır. Genel olarak beta hücre ölümünde ER stresin, MAPK aktivasyonu ve apoptotik sinyal yollarının aktive olmasıyla gerçekleşir (173). Tip 2 diyabetin gelişimde apoptoz önemli rol oynar.

Diyabetin temel patofizyolojisinde glikozun indüklediği insülin sekresyonu yer alır ve yetersiz insülin sekresyonu kronik hiperglisemiye neden olur. Hiperglisemiye bağlı β-hücre apoptozu, pro-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin (Bad, Bid, Bik ve Bax) konsantrasyonu, intrinsik yolun mitokondriyal membranında anti-apoptotik proteinlerin (Bcl-2 ve Bcl-xL) konsantrasyonunu aştığında gerçekleşmektedir. Glukoz toksisitesi, adenozin trifosfat üretimi yoluyla K^+ kanal kapanması, hücre membran potansiyeliyle Ca^{+2} kanalının açılması ve plazma membran depolarizasyonuyla hücrenin apoptozise duyarlı hale gelmesine katkıda bulunabilir (174). Tip 2 diyabetin beta hücre apoptozuna ve bozulmuş insülin salgılama fonksiyonuna neden olan faktörler arasında lipotoksisite, glikotoksisite, amiloid birikimi ve inflamasyon yer alır. Bu faktörlerin neden olduğu ER stres, oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyon gibi stres yolları beta hücre apoptozunu indüklemektedir (175).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü desteğiyle (Proje No: 2022/030) Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Fizyoloji Anabilim Dalı ve Biyofizik Anabilim Dalı iş birliği ile gerçekleştirilmiştir.

3.1. DENEY GRUPLARININ OLUŞRULMASI

3.1.1. Hücre Kültürü

Çalışmada insan pankreatik beta (β) hücre hattı (1.1B4), aseptik hücre kültüründe, %10 fetal sığır serumu (FBS), %1 antibiyotik (100 IU/ml penisilin, 0,1 mg/ml streptomisin) içeren RPMI 1640 besi yerinde, inkübasyon koşulları 37 °C ve %5 karbondioksit olacak şekilde büyütüldü. Hücreler %80 oranında büyüdüklerinde çalışmaya başlandı.

3.1.2. Deney Gruplarının Oluşturulması

Çinkonun olası etkileri ilgili hipotezimizi test etmek amacıyla Tablo 3.1.'de gösterildiği gibi Kontrol (K), Diyabet (D), Diyabet+Çinko (DZ), Diyabet+Kutu A (DB) ve Diyabet+Çinko+Kutu A (DZB) olmak üzere 5 deney grubu oluşturuldu.

Tablo 3.1: Çalışmada oluşturulan deney grupları

Gruplar	Alt Gruplar	Kısaltma	İnkübasyon	
			4 Saat	24 Saat
Kontrol Grupları	Kontrol Grup	K	Normal Besi yeri	Normal Besi yeri
Diyabet Grupları	Diyabetik Kontrol Grup	D	STZ	Normal Besi yeri
	Çinko Desteği Yapılan Diyabetik Grup	DZ	STZ	Normal Besi yeri + $ZnCl_2$
	Kutu A Desteği Yapılan Diyabetik Grup	DB	STZ	Normal Besi yeri + Kutu A
	Çinko ve Kutu A Desteği Yapılan Diyabetik Grup	DZB	STZ	Normal Besi yeri + $ZnCl_2$ + Kutu A

3.1.2.1. Streptozotosin uygulaması: Beta hücre hasarı oluşturmak için deneylerde en yaygın olarak kullanılan Streptozotosin (STZ) modeli kullanıldı. STZ'nin 15 mM'ın üzerindeki dozları pankreasın beta hücrelerinde apoptotik etki ettiği, 30 mM'den daha yüksek STZ dozlarında ise nekroz yolakları üzerinden hücre ölümlerine neden olduğu rapor edilmiştir. STZ'nin 20 mM üzerindeki dozlarında insülinom, keratinositler ve genetiği değiştirilmiş karaciğer hücrelerinde oksidatif stres aracılığıyla apoptoza neden olduğu gösterilmiştir. Literatürde hücre kültüründe STZ 0-30 mM dozları arasında uygulanmıştır. STZ'nin beta hücrelerindeki sitotoksik etkisi iki saat içerisinde meydana gelmektedir (176). Diyabet oluşturmak için 20 mM konsantrasyondaki STZ 4 saat uygulandı. STZ uygulaması için pasajlanan hücreler kontrol edilip göreceli olarak %80 oranında büyüdüklerinde STZ uygulaması esnasında sonuçları etkileyebilecek diğer faktörleri ortadan kaldırmak amacıyla bütün gruplara aynı işlem (besi yeri değişimi ve yıkama) yapıldı. STZ uygulaması için öncelikle grupların eski besi yeri boşaltılıp, HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) ile üçer defa yıkandı. Daha sonra diyabet oluşturulmak istenen grupların besi yeri 20 mM streptozotosin(U-9889) (Santa Cruz Biotechnology, SC-200719) içeren besi yeri ile yenilenirken, diğer gruplarınki ise normal besi yeri kullanılarak yenilendi. Hücreler 4 saat süresince 37°C ve %5 karbondioksit koşullarında inkübe edildi. STZ ile muamele edilen beta hücrelerinin 4 saat sonra mikroskobik incelemesinde β-hücre hatlarının keskinliğini kaybettiği, oval görünümlü ve kabarık hücre formuna sahip oldukları gözlemlendi. Bu aşamadan sonra deney grupları oluşturulmak üzere $ZnCl_2$ [çinko (II) klorür] ve Kutu A takviyesi yapıldı.

3.1.2.2. Çinko klorür takviyesi uygulaması: NS-1E hücreleri kullanılarak yapılan bir çalışmada hücrelerin 0,1 mM konsantrasyona kadar $ZnCl_2$'ün 24 saatlik uygulamasını iyi tolere edildiği ancak konsantrasyonun 0,2 mM'den 1 mM'ye yükseltilmesinin doza bağlı hücre ölümünü sürekli olarak artırmış olup 0,4-1 mM konsantrasyondaki $ZnCl_2$'ün sitotoksik olduğu bulunmuştur. Hücreler için 5-30 µM konstrasyondaki $ZnCl_2$'ün 24 saatlik uygulamasının fizyolojik konsantrasyonu olduğu bildirilmiştir. Dahası insülin salınımı için 15-30 µM aralığının plato evresi olduğu ve 20 µM $ZnCl_2$'ün 24 saatlik uygulamasının maksimum insülin sekresyonuna aracılık ettiği gösterilmiştir (99). Başka bir çalışmada 50 µM $ZnCl_2$ takviyesinin beta hücrelerinde insülin sekresyonunu önemli ölçüde arttırdığı belirtilmektedir (177).

Çalışmada beta hücrelerindeki harabiyeti azaltmak ve insülin sekresyonunu arttırabilmek için besi yerine 30 µmol/L (30 µM) düzeyinde $ZnCl_2$ eklendi ve 24 saat inkübasyon yapıldı (178). Çalışmada $ZnCl_2$ takviyesi besi yerine ilave edilerek uygulandı. Bunun için "DZ" grupları için hazır alınan 5 mL besi yerinden 15 µL besiyeri çekilip yine aynı miktarda 10 mM'lık solüsyondan 15 µL eklenmiştir. Sonuçta 30 µM'lık 5 mL çözelti hazırlanmıştır. STZ uygulamasının ardından bütün gruplar HBSS ile üç defa yıkandı ve yeni besi (besi yeri + çinko klorür karışımı (Thermo Scientific, 10316143) 5 mL eklendi. Bu işlem sonrasında hücreler 24 saat süresince 37 °C ve %5 karbondioksit koşullarında inkübe edildi.

3.1.2.3. Kutu A takviyesi uygulaması: Pankreas adacık hücrelerinin 10 µM konsantrasyona kadar kutu A (Box A: HMGB1 inhibitörü) ile 4 güne kadar uygulamasının hücre canlılığını, morfolojilerini ve insülin salgılama yeteneklerini etkilemediği bildirilmiştir (179). Çalışmada kutu A besi yerine 100 ng/L (9,6 µM) (HMGBiotech, HM-012) dozunda eklendi ve 24 saat süreyle inkübasyon yapıldı (180). Çalışmada kutu A takviyesi besiyerine ilave edilerek uygulandı. "DB" grupları için hazır olarak alınan 5 mL besiyerinden 0,05 µL besiyeri çekilip 100 µg/L kutu A solüsyonundan 0,05 µL eklenmiştir. Bu işlem sonrasında hücreler 24 saat süresince 37 °C ve %5 karbondioksit koşullarında inkübe edilmiştir.

3.1.2.4. Çinko klorür ve kutu A uygulaması: Çalışmada $ZnCl_2$ ve kutu A takviyesi besi yerine ilave edilerek uygulandı. "DZB" grupları için hazır olarak alınan 5 mL besiyerinden $ZnCl_2$ için 15 µL besiyeri; kutu A için 0,05 µL besiyeri çekilip 10 mM'lık $ZnCl_2$ solüsyondan 15 µL ve 100 µg kutu A solüsyonundan 0,05 µL eklenmiştir. Sonuçta 30 µM'lık $ZnCl_2$ ve 100 ng/L kutu A çözeltisi hazırlanmıştır. STZ uygulaması ardından bütün gruplar HBSS ile üç defa yıkandı ve yeni besiyeri (besi yeri + kutu A karışımı + $ZnCl_2$ karışımı) 5 mL olacak şekilde eklendi. Bu işlem sonrasında hücreler 24 saat süresince 37 °C ve %5 karbondioksit koşullarında inkübe edildi.

3.1.3. Hücrelerin Toplanması

$ZnCl_2$ ve kutu A takviyesinin 24 saat inkübasyonunun ardından flasklar inkübatörden alınarak hücrelerin bulunduğu yüzey buzun üzerine gelecek şekilde bekletildi. Daha sonra flasklar üçer defa HBSS ile yıkanarak ripa tamponu (Santa Cruz Biotechnology, SC-24948) ile hücreler parçalanıp mekanik olarak yüzeyden kazınarak

ependorf tüplerine alındı. Örnekler 13000 rpm'de 4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant mikro pipet yardımıyla tüplere eşit miktarda paylaştırıldı ve analiz yapılmak üzere -20 °C'de saklandı.

3.2. PROTEİN İFADE DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ

Western blot Yöntemindeki dikey jel sistemine eşit miktarda protein yüklemesini yapabilmek için örneklerin protein konsantrasyonu ELISA (Sigma Life Science, B6916) yöntemiyle broadford deneyine göre belirlendi. 200 µg protein örneği, 4 × SDS yükleme tamponu ile karıştırıldı ve ardından 4-12% Bis-Tris jelinde ayrıldı. Yükleme yapıldıktan sonra proteinler 120-volt altında yaklaşık bir saat boyunca yürütüldü. Yürütülen proteinler iBlot cihazı (Invitrogen, IB1001EU) yardımıyla PVDF membrana transfer edildi. Standart western blot protokülüne devam etmeden önce elde edilecek protein bantlarının daha net ve belirgin görünmesi için sinyal arttırıcı bir çözelti (enhancer) uygulandı. Bu işlemden sonra jeller üç defa distile su ile yıkandı. Membranla antikorlar arasındaki nonspesifik bağlanmaları en aza indirmek için sığır serum albumini (BSA, %5) ile doyurma işlemi yapıldı. Bu işlem orbital karıştırıcı yardımıyla oda sıcaklığında 1 saat sürdürüldü. HMGB1 (Abcam, ab18256), TLR2 (Abcam, ab191458), TLR4 (Abcam, ab22048), ERK1/2 (Cell Signaling Technology, CS 4695) ve SAPK/JNK (Cell Signaling Technology, CS 9258) proteinlere karşı birinci antikorlar kullanıldı. Proteinlerin tanımlanması için her bir birincil antikor (HMGB1, TLR2, TLR4, ERK1/2, SAPK/JNK,) önerilen miktarlarına göre seyreltildi. Daha sonra membranlar, birincil antikorlarla orbital karıştırıcı yardımıyla +4 °C'de bir gece inkübe edildi. PVDF membranlar öncelikle PBS-T ile 10'ar dakika karıştırıcı altında üç kez yıkandı. İkincil antikorlar anti-tavşan (Santa Cruz Biotechnology, SC-2057) ve anti-fare (Santa Cruz Biotechnology, SC-3589) bloklama tamponunda (%5 BSA+PBS-T) protokolüne uygun şekilde seyreltildikten (1/3000) sonra PVDF membranlar ile 1 saat oda sıcaklığında orbital karıştırıcı yardımıyla inkübe edildi. Membranlar 10'ar dakika olmak üzere üç kez PBS-T çözeltisi ile yıkandı. Protein bandları, NCIP/BNP kit (Millipore, ES0006) kullanılarak tespit edildi. Standart molekül ağırlıklarına sahip markır kullanılarak hedeflenen proteinler tayin edildi.

3.3. BİYOKİMYASAL ÖLÇÜMLER

3.3.1. Oksidatif Stresin Saptanması

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

3.3.1.1. Total oksidan seviyenin ölçülmesi: Farklı oksidan moleküllerin ayrı ayrı ölçülmesi pratik olmadığından ve oksidan etkileri aditif olduğundan bir numunede Toplam Oksidan Seviyesi (TOS) ölçülür. TOS testinde, örnek içindeki oksidanlar ferroz iyon-şelatör kompleksini ferrik (Fe^{+3}) iyona oksitler. Oksidasyon reaksiyonu, reaksiyon ortamında bol miktarda bulunan etki güçlendirici moleküller tarafından uzatılır. Ferrik iyon, asidik bir ortamda kromojen ile renkli bir kompleks oluşturur. Spektrofotometrik olarak ölçülebilen renk yoğunluğu, numunede bulunan toplam oksidan molekül miktarı ile ilgilidir. Test, hidrojen peroksit ile kalibre edilir ve sonuçlar litre başına mikromolar hidrojen peroksit eşdeğeri cinsinden ifade edilir (μmol H_2O_2 Eşdeğeri/L). Çalışmada kör, standart ve örneklerden 22,5 μL alındı ve üzerine 150 μL "reaktif" 1 eklendi. 530 nm dalga boyuna ayarlanmış mikroplaka spektrofotometresi (BioTek Eon) başlangıç absorbansı (A1) okundu. Daha sonra 7,5 μL "reaktif" 2 ilave edildi, 37 °C'de 5 dakika bekledikten sonra 530 nm'de son absorbans (A2) okundu. Sonuçlar aşağıdaki denkleme göre hesaplandı ve μmol H_2O_2 Equiv/L olarak ifade edildi.

Standart ya da örnek için $\Delta Abs = A2-A1$

$TOS = (\Delta Abs \text{ Örnek} / \Delta Abs \text{ Standart}) * 10^{\Delta}$

$^{\Delta}$Standart konsantrasyonu

3.3.1.2. Total antioksidan seviyenin ölçülmesi: Total Antioksidan Seviyesinin (TAS) ölçme prensibi, örneklerde bulunan antioksidanlar koyu mavi-yeşil renkli ABTS radikalini renksiz ABTS formuna indirgemesine dayanır. 660 nm'de absorbans değişikliği örneğin toplam antioksidan seviyesi ile ilişkilidir. Test, genellikle Trolox Eşdeğeri olarak adlandırılan ve bir E vitamini analogu olan kararlı bir antioksidan standart çözeltisi ile kalibre edilir. Sonuçlar litre başına mikromolar Trolox eşdeğeri cinsinden ifade edilir (µmol Trolox Eq/L). Çalışmada kör, standart ve örneklerden 9 µL alındı ve üzerine 150 µL "reaktif" 1 eklendi. 660 nm dalga boyuna ayarlanmış mikroplaka spektrofotometresi (BioTek Eon) başlangıç absorbansı (A1) okundu. Daha sonra 22,5 µL "reaktif" 2 ilave edildi, 37 °C'de 5 dakika bekledikten sonra 660 nm'de son absorbans (A2) okundu. Sonuçlar aşağıdaki denkleme göre hesaplandı ve mmol Trolox Equiv. /L olarak ifade edildi.

Standart ya da örnek ya da H2O için ΔAbs= A2-A1

TAS = (ΔAbs H2O – Δabs Örnek) / (ΔAbs H2O – Δabs Standart)

3.3.1.3. Oksidatif stres indeksinin hesaplanması: Elde edilen TOS'un TAS'a oranı Oksidatif Stres İndeksi (OSI) olarak aşağıdaki denkleme göre hesaplandı.

OSI = [(TOS, µmol H2O2 Eq/L) / ((TAS, µmol Trolox Eq/L) * 1000)] * 100

3.4. İNSÜLİN SALGISINDAKİ DEĞİŞİMİN TAYİNİ

3.4.1. Pankreatik Beta Hücrelerinin Glukoz ile İnsülin Salınımının İndüklenmesi

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

3.4.2. İnsülin Salınım Analizi

İnsülin salınımı analizi çift antikorlu sandviç ELISA kiti (Shanghai Coon Koon Biotech, CK-bio-14821) ile yapıldı. Sandviç ELISA ölçümünde kit için özel olan 96 kuyucuklu plaka kullanıldı. ELISA kit protokolüne uygun olarak reaktifler, numuneler ve standartlar hazırlandı. Plakaya her numuneden 10 µl + 40 µl dilue solüsyonu ve standartlardan 50 µl eklendi ve üzerlerine 100 µl HRP eklenerek 37°C'de 60 dakika inkübasyon yapıldı. Daha sonra plaka, yıkama solüsyonu ile 5 defa yıkandı, karanlık ortamda 50 µl kromojen A + 50 µl kromojen B solüsyonu eklendi ve renk geliştirmek üzere 37 °C'de 15 dakika inkübasyon yapıldı. Protokole uygun olarak 50 µl durdurma solüsyonu eklendi ve absorbans değeri 15 dakika içinde 450 nm'de mikroplaka spektrofotometresi (BioTek Eon)'nde okundu.

3.5. HÜCRE İÇİ KALSİYUM, ÇİNKO VE HMGB1 BELİRLENMESİ

3.5.1. Kalsiyum İçeriği Tayini

Örneklerdeki kalsiyum içeriği kolorimetrik kalsiyum test kiti (Otto Scientific, OttoBC133) ile ölçüldü. Bu test analizinde örneklerde bulunan kalsiyum, spektrofotometri ile ölçülebilen renkli bir kompleks oluşturan arsenazo III ile reaksiyona girmektedir. Çalışmada örnek ve standartlardan 5 µl alındı ve üzerlerine 500 µl reagent-1 eklendi, 3 dakika beklendikten sonra 30 saniye 37 °C tutuldu ve 650 nm'de çok modlu floresan okuyucu (Thermo Scientific Varioskan Flash) cihazında okuma yapıldı. Sonuçlar aşağıdaki denkleme göre hesaplandı.

Kalsiyum (g/dL) = [Örnek Absorbans / Standart Absorbans] * Standart Konsantrasyon$^{\Delta}$

$^{\Delta}$(2,82 mmol/l; 5,64 mEq/l; 11,3 mg/dl)

3.5.2. Çinko İçeriği Tayini

Örneklerdeki çinko içeriği kolorimetrik çinko test kiti (Rel Assay Diagnostic, RL0901) ile ölçüldü. Bu test analizinde örneklerde bulunan çinko, bazik ortamda 5-Br-PAPS'ın kırmızı tutuncu rengini açık pembeye dönüştürür. Çalışmada örnek ve standartlardan 14 µl alındı ve üzerlerine 160 µl reagent-1 eklendi. Reagent-1 ve örnek pipetlenerek karıştırıldıktan iki dakika sonra 30 µl reagent-2 eklenir. 5 dakika 37 °C inkübasyon sonrasında 548 nm'de çok modlu floresan okuyucu (Thermo Scientific

Varioskan Flash) cihazında okuma yapıldı. Hesaplama için su koyulan kuyudan elde edilen absorbans değeri, örnek, standart ve kontrol koyulan kuyulardan elde edilen absorbans değerinden çıkarılır. Standartın absorbansı 262 µg/dL çinkoya karşılık gelir. Faktör hesaplanır ve örnek yüklenen kuyulardan ölçülen absorbans değeri faktörle çarpılarak örneklerdeki çinko konsantrasyonu elde edildi.

3.5.3. Yüksek Hareketli Grup Protein 1 Tayini

HMGB1 ölçümü ELISA kiti (Elabscience, E-EL-R0505) ile yapıldı. Bu ELISA kit Sandviç-ELISA prensibine dayanmaktadır. Bu kit ile birlikte verilen mikro ELISA plakası HMGB1'e özgü bir antikorla önceden kaplanmıştır. HMGB1 ölçümü için her gruptan toplam altı adet numune alındı. Çalışmada mikro ELISA plaka oyuklarına 100 µL örnek ve 100 µL standart eklendi; 90 dakika 37 °C inkübe edildi. Daha sonra sıvı atıldı, her bir mikro plaka kuyusuna 100 µL Biotinylated Detection Ab çalışma solüsyonu eklendi ve 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi. Plaka 3 defa yıkandı ve 100 µL HRP eklendi, 30 dakika 37 °C inkübe edildi. Daha sonra plaka 5 defa yıkandı, plaka ışıktan korunarak 100 µL substrat solüsyonu her kuyucuğa eklendi, 15 dakika 37 °C inkübe edildi. Enzim-substrat reaksiyonu stop solüsyonundan 50 µl eklenerek reaksiyon sonlandırıldı. Son olarak plaka 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik mikroplaka spektrofotometresi (BioTek Eon) ile okundu. Hesaplamalar protokole uygun olarak yapıldı.

3.6. APOPTOTİK HÜCRE SAYISININ BELİRLENMESİ

Apoptotik hücre sayısını belirlemek için TUNEL kiti (Roche, 1684795) kullanıldı. Bu amaçla cover sliplerde büyütülüp, deney grupları oluşturulmuş hücreler kullanıldı ve ardından üretici firmanın önerdiği protokol takip edildi. Özetle, taze hazırlanmış olan %2'lik parafolmaldehitten cover sliplerin üzerine 200 µL eklendi ve 40 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu şekilde hücrelerin fiksasyonu sağlanmış oldu. Her seferinde 2 dakika olmak üzere 3 kez fosfat ile tamponlanmış tuz çözeltisi (PBS) ile yıkanarak formaldehit uzaklaştırıldı. Ardından TUNEL kiti içindeki boyanın hücre içine kolay girmesini sağlamak amacıyla %0,02'lik Triton X-100 deterjanı ile permabilizasyon (hücre porlarının genişlemesi) işlemi 10 dakika buz üzerinde gerçekleştirildi. Tekrar her seferinde iki dakika olmak üzere 3 kez PBS ile yıkama işlemi yapıldı. TUNEL kitinin içerisindeki etiketleme çözeltisi (labelling solution) ile enzim çözeltisi karıştırılarak mastır karışım hazırlandı. Negatif kontrol için enzim içermeyen etiketleme çözeltisi

kullanıldı. Her bir coverslipin üzerini kapatacak miktarda master karışım, negatif kontrol için ise yalnızca etiketleme çözeltisi eklendi, karanlıkta ve nemli ortamda 1 saat 20 dakika boyunca inkübatörde bekletildi. Son olarak, karanlıkta yine her seferinde 2 dakika olmak üzere 3 kez yıkama işlemi yapıldı. Lamlara grup, tarih ve saat bilgileri işlendikten sonra coverslipler kapatıldı. Bir iki saat karanlıkta sıvı kısmının uzaklaşması bekletildikten sonra oje yardımıyla coverslipler kapatıldı ve hemen immünofloresan mikroskobunda (Olympus BX51) 20x ve 100x objektifte alan taramaları yapıldı. Elde edilen fotoğraflarda yeşil boyanan çekirdekler TUNEL pozitif hücrelerdir. Yeşil boyanan bu çekirdeklerin sayısı ImageJ programı kullanılarak sayıldı.

3.7. MİTOKONDRİYAL MEMBRAN POTANSİYELİ ÖLÇÜMÜ

Mitokondriyal Membran Potansiyelini (MMP) ölçmek için çift emisyonlu, zar potansiyeline duyarlı floresan bir boya olan JC-10 kullanıldı. Sağlıklı hücrelerin mitokondriyal membran potansiyeli yüksektir ve JC-10, 560-595 nm'de sırasıyla geniş uyarma ile çok dar emisyon spektrumları sergileyen kırmızı J-agregatlar oluşturur. Apoptotik hücreler ya da sağlıksız hücrelerde (depolarize) düşük membran potansiyelinden dolayı JC-10 boyası birikmediği için 485-535 nm'de yeşil J-agregatlar oluşur. Mikroskobik inceleme sırasında apoptotik olmayan hücrelerde sitozol kırmızı renkli, apoptotik hücrelerde ise yeşil renkli olarak görüntülenir. JC-10'in kırmızı-yeşil floresan oranı sadece membran potansiyeline bağlıdır ve mitokondriyal boyut, şekil veya yoğunluktan etkilenmez.

Mitokondriyal membran potansiyeli JC-10 test kiti (Abcam, ab112134) kullanılarak analiz edildi. Hücreler, 96'lık mikroplakaya ekildi ve deneme grupları oluşturdu. 24 saatlik inkübasyon süresinden sonra, mikro plakanın her bir kuyucuğuna 50 µL JC-10 boya çözeltisi ilave edildi ve alüminyum folyo kullanılarak 1 saat 37 °C'de, %5 CO_2 koşulunda inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, kit içerisinde yer alan analiz çözeltisi plaka içerisine floresan yoğunluğu okumadan önce eklendi. Yeşil ve kırmızı oran analizi, ekstinksiyon/emisyon dalga boyları olan 490/525 nm ve 540/590 nm'de çok modlu floresan okuyucu (Thermo Scientific Varioskan Flash) cihazında yapıldı. Sonuçlar aşağıdaki denkleme göre hesaplandı.

MMP = [540/590] / [490/525]

3.8. HÜCRE CANLILIĞI ÖLÇÜMÜ

MTT testi, hücre canlılığı, proliferasyonu ve sitotoksisitesini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan bir kolometrik testtir. MTT testi hücrelerdeki mitokondriyal enzimlerin aktivitesini ölçmek için kullanılan bir laboratuvar reaktifidir. MTT test kiti, canlı hücrelerde mitokondriyal enzimler tarafından formazana indirgenen 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT) bileşiğini kullanır. Oluşan formazan miktarı, örnek içindeki canlı hücre sayısıyla doğrudan orantılıdır.

Hücre canlılığı ölçümü için MTT kit (Serva, 20395.02) kullanıldı. Ölçüm 96-oyuklu plaka ile yapıldı. Protokole göre her bir kuyucuğa 100 µL MTT reaktifi eklenerek 37 °C derecede 4 saat kadar inkübe edildi. İşlem sonrasında ortam alındı, 100 µL DMSO eklendi ve 570 nm'de çok modlu floresan okuyucu (Thermo Scientific Varioskan Flash) cihazında yapıldı. Sonuçlar aşağıdaki denkleme göre hesaplandı.

Hücre canlılığı = (Örnek optik yoğunluk / Kontrol grubu optik yoğunluk) * 100

3.9. VERİ ANALİZİ

Western Blot yöntemiyle elde edilen membran görüntülerinin bant profilleri ImageJ programı ile analiz edildi. İstatistiksel hesaplamalar Excell ve SPSS (Statistical Package for Social Sciences) programları kullanılarak yapıldı. Çalışmada elde dilen verilere Kolmogorov-Smirnov normalite testi uygulandı. Normal dağılım gösteren veriler için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yapıldı. Grup ortalamaları arasındaki farkın anlamlı çıkması durumunda Levene homojenite testi daha sonra bu testin sonucuna uygun bir post-hoc test kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen veri setlerinde Kruskal Wallis ANOVA test uygulandı ve gruplar arasındaki farkın anlamlı çıkması durumunda Mann-Whitney U testi kullanıldı. İstatistik olarak anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmanın hipotezini test etmek için, insan pankreatik beta hücre hattı olan 1.1B4 kullanılarak Kontrol (K), D (Diyabet), Diyabet + Çinko (DZ), Diyabet+Kutu A (DB) ve Diyabet+Çinko+Kutu A (DZB) olmak üzere 5 deney grubu oluşturuldu.

4.1. MİTOKONDRİYAL MEMBRAN POTANSİYELİ

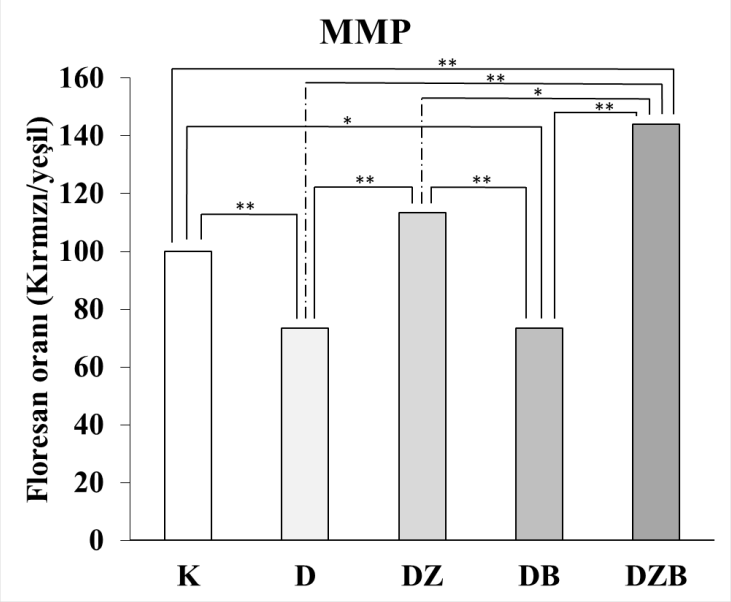
Mitokondriyal Membran Potansiyelini (MMP) ölçmek için çift emisyonlu, zar potansiyeline duyarlı floresan bir boya olan JC-10 kullanıldı. Sağlıklı hücrelerde mitokondriyal membran potansiyeli yüksektir ve kırmızı floresan verirken, apoptotik hücreler ya da sağlıksız hücrelerde (depolarize) düşük membran potansiyelinden dolayı yeşil floresan verir. MMP değeri ise kırmızı florsanın yeşil floresana oranlanması olarak değerlendirildi.

Tablo 4.1: Deney gruplarının mitokondriyal membran potansiyeli değerleri

		MMP		
		Ortalama	**Standart Sapma**	**P**
Deney Grubu	K	1,982	0,370	<0,001**
	D	1,458	0,250	
	DZ	2,250	0,426	
	DB	1,456	0,273	
	DZB	2,855	0,314	

Kruskal-Wallis H Test; İkili grup karşılaştırmaları için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır; ** p<0,01

Mitokondriyal membran potansiyeli değeri “D” grubunda “K” grubuna kıyasla anlamlı olarak düşük bulundu (p<0,01). “DZ” ve “DZB” grubu MMP değeri “D” grubuna kıyasla anlamlı artış gösterdi (p<0,01). “DB” grubunun ortalama MMP değeri “DZ” ve “DZB” gruplarının ortalama MMP değerine kıyasla anlamlı olarak düşük saptandı (p<0,01). “DZB” grubunda MMP değeri “DZ” grubuna kıyasla anlamlı artış gösterdi (p<0,05). “DZB” grubunun ortalama MMP değeri “K” grubunun ortalama MMP değerine kıyasla anlamlı artmıştır (p<0,01). “DB” grubunun MMP ortalama değeri “K” grubuna kıyasla anlamlı azalmıştır (p<0,05) (Tablo 4.1; Şekil 4.1).



Şekil 4.1: Deney gruplarının mitokondriyal membran potansiyeli

(Grafik verileri % cinsinden verilmiştir; * p<0,05; ** p<0,01; MMP: Mitokondri membran potansiyeli; K: Kontrol grubu, D: Diyabet grubu, DZ: Diyabet + Çinko grubu, DB: Diyabet + Kutu A grubu, DZB: Diyabet + Çinko + Kutu A grubu)

4.2. OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİ

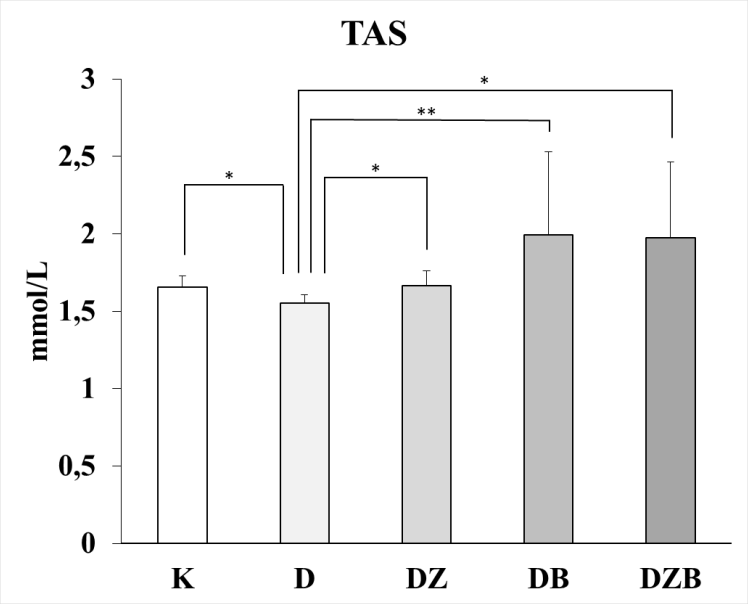
4.2.1. Total Antioksidan Seviyelerindeki Değişim

"D" grubu ortalama TAS değeri "K" grubunun ortalama TAS değerine kıyasla istatistiksel olarak düşük bulundu (p<0,05). "DZ" ve "DZB" gruplarının ortalama TAS değerleri "D" grubunun ortalama TAS değerine kıyasla istatistiksel anlamda yüksek saptanmıştır (p<0,05). "DB" grubu ortalama TAS değeri "D" grubuna göre anlamlı yükseldi (p<0,01) (Tablo 4.2; Şekil 4.2)

Tablo 4.2: Deney gruplarının total antioksidan seviyeleri

		TAS (mmol/L)		
		Ortalama	**Standart Sapma**	**P**
Deney Grubu	K	1,657	0,070	0,007**
	D	1,553	0,054	
	DZ	1,665	0,097	
	DB	1,994	0,537	
	DZB	1,973	0,491	

Kruskal-Wallis H Test; İkili grup karşılaştırmaları için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır; ** p<0,01



Şekil 4.2: Deney gruplarının total antioksidan seviyeleri

(* p<0,05; ** p<0,01; TAS: Total Antioksidan Seviyesi, K: Kontrol grubu, D: Diyabet grubu, DZ: Diyabet + Çinko grubu, DB: Diyabet + Kutu A grubu, DZB: Diyabet + Çinko + Kutu A grubu)

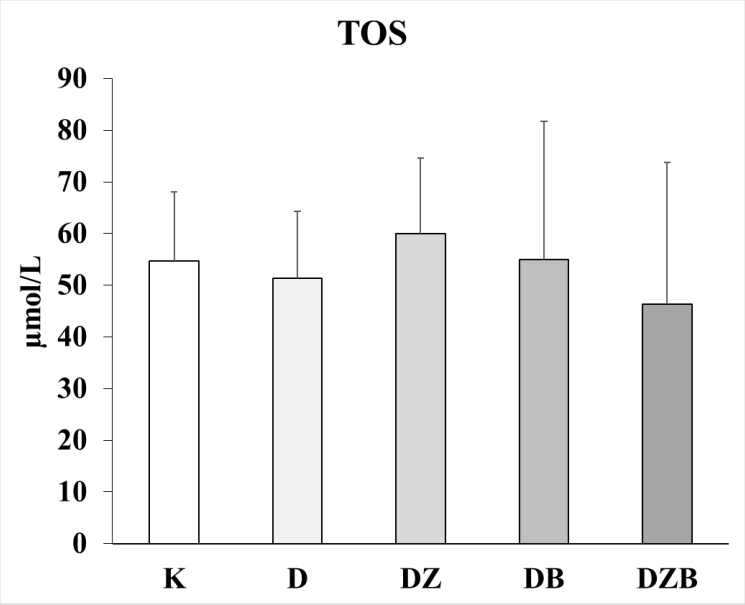
4.2.2. Total Oksidan Seviyelerindeki Değişim

Grupların ortalama TOS değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. "DZB" grubunun ortalama TOS değeri "K", "D" "DZ" ve "DB" gruplara kıyasla belirgin bir azalma gösterse de, bu fark istatistiksel olarak anlamlı seviyeye ulaşmadı (Tablo 4.3; Şekil 4.3).

Tablo 4.3: Deney gruplarının total oksidan seviyeleri

	TOS (mmol/L)			
		Ortalama	**Standart Sapma**	**P**
Deney Grubu	K	54,718	13,324	0,793
	D	51,360	12,933	
	DZ	59,920	14,616	
	DB	54,918	26,744	
	DZB	46,307	27,430	

One Way Anova Test; p<0,05 anlamlılık seviyesinde ilişki anlamlı



Şekil 4.3: Deney gruplarının total oksidan seviyeleri

(TOS: Total Oksidan Seviyesi; K: Kontrol grubu, D: Diyabet grubu, DZ: Diyabet + Çinko grubu, DB: Diyabet + Kutu A grubu, DZB: Diyabet + Çinko + Kutu A grubu)

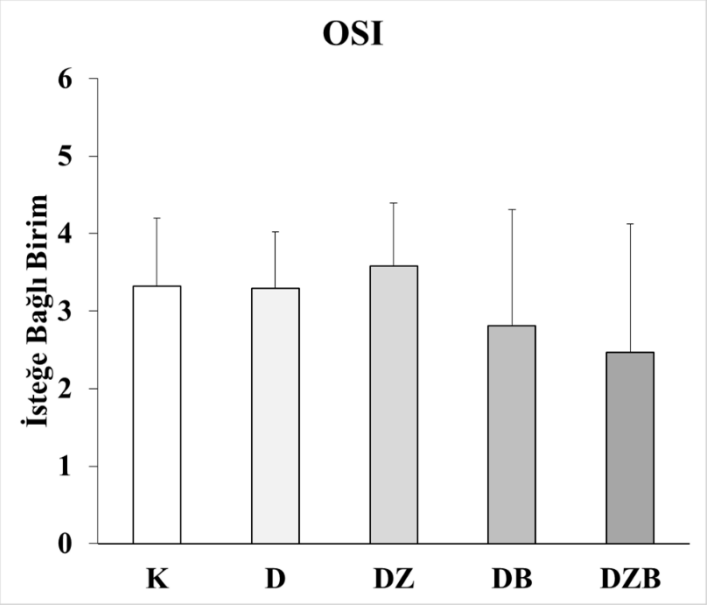
4.2.3. Grupların Oksidatif Stres İndeksi

Oksidatif Stres İndeksi (OSI) TOS'un TAS'a oranına göre hesaplandı. Grupların ortalama OSI değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (p>0,05). "DZB" grubunda OSI değeri belirgin bir azalma gösterse de, bu fark istatistiksel olarak anlamlı seviyeye ulaşmadı (Tablo 4.4; Şekil 4.4).

Tablo 4.4: Deney gruplarının oksidatif stres indeks değerleri

		OSI		
		Ortalama	**Standart Sapma**	**P**
Deney Grubu	K	3,322	0,873	0,463
	D	3,291	0,730	
	DZ	3,584	0,812	
	DB	2,808	1,504	
	DZB	2,472	1,657	

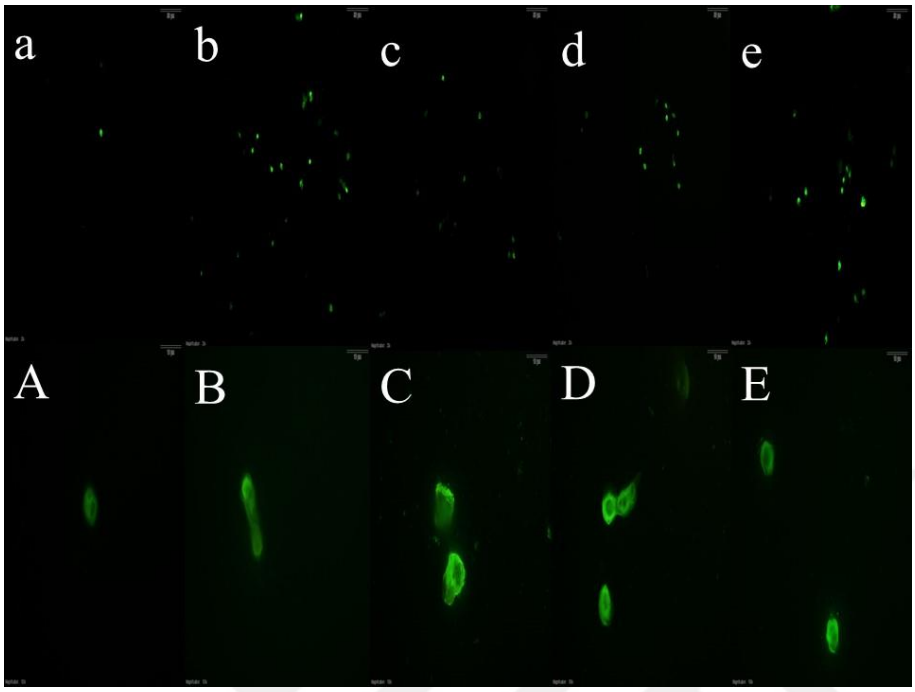
One Way Anova Test; p<0,05 anlamlılık seviyesinde ilişki anlamlı



Şekil 4.4: Deney gruplarının oksidatif stres indeks değerleri

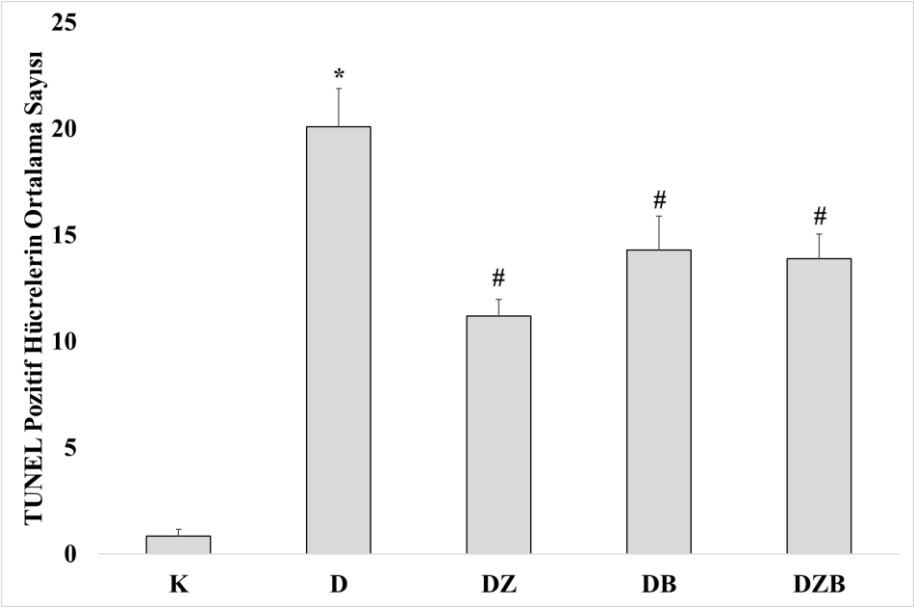
(OSI: Oksidatif Stres İndeksi; K: Kontrol grubu, D: Diyabet grubu, DZ: Diyabet + Çinko grubu, DB: Diyabet + Kutu A grubu, DZB: Diyabet + Çinko + Kutu A grubu)

4.3. APOPTOTİK HÜCRE SAYISI



Şekil 4.5: Çinko ve kutu A takviyelerinin beta hücre apoptozu üzerindeki etkisi

(Kısaltmalar: Küçük harfler: 20x'lik objektif, Büyük harfler: 100x'lik objektif çekimlerdir. A, a: Kontrol; B, b: Diyabet; C, c: Diyabet+Çinko; D, d: Diyabet + Kutu A; E, e: Diyabet + Çinko + Kutu A)



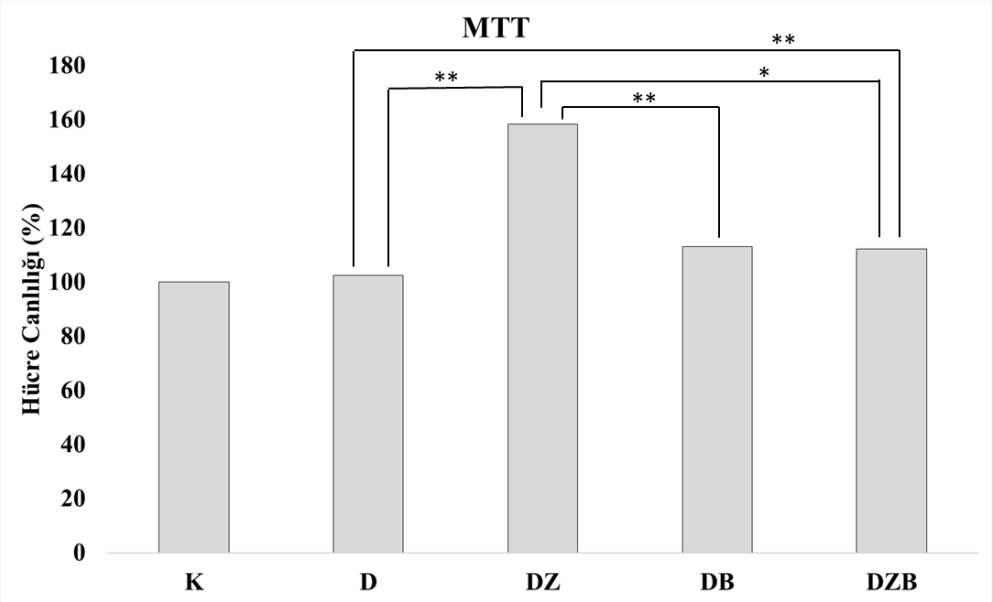
Şekil 4.6: Çinko ve kutu A takviyelerinin beta hücre apoptozu üzerindeki etkisi

(*: "K" grubuna göre p<0,05; #: "D" grubuna göre "DZ" p<0,05, "DB" ve "DZB" p<0,05) (Kruskal-Wallis H Test; İkili grup karşılaştırmaları için Mann-Whitney U testi kullanıldı)

Deney gruplarının tunnel pozitif hücreleri ortalama sayısı “D” grubunda “K” grubuna göre anlamlı derecede yüksek saptandı (*; “K” grubuna göre p<0,01). Tunel pozitif hücrelerin ortalama sayısı “D” grubuna kıyasla “DB”, “DZB” gruplarında p<0,05 düzeyinde ve “DZ” grubunda p<0,01 düzeyinde anlamlı bir azalma gösterdi (#; “D” grubuna göre) (Şekil 4.5; Şekil 4.6)

4.4. HÜCRE CANLILIĞININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Canlı hücre sayısı “D” grubuna kıyasla “DZ” ve “DZB” grubunda anlamlı bir artış gösterdi. “DZ” gurubunda canlı hücre sayısı “DZB” ve “DB” göre anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: Çinko ve kutu A takviyelerinin beta hücre canlılığı üzerine etkisi

(Grafik verileri % cinsinden verilmiştir. Kruskal-Wallis H Test; İkili grup karşılaştırmaları için Mann-Whitney U testi kullanıldı: *p<0,05; **p<0,01)

4.5. İNSÜLİN SALINIM DÜZEYLERİ

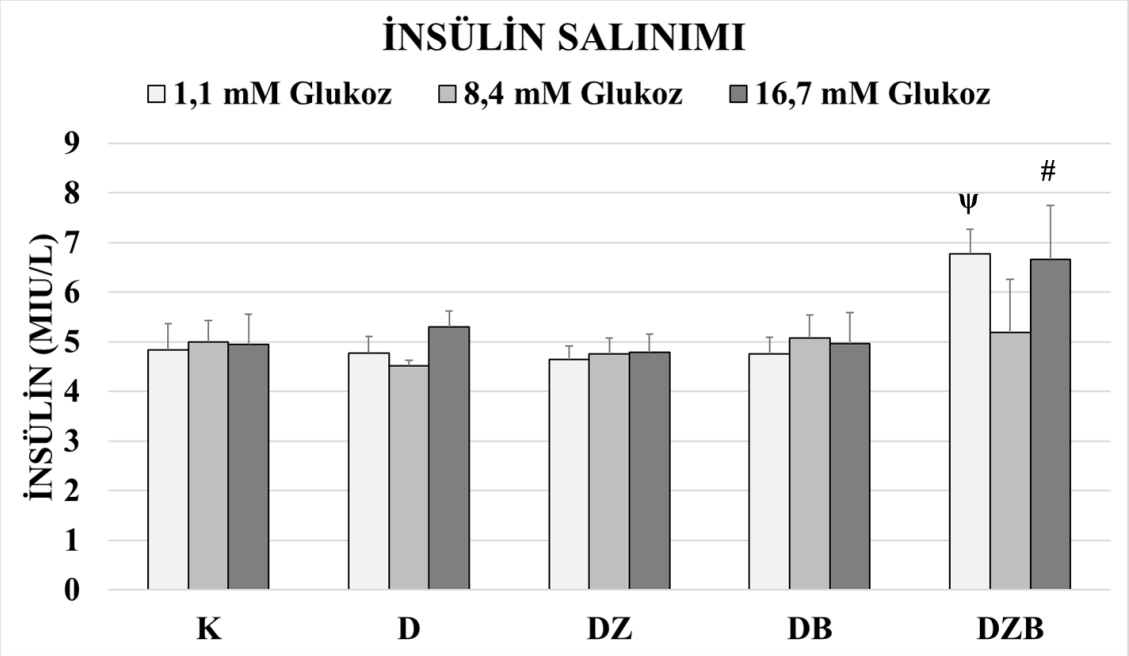
Açlık (1,1 mM glukoz) koşullarında “DZB” grubu ortalama insülin salınım düzeyi “K”, “D”, “DZ” ve “DB” gruplarının ortalama insülin salınım düzeylerine kıyasla anlamlı bir artış gösterdi (p<0,01). Hiperglisemi **(**16,7 mM glukoz) koşullarında “DZB” grubu

ortalama insülin salınımı “K”, “DZ” ve “DB” ortalama düzeylerine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi (p<0,05) (Tablo 4.5; Şekil 4.8).

Tablo 4.5: Deney gruplarının farklı glukoz koşullarında insülin salınım düzeyleri

		Deney Grupları										
		K		D		DZ		DB		DZB		
	Glukoz Kons.	X̄	SS	X̄	SS	X̄	SS	X̄	SS	X̄	SS	P
İnsülin (mIU/L)	1,1 mM	4,840	0,518	4,775	0,330	4,642	0,279	4,753	0,338	6,766	0,500	0,032*
	8,4 mM	4,993	0,438	4,512	0,124	4,751	0,320	5,081	0,452	5,193	1,060	0,064
	16,7 mM	4,954	0,601	5,298	0,319	4,796	0,366	4,964	0,621	6,668	1,081	0,032*

Kruskal-Wallis H Test; İkili grup karşılaştırmaları için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır; * p<0,05



Şekil 4.8: Deney gruplarının farklı glukoz koşullarında insülin salınım düzeyleri

(ψ: “K”, “DZ” ve “DB” grubuna göre p<0,05; #: “K” göre p<0,01; “D”, “DZ” ve “DB” göre p<0,05)

4.6. YÜKSEK HAREKETLİ GRUP PROTEİN 1, ÇİNKO VE KALSİYUM KONSANTRASYONLARI

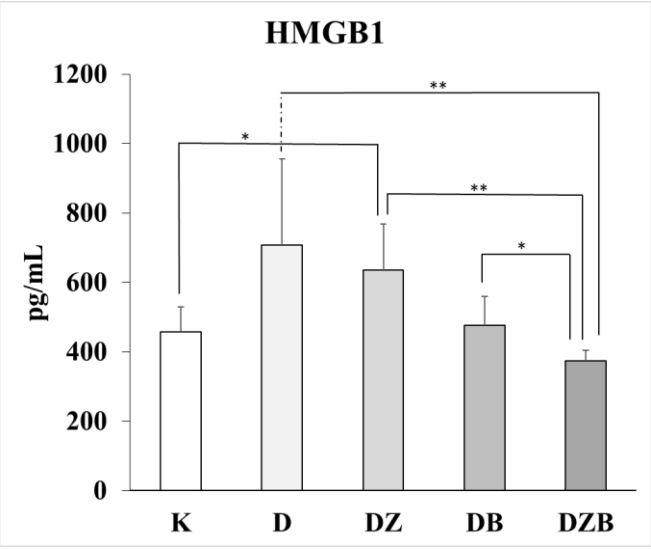
4.6.1. Yüksek Hareketli Grup Protein 1

"DZB" grubunun ortalama HMGB1 değeri ile "D" ve "DZ" grubu ortalama değerleri arasında p<0,01 düzeyinde, "DB" grubu ortalama HMGB1 değeri ile p<0,05 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır. "K" grubu ortalama HMGB1 değeri ile "DZ" grubu ortalama değeri arasında p<0,05 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır (Şekil 4.6; Şekil 4.9).

Tablo 4.6: Deney gruplarının yüksek hareketli grup protein 1 değerleri

		HMGB1 (pg/mL)		
		Ortalama	**Standart Sapma**	**P**
Deney Grubu	K	457,146	72,430	0,006**
	D	707,850	247,695	
	DZ	636,580	131,657	
	DB	476,277	83,154	
	DZB	373,650	30,602	

Kruskal-Wallis H Test; İkili grup karşılaştırmaları için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır; ** p<0,01



Şekil 4.9: Deney gruplarının yüksek hareketli grup protein 1 değerleri

(* p<0,05; ** p<0,01; K: Kontrol grubu, D: Diyabet grubu, DZ: Diyabet + Çinko grubu, DB: Diyabet + Kutu A grubu, DZB: Diyabet + Çinko + Kutu A grubu)

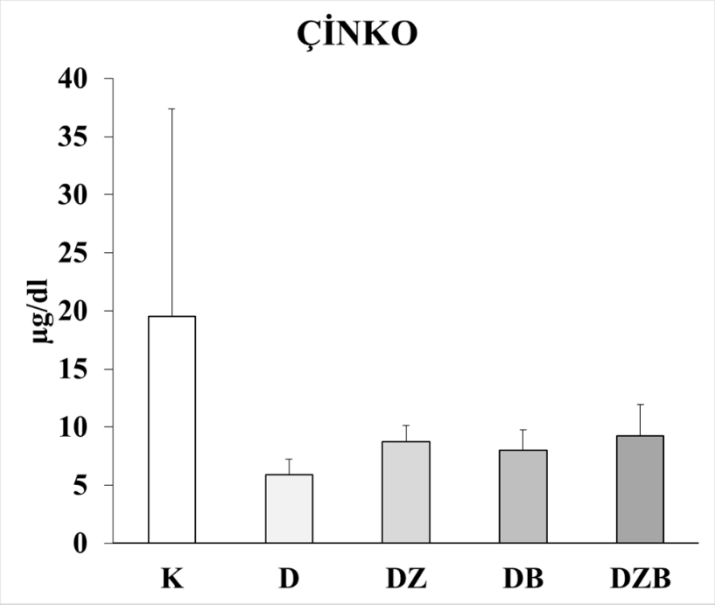
4.6.2. Çinko

Deney gruplarının ortalama çinko değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p>0,05) (Tablo 4.7; Şekil 4.10).

Tablo 4.7: Deney gruplarının çinko değerleri

		Çinko (µg/dl)		
		Ortalama	**Standart Sapma**	**P**
Deney Grubu	K	19,533	17,840	0,088
	D	5,930	1,287	
	DZ	8,740	1,426	
	DB	8,020	1,728	
	DZB	9,228	2,732	

Kruskal-Wallis H Test; p<0,05 anlamlılık seviyesinde ilişki anlamlı



Şekil 4.10: Deney gruplarının çinko değerleri

(K: Kontrol grubu, D: Diyabet grubu, DZ: Diyabet + Çinko grubu, DB: Diyabet + Kutu A grubu, DZB: Diyabet + Çinko + Kutu A grubu)

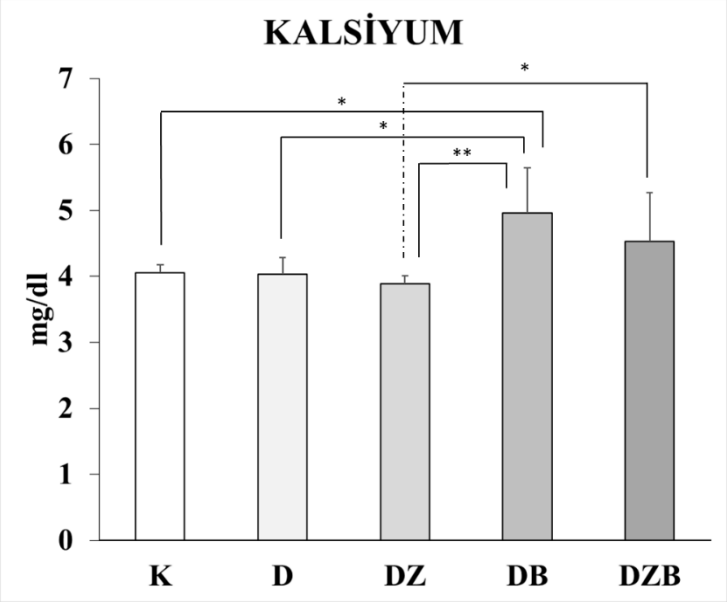
4.6.3. Kalsiyum

"DB" grubu ortalama kalsiyum değeri ile "D" ve "K" grubu ortalama değerleri arasında p<0,05 düzeyinde, "DZ" grubu ortalama kalsiyum değerleri arasından p<0,01 düzeyinde istatistiksel anlamlı bir fark saptanmıştır. "DZB" grubunda ortalama kalsiyum değeri ile "DZ" ortalama değeri arasında p<0,05 düzeyinde istatistiksel anlamlı bir fark saptanmıştır (Tablo 4.8; Şekil 4.11).

Tablo 4.8: Deney gruplarının ortalama kalsiyum değerleri

	Kalsiyum (mg/dl)			
		Ortalama	**Standart Sapma**	**P**
Deney Grubu	K	4,050	0,121	0,006**
	D	4,035	0,250	
	DZ	3,887	0,127	
	DB	4,959	0,688	
	DZB	4,533	0,739	

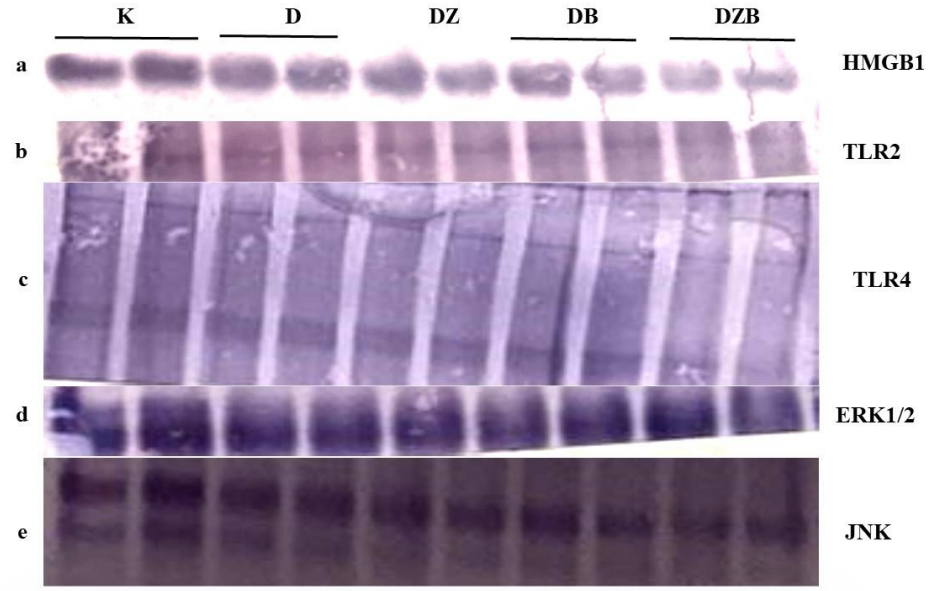
Kruskal-Wallis H Test; İkili grup karşılaştırmaları için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır; ** p<0,01



Şekil 4.11: Deney gruplarının kalsiyum değerleri

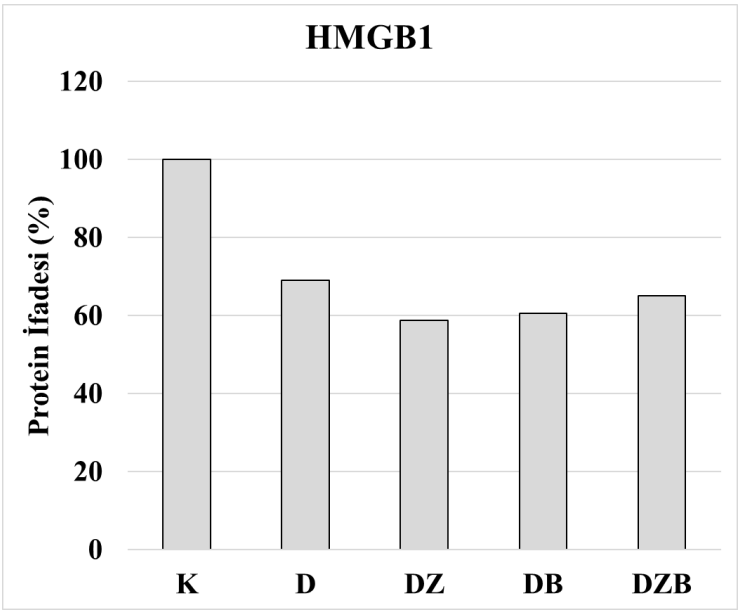
(* p<0,05; ** p<0,01; K: Kontrol grubu, D: Diyabet grubu, DZ: Diyabet + Çinko grubu, DB: Diyabet + Kutu A grubu, DZB: Diyabet + Çinko + Kutu A grubu)

4.7. PROTEİN İFADELERİNDEKİ DEĞİŞİM



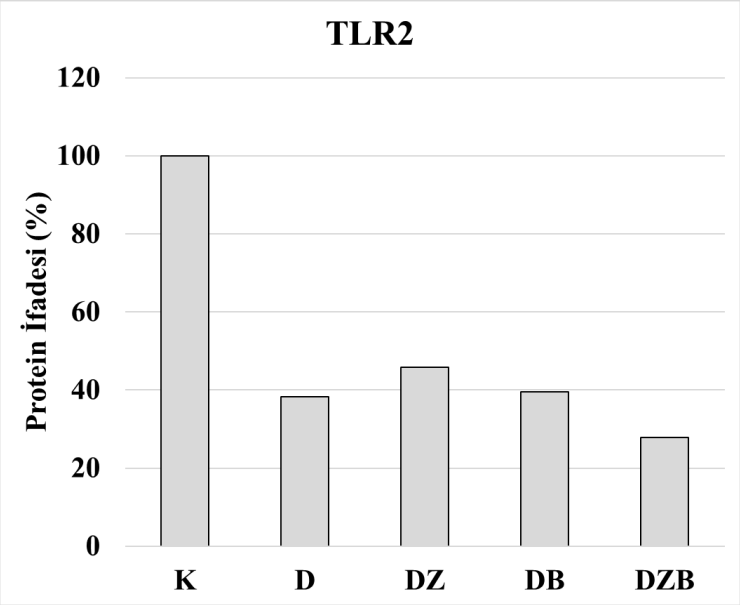
Şekil 4.12: Deney gruplarının bazı protein ifadelerindeki değişim

HMGB1 protein ifadesi "K" grubuna kıyasla "D" grubunda azaldı. "DZ" ve "DB" gruplarında "D" grubuna kıyasla HMGB1 protein ifadesi azaldı. HMGB1 protein ifadesi "DZB" grubunda ise "D" grubuna kıyasla değişiklik göstermedi (Şekil 4.12a; Şekil 4.13).



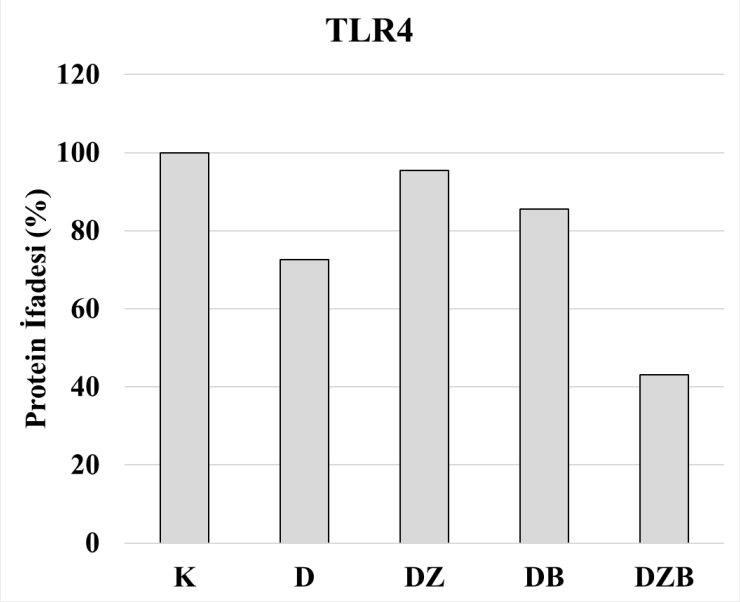
Şekil 4.13: Deney gruplarının HMGB1 protein ifadesindeki değişim

TLR2 protein ifadesi “K” grubuna kıyasla “D” grubunda azaldı. “DZ” grubunda TLR2 protein ifadesi “D” grubuna kıyasla arttı. TLR2 protein ifadesi “D” grubuna kıyasla “DB” grubunda değişiklik göstermezken “DZB” grubunda azaldı. “DZ” grubuna kıyasla TLR2 protein ifadesi “DB” grubunda değişiklik göstermezken “DZB” grubunda azaldı. “DZB” grubunda TLR2 protein ifadesi “DB” grubuna kıyasla değişiklik göstermedi (Şekil 4.12b; Şekil 4.14).



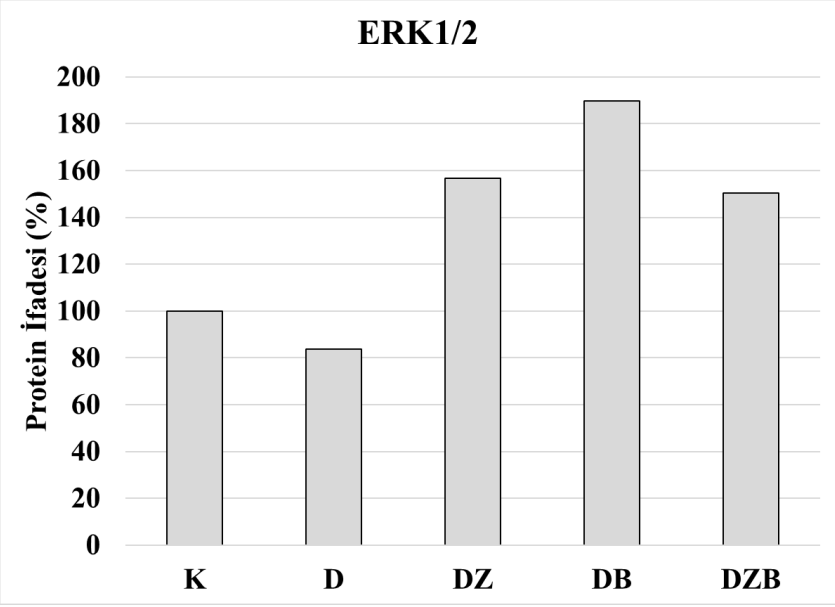
Şekil 4.14: Deney gruplarının TLR2 protein ifadesindeki değişim

TLR4 protein ifadesi “K” grubuna kıyasla “D” grubunda değişiklik göstermedi. TLR4 protein ifadesi “DB” ve “DZB” gruplarında “D” grubuna kıyasla değişiklik göstermedi. “DZ” grubunda ise “D” grubuna kıyasla TLR4 protein ifadesi arttı. TLR4 protein ifadesi “DZ” grubuna kıyasla “DB” grubunda değişiklik göstermezken “DZB” grubunda azaldı. “DZB” grubunda “DB” grubuna kıyasla TLR4 protein ifadesi azaldı (Şekil 4.12c; Şekil 4.15).



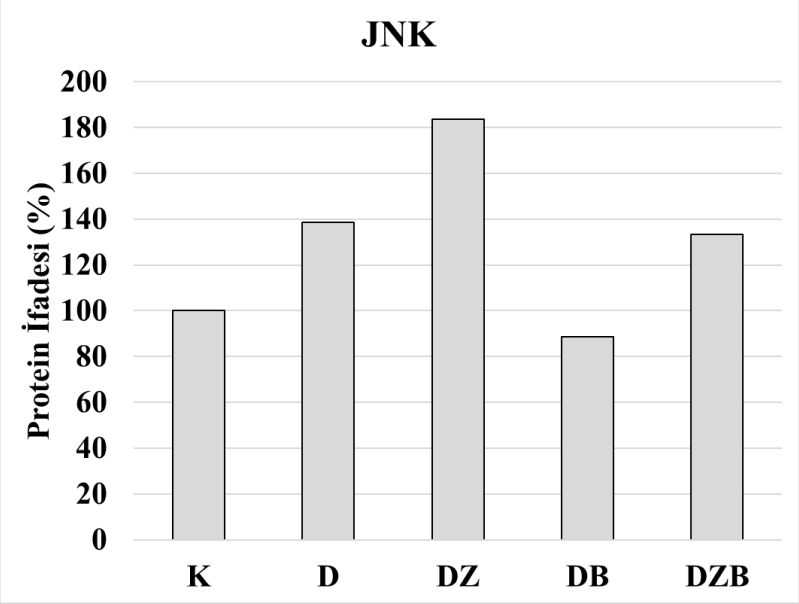
Şekil 4.15: Deney gruplarının TLR4 protein ifadesindeki değişim

ERK 1/2 protein ifadesi "K" grubuna kıyasla "D" grubunda azaldı. "DZ", "DB" ve "DZB" gruplarında "D" grubuna kıyasla ERK1/2 protein ifadesi arttı. ERK1/2 protein ifadesi "DZ" grubuna kıyasla "DZB" grubunda değişiklik göstermezken "DB" grubunda arttı. "DZB" grubunda "DB" grubuna kıyasla ERK 1/2 protein ifadesi azaldı (Şekil 4.12d; Şekil 4.16).



Şekil 4.16: Deney gruplarının ERK1/2 protein ifadesindeki değişim

JNK protein ifadesi “D” grubunda “K” grubuna kıyasla artış gösterdi. “DZ” grubunda “D” grubuna göre JNK protein ifadesi arttı. “DZB” grubunda JNK protein ifadesi “D” grubuna kıyasla değişiklik göstermedi. “DB” grubunda “D” grubuna göre JNK protein ifadesi azaldı. “DZB” ve DB” gruplarında JNK protein ifadesi “DZ” grubuna kıyasla azaldı. “DZB” grubunda “DB” grubuna göre JNK protein ifadesi arttı (Şekil 4.12e; Şekil 4.17).



Şekil 4.17: Deney gruplarının JNK protein ifadesindeki değişim

5. TARTIŞMA

Bu çalışma, çinkonun STZ kaynaklı pankreatik beta hücre toksisitesi üzerindeki etkisinin altında yatan olası hücresel mekanizmalara odaklanmaktadır. Yapılan bu tez çalışmasında elde edilen en önemli bulgular: (i) STZ, pankreas beta hücrelerinde MMP düzeylerini azaltırken, çinko takviyesi sağlıklı kontrol gruplarına kıyasla bu azalmayı önemli düzeyde iyileştirmiştir; (ii) STZ, pankreas beta hücrelerinde TAS düzeylerini önemli ölçüde azaltırken, çinko takviyesi bu azalmayı anlamlı düzeyde geri kazandırmıştır; (iii) STZ, pankreas beta hücrelerinde apoptotik hücre sayısını önemli ölçüde arttırırken, çinko takviyesi ise apoptotik hücre sayındaki artışı önemli ölçüde azaltmıştır; (iv) Çinko takviyesi, pankreas beta hücrelerinde canlı hücre sayısını arttırmıştır; (v) Çinko, STZ'nin pankreas beta hücrelerinde oluşturduğu mitokondriyal işlev bozukluğu ve beta hücre kayıplarındaki artışı tersine çevirerek insülin salınımını arttırmıştır. Çinko takviyesi, hipoglisemik ve hiperglisemik koşullarında insülin sekresyonunu kutu A ile birlikte iyileştirmiştir; (vi) STZ ile indüklenen beta hücre hasarında HMGB1 protein ifadesi azalmıştır. Çinko takviyesi, HMGB1 protein ifadesindeki azalmayı iyileştirmiştir; (vii) STZ, pankreas beta hücrelerinde TLR2 azaltırken, çinko takviyesi TLR2 arttırmıştır. STZ, hücrelerde TLR4 üzerine etkisi olmazken, çinko takviyesi TLR4 arttırmıştır; (viii) STZ, pankreas beta hücrelerinde ERK1/2 protein ifadesini azaltırken, JNK protein ifadesini arttırmıştır. Çinko takviyesi ERK1/2 ve JNK protein ifadesini iyileştirmiştir.

Mitokondriyal membran potansiyeli, proton pompaları tarafından üretilir ve oksidatif fosforilasyon sırasında enerji depolama sürecinin önemli bir bileşenidir. MMP normal seviyelerinin uzun süreli düşüşü veya yükselişi, hücre canlılığında istenmeyen kayıplara ve çeşitli patolojilere yol açabilir (119). Hiperglisemi koşullar, beta hücresinde bazal insulin miktarında artışa ve glukoz bağımlı insulin salınımlarında anlamlı bir azalmaya neden olabilir (181). Mitokondriyal membran potansiyeli hiperpolarizasyonu insan beta hücresinde insulin salgılanması için gereklidir (182). Diyabetik bireylerden alınan pankreas beta hücrelerinde glukoza yanıt olarak insülin sekresyonunun, düşük ATP/ADP oranı ve bozulmuş mitokondriyal membran potansiyeli hiperpolarizasyonu ile azalır (120). Pankreas beta hücrelerinde mitokondriyal disfonksiyon, insülin sekresyonunun bozulmasına ve beta hücre kaybına neden olmaktadır (183). Beta hücreleri ile yapılan bir çalışmada oksidatif hasarın mitokondrilerde değişikliklere yol açarak

normal glukoz metabolizmasına bağlı insülin salgılanmasını engellediği bildirilmiştir (184). Diyabette, ketoasidoza bağlı olarak vücut pH'ının düşmesi, mitokondriyal membran potansiyelinin ve oksijen kullanımının değişmesiyle ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. Mitokondriyal solunum kompleksleri, oksijen metabolizması ve ROT/RNS üretimi nedeniyle kritik bir rol oynayabilir (185). STZ'nin nispeten düşük dozunun INS-1E hücrelerinde mitokondriyal fonksiyonun bir belirteci olan mitokondriyal membran potansiyelini azalttığı bildirilmiştir (186). STZ'nin mitokondriyal solunum enzimleri olan kompleks I, kompleks II/III ve kompleks IV aktivitelerini inhibe ederek mitokondriyal disfonksiyona neden olduğu ve ATP üretimini azalttığı vurgulanmıştır. Ayrıca hücrelerdeki oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyon artışı, apoptozun artmasına neden olmuştur (187). Bu bilgiler ile yapılan tez çalışmasında elde ettiğimiz sonuçlar ile paraleldir. STZ ile indüklenen pankreatik beta hücre hasarında hücrelerin MMP seviyesi sağlıklı kontrol gruplarına kıyasla önemli ölçüde azalmıştır. Çinko takviyesi ise mitokondriyal membran potansiyellerinde anlamlı artış sağlamıştır. MMP ile eşlenik olarak ROT miktarlarıda değişmektedir. Dahası ROT'un düşük ila orta dozlarının hücre döngüsü, farklılaşması, göçü ve ölümü fizyolojik işlevler için gerekli olduğu kabul edilirken, aşırı ROT artışı proteinlere, nükleik asitlere, lipitlere, membranlara ve organellere zarar verir ve bu da apoptoz gibi hücre ölümü süreçlerinin aktivasyonuna yol açabilir (188). Hiperglisemi, beta hücrelerinde ROT üretimine katkıda bulunan potansiyel faktörlerden birisidir. Bazal seviyedeki ROT, insülin sekresyonunda önemli bir rol oynarken, ROT'un aşırı birikmesi oksidatif strese neden olur (189). Hiperglisemi, hücrelerde oksijen tüketen fosforilasyon akışının artmasına neden olur, bu durum mitokondriyal membran potansiyelini kritik bir eşiğin üzerine çıkararak ETZ'nin kompleks III'te tıkanmasına neden olur. Kompleks III'te sıkışıp kalan elektronlar sızıntı yaparak O_2'yi ROT oluşturmak için indirgeyebilir (190-192). Diyabet gelişiminin erken aşamalarında, pankreatik beta hücreleri hiperglisemi veya hiperlipidemiye yanıt vererek insülin sekresyonunu uyarır. Fakat beta hücrelerinin glukolipotoksisiteye bağlı olarak sürekli aşırı uyarılması ROT birikimine ve sürekli insülin salınımına yol açar. ROT birikimi ise membran potansiyelinde düşüşe, mitokondriyal dinamiklerin deregülasyonuna, ATP sentezinin düşmesine ve hücre ölümüne yol açar (193). Beta hücrelerinde STZ sitotoksisitenin ROT/NOS üretimi, lipit peroksidasyonu, DNA hasarı ve GSH/GSSG oranının azalmasıyla ortaya çıktığı gösterilmiştir. Ayrıca STZ'nin ROT üretimini teşvik ederek kaspaz aktivitesini ve beta hücre ölümünü indüklediği

bildirilmiştir (187). Bununla birlikte beta hücreleri yüksek miktarda ROT üretmelerine karşın diğer hücrelere kıyasla süperoksit dismutaz (SOD) izoenzimlerini, Glutatyon Peroksidaz (GPx) ve Katalaz (CAT) enzimlerini düşük miktarda eksprese ettiği bildirilmiştir. Bu da beta hücrelerini oksidatif strese karşı duyarlı hale getirmektedir (194). STZ ile diyabet oluşturulan sıçanların pankreasından izole edilmiş mitokondrilerin membran fraksiyonlarında ROT ürünlerinde önemli bir artış saptanmıştır (195). Çinko takviyesinin fare beta hücrelerinde mitokondriyal oksidatif stresi azalttığı, bunun yanında beta hücrelerinin düşük ve yüksek glukoz konsantrasyonlarında hayatta kalmasını iyileştirdiği gösterilmiştir (196). Çinko takviyesinin pankreas adacıklarında STZ'ye karşı metalotiyonein üretimini önemli ölçüde arttırarak ROT oluşumunu azaltmış olabilir (122,197). Ayrıca, çinko takviyesinin toplam antioksidan kapasitesini ve glutatyon düzeyini önemli ölçüde arttırarak, hücresel oksidatif stresin bir göstergesi olan malondialdehit seviyelerini belirgin şekilde azaltarakta pankreatik beta hücrelerinin sağkalımlarını arttırmış olabilir (16). Buna karşılık yüksek seviyede çinkonun pankreas adacık hücreleri için sitotoksik olduğu ve pankreas adacık hücresi ölümünü arttırdığı bilinmektedir (198,199). Yapılan bu tez çalışmasında, STZ ile indüklenen pankreatik beta hücre hasarında sağlıklı kontrole göre total antioksidan düzeyinde anlamlı bir azalma saptanmıştır. Çinko takviyesi total antioksidan seviyesinde anlamlı bir artış sağlamıştır. Çalışmada total oksidan düzeyinde ve oksidatif stress indeksleri bakımından gruplar arasında bir fark saptanmamıştır. Bu sonuçlar, çinkonun hücreleri koruyarak ve endojen antioksidan miktarını arttırarak bu etkiyi göstermiş olabileceğini düşündürmektedir. Bu durum diyabetiklerin antioksidanlara daha çok ihtiyaç duyduğu anlamına gelmektedir. Pankreatik beta hücrelerinin antioksidan savunmasının düşük olması nedeniyle çinko takviyesi hücre içi antioksidan savunmaya katkı sağlayabileceği kanısındayız.

Diyabette, çinko takviyesinin oksidatif stresle önemli ilişkisi bulunmamaktadır. Zira DM durumunda ortaya çıkan hiperglisemi genellikle idrarla çinko kaybını arttırmaktadır (200,201). Bu kayıp, pankreatik beta hücresinden insülin ekzositozu meydana geldiğinde insülin granülleri plazma zarı ile birleşerek insülinle birlikte önemli miktarda çinkonun hücre dışı boşluğa geçmesiyle ilişkilidir (10). Dolayısıyla, beta hücrelerinin sürekli glukoz ile uyarılması çinko yetersizliğine yol açar (202). Çalışmada, STZ ile indüklenen pankreatik beta hücre hasarında hücrelerin hücre içi çinko konsantrasyonları sağlıklı kontrollere göre azalmış olup bu azalma istatistiksel olarak

anlamlı değildi. Bununla birlikte çinko takviyesi yapılan gruplarda kısmen de olsa hücre içi çinko konsantrasyonunda artma eğilimi gözlemlenmiştir.

İnsülin salınımında önemli bir diğer faktörde hücre içi kalsiyum miktarıdır. Çünkü, beta hücrelerinde kalsiyum sinyal yollarının kısa süreli uyarılması, hücrelerin canlılığı, replikasyonu, insülin üretimi ve salgılanması için gereklidir. Buna karşılık kalsiyum sinyal yollarının sürekli uyarılması beta hücresinde ER stresini ve kayıpları arttırır (203). Beta hücrelerinden insülin salınması sürecinde hücre zarında bulunan voltaja duyarlı kalsiyum kanalları hücre içine doğru yoğun şekilde kalsiyum akışına yol açar, bu da sitozolik kalsiyum konsantrasyonunu arttırarak insülin salgılanmasını uyarır (204). Beta hücrelerinde mitokondriyal ROT, plazma membran depolarizasyonuna, daha sonra kalsiyumun hücre içine akışına ve insülin granül ekzositozuna yol açar. Bununla birlikte sürekli besin uyarımı mitokondrin daha fazla kalsiyum alımını teşvik ederek oksidatif fosforilasyonu hızlandırır (205). Patolojik koşullar altında beta hücresinde yüksek glikoza yanıt olarak anormal kalsiyum dinamikleri mitokondriyal fonksiyonun ve yapının değişmesine katkıda bulunabilir. Bu değişikleri glukoza bağımlı insülin yanıtını ve hücre canlılığını etkileyebilir (206). Çalışmamızda STZ ile indüklenen pankreatik beta hücre hasarında kutu A takviyesi hücre içi kalsiyum konsantrasyonlarında anlamlı bir artış sağlamıştır. Çinko takviyesinin hücre içi kalsiyumu konsantrasyonunu azaltma eğiliminde olduğu saptanmıştır. Çinkonun bu etkisi, voltaj kapılı kalsiyum kanallarını bloke ederek hücre içine doğru yoğun şekilde kalsiyum akışına engelleyerek kalsiyum ve buna bağlı insülin salınımı üzerine olumsuz etki ettiği düşündürmektedir. Muhtemelen kalsiyum miktarındaki düşüş farklı bir faktör tarafından tamponlanmış olabilir. Aslında mevcut sonuçlarımız diğer araştırmacılarının bazılarının sonuçlarıyla uyumludur. Bu çalışmalarda çinkonun pankreas beta hücrelerindeki voltaj kapılı kalsiyum kanallarını bloke ederek insülin salınımını üzerinde inhibitör etkisi olabileceği bildirilmiştir (207,208). Bizim çalışmamızda da kalsiyum miktarı azaldı fakat insülin salınımı artmıştır. İnsülin salınımının arttığını gösteren diğer çalışmalar ile de bulgularımız benzerlik göstermektedir. Literatürde pankreatik beta hücresinin fizyolojik konsantrasyon aralığı içindeki çinko takviyesi insülin salgılanmasını indüklerken, çinko şelasyonunun beta hücrelerinde insülin içeriğini azalttığı rapor edilmiştir (99). Yapılan bu tez çalışmasında da kullanılan 30 μM çinkonun hücre içi fizyolojik konsantrasyonu aralığındadır (209). Tip 2 diyabetli bireylerle yapılan bir çalışmada

çinko takviyesinin glisemik kontrolü, beta hücre fonksiyonunu ve insülin salgısını iyileştirebileceği gösterilmiştir (121). Yapılan bu çalışmada farklı glukoz konsatrasyonlarında (hipoglisemik, normoglisemik ve hiperglisemik) beta hücresinin insülin salınımları tayin edilmiştir. Hipoglisemik ve hiperglisemik koşullarında çinko takviyesinin insülin salınımına herhangi bir etkisi olmazken, çinko ve kutu A'nın birlikte takviyesi insülin sekresyonunda anlamlı düzeyde artış sağlamıştır.

Yapılan bu tez çalışmasında, DM'de meydana gelen patolojik koşullarda HMGB1'in rollünün olabileceği öne sürülmüştü. Çünkü hiperglisemik koşullar altında doğrudan ve dolaylı olarak HMGB1 salınımı artar (164). Yapılan çalışmalarda serum HMGB1 seviyesinin diyabetik olmayanlara kıyasla diyabetik hastalarda aşırı eksprese edildiği gösterilmiştir (20,210,211). Bizim yaptığımız tez çalışmasındada, STZ ile muamele edilen pankreatik hücrelerde HMGB1 miktarı önemli düzeyde artmıştır. Bu proteinin patolojik koşullar altında hücreler arasında haberci bir molekül olarak görev yapmasından kaynaklıdır. Fizyolojik koşullar altında HMGB1 bir nükleer protein olarak hücre içinde bulunurken, hücreler stres altındayken hücre dışı ortama bir sinyal molekülü olarak salgılanabilir (133). HMGB1, hasarlı pankreatik beta hücrelerinden pasif olarak ve adacıklara sızan bağışıklık hücreleri tarafından aktif olarak salgılanabilir. Hücre dışı HMGB1, insülitin ilerlemesine ve diyabetin ortaya çıkmasına katkıda bulunan doğuştan gelen bağışıklık aracı olarak görülmektedir. Dahası, HMGB1'in baskılanmasının farelerde diyabet gelişimini önemli ölçüde inhibe ettiği bildirilmiştir (163). Sepsis koşullarında kutu A proteinin HMGB1 ile indüklenen proinflamatuar sitokin salınımını azaltarak organ hasarı gelişiminden koruduğu vurgulanmıştır (212). HMGB1'i hedeflemenin inflamasyon ve inflamatuar hastalıkların, özellikle sepsis, steril inflamasyon, otoimmün hastalıklar ve kanser tedavisinde başarılı olduğu gösterilmiştir (213). Çalışmamızda STZ ile indüklenen pankreatik beta hücre hasarında HMGB1 konsantrasyonu artmıştır. Çinko ve kutu A'nın birlikte takviyesi HMGB1 konsantrasyonunu önemli ölçüde azaltmıştır. HMGB1 protein ifadesi diyabet grubunda sağlıklı kontrollere göre azalmıştır. Bu azalmanın muhtemelen hücre içi HMGB1'in hücre dışına salınımının artmasından kaynaklıdır. Bu bilgiler literatürdeki bilgilerle desteklenmektedir. Ayrıca çinko ve kutu A, HMGB1 protein ifadesini eşdeğer miktarda azaltmıştır. İlginç bir şekilde çinko ve kutu A birlikte takviyesi HMGB1 protein ifadesi üzerinde bir etki yapmamıştır. Hasarlı hücrelerden HMBG1 salınarak konsantrasyon artmıştır. STZ'nin beta hücrelerinde oluşturduğu hasar,

hücrelerin HMGB1 protein ifadesi yeteneğini sınırlamış olabilir. Bu farklılığın birçok nedeni olabilir. Bu tez araştırmasında bu yolaklardan sadece bir tanesi üzerinden karmaşık olan bu sistem açıklanmaya ve yeni tedavi yolları için ip uçları aranmaya çalışılmıştır. Alternatif olarak ferroptotik hücre yolağının önemini bu kısımda belirtmekte fayda vardır. Ferroptoz yakın zamanda, DM gibi çeşitli patolojik durumlarda rol oynayan, apoptotik olmayan, demire bağımlı bir hücre ölüm mekanizması olarak tanımlandı. Adacık izolasyonu ve nakli bağlamında da bu hücre yolağının önemine dair ilk kanıtlar bulunmaktadır (214). Çeşitli in vivo ve in vitro çalışmalar, deneysel diyabet modellerinde ferroptotik belirteçlerdeki belirgin değişikliklerin gözlemlenmesiyle desteklenen, ferroptozun beta hücre ölümü ve insülin direnci ile ilişkisini vurgulamıştır. Fakat, ferroptotik hücre ölümü yolunun diyabetik patogenez üzerindeki etkisi hala belirsizdir (215). Çinko ve manganez, benzer fizikokimyasal özellikler ve ortak emilim yolları nedeniyle demir emilimini engelleyebilir. Manganezde görülen bu yarışmalı inhibitor etkinin çinko sahip olmadığı bildirilmektedir (216). HMGB1 hepsidin adı verilen demir metabolizmasını düzenleyen hormonun salınımını da arttırmaktadır. Demir birikimi son yıllarda yeni tanımlanan programlanmış hücre ölüm yolağı olan ferroptoz için elzemdir (217). Çalışmamız bu yolakları araştırmak için dizayn edilmedi fakat ileri ki zamanlarda bu yolakları içine alacak şekilde yeni çalışmaların dizayn edilmesi için yol gösterici olabilir.

Fare insülinoma hücreleriyle yapılan bir çalışmada pankreas beta hücrelerinde artan glukoz seviyelerinin insülin salınımını ile birlikte TLR4 ekspresyonunu arttırdığını, ayrıca TLR4 ekspresyonunun hücre canlılığı, insülin içeriği ve salgısını azalttığı ileri sürülmüştür (218). İnsan ve fare beta hücrelerinde TLR2 ve TLR4 reseptörlerinin birlikte baskılanmasının, beta hücrelerinin yüksek enerjiye bağlı beta hücre replikasyonunu teşvik ettiği ve hiperinsülinemiyi desteklediği gösterilmiştir (219). Genel kanı DM'de TLR2 protein ifadesinin artışı olmasına rağmen, azaldığını gösteren çalışmalarda vardır. TLR2 miktarının azalmasının önemi, mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olmasına rağmen immün hücreleri baskılama yeteneğinde gizlidir (220). Dolayısıyla TLR2 miktarının azalması immün sistem aktivasyonu anlamına gelmektedir ki DM'in otoimmün bir hastalık olduğu bilgisiyle paralellik göstermektedir. Ayrıca tip 2 DM'li hastalarda TLR2 pozitif monosit hücre sayısının az olduğu ve glisemik kontrolün bu hasta grubunda zayıf olduğu da bildirilmektedir. Yine aynı çalışmada TLR2 plazma seviyesinin

tip 2 DM'li hastalarda daha düşük, in vitro deneylerde ise yüksek glukoz koşullarında TLR2 ifadesinin az olduğu da belirtilmiştir. Dahası in vitro çalışmada, karşılık gelen ligandlarla TLR4 etkileşiminin ancak pankreatik beta hücre apoptozuna yol açtığı, TLR2 etkileşiminin yol açmadığı gösterilmiştir (220,221). Meksika'da ve Çin'de TLR2 gen polimorfizm ile tip 2 DM arasında pozitif kolerasyonun olduğu bilgisi bu savımızı güçlendirmektedir (220-223). Benzer şekilde, Ülkemizde yapılan bir çalışmada da benzer sonuç elde edilmiştir (224). Yapılan bu tez çalışmasında, TLR2 protein ifadesi STZ ile indüklenen pankreatik beta hücre hasarında kontrol grubuna göre azalırken, TLR4 değişim yoktu. STZ ile indüklenen pankreatik beta hücre hasarında çinko takviyesi TLR2 ve TLR4 protein ifadesinde artış sağlarken, kutuA takviyesinin her iki protein ifadesinde etkisi olmamıştır. Fakat muhtemelen iki ajanın sinerjik etkisi ile çinko ve kutu A birlikte takviyesi TLR2 protein ifadesinde artış sağlarken, TLR4 ifadesinde değişiklik yapmamıştır. Protein ifadelerinde ki değişim baz alınarak, TLR2 ve TLR4 STZ kaynaklı DM'de asıl etkinin, baskın olanın TLR2 reseptörü üzerinden meydana geldiği anlaşılmaktadır. Ülke topraklarımızın çinkodan yoksun olduğu (29) ve "DZ" grubunda TLR2 protein ifadesinde artış yaptığı bilgileri ilişkilendirildiğinde yapılan tez çalışmasının önemi daha da anlaşılabilecektir.

Mitojenle aktive olan protein kinazlar (MAPK'ler) TLR ailesinin hücre içi sinyal yolağında yer alır (225), hücre dışı sinyalleri hücre içine ileterek hücre çoğalmasını, farklılaşmasını, hareketliliğini ve hayatta kalması gibi çeşitli hücresel olayları düzenler (226). ERK1/2, hücre adezyonu, hücre döngüsünün devamlılığı, hücre göçü, hücrenin hayatta kalması, farklılaşması, metabolizması, çoğalması ve transkripsiyon dahil olmak üzere çok çeşitli süreçlerin düzenlenmesine katılır (227). ERK1/2'nin aktivasyonu genellikle hücrenin hayatta kalmasını destekler, ancak belirli koşullar altında ERK1/2 proapoptotik fonksiyonlara sahip olabilir (228). MIN6 ve izole fare pankreatik hücreleri ile yapılan bir çalışamada ERK1/2 ekspresyonun glukoz tarafından tetiklenen bir sinyal yolunu modüle ederek pankreas beta hücrelerinin hayatta kalmasında anahtar rol oynadığı vurgulanmıştır (229). Bir çalışmada fare insülinoma hücrelerinde IFN-γ tarafından uyarılan mitokondriyal apoptotik yolağının AMPK ve ERK1/2 sinyal moleküllerinin aktivasyonu ile inhibe edilebildiği bildirilmiştir (230). Beta hücreleri ile yapılan başka bir çalışmada ERK1/2 aktivasyonun proapoptotik protein olan Bad'in fosforile olmasına ve inaktivasyonuna yol açarak beta hücrelerini apoptoza karşı koruyabildiği gösterilmiştir (231). STZ ile indüklenen apoptotik hücre

modelinde sinamik asidin nikotinamid ile kombinasyonunun ERK1/2 yolunu hedef alarak hücrelerin hayatta kalma etkilerini ortaya koymuşlardır (232). İn vivo ve in vitro olarak gerçekleştirilen başka çalışmada dracorhodin perchlorate adlı bitkisel bir pigmentin glikolipotoksisitenin neden olduğu beta hücre fonksiyon bozukluğuna ve apoptozunu Erk1/2'in ER stresi ve mitokondrial yolları etkileyerek beta hücre apoptozunu önemli ölçüde inhibe edebildiği ve aynı zamanda insülin salgısını iyileştirebildiği gösterilmiştir (233). Yüksek enerjili batı tipi bir diyet tüketimi, periferik insülin direncini telafi etmek amacıyla hafif bir adaptif beta hücre proliferasyonunu tetikler. Bu bağlamda temel mekanizmanın belirlenmesi üzere yapılan bir çalışmada insan ve fare beta hücrelerinde TLR2 ve TLR4 reseptörlerinin birlikte baskılanmasının Erk1/2 aktivasyonuna bağlı olarak çekirdekte hücre döngüsü düzenleyicileri olan siklin D2 ve Cdk4'ü artmıştır. ERK1/2'nin beta hücre proliferasyonunu teşvik ettiği ve hiperinsülinemiyi desteklediği vurgulanmıştır (219). Diğer taraftan ERK1/2'in glukoz yoksunluğu koşullarında kanser hücrelerinin hem içsel hem de dışsal apoptoz yolları ile pro-apoptotik etkisi de bildirilmiştir (234) . TLR2 yolağı ERK sinyalini düzenler (235,236). TLR2 proanjiyojenik sitokin salgısını arttırarak yara iyileşmesini sağladığına dair kanıtlar mevcuttur. Dahası TLR ligandları saç teli kaybı, yanma, travma gibi bazı patolojileri tedavi amaçlı kullanılabilir. TLR2 oksidatif stres ve doku rejenerasyonu arasındaki ortak bağlantıda aktif rol oynayabileceği de belirtilmektedir (237). Bu tez çalışmasında da STZ TLR2 protein miktarını azaltırken, ERK1/2 protein ifadesinde de benzer değişim yaptığı bulunmuştur. Bu bulgu ile STZ pankreatik beta hücrelerde hasarı TLR2/ERK1/2 yolağı aracılığıyla yaptığı çinko takviyesinin TLR2/ERK1/2 yolağındaki bu proteinlerin artmasını sağlayarak DM'e karşı koruyucu olabileceği düşünülmektedir. TLR'ler TIR domani üzerinden MAPK ve NF-κB aktivasyonu sağlayan ortak yola sahiptir. TLR2 ve TLR4 ortak yola sahip olmalarına rağmen farklı etkilere sahip olabileceğine dair bilgiler mevcuttur (238). Protein Kinaz C (PKC)-α TLR2 ekspresyonunu etkilerken, PKC-δ TLR4 ekspresyonunu etkilediğine dair sonuçlar bulunmaktadır (239). Çalışmamızda STZ ile indüklenen pankreatik beta hücre hasarında sağlıklı kontrollerine göre ERK1/2 protein ifadesi azalmıştır. Çinko ve/veya kutu A takviyesi ERK1/2 protein ifadesini arttırdığı gözlemlenmiştir. STZ pankreatik beta hücre hasarını, MAPK'nın diğer bir üyesi olan c-Jun N-terminal kinaz (JNK) üzerinden yaptığına kanısına varılmıştır. JNK, memeli hücrelerinde çevresel stres,

proinflamatuar sitokinler ve mitojenik uyaranlarla aktive edilir. Biyokimyasal ve genetik çalışmalar, JNK'nin birçok transkripsiyon faktörünün aktivitesini düzenlediğini ve JNK yolunun, inflamatuar yanıtların, hücre çoğalmasının ve apoptozun düzenlenmesi için gerekli olduğunu göstermektedir (240). Diyabetik pankreatik beta hücrelerinde insülin gen transkripsiyonunun ve sekresyonunun oksidatif stress altında baskılandığı gösterilmiştir. JNK'nın aktive olması beta hücrelerinde oksidatif stres ile insülin gen ekspresyonunun azaltılmasında önemli rol almıştır. JNK'nın baskılanması ise insülin gen ifadesini ve salgısını oksidatif stresten koruduğu bildirilmiştir (241). Başka bir çalışmada pankreas beta hücrelerinde hiperlipidemi ile ROT üretiminin JNK aktivasyonuna yol açarak disfonksiyona neden olduğu bildirilmiştir. Beta hücrelerinde JNK baskılanmasının glukoza bağlı insülin sekresyonunu ve insülin mRNA seviyelerini önemli ölçüde arttırmıştır (242). Çalışmada STZ ile indüklenen pankreatik beta hücre hasarında sağlıklı kontrollere göre JNK protein ifadesini artmıştır. Çinko takviyesi, JNK protein ifadesini arttırırken, kutu A'nın takviyesi JNK protein ifadesini azaltmıştır. Çinko ve kutu A'nin birlikte takviyesi ise JNK protein ifadesinde azalma yapmıştır.

Çalışmalarda HMGB1 ile çinko arasında bir ilişkinin olabileceği ifade edilmektedir (21-24). HMGB1 ve çinko bağlantılı çalışmalar az olmakla birlikte, Siddigui ve ark. (21) yaptıkları çalışmada, sepsiste HMGB1'in güçlü inflamatuar etkilerinin fizyolojik pH'ta plazma sialoglikoproteinler tarafından tutularak kontrol altına alındığını, fakat sepsisin geç aşamalarında ortaya çıkan düşük pH ve düşük çinko seviyelerinde tetiklendiğini saptamıştır. Çinkonun HMGB1'in sialoglikoproteinle birleşmesinde güçlü bir rolü olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte çinkonun HMGB1'in dimer veya tetramer oluşumunda rol oynadığı vurgulanmıştır. Anggayasti ve ark. (26) çinkonun HMGB1 tetramerlerinin oluşumunu teşvik ettiğini saptamışlardır. HMGB1 tetramerlerinin RAGE ve TLR bağlanarak inflamatuar tepkileri destekleyebileceği düşünülmüştür. Başka bir çalışmada tip 1 diyabet insidansı ile çinko arasında negatif ilişki olduğu ortaya konmuştur. Çinkonun diyabet hastalığının başlangıcına karşı olası koruyucu bir rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (27). HMGB1'in TLR üyelerinden TLR2, TLR4 ve TLR9 ile etkileşime girebilmektedir. HMGB1'in bu üç TLR aracılığıyla MyD88 bağımlı yolu aktive ederek NF-κB ve interferon düzenleyici faktör yollarını uyarır (146,154-156). Diyabetik fare modelinde izole beta hücrelerinde HMGB1 ekspresyonunun arttığı saptanmıştır. Beta hüclerinin ana reseptörünün TLR4 olduğu ve HMGB1'in beta hücrelerine seçici olarak hasar vermek

için TLR4 aracılığıyla sinyal verebileceği ileri sürülmüştür (157). Bu çalışmada hem TLR4 hem de TLR2 protein ifadelerine bakıldı. STZ hasarında asıl hasarın TLR2 üzerinden bu yolağın azalması aracılığıyla olabileceği sonucuna varılmıştır. Bu sonuç ile litratürde mevcut kanıtlar ile desteklenmektedir. Yapılan bir çalışmada, yüksek yağlı diyete bağlı obezitenin, pankreas beta hücrelerinde TLR4'ü arttırdığı ve ardından pankreas adacığına makrofajın toplanmasına yol açtığı ve bunun sonunda pankreas beta hücresi fonksiyon bozukluğuna yol açtığı gösterilmiştir (243). Diyabetik farelerde ve glikolipotoksik koşullara maruz bırakılan MIN6 hücrelerinde laykopenin hem diyabetik farelerde hem de MIN6 hücrelerinde inflamasyonla pozitif ilişkili olan TLR4/MyD88/NF-κB sinyal yolağını düzenleyerek adacık fonksiyonunu, apoptozu iyileştirdiği ve hiperglisemi ile dislipidemiyi hafiflettiği gösterilmiştir (244). İsviçre albino farelerinde TLR4/ROT/NF-κB yolu'nun inflamasyonun, oksidatif stresin ve pankreatik hücre ölümünün başlatılmasında kritik bir rol oynadığı ileri sürülmüştür (245). INS-1 beta hücrelerinin palmitat ile muamelesinde TLR4/MyD88 etkileşimini artarak fosfo-JNK seviyesinde bir artışa ve inhibitör faktör kappa B alfa (IκBα) düzeyinde azalmaya neden olmuştur. Ayrıca JNK inhibitörünün, palmitat kaynaklı INS-1 hücre ölümüne karşı önemli ölçüde koruma sağlarken, IκB kinaz (IKK) inhibitörünün bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (221). Çalışmamızda TLR4'ün baskılanmasının beta hücre ölümünü önlerken "DZ", "DB" ve "DZB" gruplarında TLR2'nin miktarında ufak artışların bile hücre sağkalımını arttırdığı bulunmuştur. Bu sağkalım Erk1/2 miktarının artışı, JNK'ın azaltılması ile ilişkili bulunmuştur. Fakat literatürde DM'in her iki TLR reseptörü ile ilişkisinin olabileceği de belirtilmektedir. Örneğin, tip 2 diyabetli bireylerde sağlıklı kontrollerine göre monositlerinde TLR2 ve TLR4 proteinleri önemli ölçüde yüksek olduğu saptanmıştır. HMGB1 seyiyesinin TLR2 ve TLR4 ile pozitif korelasyon göstermiştir. Ayrıca TLR-MyD88-NF-$_k$B sinyali, sitokin seviyelerindeki artışla ilişkilendirilmiştir (210). Sağkalım ve ölüm yolakları arasında kompleks etkileşimlerin pankreatik beta hücrelerin temel görevi olan insülin salınımına etkisi de araştırılmıştır. STZ insülin salınım fonksiyonunda kayıplara neden olurken, çinko, kutu-A ve kombinasyon tedavileri insülin salınım fonksiyonunu iyileştirmiştir. Hatta "DZB" deki kombinasyon tedavisi çinko ve kutu-A nın sinerjetik etkiye sahip olduğu anlaşılmaktadır. Elde edilen bu bilgiler literatür ile desteklenmektedir. Örneğin, INS-1 hücrelerinde düşük glukoz konsantrasyonda HMGB1'in doza bağlı insulin salgısında önemli bir artış sağlarken, yüksek glukoz

konsantrasyonunda insulin salgısını etkilemediği gösterilmiştir. Ayrıca HMGB1'in INS-1 hücrelerinde kalsiyumu artırmada etkili olduğu bildirilmiştir (246). Tam tersi HMGB1'in inhibisyonunun olumsuz etkiye sahip olduğunu gösteren çalışma da mevcuttur. Bunlardan bir tanesi, kültüre edilmiş fare beta hücrelerinin, kültür ortamından önceden var olan HMGB1'in çıkarılmasının hücrelerin canlılığı ve fonksiyonu üzerinde olumsuz bir etki oluşturduğu ve pankreas beta hücrelerinin insülin salgılama işlevinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (247).

Tip 1 ve tip 2 diyabete neden olan temel mekanizma fonksiyonel beta hücre kütlesinin kaybıdır. Diyabet gelişiminin yavaşlatılması veya önlenmesi, ayrıca beta hücre replasman tedavilerinde geliştirilen yöntemlerin başarılı olması için beta hücre apoptoz yolaklarını yavaşlatan ve hatta önleyen terapötik uygulamaların geliştirilmesi önemlidir. Çalışmada elde edilen verilere göre çinko takviyesi özellikle TLR2/MAPK protein ifadelerinde önemli artışlar sağlayarak apoptotik hücre ölümlerinin azalması ile insülin salınımını arttırmıştır. Çinko takviyesi HMGB1/TLR/MAPK metabolik yolağı üzerinden beta hücresinin sağkalımını arttırarak insülin salınımı iyileştirebilir.

Çalışmamızda HMGB1/TLR/MAPK metabolik yolağına odaklanılmıştır. Hücre içi antioksidan enzimlerin ve apoptotik proteinlerin analizi yapılamamıştır. Bu çalışmada beta hücresi toplam antioksidan seviyesi ve apoptotik hücre sayısı ölçümleri yapılmıştır. Literatür incelendiğinde çinkonun HMGB1 üzerinden diyabetin beta hücreleri üzerine koruyucu etkisini ve bunun mekanizmasını araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanılmamış olup çalışmamız bu konuda yapılan ilk araştırmadır. Çalışma verileri çinko takviyesinin DM tedavisinde tamamlayıcı veya destekleyici bir yaklaşım olarak değerlendirilmesi için umut verici sonuçlar sağlamıştır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yapılan bu tez çalışmasının verilerine göre;

- STZ ile indüklenen pankreatik beta hücre hasarında hücrelerin MMP seviyesi sağlıklı kontrol gruplarına kıyasla önemli ölçüde azalmıştır. Çinko takviyesi ise mitokondriyal membran potansiyellerinde anlamlı artış sağlamıştır.
- STZ ile indüklenen pankreatik beta hücre hasarında sağlıklı kontrole göre total antioksidan düzeyinde anlamlı bir azalma saptanmıştır. Çinko takviyesi total antioksidan seviyesinde anlamlı bir artış sağlamıştır. Çinkonun hücreleri koruyarak ve endojen antioksidan miktarını arttırarak bu etkiyi göstermiş olabilabileceğini düşündürmektedir.
- Çalışmada STZ ile indüklenen pankreatik beta hücre hasarında HMGB1 konsantrasyonu artmıştır. Çinko ve kutu A'nın birlikte takviyesi HMGB1 konsantrasyonunu önemli ölçüde azaltmıştır.
- HMGB1 protein ifadesi diyabet grubunda sağlıklı kontrollere göre azaldı. Bu azalma muhtemelen hücre içi HMGB1'in hücre dışına salınımının artmasından kaynaklıdır. Ayrıca çinko ve kutu A, HMGB1 protein ifadesini eşdeğer miktarda azaltmıştır. STZ'nin beta hücrelerinde oluşturduğu hasar, hücrelerin HMGB1 protein ifadesi yeteneğini sınırlamış olabilir. Bu farklılığın birçok nedeni olabilir. Bu tez araştırmasında karmaşık olan bu sistem açıklanmaya ve yeni tedavi yolları için ip uçları aranmaya bu yolaklardan sadece bir tanesi üzerinden çalışılmıştır. Bu nedenle ferroptotik hücre yolağı gibi farklı mekanizmaların incelendiği yeni çalışmaların dizayn edilmesine ihtiyaç vardır.
- TLR2 protein ifadesi STZ ile indüklenen pankreatik beta hücre hasarında kontrol grubuna göre azalırken, TLR4 değişim yoktu. STZ ile indüklenen pankreatik beta hücre hasarında çinko takviyesi TLR2 ve TLR4 protein ifadesinde artış sağlarken, kutuA takviyesinin her iki protein ifadesinde etkisi olmamıştır. Fakat muhtemelen iki ajanın sinerjik etkisi ile çinko ve kutu A birlikte takviyesi TLR2 protein ifadesinde artış sağlarken, TLR4 ifadesinde değişiklik yapmamıştır. Protein ifadelerinde ki değişim baz alınarak, TLR2 ve TLR4 STZ kaynaklı DM'de asıl etkinin, baskın olanın TLR2 reseptörü üzerinden meydana geldiği anlaşılmaktadır.

- STZ, TLR2 protein miktarını azaltırken, ERK1/2 protein ifadesinde de benzer değişim yaptığı bulunmuştur. Bu bulgu ile STZ pankreatik beta hücrelerde hasarı TLR2/ERK1/2 yolağı aracılığıyla yaptığı çinko takviyesinin TLR2/ERK1/2 yolağındaki bu proteinlerin artmasını sağlayarak DM'e karşı koruyucu olabileceği düşünülmektedir.
- STZ ile indüklenen pankreatik beta hücre hasarında sağlıklı kontrollere göre JNK protein ifadesini artmıştır. Çinko takviyesi, JNK protein ifadesini arttırırken, kutu A'nın takviyesi JNK protein ifadesini azaltmıştır. Çinko ve kutu A'nin birlikte takviyesi ise JNK protein ifadesinde azalma yapmıştır. STZ pankreatik beta hücre hasarını JNK üzerinden yaptığı kanısına varılmıştır.
- Çalışmada TLR4'ün baskılanmasının beta hücre ölümünü önlerken "DZ", "DB" ve "DZB" gruplarında TLR2'nin miktarında ufak artışların bile hücre sağkalımını arttırdığı bulunmuştur. Bu sağkalım Erk1/2 miktarının artışı, JNK'ın azaltılması ile ilişkili bulunmuştur.
- STZ, insülin salınım fonksiyonunda kayıplara neden olurken çinko, kutu A ve kombinasyon tedavileri insülin salınım fonksiyonunu iyileştirmiştir. Hatta "DZB" deki kombinasyon tedavisi hipoglisemik ve hiperglisemik koşullarda çinko ve kutu A'nın sinerjik etkiye sahip olduğu anlaşılmaktadır.

Bu çalışmada elde ettiğimiz veriler, DM'ye bağlı apoptozis yolaklarının hücre ölümü ve insülin salınımı mekanizmalarında çinkonun etkileri hakkında literatürde bu konudaki açığı kapatmaya yönelik bilgiler barındırmaktadır. Çinko takviyesi, ülkemizde ve dünyada prevalansı artmakta olan ve komplikasyonlarına bağlı yaşam kalitesini düşüren diyabetin etkilerini basit, kullanımı kolay, ucuz alternatif bir tedavi yöntemi olarak hem bilime hem de ülke ekonomisine katkı potansiyeline sahip olması açısından önemlidir. Elde edilen veriler ile moleküler hedefler doğrultusunda DM hastalarının tıbbi beslenme tedavisine ek olarak diyet çinko içeriğinin arttırılmasının ve/veya çinko takviyesinin kullanılmasının bireylerin yaşam kalitesini artırabileceği öngörülmekte olup yapılacak deneysel ve klinik çalışmalarla sonuçların desteklenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Alphan, M.E. (2013). Diabetes Mellitus ve Beslenme Tedavisi. İçinde Alphan, M.E. (Ed.), *Hastalıklarda Beslenme Tedavisi*. Ankara: Hatipoğlu Yayınları; 415-507.
2. Turner, R. C., Cull, C. A., Frighi, V., & Holman, R. R. (1999). Glycemic control with diet, sulfonylurea, metformin, or insulin in patients with type 2 diabetes mellitus. Progressive requirement for multiple therapies (UKPDS 49). *Journal of the American Medical Association*, *281*(21), 2005-2012.
3. Lin, X., Xu, Y., Pan, X., Xu, J., Ding, Y., Sun, X., Song, X., Ren, Y., & Shan, P. F. (2020). Global, regional, and national burden and trend of diabetes in 195 countries and territories: an analysis from 1990 to 2025. *Scientific Reports*, *10*(1), 14790.
4. Cole, J. B., & Florez, J. C. (2020). Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications. *Nature Reviews Nephrology* 16(7), 377-390.
5. Association, A. D. (2022). Standards of Medical Care in Diabetes—2022 Abridged for Primary Care Providers. *Clinical Diabetes*, *40*(1), 10-38.
6. Sapra, A., Bhandari, P., & Wilhite (Hughes), A. (2021). Diabetes Mellitus (Nursing). *StatPearls*. StatPearls Publishing. Erişim 12.05.2021, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33760470
7. Eizirik, D. L., Pasquali, L., & Cnop, M. (2020). Pancreatic β-cells in type 1 and type 2 diabetes mellitus: different pathways to failure. *Nature Reviews Endocrinology*, *16*(7), 349-362.
8. Prasad, A. S. (2014). Impact of the discovery of human zinc deficiency on health. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 28(4), 357-363.
9. K, L., MA, R., A, S., JW, C., R, V. de P., M, G., L, V. L., E, W., F, C., GA, R., P, G., PA, in't V., & FC, S. (2009). Insulin crystallization depends on zinc transporter ZnT8 expression, but is not required for normal glucose homeostasis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(35), 14872-14877.
10. Li, Y. V. (2014). Zinc and insulin in pancreatic beta-cells. *Endocrine*, *45*(2), 178-189.
11. Bellomo, E. A., Meur, G., & Rutter, G. A. (2011). Glucose regulates free cytosolic Zn 2+ concentration, Slc39 (ZiP), and metallothionein gene expression in primary pancreatic islet β-cells. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(29), 25778-25789.
12. Gerber, P. A., & Rutter, G. A. (2017). The Role of Oxidative Stress and Hypoxia in Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes Mellitus. Içinde *Antioxidants and Redox Signaling* 26(10), 501-518.
13. Ma, Z. A., Zhao, Z., & Turk, J. (2012). Mitochondrial dysfunction and β-cell failure in type 2 diabetes mellitus. *Experimental Diabetes Research*, *2012*.
14. Janko, C., Filipović, M., Munoz, L. E., Schorn, C., Schett, G., Ivanović-Burmazović, I., & Herrmann, M. (2014). Redox modulation of HMGB1-related signaling. *Antioxidants and Redox Signaling*, *20*(7), 1075-1085.
15. Lei, X. G., & Vatamaniuk, M. Z. (2011). Two tales of antioxidant enzymes on β cells and diabetes. Içinde *Antioxidants and Redox Signaling* 14(3), 489-503.
16. Mousavi, S. M., Hajishafiee, M., Clark, C. C. T., Borges do Nascimento, I. J., Milajerdi, A., Amini, M. R., & Esmaillzadeh, A. (2020). Clinical effectiveness of zinc supplementation on the biomarkers of oxidative stress: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Pharmacological Research*, 161, 105166.
17. Yang, H., Wang, H., & Andersson, U. (2020). Targeting Inflammation Driven by HMGB1. *Frontiers in Immunology*, 11, 484.
18. Tsalamandris, S., Antonopoulos, A. S., Oikonomou, E., Papamikroulis, G. A., Vogiatzi, G., Papaioannou, S., Deftereos, S., & Tousoulis, D. (2019). The role of inflammation in diabetes: Current concepts and future perspectives. Içinde *European Cardiology Review* 14(1), 50-59.
19. Magna, M., & Pisetsky, D. S. (2014). The role of HMGB1 in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases. *Molecular Medicine*, *20*(1), 138-146.
20. Marjanac, I., Lovrić, R., & Barbić, J. (2019). Serum levels of the high-mobility group box 1 protein (HMGB1) in children with type 1 diabetes mellitus: Case-control study. *Central European Journal of Immunology*, *44*(1), 33-37.
21. Siddiqui, S. S., Dhar, C., Sundaramurthy, V., Sasmal, A., Yu, H., Bandala-Sanchez, E., Li, M., Zhang, X., Chen, X., Harrison, L. C., Xu, D., & Varki, A. (2021). Sialoglycan recognition is a common connection linking acidosis, zinc, and HMGB1 in sepsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *118*(10).
22. Dubey, P., Thakur, V., & Chattopadhyay, M. (2020). Role of minerals and trace elements in diabetes and insulin resistance. Içinde *Nutrients* 12(6), 1-17).

23. Bjørklund, G., Dadar, M., Pivina, L., Doşa, M. D., Semenova, Y., & Aaseth, J. (2019). The Role of Zinc and Copper in Insulin Resistance and Diabetes Mellitus. *Current Medicinal Chemistry*, *27*(39), 6643-6657.
24. Jansen, J., Karges, W., & Rink, L. (2009). Zinc and diabetes - clinical links and molecular mechanisms. Içinde *Journal of Nutritional Biochemistry*, 20(6), 399-417.
25. Okui, T., Hiasa, M., Ryumon, S., Ono, K., Kunisada, Y., Ibaragi, S., Sasaki, A., Roodman, G. D., White, F. A., & Yoneda, T. (2021). The HMGB1/RAGE axis induces bone pain associated with colonization of 4T1 mouse breast cancer in bone. *Journal of Bone Oncology*, *26*, 100330.
26. Anggayasti, W. L., Mancera, R. L., Bottomley, S., & Helmerhorst, E. (2016). The effect of physicochemical factors on the self-association of HMGB1: A surface plasmon resonance study. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, *1864*(11), 1620-1629.
27. Valera, P., Zavattari, P., Sanna, A., Pretti, S., Marcello, A., Mannu, C., Targhetta, C., Bruno, G., & Songini, M. (2015). Zinc and other metals deficiencies and risk of type 1 diabetes: An ecological study in the high risk Sardinia Island. *PLoS ONE*, 10(11), e0141262.
28. Cakmak, I., & Kutman, U. B. (2018). Agronomic biofortification of cereals with zinc: a review. *European Journal of Soil Science*, *69*(1), 172-180.
29. Cakmak, I., Kalayci, M., Ekiz, H., Braun, H. J., Kilinç, Y., & Yilmaz, A. (1999). Zinc deficiency as a practical problem in plant and human nutrition in Turkey: A NATO-science for stability project. *Field Crops Research*, *60*(1-2), 175-188.
30. T.C. Sağlık Bakanlığı. Türkiye Beslenme ve Sağlık Araştırması 2010. Ankara: Sağlık Araştırmaları Genel Müdürlüğü, Sağlık Bakanlığı (internette) 2010. Erişim 24.05.2021, https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/saglikli-beslenme-hareketli-hayat-db/Yayinlar/kitaplar/diger-kitaplar/TBSA-Beslenme-Yayini.pdf.
31. T.C. Sağlık Bakanlığı. *Türkiye Beslenme ve Sağlık Araştırması (TBSA) 2019*. Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Yayın No: 1132. Erişim 12.05.2021, https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/saglikli-beslenme-hareketli-hayat-db/Yayinlar/kitaplar/TBSA_RAPOR_KITAP_20.08.pdf
32. Chausmer, A. B. (1998). Zinc, insulin and diabetes. *Journal of the American College of Nutrition*, *17*(2), 109-115.
33. Huang, Q., Du, J., Merriman, C., & Gong, Z. (2019). Genetic, functional, and immunological study of ZnT8 in diabetes. *International Journal of Endocrinology*, 2019.
34. Cannas, D., Loi, E., Serra, M., Firinu, D., Valera, P., & Zavattari, P. (2020). Relevance of essential trace elements in nutrition and drinking water for human health and autoimmune disease risk. *Nutrients*, 12(7), 1-22).
35. Zhang, J., Chen, L., Wang, F., Zou, Y., Li, J., Luo, J., Khan, F., Sun, F., Li, Y., Liu, J., Chen, Z., Zhang, S., Xiong, F., Yu, Q., Li, J., Huang, K., Adam, B. L., Zhou, Z., Eizirik, D. L., … Wang, C. Y. (2020). Extracellular HMGB1 exacerbates autoimmune progression and recurrence of type 1 diabetes by impairing regulatory T cell stability. *Diabetologia*, *63*(5), 987-1001.
36. Chen, X., Ma, J., Kwan, T., Stribos, E. G. D., Messchendorp, A. L., Loh, Y. W., Wang, X., Paul, M., Cunningham, E. C., Habib, M., Alexander, I. E., Sharland, A. F., Chadban, S. J., & Wu, H. (2018). Blockade of HMGB1 attenuates diabetic nephropathy in mice. *Scientific Reports*, *8*(1).
37. Zhu, Z., Peng, X., Li, X., Tu, T., Yang, H., Teng, S., Zhang, W., Xing, Z., Tang, J., Hu, X., Fang, Z., & Zhou, S. (2020). HMGB1 impairs endothelium-dependent relaxation in diabetes through TLR4/eNOS pathway. *FASEB Journal*, *34*(6), 8641-8652.
38. Zajac, J., Shrestha, A., Patel, P., & Poretsky, L. (2010). The main events in the history of diabetes mellitus. *Principles of Diabetes Mellitus*, 3-16.
39. Karamanou, M., Protogerou, A., Tsoucalas, G., Androutsos, G., & Poulakou-Rebelakou, E. (2016). Milestones in the history of diabetes mellitus: The main contributors. *World journal of diabetes*, *7*(1), 1-7.
40. Ahmed, A. M. (2002). History of Diabetes Mellitus. *Saudi Medical Journal*, *23*(4).
41. Forouhi, N. G., & Wareham, N. J. (2022). Epidemiology of diabetes. *Medicine*, *50*(10), 638-643.
42. Saeedi, P., Petersohn, I., Salpea, P., Malanda, B., Karuranga, S., Unwin, N., Colagiuri, S., Guariguata, L., Motala, A. A., Ogurtsova, K., Shaw, J. E., Bright, D., & Williams, R. (2019). Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *157*.
43. Satman, I., Yilmaz, T., Sengül, A., Salman, S., Salman, F., Uygur, S., Bastar, I., Tütüncü, Y., Sargin, M., Dinççag, N., Karsidag, K., Kalaça, S., Özcan, C., & King, H. (2002). Population-based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: Results of the Turkish Diabetes Epidemiology Study (TURDEP). *Diabetes Care*, *25*(9), 1551-1556.
44. Satman, I., Omer, B., Tutuncu, Y., Kalaca, S., Gedik, S., Dinccag, N., Karsidag, K., Genc, S., Telci, A., Canbaz, B., Turker, F., Yilmaz, T., Cakir, B., & Tuomilehto, J. (2013). Twelve-year trends in the prevalence

and risk factors of diabetes and prediabetes in Turkish adults. *European Journal of Epidemiology*, *28*(2), 169-180.
45. Bommer, C., Heesemann, E., Sagalova, V., Manne-Goehler, J., Atun, R., Bärnighausen, T., & Vollmer, S. (2017). The global economic burden of diabetes in adults aged 20–79 years: a cost-of-illness study. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*, *5*(6), 423-430.
46. Bommer, C., Sagalova, V., Heesemann, E., Manne-Goehler, J., Atun, R., Bärnighausen, T., Davies, J., & Vollmer, S. (2018). Global Economic Burden of Diabetes in Adults: Projections From 2015 to 2030. *Diabetes Care*, *41*(5), 963-970.
47. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2021. (2021). *Diabetes care*, *44*(Suppl 1), S15-S33.
48. ElSayed, N. A., Aleppo, G., Aroda, V. R., Bannuru, R. R., Brown, F. M., Bruemmer, D., Collins, B. S., Hilliard, M. E., Isaacs, D., Johnson, E. L., Kahan, S., Khunti, K., Leon, J., Lyons, S. K., Perry, M. Lou, Prahalad, P., Pratley, R. E., Seley, J. J., Stanton, R. C., & Gabbay, R. A. (2023). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Care in Diabetes-2023. *Diabetes care*, *46*(Suppl 1), S19-S40.
49. Warshauer, J. T., Bluestone, J. A., & Anderson, M. S. (2020). New Frontiers in the Treatment of Type 1 Diabetes. *Cell Metabolism*, 31(1), 46-61.
50. Schleicher, E., Gerdes, C., Petersmann, A., Müller-Wieland, D., Müller, U. A., Freckmann, G., Heinemann, L., Nauck, M., & Landgraf, R. (2022). Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus 1. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, *130*, S1-S8.
51. T, T. (2017). Apoptosis of pancreatic β-cells in Type 1 diabetes. *Bosnian journal of basic medical sciences*, *17*(3), 183-193.
52. Blair, M. (2016). Diabetes Mellitus Review. *Urologic nursing*, 36(1), 27-36.
53. Johns, E. C., Denison, F. C., Norman, J. E., & Reynolds, R. M. (2018). Gestational Diabetes Mellitus: Mechanisms, Treatment, and Complications. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, *29*(11), 743-754.
54. Li, S., Wang, J., Zhang, B., Li, X., & Liu, Y. (2019). Diabetes mellitus and cause-specific mortality: A population-based study. *Diabetes and Metabolism Journal*, *43*(3), 319-341.
55. Gross, J. L., De Azevedo, M. J., Silveiro, S. P., Canani, L. H., Caramori, M. L., & Zelmanovitz, T. (2005). Diabetic Nephropathy: Diagnosis, Prevention, and Treatment. *Diabetes Care*, *28*(1), 164-176.
56. Deshpande, A. D., Harris-Hayes, M., & Schootman, M. (2008). Epidemiology of Diabetes and Diabetes-Related Complications. *Physical Therapy*, *88*(11), 1254.
57. Varghese, R. T., & Jialal, I. (2022). Diabetic Nephropathy. *StatPearls. StatPearls Publishing.* Erişim 10.04.2023, https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30480939/
58. Stitt, A. W., Curtis, T. M., Chen, M., Medina, R. J., McKay, G. J., Jenkins, A., Gardiner, T. A., Lyons, T. J., Hammes, H. P., Simó, R., & Lois, N. (2016). The progress in understanding and treatment of diabetic retinopathy. *Progress in Retinal and Eye Research*, *51*, 156-186.
59. Teo, Z. L., Tham, Y. C., Yu, M., Chee, M. L., Rim, T. H., Cheung, N., Bikbov, M. M., Wang, Y. X., Tang, Y., Lu, Y., Wong, I. Y., Ting, D. S. W., Tan, G. S. W., Jonas, J. B., Sabanayagam, C., Wong, T. Y., & Cheng, C. Y. (2021). Global Prevalence of Diabetic Retinopathy and Projection of Burden through 2045: Systematic Review and Meta-analysis. *Ophthalmology*, *128*(11), 1580-1591.
60. Smith, S., Normahani, P., Lane, T., Hohenschurz-Schmidt, D., Oliver, N., & Davies, A. H. (2022). Prevention and Management Strategies for Diabetic Neuropathy. *Life (Basel, Switzerland)*, *12*(8).
61. Everett, E., & Mathioudakis, N. (2018). Update on management of diabetic foot ulcers. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1411*(1), 153-165.
62. Bandyk, D. F. (2018). The diabetic foot: Pathophysiology, evaluation, and treatment. *Seminars in Vascular Surgery*, *31*(2-4), 43-48.
63. Fowler, M. J. (2008). Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. *Clinical Diabetes*, *26*(2), 77-82.
64. King, K. D., Jones, J. D., & Warthen, J. (2005). Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes Mellitus. *American Journal of Pharmaceutical Education*, *69*(5), 87.
65. Portegies, M. L. P., Koudstaal, P. J., & Ikram, M. A. (2016). Cerebrovascular disease. *Handbook of Clinical Neurology*, *138*, 239-261.
66. Simó, R., & Hernández, C. (2002). Tratamiento de la diabetes mellitus: objetivos generales y manejo en la práctica clínica. *Revista Española de Cardiología*, *55*(8), 845-860.
67. Wang, X., Kang, J., Liu, Q., Tong, T., & Quan, H. (2020). Fighting Diabetes Mellitus: Pharmacological and Non-pharmacological Approaches. *Current Pharmaceutical Design*, *26*(39), 4992-5001.
68. Tan, S. Y., Mei Wong, J. L., Sim, Y. J., Wong, S. S., Mohamed Elhassan, S. A., Tan, S. H., Ling Lim, G. P., Rong Tay, N. W., Annan, N. C., Bhattamisra, S. K., & Candasamy, M. (2019). Type 1 and 2 diabetes

mellitus: A review on current treatment approach and gene therapy as potential intervention. *Diabetes & metabolic syndrome*, *13*(1), 364-372.
69. Meier, J. J., Bhushan, A., & Butler, P. C. (2006). The potential for stem cell therapy in diabetes. *Pediatric research*, *59*(4 Pt 2).
70. Zhou, Q., & Melton, D. A. (2018). Pancreas regeneration. *Nature*, *557*(7705), 351.
71. Zhong, F., & Jiang, Y. (2019). Endogenous Pancreatic β Cell Regeneration: A Potential Strategy for the Recovery of β Cell Deficiency in Diabetes. *Frontiers in Endocrinology*, *10*(FEB), 101.
72. Bellin, M. D., & Dunn, T. B. (2020). Transplant strategies for type 1 diabetes: whole pancreas, islet and porcine beta cell therapies. *Diabetologia*, *63*(10), 2049-2056.
73. Gruessner, A. C. (2011). 2011 Update on Pancreas Transplantation: Comprehensive Trend Analysis of 25,000 Cases Followed Up Over the Course of Twenty-Four Years at the International Pancreas Transplant Registry (IPTR). *The Review of Diabetic Studies: RDS*, *8*(1), 6.
74. Lee, J., & Yoon, K. H. (2022). β cell replacement therapy for the cure of diabetes. *Journal of Diabetes Investigation*, *13*(11), 1798.
75. Barton, F. B., Rickels, M. R., Alejandro, R., Hering, B. J., Wease, S., Naziruddin, B., Oberholzer, J., Odorico, J. S., Garfinkel, M. R., Levy, M., Pattou, F., Berney, T., Secchi, A., Messinger, S., Senior, P. A., Maffi, P., Posselt, A., Stock, P. G., Kaufman, D. B., … Shapiro, A. M. J. (2012). Improvement in Outcomes of Clinical Islet Transplantation: 1999–2010. *Diabetes Care*, *35*(7), 1436-1445.
76. Chen, S., Du, K., & Zou, C. (2020). Current progress in stem cell therapy for type 1 diabetes mellitus. *Stem Cell Research and Therapy*, *11*(1), 1-13.
77. Chiang, J. L., Kirkman, M. S., Laffel, L. M. B., & Peters, A. L. (2014). Type 1 Diabetes Through the Life Span: A Position Statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care*, *37*(7), 2034-2054.
78. de Klerk, E., & Hebrok, M. (2021). Stem Cell-Based Clinical Trials for Diabetes Mellitus. *Frontiers in Endocrinology*, *12*, 95.
79. Rorsman, P., & Ashcroft, F. M. (2018). Pancreatic β-Cell Electrical Activity and Insulin Secretion: Of Mice and Men. *Physiological reviews*, *98*(1), 117-214.
80. Vasiljević, J., Torkko, J. M., Knoch, K. P., & Solimena, M. (2020). The making of insulin in health and disease. *Diabetologia*, *63*(10), 1981-1989.
81. Gorai, B., & Vashisth, H. (2022). Progress in Simulation Studies of Insulin Structure and Function. *Frontiers in endocrinology*, *13*.
82. Campbell, J. E., & Newgard, C. B. (2021). Mechanisms controlling pancreatic islet cell function in insulin secretion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *22*(2), 142-158.
83. Marchetti, P., Bugliani, M., De Tata, V. D., Suleiman, M., & Marselli, L. (2017). Pancreatic Beta Cell Identity in Humans and the Role of Type 2 Diabetes. *Frontiers in cell and developmental biology*, 5, 55.
84. Vallee, B. L., & Falchuk, K. H. (1993). The biochemical basis of zinc physiology. *Physiological Reviews*, 73(1), 79-118.
85. Hess, S. Y., Peerson, J. M., King, J. C., & Brown, K. H. (2007). Use of serum zinc concentration as an indicator of population zinc status. *Food and Nutrition Bulletin*, 28 (3 supp l3), 403-429.
86. Maares, M., & Haase, H. (2020). A Guide to Human Zinc Absorption: General Overview and Recent Advances of In Vitro Intestinal Models. *Nutrients*, *12*(3).
87. Krebs, N. F. (2000). Overview of zinc absorption and excretion in the human gastrointestinal tract. *The Journal of nutrition*, 130 (5S Suppl).
88. Hashimoto, A., Nakagawa, M., Tsujimura, N., Miyazaki, S., Kizu, K., Goto, T., Komatsu, Y., Matsunaga, A., Shirakawa, H., Narita, H., Kambe, T., & Komai, M. (2016). Properties of Zip4 accumulation during zinc deficiency and its usefulness to evaluate zinc status: a study of the effects of zinc deficiency during lactation. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 310(5), R459-R468.
89. Nishito, Y., & Kambe, T. (2018). Absorption Mechanisms of Iron, Copper, and Zinc: An Overview. *Journal of nutritional science and vitaminology*, *64*(1), 1-7.
90. King, J. C. (2011). Zinc: an essential but elusive nutrient. *The American journal of clinical nutrition*, *94*(2).
91. T, Z., Q, H., Y, S., W, S., Q, H., & W, W. (2019). Zinc and its regulators in pancreas. *Inflammopharmacology*, *27*(3), 453-464.
92. Cousins, R. J., Liuzzi, J. P., & Lichten, L. A. (2006). Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(34), 24085-24089.
93. Thingholm, T. E., Rönnstrand, L., & Rosenberg, P. A. (2020). Why and how to investigate the role of protein phosphorylation in ZIP and ZnT zinc transporter activity and regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(16), 3085-3102.
94. Baltaci, A. K., & Yuce, K. (2018). Zinc Transporter Proteins. *Neurochemical Research*, 43(3), 517-530.

95. Huang, L. (2014). Zinc and its transporters, pancreatic β-cells, and insulin metabolism. *Vitamins and hormones*, *95*, 365-390.
96. Lawson, R., Maret, W., & Hogstrand, C. (2017). Expression of the ZIP/SLC39A transporters in β-cells: a systematic review and integration of multiple datasets. *BMC genomics*, *18*(1).
97. Lemaire, K., Chimienti, F., & Schuit, F. (2012). Zinc transporters and their role in the pancreatic β-cell. *Journal of Diabetes Investigation*, *3*(3), 202.
98. Chimienti, F., Favier, A., & Seve, M. (2005). ZnT-8, a pancreatic beta-cell-specific zinc transporter. *Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, *18*(4), 313-317.
99. Nygaard, S. B., Larsen, A., Knuhtsen, A., Rungby, J., & Smidt, K. (2014). Effects of zinc supplementation and zinc chelation on in vitro β-cell function in INS-1E cells. *BMC research notes*, *7*(1).
100. Bensellam, M., Laybutt, D. R., & Jonas, J.-C. (2021). Emerging Roles of Metallothioneins in Beta Cell Pathophysiology: Beyond and above Metal Homeostasis and Antioxidant Response. *Biology*, *10*(3), 176.
101. AK, B., K, Y., & R, M. (2018). Zinc Metabolism and Metallothioneins. *Biological trace element research*, *183*(1), 22-31.
102. de Benoist, B., Darnton-Hill, I., Davidsson, L., Fontaine, O., & Hotz, C. (2007). Conclusions of the Joint WHO/UNICEF/IAEA/IZiNCG Interagency Meeting on Zinc Status Indicators. *Food and nutrition bulletin*, 28(3 Suppl).
103. Gibson, R. S., Hess, S. Y., Hotz, C., & Brown, K. H. (2008). Indicators of zinc status at the population level: a review of the evidence. *British Journal of Nutrition*, 99(S3), 14-23.
104. T.C. Sağlık Bakanlığı. Türkiye Beslenme Rehberi (TÜBER) 2022. Ankara: Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, 2022. Erişim 12.05.2024, https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/web-uygulamalarimiz/357.html
105. Maxfield, L., Shukla, S., & Crane, J. S. (2022). Zinc Deficiency. *StatPearls*. Erişim 29.07.2023, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493231/
106. Wessells, K. R., & Brown, K. H. (2012). Estimating the Global Prevalence of Zinc Deficiency: Results Based on Zinc Availability in National Food Supplies and the Prevalence of Stunting. *PLoS ONE*, *7*(11).
107. Agnew, U. M., & Slesinger, T. L. (2022). Zinc Toxicity. *StatPearls*. Erişim 28.04.2023, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554548/
108. Rahimzadeh, M. R., Rahimzadeh, M. R., Kazemi, S., & Moghadamnia, A. A. (2020). Zinc Poisoning - Symptoms, Causes, Treatments. *Mini reviews in medicinal chemistry*, *20*(15), 1489-1498.
109. Türkomp. *Ulusal Gıda Kompozisyon Veri Tabanı*. Erişim 05.04.2023, http://www.turkomp.gov.tr/component_result-27
110. Jakubczyk, K., Dec, K., Kałduńska, J., Kawczuga, D., Kochman, J., & Janda, K. (2020). Reactive oxygen species - sources, functions, oxidative damage. *Polski merkuriusz lekarski: organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*, *48*(284), 124-127.
111. Ali, S. S., Ahsan, H., Zia, M. K., Siddiqui, T., & Khan, F. H. (2020). Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players. *Journal of food biochemistry*, *44*(3).
112. Guo, Q., Li, F., Duan, Y., Wen, C., Wang, W., Zhang, L., Huang, R., & Yin, Y. (2020). Oxidative stress, nutritional antioxidants and beyond. *Science China. Life sciences*, *63*(6), 866-874.
113. Brieger, K., Schiavone, S., Miller, F. J., & Krause, K. H. (2012). Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss medical weekly*, 142.
114. Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free Radicals, Antioxidants and Functional Foods: Impact on Human Health. *Pharmacognosy Reviews*, *4*(8), 118-126.
115. Zhang, P., Li, T., Wu, X., Nice, E. C., Huang, C., & Zhang, Y. (2020). Oxidative stress and diabetes: antioxidative strategies. *Frontiers of Medicine*, *14*(5), 583-600.
116. Lubag, A. J. M., De Leon-Rodriguez, L. M., Burgess, S. C., & Sherry, A. D. (2011). Noninvasive MRI of β-cell function using a Zn 2+-responsive contrast agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(45), 18400-18405.
117. Silva, J. P., & Coutinho, O. P. (2010). Free radicals in the regulation of damage and cell death-basic mechanisms and prevention. *Drug Discoveries & Therapeutics*, *4*(3), 144-167.
118. Petit, P. X., Lecoeur, H., Zorn, E., Dauguet, C., Mignotte, B., & Gougeon, M. L. (1995). Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *The Journal of cell biology*, *130*(1), 157-167.
119. Zorova, L. D., Popkov, V. A., Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Pevzner, I. B., Jankauskas, S. S., Babenko, V. A., Zorov, S. D., Balakireva, A. V., Juhaszova, M., Sollott, S. J., & Zorov, D. B. (2018). Mitochondrial membrane potential. *Analytical biochemistry*, *552*, 50-59.
120. Anello, M., Lupi, R., Spampinato, D., Piro, S., Masini, M., Boggi, U., del Prato, S., Rabuazzo, A. M., Purrello, F., & Marchetti, P. (2005). Functional and morphological alterations of mitochondria in pancreatic beta cells from type 2 diabetic patients. *Diabetologia*, *48*(2), 282-289.

121. Said, E., Mousa, S., Fawzi, M., Sabry, N. A., & Farid, S. (2021). Combined effect of high-dose vitamin A, vitamin E supplementation, and zinc on adult patients with diabetes: A randomized trial. *Journal of Advanced Research*, *28*, 27-33.
122. Ohly, P., Dohle, C., Abel, J., Seissler, J., & Gleichmann, H. (2000). Zinc sulphate induces metallothionein in pancreatic islets of mice and protects against diabetes induced by multiple low doses of streptozotocin. *Diabetologia*, *43*(8), 1020-1030.
123. Bosco, M. D., Mohanasundaram, D. M., Drogemuller, C. J., Lang, C. J., Zalewski, P. D., & Coates, P. T. (2010). Zinc and zinc transporter regulation in pancreatic islets and the potential role of zinc in islet transplantation. *Review of Diabetic Studies*, 7(4), 263-274.
124. Nagata, M., Mullen, Y., Matsuo, S., Herrera, M., & Clare-Salzler, M. (1990). Destruction of islet isografts by severe nonspecific inflammation. *Transplantation Proceedings*, 22(2), 855-856.
125. Okamoto, T., Kuroki, T., Adachi, T., Ono, S., Hayashi, T., Tajima, Y., Eguchi, S., & Kanematsu, T. (2011). Effect of Zinc on early graft failure following intraportal islet transplantation in rat recipients. *Annals of Transplantation*, *16*(3), 114-120.
126. Mishima, T., Kuroki, T., Tajima, Y., Adachi, T., Hirabaru, M., Tanaka, T., Kitasato, A., Takatsuki, M., & Eguchi, S. (2014). Dietary zinc supplementation to the donor improves insulin secretion after islet transplantation in chemically induced diabetic rats. *Pancreas*, *43*(2), 236-239.
127. Roh, J. S., & Sohn, D. H. (2018). Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Network*, *18*(4).
128. Vénéreau, E., Ceriotti, C., & Bianchi, M. E. (2015). DAMPs from Cell Death to New Life. *Frontiers in immunology*, 6, 422.
129. Murao, A., Aziz, M., Wang, H., Brenner, M., & Wang, P. (2021). Release mechanisms of major DAMPs. *Apoptosis*, *26*(3), 152.
130. Reeves, R. (2010). Nuclear functions of the HMG proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, *1799*(1-2), 3-14.
131. Bianchi, M. E., & Agresti, A. (2005). HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation. *Current Opinion in Genetics & Development*, *15*(5), 496-506.
132. Starkova, T. Y., Polyanichko, A. M., Artamonova, T. O., Tsimokha, A. S., Tomilin, A. N., & Chikhirzhina, E. V. (2023). Structural Characteristics of High-Mobility Group Proteins HMGB1 and HMGB2 and Their Interaction with DNA. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(4), 3577.
133. Štros, M. (2010). HMGB proteins: Interactions with DNA and chromatin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, *1799*(1-2), 101-113.
134. Dumitriu, I. E., Baruah, P., Manfredi, A. A., Bianchi, M. E., & Rovere-Querini, P. (2005). HMGB1: Guiding immunity from within. *Trends in Immunology*, 26(7), 381-387.
135. Naglova, H., & Bucova, M. (2012). HMGB1 and its physiological and pathological roles. Içinde *Bratislava Medical Journal*, 113(3), 163-171.
136. He, S. J., Cheng, J., Feng, X., Yu, Y., Tian, L., & Huang, Q. (2017). The dual role and therapeutic potential of high-mobility group box 1 in cancer. *Oncotarget*, 8(38), 64534-64550.
137. Yuan, S., Liu, Z., Xu, Z., Liu, J., & Zhang, J. (2020). High mobility group box 1 (HMGB1): A pivotal regulator of hematopoietic malignancies. *Journal of Hematology and Oncology*, 13(1), 1-19.
138. Taverna, S., Tonacci, A., Ferraro, M., Cammarata, G., Cuttitta, G., Bucchieri, S., Pace, E., & Gangemi, S. (2022). High Mobility Group Box 1: Biological Functions and Relevance in Oxidative Stress Related Chronic Diseases. *Cells*, *11*(5), 849.
139. Deng, M., Scott, M. J., Fan, J., & Billiar, T. R. (2019). Location is the key to function: HMGB1 in sepsis and trauma-induced inflammation. *Journal of leukocyte biology*, 106(1), 161-169.
140. Kuehl, L., Salmond, B., & Le Tran. (1984). Concentrations of high-mobility-group proteins in the nucleus and cytoplasm of several rat tissues. *The Journal of cell biology*, 99(2), 648-654.
141. Tang, D., Kang, R., Zeh, H. J., & Lotze, M. T. (2011). High-mobility group box 1, oxidative stress, and disease. Içinde *Antioxidants and Redox Signaling*, 14(7), 1315-1335.
142. Kang, R., Chen, R., Zhang, Q., Hou, W., Wu, S., Cao, L., Huang, J., Yu, Y., Fan, X. G., Yan, Z., Sun, X., Wang, H., Wang, Q., Tsung, A., Billiar, T. R., Zeh, H. J., Lotze, M. T., & Tang, D. (2014). HMGB1 in health and disease. *Molecular aspects of medicine*, *40*, 1-116.
143. Chung, H., Nam, H., Nguyen-Phuong, T., Jang, J., Hong, S. J., Choi, S. W., Park, S. B., & Park, C. G. (2021). The blockade of cytoplasmic HMGB1 modulates the autophagy/apoptosis checkpoint in stressed islet beta cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *534*, 1053-1058.
144. Andersson, U., Yang, H., & Harris, H. (2018). Extracellular HMGB1 as a therapeutic target in inflammatory diseases. İçinde *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 22(3), 263-277.
145. Pellegrini, L., Foglio, E., Pontemezzo, E., Germani, A., Russo, M. A., & Limana, F. (2019). HMGB1 and repair: focus on the heart. İçinde *Pharmacology and Therapeutics*, 196, 160-182.

146. Wang, Y., Zhong, J., Zhang, X., Liu, Z., Yang, Y., Gong, Q., & Ren, B. (2016). The Role of HMGB1 in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. *Journal of Diabetes Research*, *2016*.
147. Hudson, B. I., Carter, A. M., Harja, E., Kalea, A. Z., Arriero, M., Yang, H., Grant, P. J., & Schmidt, A. M. (2008). Identification, classification, and expression of RAGE gene splice variants. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22(5), 1572-1580.
148. Hudson, B. I., & Lippman, M. E. (2018). Targeting RAGE Signaling in Inflammatory Disease. *Annual review of medicine*, 69, 349-364.
149. Kim, H. J., Jeong, M. S., & Jang, S. B. (2021). Molecular Characteristics of RAGE and Advances in Small-Molecule Inhibitors. *International journal of molecular sciences*, 22(13), 6904.
150. Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology*, 11(5), 373-384.
151. Kawasaki, T., & Kawai, T. (2014). Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in Immunology*, *5*, 461.
152. Gupta, K., Saldanha, M., Parasnis, M., Devarajan, P. V., Jain, R., & Dandekar, P. (2019). Toll-Like Receptor-Mediated Endocytosis in Infectious Disease. *AAPS Advances in the Pharmaceutical Sciences Series*, 39, 323-349.
153. Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 1(2), 135-145.
154. Yu, M., Wang, H., Ding, A., Golenbock, D. T., Latz, E., Czura, C. J., Fenton, M. J., Tracey, K. J., & Yang, H. (2006). HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. *Shock (Augusta, Ga.)*, 26(2), 174-179.
155. Ivanov, S., Dragoi, A. M., Wang, X., Dallacosta, C., Louten, J., Musco, G., Sitia, G., Yap, G. S., Wan, Y., Biron, C. A., Bianchi, M. E., Wang, H., & Chu, W. M. (2007). A novel role for HMGB1 in TLR9-mediated inflammatory responses to CpG-DNA. *Blood*, 110(6), 1970-1981.
156. Park, J. S., Svetkauskaite, D., He, Q., Kim, J. Y., Strassheim, D., Ishizaka, A., & Abraham, E. (2004). Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *The Journal of biological chemistry*, 279(9), 7370-7377.
157. Li, M., Song, L., Gao, X., Chang, W., & Qin, X. (2012). Toll-like receptor 4 on islet β cells senses expression changes in high-mobility group box 1 and contributes to the initiation of type 1 diabetes. *Experimental & molecular medicine*, 44(4), 260-267.
158. Kawai, T., & Akira, S. (2007). Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends in molecular medicine*, 13(11), 460-469.
159. O'Neill, L. A. J., Fitzgerald, K. A., & Bowie, A. G. (2003). The Toll-IL-1 receptor adaptor family grows to five members. *Trends in Immunology*, 24(6), 286-289.
160. Kawagoe, T., Sato, S., Matsushita, K., Kato, H., Matsui, K., Kumagai, Y., Saitoh, T., Kawai, T., Takeuchi, O., & Akira, S. (2008). Sequential control of Toll-like receptor–dependent responses by IRAK1 and IRAK2. *Nature Immunology*, 9(6), 684-691.
161. Zhang, S., Zhong, J., Yang, P., Gong, F., & Wang, C. Y. (2010). HMGB1, an innate alarmin, in the pathogenesis of type 1 diabetes. Içinde *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 3(1), 24-38.
162. Biscetti, F., Rando, M. M., Nardella, E., Cecchini, A. L., Pecorini, G., Landolfi, R., & Flex, A. (2019). High mobility group box-1 and diabetes mellitus complications: State of the art and future perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(24), 6258.
163. Han, J., Zhong, J., Wei, W., Wang, Y., Huang, Y., Yang, P., Purohit, S., Dong, Z., Wang, M. H., She, J. X., Gong, F., Stern, D. M., & Wang, C. Y. (2008). Extracellular high-mobility group box 1 acts as an innate immune mediator to enhance autoimmune progression and diabetes onset in NOD mice. *Diabetes*, 57(8), 2118-2127.
164. Wu, H., Chen, Z., Xie, J., Kang, L. N., Wang, L., & Xu, B. (2016). High Mobility Group Box-1: A Missing Link between Diabetes and Its Complications. *Mediators of Inflammation*, 2016.
165. Chen, Y., Qiao, F., Zhao, Y., Wang, Y., & Liu, G. (2015). HMGB1 is activated in type 2 diabetes mellitus patients and in mesangial cells in response to high glucose. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(6), 6683-6691.
166. Chung, H., Hong, S. J., Choi, S. W., Koo, J. Y., Kim, M., Kim, H. J., Park, S. B., & Park, C. G. (2019). High mobility group box 1 secretion blockade results in the reduction of early pancreatic islet graft loss. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 514(4), 1081-1086.
167. Matsuoka, N., Itoh, T., Watarai, H., Sekine-Kondo, E., Nagata, N., Okamoto, K., Mera, T., Yamamoto, H., Yamada, S., Maruyama, I., Taniguchi, M., & Yasunami, Y. (2010). High-mobility group box 1 is involved in the initial events of early loss of transplanted islets in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 120(3), 735-743.

168. Itoh, T., Nitta, T., Nishinakamura, H., Kojima, D., Mera, T., Ono, J., Kodama, S., & Yasunami, Y. (2015). HMGB1-mediated early loss of transplanted islets is prevented by anti-IL-6R antibody in mice. *Pancreas*, 44(1), 166-171.
169. Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495.
170. O'Brien, M. A., & Kirby, R. (2008). Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 18(6), 572-585.
171. Thomas, H. E., McKenzie, M. D., Angstetra, E., Campbell, P. D., & Kay, T. W. (2009). Beta cell apoptosis in diabetes. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, 14(12), 1389-1404.
172. Vitale, I., Pietrocola, F., Guilbaud, E., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostini, M., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Aqeilan, R. I., Arama, E., Baehrecke, E. H., Balachandran, S., Bano, D., Barlev, N. A., Bartek, J., … Galluzzi, L. (2023). Apoptotic cell death in disease—Current understanding of the NCCD 2023. *Cell Death & Differentiation*, 30(5), 1097-1154.
173. Cnop, M., Welsh, N., Jonas, J. C., Jörns, A., Lenzen, S., & Eizirik, D. L. (2005). Mechanisms of Pancreatic β-Cell Death in Type 1 and Type 2 DiabetesMany Differences, Few Similarities. *Diabetes*, 54(suppl 2), 97-107.
174. Tomita, T. (2016). Apoptosis in pancreatic β-islet cells in Type 2 diabetes. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 16(3), 162.
175. You, S. F., Zheng, J. Y., Chen, Y. P., & Huang, H. Bin. (2022). Research progress on the mechanism of beta-cell apoptosis in type 2 diabetes mellitus. *Frontiers in Endocrinology*, *13*, 976465.
176. Eleazu, C. O., Eleazu, K. C., Chukwuma, S., & Essien, U. N. (2013). Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, 12(1), 1-7.
177. Kim, G., Shin, K. H., & Pae, E. K. (2016). Zinc Up-Regulates Insulin Secretion from β Cell-Like Cells Derived from Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Tooth (SHED). *International journal of molecular sciences*, 17(12), 2092.
178. Slucca, M., Harmon, J. S., Oseid, E. A., Bryan, J., & Robertson, R. P. (2010). ATP-sensitive K+ channel mediates the zinc switch-off signal for glucagon response during glucose deprivation. *Diabetes*, 59(1), 128-134.
179. Jo, E. H., Hwang, Y. H., & Lee, D. Y. (2015). Encapsulation of pancreatic islet with HMGB1 fragment for attenuating inflammation. *Biomaterials research*, 19(1), 1-7.
180. Cottone, L., Capobianco, A., Gualteroni, C., Perrotta, C., Bianchi, M. E., Rovere-Querini, P., & Manfredi, A. A. (2015). 5-Fluorouracil causes leukocytes attraction in the peritoneal cavity by activating autophagy and HMGB1 release in colon carcinoma cells. *International Journal of Cancer*, 136(6), 1381-1389.
181. Khadija, S., Veluthakal, R., Sidarala, V., & Kowluru, A. (2014). Glucotoxic and diabetic conditions induce caspase 6-mediated degradation of nuclear lamin A in human islets, rodent islets and INS-1 832/13 cells. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, 19(12), 1691-1701.
182. Gerencser, A. A. (2018). Metabolic activation-driven mitochondrial hyperpolarization predicts insulin secretion in human pancreatic beta-cells. *Biochimica et biophysica acta. Bioenergetics*, 1859(9), 817-828.
183. Prasun, P. (2020). Role of mitochondria in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, 19(2), 2017.
184. Maechler, P., Jornot, L., & Wollheim, C. B. (1999). Hydrogen peroxide alters mitochondrial activation and insulin secretion in pancreatic beta cells. *The Journal of biological chemistry*, 274(39), 27905-27913.
185. Raza, H., Prabu, S. K., John, A., & Avadhani, N. G. (2011). Impaired mitochondrial respiratory functions and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *International journal of molecular sciences*, 12(5), 3133-3147.
186. Lee, H. A., Lee, E., Do, G. Y., Moon, E. K., Quan, F. S., & Kim, I. (2019). Histone deacetylase inhibitor MGCD0103 protects the pancreas from streptozotocin-induced oxidative stress and β-cell death. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 109, 921-929.
187. Nahdi, A. M. T. A., John, A., & Raza, H. (2017). Elucidation of Molecular Mechanisms of Streptozotocin-Induced Oxidative Stress, Apoptosis, and Mitochondrial Dysfunction in Rin-5F Pancreatic β-Cells. *Oxidative medicine and cellular longevity*, *2017*.
188. Redza-Dutordoir, M., & Averill-Bates, D. A. (2016). Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et biophysica acta*, 1863(12), 2977-2992.
189. Eguchi, N., Vaziri, N. D., Dafoe, D. C., & Ichii, H. (2021). The Role of Oxidative Stress in Pancreatic β Cell Dysfunction in Diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1-18.
190. Sha, W., Hu, F., & Bu, S. (2020). Mitochondrial dysfunction and pancreatic islet β-cell failure (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 20(6), 1-1.

191. Pramanik, K. C., Boreddy, S. R., & Srivastava, S. K. (2011). Role of mitochondrial electron transport chain complexes in capsaicin mediated oxidative stress leading to apoptosis in pancreatic cancer cells. *PloS one*, 6(5), e20151.
192. Sena, L. A., & Chandel, N. S. (2012). Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Molecular cell*, 48(2), 158-167.
193. Vela-Guajardo, J. E., Garza-González, S., & García, N. (2021). Glucolipotoxicity-induced Oxidative Stress is Related to Mitochondrial Dysfunction and Apoptosis of Pancreatic β-cell. *Current diabetes reviews*, 17(5), 46-56.
194. Gurgul-Convey, E., Mehmeti, I., Plötz, T., Jörns, A., & Lenzen, S. (2016). Sensitivity profile of the human EndoC-βH1 beta cell line to proinflammatory cytokines. *Diabetologia*, 59(10), 2125-2133.
195. Raza, H., Prabu, S. K., Robin, M. A., & Avadhani, N. G. (2004). Elevated mitochondrial cytochrome P450 2E1 and glutathione S-transferase A4-4 in streptozotocin-induced diabetic rats: tissue-specific variations and roles in oxidative stress. *Diabetes*, 53(1), 185-194.
196. Duprez, J., Roma, L. P., Close, A. F., & Jonas, J. C. (2012gn). Protective antioxidant and antiapoptotic effects of ZnCl2 in rat pancreatic islets cultured in low and high glucose concentrations. *PloS one*, *7*(10).
197. Yang, J., & George Cherian, M. (1994). Protective effects of metallothionein on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Life sciences*, 55(1), 43-51.
198. Kim, B. J., Kim, Y. H., Kim, S., Kim, J. W., Koh, J. Y., Oh, S. H., Lee, M. K., Kim, K. W., & Lee, M. S. (2000). Zinc as a paracrine effector in pancreatic islet cell death. *Diabetes*, 49(3), 367-372.
199. Chang, I., Cho, N., Koh, J. Y., & Lee, M. S. (2003). Pyruvate inhibits zinc-mediated pancreatic islet cell death and diabetes. *Diabetologia*, 46(9), 1220-1227.
200. Brandão-Neto, J., Silva, C. A. B., Shuhama, T., Silva, J. A., & Oba, L. (2001). Renal handling of zinc in insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 14(1), 75-80.
201. Cunningham, J. J., Aizhong Fu, Mearkle, P. L., & Glenn Brown, R. (1994). Hyperzincuria in individuals with insulin-dependent diabetes mellitus: concurrent zinc status and the effect of high-dose zinc supplementation. *Metabolism: clinical and experimental*, 43(12), 1558-1562.
202. Lawson, R., Maret, W., & Hogstrand, C. (2018). Prolonged stimulation of insulin release from MIN6 cells causes zinc depletion and loss of β-cell markers. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 49, 51-59.
203. Sabatini, P. V., Speckmann, T., & Lynn, F. C. (2019). Friend and foe: β-cell Ca2+ signaling and the development of diabetes. *Molecular Metabolism*, 21, 1-12.
204. De León, D. D., & Stanley, C. A. (2007). Mechanisms of Disease: advances in diagnosis and treatment of hyperinsulinism in neonates. *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism*, 3(1), 57-68.
205. Wiederkehr, A., & Wollheim, C. B. (2012). Mitochondrial signals drive insulin secretion in the pancreatic β-cell. *Molecular and cellular endocrinology*, 353(1-2), 128-137.
206. Georgiadou, E., & Rutter, G. A. (2020). Control by Ca2+ of mitochondrial structure and function in pancreatic β-cells. *Cell calcium*, 91, 102282.
207. Ferrer, R., Soria, B., & Dawson, C. M. (1984). Effects of Zn2+ on glucose-induced electrical activity and insulin release from mouse pancreatic islets. *The American journal of physiology*, 246(5), C520-C527.
208. Ghafghazi, T., McDaniel, M. L., & Lacy, P. E. (1981). Zinc-induced inhibition of insulin secretion from isolated rat islets of Langerhans. *Diabetes*, 30(4), 341-345.
209. Hara, T., Takeda, T. aki, Takagishi, T., Fukue, K., Kambe, T., & Fukada, T. (2017). Physiological roles of zinc transporters: molecular and genetic importance in zinc homeostasis. *The journal of physiological sciences: JPS*, 67(2), 283-301.
210. Dasu, M. R., Devaraj, S., Park, S., & Jialal, I. (2010). Increased toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects. *Diabetes care*, 33(4), 861-868.
211. Wang, H., Qu, H., & Deng, H. (2015). Plasma HMGB-1 Levels in Subjects with Obesity and Type 2 Diabetes: A Cross-Sectional Study in China. *PloS one*, 10(8), e0136564.
212. Yang, H., Ochani, M., Li, J., Qiang, X., Tanovic, M., Harris, H. E., Susarla, S. M., Ulloa, L., Wang, H., DiRaimo, R., Czura, C. J., Wang, H., Roth, J., Warren, H. S., Fink, M. P., Fenton, M. J., Andersson, U., & Tracey, K. J. (2004). Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(1), 296-301.
213. Xue, J., Suarez, J. S., Minaai, M., Li, S., Gaudino, G., Pass, H. I., Carbone, M., & Yang, H. (2021). HMGB1 as a therapeutic target in disease. *Journal of Cellular Physiology*, 236(5), 3406-3419.
214. Schepp, F., Schubert, U., Schmid, J., Lehmann, S., Latunde-Dada, G. O., Kose, T., Steenblock, C., Bornstein, S. R., Linkermann, A., & Ludwig, B. (2023). Mechanistic Insights into Ferroptotic Cell Death in Pancreatic Islets. *Hormone and Metabolic Research.*

215. Prasad M, K., Mohandas, S., & Kunka Mohanram, R. (2023). Role of ferroptosis inhibitors in the management of diabetes. *BioFactors (Oxford, England)*, 49(2), 270-296.
216. Rossander-Hultén, L., Brune, M., Sandström, B., Lönnerdal, B., & Hallberg, L. (1991). Competitive inhibition of iron absorption by manganese and zinc in humans. *The American journal of clinical nutrition*, 54(1), 152-156.
217. Davaanyam, D., Lee, H., Seol, S. I., Oh, S. A., Kim, S. W., & Lee, J. K. (2023). HMGB1 induces hepcidin upregulation in astrocytes and causes an acute iron surge and subsequent ferroptosis in the postischemic brain. *Experimental & molecular medicine*, 55(11), 1-15.
218. Garay-Malpartida, H. M., Mourão, R. F., Mantovani, M., Santos, I. A., Sogayar, M. C., & Goldberg, A. C. (2011). Toll-like receptor 4 (TLR4) expression in human and murine pancreatic beta-cells affects cell viability and insulin homeostasis. *BMC immunology*, *12*, 1-8.
219. Ji, Y., Sun, S., Shrestha, N., Darragh, L. B., Shirakawa, J., Xing, Y., He, Y., Carboneau, B. A., Kim, H., An, D., Ma, M., Oberholzer, J., Soleimanpour, S. A., Gannon, M., Liu, C., Naji, A., Kulkarni, R. N., Wang, Y., Kersten, S., & Qi, L. (2019). Toll-like receptors TLR2 and TLR4 block the replication of pancreatic β cells in diet-induced obesity. *Nature Immunology*, 20(6), 677-686.
220. Sepehri, Z., Kiani, Z., Nasiri, A. A., & Kohan, F. (2016). Toll-like receptor 2 and type 2 diabetes. *Cellular & molecular biology letters*, 21(1), 1-9.
221. Lee, S. M., Choi, S. E., Lee, J. H., Lee, J. J., Jung, I. R., Lee, S. J., Lee, K. W., & Kang, Y. (2011). Involvement of the TLR4 (Toll-like receptor4) signaling pathway in palmitate-induced INS-1 beta cell death. *Molecular and cellular biochemistry*, 354(1-2), 207-217.
222. Liu, F., Lu, W., Qian, Q., Qi, W., Hu, J., & Feng, B. (2012). Frequency of TLR 2, 4, and 9 gene polymorphisms in Chinese population and their susceptibility to type 2 diabetes and coronary artery disease. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2012.
223. Maldonado-Bernal, C., Trejo-De la O, A., Sánchez-Contreras, M. E., Wacher-Rodarte, N., Torres, J., & Cruz, M. (2011). Low frequency of Toll-like receptors 2 and 4 gene polymorphisms in Mexican patients and their association with type 2 diabetes. *International journal of immunogenetics*, 38(6), 519-523.
224. Karaali, Z. E., Candan, G., Aktuğlu, M. B., Velet, M., & Ergen, A. (2019). Toll-Like Receptor 2 (TLR-2) Gene Polymorphisms in Type 2 Diabetes Mellitus. *Cell journal*, 20(4), 559-563.
225. Yehualashet, A. S. (2020). Toll-like Receptors as a Potential Drug Target for Diabetes Mellitus and Diabetes-associated Complications. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy*, 13, 4763-4777.
226. Cargnello, M., & Roux, P. P. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, *75*(1), 50-83.
227. Roskoski, R. (2012). ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacological research*, 66(2), 105-143.
228. Lu, Z., & Xu, S. (2006). ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB life*, 58(11), 621-631.
229. Costes, S., Broca, C., Bertrand, G., Lajoix, A. D., Bataille, D., Bockaert, J., & Dalle, S. (2006). ERK1/2 control phosphorylation and protein level of cAMP-responsive element-binding protein: a key role in glucose-mediated pancreatic beta-cell survival. *Diabetes*, 55(8), 2220-2230.
230. XIANG, R. L., MEI, M., SU, Y. C., LI, L., WANG, J. Y., & WU, L. L. (2015). Visfatin Protects Rat Pancreatic β-cells against IFN-γ-Induced Apoptosis through AMPK and ERK1/2 Signaling Pathways. *Biomedical and environmental sciences: BES*, 28(3), 169-177.
231. Quoyer, J., Longuet, C., Broca, C., Linck, N., Costes, S., Varin, E., Bockaert, J. L., Bertrand, G., & Dalle, S. (2010). GLP-1 mediates antiapoptotic effect by phosphorylating Bad through a beta-arrestin 1-mediated ERK1/2 activation in pancreatic beta-cells. *The Journal of biological chemistry*, 285(3), 1989-2002.
232. Shah, S. A. R., Khan, M. I., Jawaid, H., Qureshi, U., Ul-Haq, Z., & Hafizur, M. R. (2021). Nicotinamide-cinnamic acid cocktail exerts pancreatic β-cells survival coupled with insulin secretion through ERK1/2 signaling pathway in an animal model of apoptosis. *DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29(2), 483-492.
233. Liu, L., Liang, C., Mei, P., Zhu, H., Hou, M., Yu, C., Song, Z., Bao, Y., Huang, Y., Yi, J., Wang, S., Wu, Y., Zheng, L., Sun, Y., Wang, G., Huo, M., Yang, S., Sun, L., & Li, Y. (2019). Dracorhodin perchlorate protects pancreatic β-cells against glucotoxicity- or lipotoxicity-induced dysfunction and apoptosis in vitro and in vivo. *The FEBS journal*, 286(18), 3718-3736.
234. Kim, M. J., Park, I. J., Yun, H., Kang, I., Choe, W., Kim, S. S., & Ha, J. (2010). AMP-activated protein kinase antagonizes pro-apoptotic extracellular signal-regulated kinase activation by inducing dual-specificity protein phosphatases in response to glucose deprivation in HCT116 carcinoma. *The Journal of biological chemistry*, 285(19), 14617-14627.

235. Groft, S. G., Nagy, N., Henry Boom, W., & Harding, C. V. (2020). Toll-Like Receptor 2-Tpl2-Dependent ERK Signaling Drives Inverse Interleukin 12 Regulation in Dendritic Cells and Macrophages. *Infection and immunity*, 89(1), 10-1128.
236. Flynn, C. M., Garbers, Y., Lokau, J., Wesch, D., Schulte, D. M., Laudes, M., Lieb, W., Aparicio-Siegmund, S., & Garbers, C. (2019). Activation of Toll-like Receptor 2 (TLR2) induces Interleukin-6 trans-signaling. *Scientific reports*, 9(1), 7306.
237. Xiong, L., Zhevlakova, I., West, X. Z., Gao, D., Murtazina, R., Horak, A., Brown, J. M., Molokotina, I., Podrez, E. A., & Byzova, T. V. (2023). TLR2 Regulates Hair Follicle Cycle and Regeneration via BMP Signaling. *bioRxiv: the preprint server for biology*.
238. Parker, L. C., Whyte, M. K. B., Vogel, S. N., Dower, S. K., & Sabroe, I. (2004). Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 agonists regulate CCR expression in human monocytic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 172(8), 4977-4986.
239. Dasu, M. R., Devaraj, S., Zhao, L., Hwang, D. H., & Jialal, I. (2008). High glucose induces toll-like receptor expression in human monocytes: mechanism of activation. *Diabetes*, 57(11), 3090-3098.
240. Chen, Y. R., & Tan, T. H. (2000). The c-Jun N-terminal kinase pathway and apoptotic signaling (review). *International journal of oncology*, 16(4), 651-662.
241. Kaneto, H., Xu, G., Fujii, N., Kim, S., Bonner-Weir, S., & Weir, G. C. (2002). Involvement of c-Jun N-terminal kinase in oxidative stress-mediated suppression of insulin gene expression. *The Journal of biological chemistry*, 277(33), 30010-30018.
242. Jiao, J., Dou, L., Li, M., Lu, Y., Guo, H. B., Man, Y., Wang, S., & Li, J. (2012). NADPH oxidase 2 plays a critical role in dysfunction and apoptosis of pancreatic β-cells induced by very low-density lipoprotein. *Molecular and cellular biochemistry*, 370(1-2), 103-113.
243. Li, J., Chen, L., Zhang, Y., Zhang, W. J., Xu, W., Qin, Y., Xu, J., & Zou, D. (2013). TLR4 is required for the obesity-induced pancreatic beta cell dysfunction. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 45(12), 1030-1038.
244. Liu, Y., Tian, Y., Dai, X., Liu, T., Zhang, Y., Wang, S., Shi, H., Yin, J., Xu, T., Zhu, R., Zhang, Y., Zhao, D., Gao, S., Wang, X. D., Wang, L., & Zhang, D. (2023). Lycopene ameliorates islet function and down-regulates the TLR4/MyD88/NF-κB pathway in diabetic mice and Min6 cells. *Food & function*, 14(11), 5090-5104.
245. Choudhury, S., Ghosh, S., Gupta, P., Mukherjee, S., & Chattopadhyay, S. (2015). Inflammation-induced ROS generation causes pancreatic cell death through modulation of Nrf2/NF-κB and SAPK/JNK pathway. *Free radical research*, 49(11), 1371-1383.
246. Guzmán-Ruiz, R., Ortega, F., Rodríguez, A., Vázquez-Martínez, R., Díaz-Ruiz, A., Garcia-Navarro, S., Giralt, M., Garcia-Rios, A., Cobo-Padilla, D., Tinahones, F. J., López-Miranda, J., Villarroya, F., Frühbeck, G., Fernández-Real, J. M., & Malagón, M. M. (2014). Alarmin high-mobility group B1 (HMGB1) is regulated in human adipocytes in insulin resistance and influences insulin secretion in β-cells. *International journal of obesity (2005)*, 38(12), 1545-1554.
247. Chung, H., Hong, S. J., Choi, S. W., & Park, C. G. (2020). The effect of preexisting HMGB1 within fetal bovine serum on murine pancreatic beta cell biology. *Islets*, 12(1), 1-8.