

**T.C.**  
**GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PANKREAS DOKUSUNDA HÜCRE YÜZEYİNE BAĞLI**  
**GLİKOKONJUGAT PROFİLLERİNİN MİKROSKOBİK**  
**İŞARETLEME YÖNTEMLERİ İLE İRDELENMESİ**

**TUĞÇE UYGUR**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**GEBZE**  
**2016**

**T.C.  
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PANKREAS DOKUSUNDA HÜCRE  
YÜZEYİNE BAĞLI GLİKOKONJUGAT  
PROFİLLERİNİN FLORESAN İŞARETLİ  
LEKTİN İLE İŞARETLENMESİ**

**TUĞÇE UYGUR  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**DANIŞMANI  
YRD. DOÇ. DR YOSUN MATER**

**GEBZE  
2016**

**T.R.**

**GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY  
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES**

**LABELING OF CELL SURFACE  
GLYCOCONJUGATE PROFILES OF  
PANCREAS TISSUE**

**TUĞÇE UYGUR**

**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF SCIENCE**

**DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY OF GENETICS**

**THESIS SUPERVISOR  
ASSİST.PROF.DR YOSUN MATER**

**GEBZE**

**2016**



## YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 19/01/2016 tarih ve 2016/05 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 12/02/2016 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Tuğçe UYGUR'un tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

### JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Yrd.Doç.Dr. Yosun MATER

ÜYE

: Doç.Dr. Ayten KANDILCI

ÜYE

: Yrd.Doç.Dr. Şule Beyhan ÖZDAŞ

### ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

...../...../..... tarih ve ...../..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

## ÖZET

Bu tezde, pankreas  $\beta$  hücre ve asiner hücre yüzey glikokonjugatlarından, N-Asetilglukozamin oligomerleri, sialik asidi (GlcNAc, Neu5Ac), özellikle  $\beta$ -GlcNAc tipi sialik asidi floresan işaretli Wheat Germ Agglutinin (WGA) lektini kullanılarak, işaretlemek amaçlanmıştır. Deneyleerde, İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Enstitüsü'nden alınan kontrol diyeti ve yağlı diyet uygulanarak kısmen obeziteye bağlı metabolik sendrom oluşturulmuş iki farklı grup sıçan pankreası kullanılmıştır. Ekzokrin ve endokrin pankreas dokusu hücre zarlarında yer alan glikan birimlerinin, fluorescein işaretli lektinlerle özgün olarak işaretlenmede kullanılabilirliği araştırılmıştır. Bu amaçla çalışmada, hücre yüzeylerinde bulunan N-Asetilglukozamin oligomerleri, özellikle  $\beta$ -GlcNAc tipi olmak üzere sialik asiti işaretleyen FITC-WGA ile floresan mikroskopta mikrograflar alınarak görüntülenmiştir.

Elde edilen verilere göre değerlendirilen mikrografların sonucunda, bu birimler, görüntüler çok net olmamakla birlikte, yağlı diyet uygulanan sıçanlarda kontrol grubuna göre, hem ekzokrin pankreasta asiner hücrelerde hem de endokrin pankreasta beta hücrelerde GlcNAc oligomerleri, sialik asit ve özellikle  $\beta$ -GlcNAc tipi sialik asit oldukça yaygın ve yoğun olarak işaretlenmiştir. Bu sonuçlar, DAPI boyamasında da bir artmanın olmamasıyla ve her iki floresan boyamanın çakıştırılmasıyla desteklenmiştir.

Bu çalışmada kullanılan yöntemin, hücre yüzeylerinde tanıma tutunma mekanizmalarına aracılık eden şeker birimlerinin uygulanan diyetle artmasıyla *Diabetes mellitus* başta olmak üzere otoimmün rahatsızlıkları belirlemede kullanılabileceği, metabolik hastalıklara yönelik erken tanı ve/veya tedavi çalışmalarında, hastalığa ilişkin yönlendirilmiş ilaç çalışmaları için yol gösterici olabileceği önerilmiştir.

**Anahtar kelimeler: FITC-WGA, *Diabetes mellitus*, sialik asit,  $\beta$ -GlcNAc tipi sialik asit, floresan mikroskop.**

## SUMMARY

In this thesis, it's purposed that staining by using of FITC-WGA of the N-acetylglucosamine oligomers, sialic acid and especially  $\beta$ -GlcNAc type sialic acid these are from among of the cell surface glycoconjugates of pancreatic beta and acinar cells. Using two different group rat pancreases for the experiments provided from Istanbul University Institute of Experimental Medicine that applied control diet and high fat diet constituted obesity induced metabolic syndrome. It was researched that the availability of glycan units on the surface of cells of exocrine and endocrine pancreas tissue for specific labelling with fluorescent labelled lectins. With this purpose, N-acetylglucosamine oligomers on cell surface were displayed with taking micrographs by FITC-WGA that is labelled especially  $\beta$ -GlcNAc type sialic acid.

Evaluated micrographs according to the data, this units with not very unclear images, rats that fed with high fat diet GlcNAc oligomers, sialic acid and  $\beta$ -GlcNAc type sialic acids on both acinar cells of exocrine pancreas and beta cells of endocrine pancreas stained more extensive and more intense to control group rats. This conclusions were supported with no increase in DAPI staining and merged two staining.

It is suggested that this method, increased glycan units by applied diet these mediate mechanisms of recognition and adhesion on cell surface, it may be using for detection of autoimmune disorders notably *Diabetes mellitus*, may be guiding to early diagnosis and/or treatment studies for metabolic diseases , directed medicine studies.

**Key Words: FITC-WGA, *Diabetes mellitus*, sialic acid,  $\beta$ -GlcNAc type sialic acid, fluorescence microscopy.**

## TEŞEKKÜR

Başta, yüksek lisans eğitimimde ve akademik hayatımda desteğini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyip bilgisi ve deneyimi ile bu çalışmanın oluşmasının yolunu açan danışmanım Yrd. Doç.Dr Yosun Mater'e,

Tezin laboratuvar çalışmaları aşamasında yardımcı olan ve imkan sağlayan Yrd. Doç.Dr Şule Beyhan Özdaş'a,

Deneysel materyalin temini için İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'ne,

Projeye ayrılan bütçe için Gebze Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı'na,

Bugünlere gelmemde büyük katkısı olan emekli Prof.Dr. Sabire Karaçalı'ya,  
Bu süreçte sabırla ve özveriyle yanımda olan ve benden desteklerini esirgemeyen aileme ve tüm arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa</u></b>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin amacı, kapsamı, içeriği	1
1.2. Pankreasın tarihçesi	1
1.3. Pankreasın anatomisi ve histolojisi	3
2. EN SIK KARŞILAŞILAN PANKREAS HASTALIKLARI	9
2.2. Kistik Fibrozis	10
2.3. Pankreas Kanseri	11
2.4. Şeker Hastalığı, Diyabet ( <i>Diabetes mellitus</i> )	13
3. GLİKOKONJUGATLARIN PANKREAS $\beta$ HÜCRELERİNDEKİ VE DİYABETTEKİ ROLLERİ	16
3.1. Sialik Asitler ve Diyabet	16
3.2. Glikoz sensörü ve insulin sinyalinin düzenleyicisi olarak heksozamin biyosentez yolağı (HBP)	17
3.3. O N-asetil glikozaminin (O-GlcNAc) Modifikasyonunun Pankreas Beta Hücrelerindeki Fonksiyonları	18
3.4. O N-asetil glikozaminin (O-GlcNAc) Modifikasyonu ve Diyabet	19
3.5. O N-asetil glikozaminin (O-GlcNAc) Modifikasyonunun Diyabetik Komplikasyonlarla İlişkili Organ ve Dokularda Fonksiyonları	20
3.6. Proteoglikanlar ve Diyabet	21
3.6.1. Heparan sülfat içeren proteoglikanlar	21

3.7. Glikosfingolipitler ve Diyabet	22
3.8. $\beta$ Hücrelerin Belirlenmesi ve Sınıflandırmasında İşaretleyici Olarak Sialik asit polimerli Nöral hücre adezyon molekülü (PSA-NCAM)	24
4. GLİKOKONJUGATLAR VE LEKTİNLER	26
4.1. Lektinlerin genel özellikleri	26
4.2. Buğday tohumu lektini (Wheat Germ Agglutinin, <i>-Triticum vulgare-</i> , WGA)	28
4.3. WGA ile yapılan çalışmalar	29
5. MATERYAL-METOD	31
5.1. Deneyde Kullanılacak Doku Materyalinin Eldesi ve Hazırlanması	31
5.2. Floresan İşaretleme Prosedürü	32
6. SONUÇLAR	33
6.1. FITC-WGA Lektini İşaretleme Sonuçları	33
6.2. Histolojik Boyama Sonuçları	38
7. TARTIŞMA	39
KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ	48

# SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u>	<u>Açıklamalar</u>
<u>Kısaltmalar</u>	
Å	: Angström
$\alpha$	: Alfa
$\beta$	: Beta
$\delta$	: Delta
$\epsilon$	: Epsilon
°C	: Celsius
NaCl	: Sodyum klorür
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
Dk	: Dakika
E.R.	: Endoplazmik retikulum
Gr	: Gram
H&E	: Hematoksilen-Eozin
İ.Ü.	: İstanbul Üniversitesi
Kcal	: Kilokalori
Kg	: Kilogram
LPS	: Lipopolisakkarit
Mg	: Miligram
M.Ö.	: Milattan önce
M.S.	: Milattan sonra
USA	: United States of America

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b><u>Sekil No:</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
1.1: Pankreas kanalını gösteren Wirsüng orijinal çizimi.	2
1.2: Pankreasın çevresindeki organlarla ve yapılarla anatomik ilişkisi.	4
1.3: Pankreasta endokrin ve ekzokrin doku.	4
1.4: Işık mikroskobunda objektif lens ile pankreas kesiti.	6
1.5: Anti-glukagon (a), anti-insulin (b), anti-somatostatin (c) ve anti-pankreatik polipeptit (d) ile immunohistokimya boyamada yan yana rat pankreatik adacıkların ışık mikrografları.	7
1.6: Pankreatik adacıkların anatomik karakteristikleri.	8
6.1: FITC - WGA ile işaretlenmiş kontrol pankreas kesitleri.	34
6.2: FITC - WGA ile işaretlenmiş yağlı diyet pankreas kesitleri.	35
6.3: FITC- WGA (Wheat Germ Aglutinin) ile Yapılan Denemenin Sonuçları.	36
6.4: Histolojik boyama sonuçları.	38

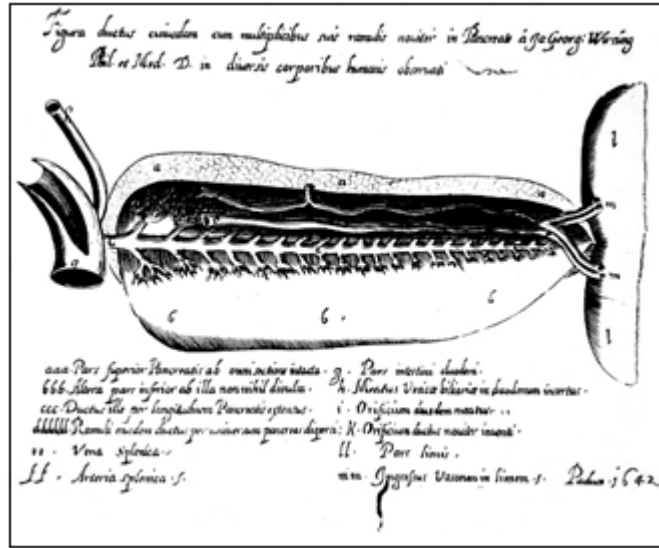
# 1. GİRİŞ

## 1.1. Tezin amacı, kapsamı, içeriği

Bu tez çalışmasında amaç, floresan işaretli WGA lektini kullanılarak pankreas  $\beta$  hücre ve asiner hücre yüzey glikokonjugatları arasında N-Asetilglukozamin oligomerlerini, sialik asidi (GlcNAc, Neu5Ac) işaretlemekle beraber (Vector Laboratories) özellikle  $\beta$ -GlcNAc tipi sialik asidi işaretlemektir [1]. Bu çalışmada sialik asit (GlcNAc, Neu5Ac) ve  $\beta$ -GlcNAc tipi sialik asit şeker profillerinin işaretlemesi ve göreceli olarak miktarının belirlenmesini kolaylaştıracak immünohistokimyasal bir işaretleme yöntemini denemek hedeflenmiştir. Bu sayede asinar ve  $\beta$  hücre yüzeylerindeki sialik asit ve GlcNAc rezidülerinin daha kolay belirlenmesine yardımcı olacağı ve tanıma tutunma mekanizması birimleri, yani glikokonjugatlar kullanılarak hastalığın gelişmesinde farklı pankreas hücrelerinde görülen değişim, dünya genelinde en sık karşılaşılan metabolik, kronik hastalıklardan biri olan Diabetes mellitus'un etkilerine dair (Diyabet, Şeker hastalığı) yol gösterici olabilir. Ek olarak bu çalışmamız hastalığın ilerlemesine yönelik olası yönlendirilmiş ilaç çalışmaları için yol gösterici ve destekleyici olabilir düşüncesindeyiz.

## 1.2. Pankreasın tarihçesi

Pankreas, ilk olarak M.Ö. 336 yılında anatomist ve cerrah Herophilus tarafından keşfedilmiştir. Herophilus'tan 400 yıl sonra, M.S. 1. ya da 2. yüzyılda Efesli anatomist Ruphos bu organa Yunanca "bütün et" (all flesh) anlamına gelen "pankreas" adını vermiştir. Roma İmparatorluğu döneminde Galen, pankreasın; hemen arkasında uzanan büyük kan damarlarını korumak için bir yastık ya da tampon rolü oynadığını düşünmüştür. Pankreas ile ilgili çalışmalar Johann Georg Wirsüng tarafından pankreas kanalının bulunmasıyla devam etmiştir (Şekil 1.1) [2].



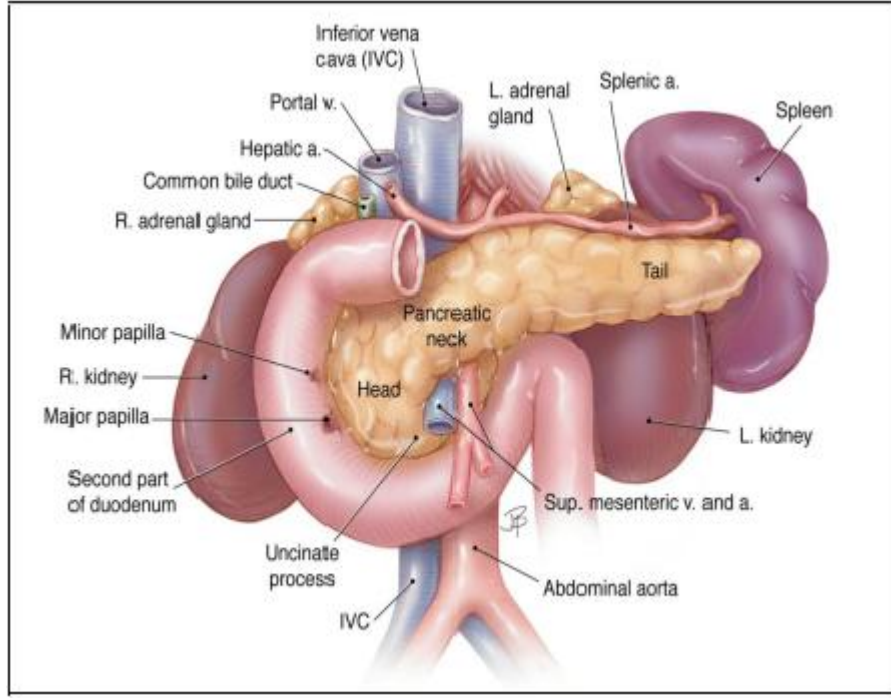
Şekil 1.1: Pankreas kanalını gösteren Wirsüng orijinal çizimi.

Par Moyse, 1852 yılında yazdığı teziyle, pankreasın histolojisini tanımlayan muhtemelen ilk kişidir. Kabaca yaptığı çizimde, ekzokrin asinusun yapısını tasvir etmiştir. 1869'da Paul Langerhans, bugün Langerhans adacıkları olarak bildiğimiz, pankreasın endokrin sistemi olan, pankreasın adacıklarını tanımlamıştır. Langerhans'ın tanımı, histolojik olarak pankreasın ilk iyi tanımıdır. Sonraları diyabet olarak bilinen semptomları; sık idrara çıkma, giderilemeyen susuzluk, idrarda şekere rastlama, kilo kaybı ve ölüm olan hastalık, M.Ö. 1500'li yıllarda da bilinmektedir. Bu hastalığa diyabet-*Diabetes mellitus* ismi ise Aretaeus (M.S. 81-150) tarafından verilmiştir (Yunanca Diabetes: İdrara geçen, Latince mellis: tatlı veya bal). Joseph Friedrich Von Mering (1849-1908) ve Oskar Minkowski (1858-1931), 1889'da bir köpeğin pankreasının cerrahi yolla alınmasının (pankreatektomi) diyabetle sonuçlandığını kanıtlamışlardır [3]. Etiënne Lancereaux 1877'de pankreasta ileri atrofiyi, ciddi diyabetik olan 2 modelle tanımlamasıyla, pankreatik diyabet kavramını başlatmıştır. Jean de Meyer, 1909'da "insülin" kelimesini Langerhans adacıklarının bir ürünü olarak tanımlamak üzere öne sürmüştür [4]. Frederick Grant Banting (1891-1941) ve Charles Herbert Best (1899-1978), 1921'de insulini keşfetmişlerdir. İlk islet hücresi hormonu keşfedilmiş ve bu da yeni bir hastalığın; insülin üreten tümörün keşfedilmesine yol açmıştır. Frederick Sanger 1958'de insülinin moleküler yapısını keşfetmiştir. Pankreastan barsağa salgılanan sindirim enzimleri (amilaz, lipaz, tripsin, vb.) 19. yy'ın sonuna doğru keşfedilmiştir. Yağları, proteinleri ve nişastayı yıkım etkinliklerinin gösterilmesi, basamak basamak gerçekleşmiştir.

Pankreasın birincil görevi olan sindirim enzimlerinin esaslarının keşfine, Johann Nepomuk Eberle (1798-1834); Claude Bernard (1813-1878); Alexander Danilevsky ve Willy Kuhne (1837-1900) olmak üzere pek çok bilim insanı, farklı ülkelerden katılmıştır. William Maddock Bayliss ve Ernest Henry Starling 1902'de sekretini keşfetmişler ve böylece hormon kavramına giriş yapmışlardır. Duodenal ve jejunal mukozadan salgılanan sekretin hormonu, pankreası sıvısını barsağa salgılaması için uyarmaktadır. Julius Wohlgemuth 1908'de serumda amilaz konsantrasyonunu ölçmek için bir metod tanımlamıştır. Böylece laparotomi otopside önce, akut pankreatit tanısında kullanılmıştır. George Palade, 1974'de ekzokrin pankreas hücresindeki protein sentezi, segregasyon, taşınım, depolama, salınımın biyokimyasal aşamaları ve her bir işlemle ilişkili ultra-yapısal birimleri tanımlamıştır [3].

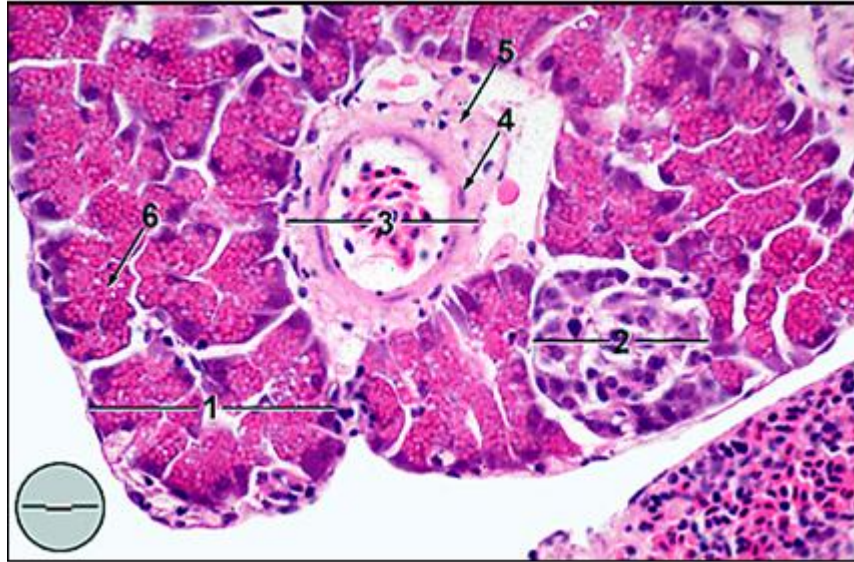
### **1.3. Pankreasın anatomisi ve histolojisi**

Pankreas, karnın üst kısmında midenin arkasında yer almaktadır. Pankreas, gastrointestinal sistemin parçasıdır. Ürettiği sindirim enzimlerini barsağa salgılayan ve aynı zamanda vücutta enerji metabolizmasını ve depolamayı kontrol eden hormonları üretilen, kana salgılayan endokrin bir organdır [5]. Midenin arkasında; ince barsak, karaciğer ve dalak arasında yer almaktadır. Yaklaşık 16 cm uzunluğunda ve yaprak şeklindedir. Geniş kısmı pankreas başı olarak isimlendirilip karın merkezine doğru konumlanır. Orta kısmı; gövde, ince kısmı kuyruk olarak isimlendirilir ve sol tarafa uzanmaktadır. Superior mezenterik arter, superior mezenterik ven, portal ven ve çölyak arter (aksis) olmak üzere bir çok kan damarı pankreası çevreleyerek; pankreası ve çevresindeki organları kanla besler (Şekil 1.2) [5], [6].



Şekil 1.2: Pankreasın çevresindeki organlarla ve yapılarla anatomik ilişkisi.

Pankreas, ekzokrin ve endokrin pankreas olarak iki temel kısma ayrılmaktadır (Şekil 1. 3) [7].



Şekil 1.3: Pankreasta endokrin ve ekzokrin doku (Formalin, H&E, Bar = 22.2  $\mu$ m). 1. Ekzokrin pankreas dokusu (asinar hücreler); 2. Endokrin pankreas dokusu (Langerhans adacıkları); 3. Kan damarları; 4. Endotel; 5. Bağ doku; 6. Zimojen granülleri (Formalin, H&E, Bar=22.2  $\mu$ m).

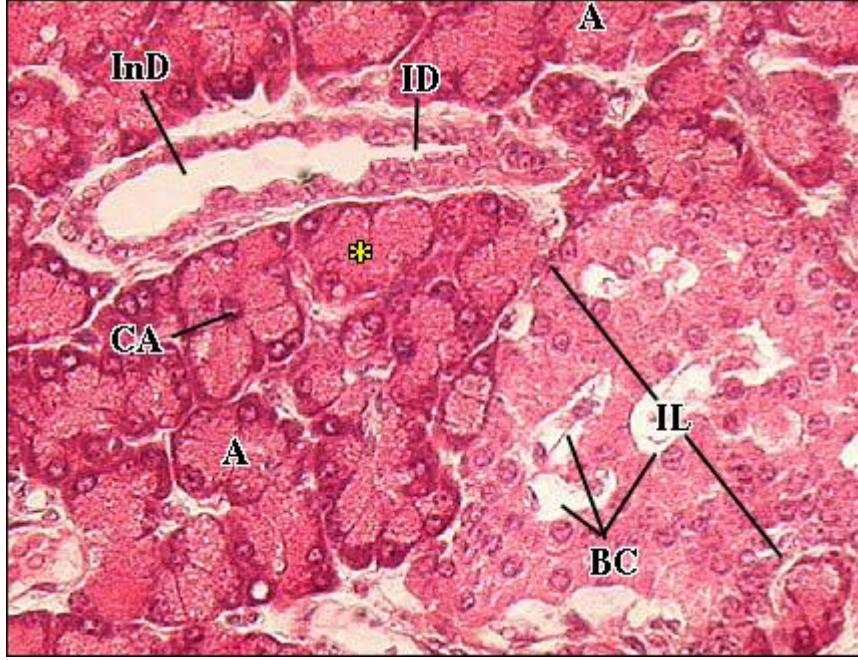
- Ekzokrin pankreas

Sindirim enzimlerini üreten ve oniki parmak barsağına (Duodenum) salgılayan kısımdır. Bağ dokuyla, damarlar ve sinirlerle ilişkili asinar ve kanal hücrelerini içerir. Ekzokrin bileşenler, pankreasın kütlesinin %95'inden fazlasını oluşturmaktadır [5]. Pankreastan ekzokrin salgınım, sinirler ve hormonlarla kontrol edilmektedir. Sekretin hormonu, duodenuma nöroendokrin hücrelerinden salındığında, pankreas salgısı sulu ve bikarbonat bakımından zengin hale gelmektedir. Bu temel salgınım, ince barsaktan gelen asidik kimusu nötralize etmektedir. Ayrıca koleosistokinin (CCK) duodenumdaki nöroendokrin hücreler tarafından salgılandığında, pankreas ince barsağın lümenindeki karbohidrat, protein, lipit ve nükleik asitleri yıkan enzimler bakımından zengin bir ürün salgılamaktadır. Pilorik nöroendokrin hücreler tarafından salgılanan gastrin de, sindirim enzimlerince zengin pankreas salgınımına yol açmaktadır. Pankreastan salgılanan iki sindirim enzimi, tripsin ve kimotripsin; aktif olmayan, pro ya da zimojen formunda sentezlenmektedir ve pankreatik asinar hücrelerini sindirmemesi için duodenumun lümeninde enterokinaz ile aktiveleştirilmektedir.

Asinar salgı bezi, asinus hücreleri ve kanallardan oluşmaktadır. Asinus hücreleri, pankreasın salgı hücreleridir ve küçük bir lümenin etrafına dizilmişlerdir. Pankreatik asinar hücreler, protein sentezinin tipik modeliyle sindirim enzimi üretirler. Bu hücreler salgınım için fazlasıyla protein sentezi gerçekleştirirler. Bu yüksek aktivite, hematoksilin-eozin gibi histolojide kullanılan boyalar ile çift bölgeli (bizonal) boyanma özelliklerinde, açığa çıkmaktadır. Bu salgı hücrelerinin bazal bölgesi ribozomlarında protein sentezlenen endoplazmik retikulumun fazla sayıda olduğunu gösteren hematoksilen ile yoğun olarak boyanmaktadır. Bu proteinler granüllü E.R.'den Golgi'ye glikozillenmek üzere taşınmakta, ardından salgı granülleri olarak salgınmaktadır. Enzimler, bu granüllerde inaktif ya da zimojen formunda bulunmakta, kanal sistemine salgınımından sonra aktiveleşmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda protein içeren, çok sayıda zimojen granülünün varlığı salgı hücrelerinin apikal bölgesinde yoğun eozin boyama ile görülmektedir. Bu granüller açlık boyunca ya da öğünlerin arasında en yüksek seviyede ve yemek yendikten sonra ise en düşük seviyededir.

Kanallar, asinar hücrelerin salgı ürünlerini taşımaktadır. Kanal sisteminin ilk kısmı interkalar ya da intralobüler kanal olarak adlandırılmaktadır. Salgı ürünlerine

bikarbonat iyonunu salgılayan kübik epitel hücreler ile kaplıdır. Bu kanal duvarları soluk boyanan sentroasinar hücrelerden oluşan asinar lümenin içine uzanmaktadır. İnterkalar kanal etrafında çok az bağ dokuya sahiptir, daha öne çıkan bağ doku septumun içinde uzanan geniş interlobüler kanalla sonuçlanmaktadır. İnterlobüler kanallar goblet hücreleri içeren silindirik epitel ile kaplıdır. Salgılar, pankreasın çıkışı olan ana pankreatik kanallara dökülürler (Şekil 1.4) [8], [9].

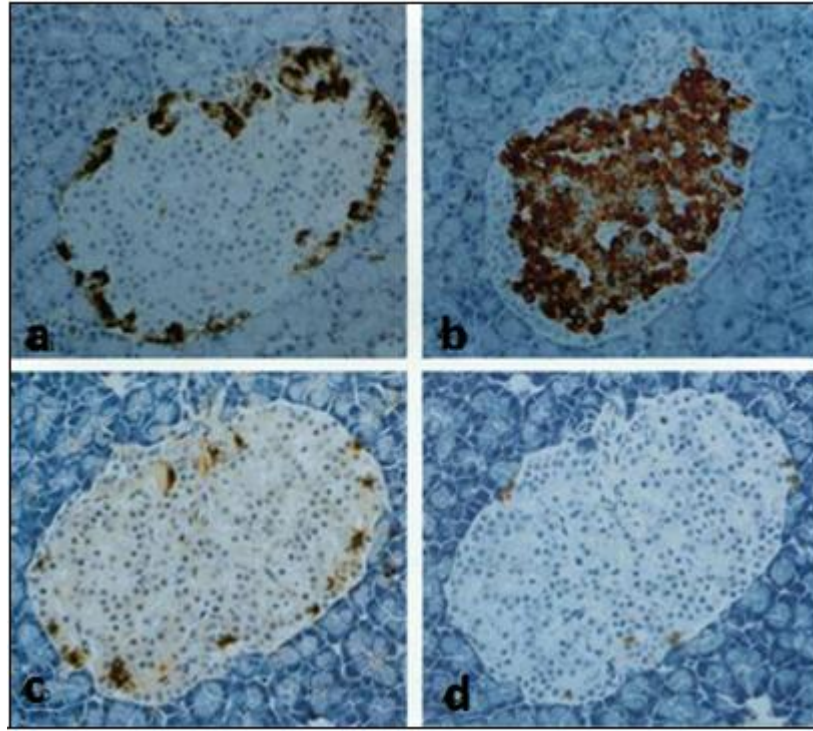


Şekil 1.4: Işık mikroskopunda objektif lens ile pankreas kesiti [X40]. A: Asinus, BC:Langerhans adacıklarındaki kılcak damarlar, CA: Senroasinar hücreler, ID: İnterkalar kanal, IL: Langerhans adacıkları, InD: İnterlobüler kanal, Sarı yıldız imi: Asinar hücrelerin sitoplazması (Zimojen granülleriyle dolu).

- Endokrin pankreas

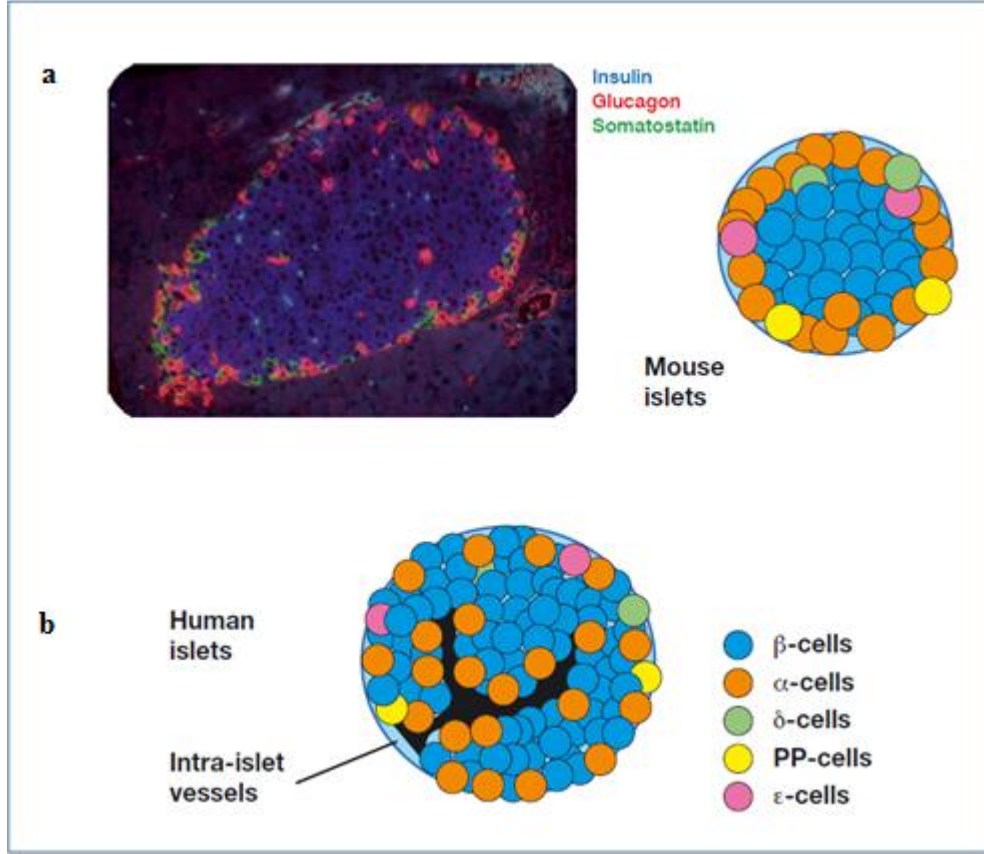
Pankreasın bu kısmı, pankreas kütesinin %1-2'sini oluşturmaktadır [5]. Pankreasın endokrin hücreleri, Langerhans adacıkları olarak bilinen kan damarları bakımından zengin yuvarlak/oval şekilli alanlarda dizilmiş ya da asinus ya da kanallara yakın ekzokrin pankreas boyunca yayılmıştır. Adacık ya da diğer bölgelerde, her biri farklı peptid hormonu salgılayan çok sayıda farklı tipte hücre bulunmaktadır. Bu hücreleri rutin hematoksilin-eozin boyaması kullanılarak

hazırlanan histolojik preparatlarda ayırt etmek mümkün değildir. Özel peptit salgılayan hücreleri tanımlayabilmek için immunohistokimyasal uygulamalar gereklidir. Bu yöntem, ışık mikroskopunda farklı peptit hormonlarını salgılayan hücrelerin görünür hale gelmesi için immunoperoksidaz gibi boyalarla birleştirilmiş spesifik peptide özgü antikor kullanılarak bir boyamaya ihtiyaç duyulur. Endokrin pankreastan salgılanan peptit hormonlar; insulin, glukagon, somatostatin, vazoaktif intestinal peptid, pankreatik polipeptit, motilin, serotonin ve P maddesi olarak sıralanmaktadır [8], [9].



Şekil 1.5: Anti-glukagon a), anti-insulin b), anti-somatostatin c) ve anti-pankreatik polipeptit d) ile immunohistokimya boyamada yan yana sıçan pankreas adacıklarının ışık mikrografları (X200).

Langerhans adacıklarında, %60-80 insulin salgılayan  $\beta$  hücreleri, %10-20 glukagon salgılayan  $\alpha$  hücreleri, az sayıda somatostatin salgılayan  $\delta$  hücreleri, pankreatik polipeptit (PP) hücreleri ve ghrelin salgılayan  $\epsilon$  hücreleri olmak üzere 5 tip hücre bulunmaktadır ( Şekil 1.6) [10], [11].



Şekil 1. 6: Pankreatik adacıkların anatomik karakteristikleri. a) Farede pankreatik adacıkların immunohistokimyasal analizi. İnsulin-pozitif  $\beta$  hücreler (mavi) adacığın merkezi bölgesinde, glukagon-pozitif  $\alpha$  hücreler zar kısmında bulunmaktadır.[X40]

Sağ üstte şematik olarak gösterilmiştir. b) İnsanda adacığın yapısının şematik gösterimi.  $\alpha$  hücreler, adacıkların merkezinde adacıklar arası, vasküler damarlarla yüzleşip,  $\beta$  hücreler tarafından kuşatılmaktadır.

## 2.EN SIK KARŞILAŞILAN PANKREAS HASTALIKLARI

Başlıca görülen pankreas hastalıkları, akut ve kronik pankreatit, kistik fibrozis, pankreas kanseri ve diyabettir.

### 2.1. Akut ve Kronik Pankreatit

Pankreatit, asinar hücelere zarar veren ve pankreasta yangı veya iltihaplanma yani inflamasyon oluşturan temel lezyonları içeren bir hastalık grubuna verilen isimdir. Şiddeti ve süresi değişkendir. Klinik işleyişinde çeşitlilikler gözlenir. En ciddi akut formu, karın (abdominal) ağrısı, şok ve bazen ölümlle karakterize edilen, akut hemorajik (kanamalı) pankreatittir. Şiddetli akut pankreatit, akciğerlerde ödem, hipoksemi (Arterlerde oksijen basıncının düşmesi, yeteri kadar oksijen alınamaması durumu), böbrek yetmezliği ve diğer sistemik belirtilerle karmaşık hale gelebilen bir hastalık türüdür. Tedavi sonrası, hastalığın iyileşmesini takiben, kısa süreli görülen akut pankreatitin hafif dereceleri interstisyel pankreatit olarak adlandırılmaktadır. Pankreatitin devam etmesi veya bazı hastalarda aylar ya da yıllar sonra nüksetmesi pankreasın yıkımıyla sonuçlanmaktadır. Bu, kronik pankreatit olarak adlandırılan pankreatit tipidir. Kronik formda, başlıca klinik göstergeler, ağrı ya da pankreasın ekzokrin işlevinin kaybına yol açan hatalı emilim işaretleridir.

Akut pankreatit diğer adıyla, doku içi (interstisyel) pankreatitte, başlıca değişim, asinar dokunun stromasında ödemle seyreden akut inflamasyondur. Pankreatitin hafif derecesi bazen ödemli pankreatit olarak adlandırılır. Asinar doku, stroma ya da peripankreatik yağın, yağ dokusunun ölümü yani nekrozu önemsizdir ya da yoktur.

Akut hemorajik (kanamalı) pankreatitte başlıca değişim, asinar doku, stroma ve bitişik yağ dokunun nekrozudur. Nekrotik alanlar ve canlı doku arasındaki ara yüzde akut inflamasyon önemli bir diğer dikkat çekici belirtidir. Buna karşın, sürecin ilk zamanlarında lökositlerin sızması önemsiz seviyededir. Nekroz alanlarında hemoraji, kanama tipik olarak görülür, ancak tek şekilde gözlenmez. Ölü asinar hücelere, sindirim enzimlerinin yüksek seviyede olması nedeniyle sıvılaşarak nekroza uğramaktadırlar.

Kronik pankreatit, ısrarcı interstisyel pankreatit, doku içi fibrozis (dejenerasyon, bozulma) ve asinar dokunun küçülmesine yani atrofisine yol açabilmektedir. Akut pankreatit asinar hücre dokusunun tahribatına neden olan, kalıcı iz bırakan ve tekrarlayan ataklar nedeniyle asinar hücre dokusunun ileri derecede kaybına yol açan bir pankreas rahatsızlığıdır. Bu sürecin aktif aşamaları boyunca, doku içi bölgelere lenfositler sızmakta, takiben inflamasyon azabilmektedir. Bu hastalığın belirtileri yani lezyonları arasında yer alan en önemli değişimler, ekzokrin pankreasın atrofisi ve fibrozisidir. Kronik pankreatit, kanal tıkanması gibi pankreatitin sürekli uyarılma durumlarında ortaya çıkmaktadır. Kronik pankreatitin ileri seviyelerinde asinar doku tamamen atrofik ve yerini yoğun yapılı bağ dokusuna bırakmıştır. Adacıklar ve kanallar devamlılık gösterir ama bağ dokuyla kuşatılmıştır. Alkolik kişilerde daha sık gözlenen bir rahatsızlıktır. Ekzokrin pankreastaki atrofi, buna bağlı kalıcı zarar nedeni ile enzim salınımının normal seviyenin %10 altına düştüğü gözlenir. Buna bağlı olarak ortaya çıkan emilim bozukluğu, yağ ve azotun dışkıyla yoğun şekilde kaybına yol açar [12].

## **2.2. Kistik Fibrozis**

Kistik fibrozis, CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) genindeki mutasyonlara bağlı olarak gelişen, otozomal, resesif geçişli genetik bir hastalıktır. Hastalık salgı sistemini bozmakta ve farklı sistemlerde patolojik durumlara yol açmaktadır. Kistik fibrozis en çok akciğer ve pankreasın işlevinde sorunlar ortaya çıkmasına yol açan bir rahatsızlıktır [13]. Klinik bulguları, kötü beslenmeyle pankreas yetmezliği, akciğer hastalıkları ve bozulmuş iyon transferi (artan terlemeyle NaCl atılımı) ile tanımlanabilir.

Kistik fibrozisin pankreatik lezyonu; pankreatik kanal sisteminin aşamalı tıkanması ile sonuçlanan kronik bir çeşit pankreatitin yaygın şeklidir. İnterlobüler ve intralobüler kanallar karakteristik olarak koyu müsinoz (musin yapılı) ya da proteinöz (protein yapılı) salgılarıyla dolmuştur. Kanallar belli bir yerden ya da dağınık şekilde açılmış olarak gözlenebilir. Hastalığın erken aşamasında, yaygın interstitial pankreatit mevcuttur. Bu rahim içindeyken ve doğum esnasında gerçekleşebilmektedir. Sonrasında, asinar doku büyük ölçüde atrofik hale geldiğinde inflamasyon azalmaktadır. Doğumu takiben 2-4 yaşlarında, pankreas bağ ve/veya

adipoz dokuya gömülmüş olan kanal ve adacıklardan ibaret olmaktadır. Ekzokrin pankreasta salgılanan yetersiz enzim sonucu oluşan mal-absorpsiyon (hatalı emilim) hastaların %85'inde görülen klinik tablonun en önemli göstergesidir. Akciğerde oluşan kistik fibrozisin en önemli lezyonları ise bronşektazi (bronş genişlemesi) ve zatürreden oluşmaktadır. Barsaklarda görülen tıkanmalar, anormal intestinal (barsak) mukus salınımı yine hastalığa bağlı pankreas enzimlerinin yokluğu ya da azalması sonucu meydana gelmektedir.

### **2.3. Pankreas Kanseri**

Pankreas kanseri, pankreasta kanal hücreleri, asinar hücreler ya da adacık hücrelerinde ortaya çıkmaktadır. Ekzokrin pankreasta ortaya çıkan tümörler duktal adenokarsinomlar, ksitik veya asinar hücre tümörleri olarak adlandırılırken, endokrin pankreasta ortaya çıkan tümörler, adacık hücre tümörleri nöroendokrin tümörler olarak adlandırılmaktadır. İkincisinde, tümörlerde gerçekleşen hormon salınımı endokrin bozukluklara yol açtığından özel bir grubu temsil etmektedir. Pankreas kanseri, genellikle bölgesel invazyon (çevre dokulara yayılma) ya da metastazdan sonra teşhis edildiği için cerrahi müdahalelerle iyileşme nadir olarak gerçekleşmektedir.

İnsanda pankreas kanserinin en yaygın histolojik tipi, dezmoplastik reaksiyonu tetiklemesiyle kısmen ayırt edilen kanal adenokarsinomudur. Pankreas kanserinin 12 histolojik tipi, Antonio L. Cubilla ve Patrick J. Fitzgerald tarafından tablolştırılmıştır [14].Araştırmacılar tiplendirmeyi kanserin köken aldığı hücre tipini esas alarak yapmışlardır. Buna göre gözlenen 12 tipten, 7'si kanal hücrelerinden kökenlenen kanserlerdir ve pankreas kanserlerinin toplamının %85'ini oluşturur. Kalan 5 tip pankreas kanserlerinin %1-5'lik kısmını asinar hücrelerde görülen kanserlerin oluşturduğu ve %10'unun ise hücresel kökeni belli olmayan kanserlerin oluşturduğu ifade edilmiştir. Bu tablo, histolojik tiplerin geniş spektrumunu yansıtmaması nedeniyle dikkat çekicidir. Pankreas kanserlerinin klinik seyirlerine bakıldığında, farklı histolojik tipler için benzer olduğu gözlenmiştir. Genel klinik verilere göre, kist adenokarsinomada hastalar ortalamadan biraz daha uzun hayatta kalım göstermektedirler. Papiller kistik tümör tipinde düşük malignant potansiyeli görülmektedir. Bu tip kanser, grubun en iyi teşhis edileni ama maalesef en az sıklıkta

görülenidir. Pankreas kanseri taşıyan çoğu hastada teşhis ve klinik seyir, lezyonlu bölgenin ve tümörün yayılıma büyüklüğüne bağlıdır. Tümörlerin çoğu, sert yığın halindedir. Nadiren kistik formları gözlenebilir. Örneğin, Pankreas bezinin, başında bulunan adenokarsinomaların ortalama büyüklüğü 5 cm civarında bir çapa sahip olurken, bezin gövde ya da kuyruk kısmında yer alan tümörün boyutları 10 cm çapında olabilmektedir. Bu büyüklük farkı pankreas başında ortaya çıkan kanserlerin daha erken teşhis edilmesinden kaynaklanmaktadır. Kanserlerin çoğu baş kısmında (gövde ve kuyruk kökenli kanserlerden 3 katı daha fazla oranda) ortaya çıkmaktadır. Pankreas kanserlerinin, yaklaşık %20'si çok odaklıdır ve/veya tüm pankreası kapsamaktadır. Pankreasın gövde ya da kuyruk kısmında ortaya çıkan kanserler erken semptomlar vermemekte ve tipik olarak ağrıya neden olan pankreasın baş kısmını saran zar üzerinde yer alan (retroperitoneal) sinirlere yayılmadan ya da metastaz olmadan teşhis edilememektedir. Bu durum cerrahi yolla tümörün çıkarılmasını imkansız hale getirmektedir. Pankreas kanserlerinin metastazları genellikle karaciğer, bölgesel bezler, karın zarı, akciğerler ve akciğer zarını kapsamaktadır. Kanser safhaları şu şekilde sıralanmıştır: Safha I: Kanser, pankreasla sınırlıdır. Safha II: Bölgesel lenf bezlerine yayılır. Safha III: Uzak metastazlar gerçekleştirir.

Özetle, ekzokrin pankreas kanseri, çoğunlukla yetişkinlerde ortaya çıkan bir hastalıktır ve artan yaşla birlikte görülme sıklığı artmaktadır. Kadınlara oranla erkeklerde 6 kat daha fazla görülmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar, belirli kimyasallara maruz kalan ve sigara içen bireylerin pankreas kanseri riski altında olduğunu kanıtlamıştır. Çevresel faktörler hastalıkta rol oynamakla birlikte nedenleri tam olarak bilinmemektedir.

Adacık hücre tümörleri: Herhangi bir adacık hücre tipinde meydana gelebilmekte ve işlevsel ya da işlevsiz şekilde olabilmektedir. Tümör tarafından hormon salınımı, fazla hormonun etkisini yansıtan klinik sendromlara yol açabilmektedir. Bu sendromlar, aşırı hormonal uyarılma ile hedef organlarda fonksiyon bozulması ya da lezyonları ortaya çıkarır. Bazı fonksiyonel olmayan adacık tümörleri de malignant bir tablo sergiler. Bunların klinik etkileri arasında kanal tıkanması, invazyon ve metastaz yer alır.

Bazı adacık hücresi tümörleri, özellikle küçük olanlar, sınırlı ve kapsüllü bir yapı sergilerler ve bunlar adenom adı verilir. Bunların içinde, histolojik olarak iyi huylu görünen bazı tipleri, karaciğere metastaz yapabilmektedir. Adenokarsinomun

teşhisi, yayılımın büyüklüğüne ve görülebilirliğine bağlıdır. Patologlar, erken adacık hücre adenokarsinomu ve adacık hücre adenomu arasında ayırım yapamadığından, adacık hücre tümörü terimi, sınırları belirsiz lezyonlar için kullanılmaktadır. Hormon salgılayan tümörler, işlevsiz tümörlere göre klinik seyirde daha erken teşhis edilmektedir. İşlevsel tümörler, ölümcül seyirin başlangıcında, yalnızca birkaç mm çapındadır.  $\beta$  hücresi adenomları, en çok görülen adacık hücre tümör tipidir. Bu tipte aşırı insülin salınımı, beyini ciddi şekilde tehdit etmektedir. Gastrinoma; gastrin salgılayan tümör tipidir, aşırı gastrin salınımı sonucu midede oluşturduğu fazla asit, ülserlere sebep olmaktadır [12].

## **2.4. Şeker Hastalığı, Diyabet (*Diabetes mellitus*)**

Diyabet, bilinen adı ile şeker hastalığı insülin salınımı, insülinin etkisi ya da ikisinde birden oluşan bozukluklardan dolayı oluşan, hiperglisemiyle karakterize edilen bir metabolik hastalıklar grubudur. Diyabet; kronik hiperglisemi, kalıcı doku hasarı, fonksiyon bozukluğu, özellikle gözler, böbrekler, sinirler, kalp ve kan damarları olmak üzere farklı organ yetmezlikleri ile ilişkilidir. Diyabetin gelişiminde,  $\beta$  hücrelerinin otoimmün yıkımı sonucu oluşan insülin yetersizliğinden ve/veya insülinin etkisine direnç ile sonuçlanan anormalliklere kadar farklı patojenik süreçler yer alabilir.

Bunlara ek olarak, Diyabette karbohidrat, yağ ve protein metabolizmasında görülen bazı anormallikler de hedef dokularda insülinin etkisinin eksik olmasından kaynaklanmaktadır. Eksik insülinin etkisi ile hormon etkisinin karmaşık yollarının bir veya daha fazla noktasında yetersiz insülin salınımı ve/veya azalan insüline karşı oluşan doku yanıtları, hastalığın etkileri arasında yer alır. İnsülin salınımında ve etkilediği noktalardaki bozulmalar genellikle diyabet hastalarında bir arada görülür. Karmaşık etkileri olan bir metabolik hastalık olması nedeni ile hangi etki yada etkenlerin hiperglisemiye neden olduğu bilinmemektedir. Hipergliseminin semptomları (belirtileri) arasında poliüre oluşumu, aşırı susuzluk, kilo kaybı ve bulanık görme yer alır. Büyüme ve gelişmenin bozulması, belirli enfeksiyonlara duyarlılık, kronik hiperglisemiye eşlik edebilmektedir. Kontrol edilmeyen diyabetin akut, hayatı tehdit eden sonuçları, ketoasidoz etkisi ile oluşan hiperglisemi ya da ketonik olmayan ürünler etkisi ile oluşan hiperozmolar sendromu olabilir.

Diyabetin uzun zamanlı komplikasyonları potansiyel görme kaybı, yani retinopati, böbrek yetmezliğinin yol açtığı nefropati (böbrek yetmezliği hastalığı), ayak ülserlerinin yol açtığı periferik nöropati, ayak yaraları sonucu ayağın kesilmesi, Charcot eklemi ile bağlantılı kemik yıkımının yol açtığı nöropatik osteoartropati ve otonomik nöropati sonucu gastrointestinal, ürogenital, kardiyovasküler sistemlerde ortaya çıkan semptomlar ve cinsel işlev bozuklukları olarak sıralanmaktadır. Bunlara ek olarak, diyabetli hastaların aterosklerotik kardiyovasküler, periferik arterial ve beyin damar bozukluklarına sahip olma oranları da oldukça yüksektir. Hipertansiyon ve lipoprotein metabolizmasındaki anormalliklerde bu hastalarda sıklıkla görülmektedir. Diyabet vakalarının büyük çoğunluğu, iki ana etiopatogenik kategoride yer almaktadır. Birinci kategori, tip 1 diyabet adını alan, insülin salgısının mutlak yoksunluğudur. Burada pankreas adacıklarında meydana gelen otoimmün patolojik sürecin serolojik olarak kanıtlanması ve genetik belirteçlerle teşhis edilmesi mümkündür. Daha yaygın olarak görülen ve ikinci kategori, tip 2 diyabetin nedeni ise insülin etkisine hastanın direnci ve yetersiz miktarda dengeleyici insülin salgınını oluşmasına karşın hastanın vücudunda oluşan yanıtların birleşimidir. Tip 2 diyabette, hipergliseminin derecesi çeşitli hedef dokularda patolojik ve işlevsel değişikliklere yol açmaktadır. Bununla beraber klinik semptomlar haricinde diyabetin saptanması uzun zaman alabilmektedir. Asemptomatik periyod süresince, karbohidrat metabolizmasındaki anormalliği, plazma glukozunu açlık ve oral glukoz yüklemesinden sonra, tokluk şekerinin kandaki miktarını ölçerek belirlemek mümkündür.

Buna karşın bazı diyabet hastalarında görülen semptomları, bu iki diyabet kategorisi altına yerleştirmek zordur. Örneğin, gestasyonel (hamilelik) diyabette (GDM), hiperglisemi doğumdan sonra devam edebilmekte ve tip 2 diyabet olarak da adlandırabilmektedir. Bu duruma bir diğer örnek yüksek dozda steroidlerin alımı sonucu ortaya çıkan diyabettir. Burada metabolik glukokortikoidlerin üretimi durduğunda, steroidleri kullanan kişi normoglisemik hale gelmektedir. Bu etki, kişide varsa pankreatitin nüksetmesi ve/veya düzelmiş pankreatiti takiben yıllar sonra tekrar diyabet gelişebilmesine yol açmaktadır. Bir diğer örnek, idrar söktürücü (diüretik) ilaç grubu olan tiazidlerle tedavi görmüş hastalarda yıllar sonra diyabetin gelişmesi şeklinde gözlenebilir. Tiazidler grubu ilaçlar nadiren ciddi hiperglisemiye yol açarlar. Böyle hastalarda tip 2 diyabet ilaçla iyice şiddetlenmiş olarak gözlenir. Bu tip vakalarda hem klinisyen, hem de hasta için hipergliseminin patogenezi

anlamak ve tedavi etmek, onun hangi özel tipte olduğunu belirlemekten çok daha önemlidir [15].

# 3. GLİKOKONJUGATLARIN PANKREAS $\beta$ HÜCRELERİNDEKİ VE DİYABETTEKİ ROLLERİ

## 3.1. Sialik Asitler ve Diyabet

Sialik asitler, negatif elektrik yüküne sahip, nöraminik asitten türeyen 9 karbonlu şekerlerdir [16]. Glikoprotein ve glikolipit yapılarında yer alan karbohidrat zincirlerinin son uçlarına eklenirler. İnsan serumunda belirlenen sialik asit miktarı akut fazda hastalık belirteçlerinden biri olarak kabul edilir. Yapılan çalışmalar, serumda artan sialik asit konsantrasyonlarının miyokardiyal enfeksiyon ve diyabet gibi pek çok hastalıkta olduğunu göstermiştir. Serumda yer alan sialik asit, fazlasıyla sialillenmiş akut faz glikoproteinlerinin artan seviyeleri sonucu ortaya çıkar. İnflamatuvar süreçler boyunca da artarak gözlenmeye devam eder. Serumda yer alan sialik asit, kılcal damar geçirgenliği, platelet kümelenmesi, platelet antijenik aktivitesi ve reseptör fonksiyonu aracılığıyla enzimlerin aktivitesi ile yakın ilişkilidir. Bu nedenle serumda bulunma miktarları, genel olarak akut faz proteinlerine bağlı kabul edilir. Serumda sialik asitlerin konsantrasyonu, özellikle damarlı doku-dokular olmak üzere; dokuda hasar, inflamasyon ve doku proliferasyonu gibi patolojik durumlarda artmaktadır. Sialik asit hücre membranlarının bir bileşenidir ve artan seviyeleri, özellikle vasküler doku hücrelerinde, aşırı hücre membranı hasarını başlatmaktadır. Damar epitelyum hücrelerinde yani vasküler endotelde görülen membran sialik asitlerinin yüksek konsantrasyonları, dolaşıma taşınmakta ve tip 2 diyabetle ilişkili açığa çıkan, yoğun kılcal damar yani mikrovasküler hasarlar nedeni ile sialik asitler kan dolaşımına sızmaktadır. Bu da damar geçirgenliğinde bozulmalara, dolayısıyla artan sialik asit konsantrasyonu nedeniyle, kanda bulunan sialik asit miktarının daha fazla artmasına sebebiyet vermektedir. Buna bağlı olarak, eritrositlerin sahip olduğu sialik asit içeriği, önemli seviyede düşmektedir. Bu nedenle eritrositlerin yüzeyindeki elektronegatif yükler azalmakta ve eritrositlerde çökelmeler gözlenmektedir.

Kan serumundaki sialik asitin artış, metabolik olarak, membran Glikoforin A'ya bağlı sialik asitlerin ayrılması sonucu gerçekleşmektedir [17]. Yapılan denemeler, nöraminidaz ile adiposit hücre yüzeyindeki sialik asitlerin kaldırılmasıyla, insülin aktivasyonunun inhibe edilebildiğini göstermiştir. Hücre zarı

glikoproteinleri, insulinin hücrel uyarıcı (effektör) sisteme bağlanmasını sağlayan sinyalin yayılmasında önemlidir. İnsulin reseptörü asparajin bağlı bir glikoprotein yapısındadır. Bununla beraber mannoz, galaktoz ve N-asetilglikozamin de içermektedir.

Hücre yüzeyi etiketlemesi ve spesifik bir ekzoglikosidaz olan nöraminidaz ile sindirimi, insulin reseptörünün sialik asit de içerdiğini göstermiştir. Bu insulin reseptörü mannoz ve N-asetilglikozamin içeren öncü bir glikoproteinden sentezlenmektedir. Bu öncü proteinin proteolitik kesimi ve terminal glikozillenmesiyle  $\alpha$  ve  $\beta$  alt birimleri oluşur. Tunikamisın gibi inhibitör maddeler ile glikozilasyon engellendiğinde, reseptörün insülin bağlayamadığı ve glikozilasyonun reseptörün sentezi için ne kadar önemli olduğunu gösterilmiştir [18]. Benzer sonuçlar, Kavalier ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptıkları çalışmada da görülmektedir. Bu çalışmada CMP-Neu5Ac hidroksilaz (CMP-Neu5Ac hydroxylase, *Cmah*) geni ve null fareler kullanılmıştır. Adı geçen *Cmah* geni, CMP-N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc)'den CMP-N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) dönüşümünü katalizleyen bir genidir. Yapılan denemede, farelerin *Cmah* geninde oluşan delesyonun, açlık hiperglisemisine neden olduğu görülmüştür. Benzer şekilde yüksek yağlı diyet ile beslenen *Cmah* null farelerin pankreaslarında  $\beta$  hücrelerinin fonksiyon kaybı, glikoz toleransının kötüye gitmesi ve Neu5Gc ile sialilasyonun  $\beta$  hücre fonksiyonunda önemli bir rol oynadığı belirlenmiştir [19].

### **3.2. Glikoz sensörü ve insulin sinyalinin düzenleyicisi olarak heksozamin biyosentez yolağı (HBP)**

Bir glikoz molekülü hücre içine girdiğinde hızlıca birçok metabolik yolda kullanılan glikoz-6-fosfata çevrilmektedir. Bu ara ürün ya glikojen sentezinde yer alan pentoz fosfat yolağında kullanılmakta ya da fruktoz-6-fosfata çevrilmektedir. Fruktoz-6-fosfatın büyük çoğunluğu, fruktoz-1,6-bisfosfata çevrilir ve böylece glikoliz yolağına teslim edilir. Ancak %2-5 arasında küçük bir kısmı L-glutamin D-fruktoz 6-fosfat amindotransferaz (GFAT), enzimiyle glukozamin-6-fosfata çevrilir ve buradan da urasil-difosfat N-asetilglikozamin (UDP-GlcNAc) üretilir. UDP-GlcNAc, oksijene bağlı, O N-asetil glikozaminin (O-GlcNAc) üretilmesi için öncü moleküldür. Heksozamin biyosentez yolağı (HBP), bir glikoz sensörüdür. İnsulin

direncinde, bu yolak boyunca akışın yavaşlatılması/hızlandırılması engellenerek ya da uyarılarak düzenlenir. HBP yolağının son ürünü olan UDP-GlcNAc'i kullanan yolaklar, HBP yolağının, besin algılayıcısı (sensörü) ve sinyal düzenleyici olarak rol oynadığı yolaklardır [20].

### **3.3. O N-asetil glikozaminin (O-GlcNAc) Modifikasyonunun Pankreas Beta Hücrelerindeki Fonksiyonları**

O-Glikozaminilasyon, 1984 yılında Gerald Warren Hart tarafından, T-lenfositlerin yüzeyindeki N-asetilglikozamin (GlcNAc) rezidülerinin dağılımı çalışılırken yeni bir glikozilasyon tipi olarak keşfedilmiştir. Bu glikozilasyon tipinde GlcNAc, serin ya da treonin rezidülerinin hidroksil gruplarına eklenmektedir [21]. Bu oluşum fosforilasyona/defosforilasyona uğrayan yüzlerce kinaz ve fosfotaz ile idare edilir. O-bağlı N-asetilglikozaminilasyon (O-GlcNAc), O-bağlı N-asetilglikozamin transferaz (O bağli glikoziltransferaz, O-GlcNAc transferaz, OGT)'lar ve O-bağlı N-asetilglikozaminaz (O-GlcNAc'az, OGA) olmak üzere iki enzimle idare edilmektedir. Hücrede yer alan O-GlcNAc transferazlar nükleer ve sitoplazmik proteinlere, amino şekerleri ve O-GlcNAc birimlerini eklerken, O-GlcNAc'az ise şekerin uzaklaştırılmasında, diğer bir deyişle koparılmasında-sindirilmesinde görev alır [22]. Bu enzimler O-GlcNAc'in düzenlemede, bağlandığı proteinin fosforilasyonun bir üyesine, birimine analog-benzer olarak rol oynadığı düşünülmektedir. Bunun sebebi çalışmalarda O-GlcNAc seviyelerinin mitojenlerde, hücrel sinyallerde, büyüme faktörlerinde, hücrenin safhalarında ve hücrel gelişimde gözlenen yanıtları yardımıyla varılmıştır. Yin-yang modeli adı da verilen oluşturulan model sistemde (O-GlcNAc ya da O-fosfat birimleri ile oluşturulan model), O-GlcNAc'in görevleri arasında, yalnızca proteinlerin spesifik fonksiyonlarına yardımcı olmaları değil, aynı zamanda sinyal iletimine yanıt olarak fosforlanan hidroksil rezidülerine erişimi değiştirerek hücrel fonksiyonun düzenlemesinde de rol oynadıkları belirlenmiştir [23].

Başta transkripsiyon faktörleri olmak üzere pek çok proteinin O-GlcNAc ile modifikasyonu, pankreas beta hücrelerinden insulin salınımını olumlu şekilde düzenlemektedir. Özellikle, nörojenik farklılaşma transkripsiyon faktörü 1'in (Neurogenic Differentiation 1, NeuroD1) modifikasyonu, insulin geninin

transkripsiyonunu arttırmakta, nuklear lokalizasyonunu teşvik etmektedir. Benzer şekilde pankreas ve duodenum transkripsiyon faktörünün (Pancreatic and duodenal homeobox 1, PDX-1), O-GlcNAc modifikasyonunu ve Deoksiribonükleik asit (DNA) bağlanmasını arttırdığı görülmüştür. Ancak, farmakolojik yaklaşımlarla O-GlcNAc seviyelerinin uzun dönemli yükselmesi, mekanizmanın Fosfoinositid-3-kinaz sinyal yolağıyla (phosphoinositide 3-kinase-protein kinase B signaling pathway, PI3K-Akt/PKB) ilişkili olabileceğini düşündürmüştür ve tam olarak işleyişi bilinmese de, beta hücre apoptozisiyle ilişkili olduğu görülmüştür [20].

### **3.4. O N-asetil glikozaminin (O-GlcNAc) Modifikasyonu ve Diyabet**

İnsuline duyarlı dokularda, HBP yolağı boyunca artan glukoz akışı nedeniyle tip 2 diyabete yol açan insulin direncinin gelişimiyle ilişkilidir. Bu yolağın hücrenin besin durumunda bir sensör olarak rol oynadığı ve insulin aktivitesini düzenlediği düşünülmüştür. Bu durum, iskelet kası, pankreas  $\beta$  hücreleri ve adipoz dokuda Glutamin fruktoz-6 fosfat amidotransferazın (Glutamine fructose-6-phosphate amidotransferase, GFAT) aşırı ekspresyonunun insulin direnciyle sonuçlandığının bulunmasıyla, kanıtlanmıştır. Kas ve adipoz dokuda, O-GlcNAc transferazın aşırı ekspresyonu da, insulin direncine yol açmaktadır. Bu her iki transferaz enziminin aşırı ekspresyonu, tip 2 diyabete yol açan insulin direncinin altında yatan mekanizmadır. Bu mekanizmada yer alan proteinlerden, insulin reseptör substratı 1 (Insulin Receptor Substrate-1, IRS-1) dahil olmak üzere, insulin sinyal yollarıyla ilişkili pek çok protein, aktiviteyi nasıl etkilediği tam olarak bilinmese de O-GlcNAc ile modifiye olmaktadır. İnsulin üretiminin uyarılmasına karşılık, glukozu - glikojene çeviren enzim olan glikojen sentazın aktivitesi, ortama O-GlcNAc ilavesinden etkilenmektedir. Yüksek glukoz varlığında yapılan çalışmalarda, O-GlcNAc daha çok glikojen sentaza eklenmekte ve protein fosfataz 1 aracılığıyla insuline yanıt aktivasyonuna daha az duyarlı hale gelmektedir. Böylece glikojen sentazın artan O-GlcNAc modifikasyonu, insulin direncine yol açan mekanizmalardan biridir.

Diyabetin ortaya çıkışı yani patogenezi ile ilişkili olarak, ekstrasellüler glukoz konsantrasyonu ve intrasellüler proteinlerin O-GlcNAc ile modifikasyonu arasındaki bağlantı besinlere erişime ve buna dair hücrelerde ortaya çıkan genel yanıtın bir

parçası olabilmektedir. Sinyal yolları içinde yer alan transkripsiyon faktörlerine ya da proteinlerine O-GlcNAc'ın eklenmesi, buldukları çevreye bağlı olarak oluşacak hücrel yanıtı düzenlemektedir. Ayrıca, O-GlcNAc eklenmesi ile proteozomun modifikasyonunun protein degradasyonunu inhibe etmesi, aynı zamanda hücrenin besin durumu ile protein ve aminoasitlere erişilebilirliğini sağlayan ve onları bağlayan mekanizmayı oluşturması mümkün olabilmektedir.

O-GlcNAc transferazdan yoksun hücrelerin yaşayamaması, bu modifikasyonunun hücre fizyolojisinin hayati bir parçası olduğunu göstermektedir. Hücrelere, galaktozil-transferazın ilave edilmesi, galaktoz rezidüsüyle O-GlcNAc modifikasyonuna yol açmakta ve N-asetilglukozaminidaz ile serbest bırakılması engellenmektedir. Bu hücrelerin bir hücre döngüsü içinde ölmesi, hücre döngüsünün kontrolünde O-GlcNAc'ın en az bir hayati rolünün olduğunu doğrulamaktadır. O-GlcNAc tüm hücrel süreçlerde hayati ve özel rol oynamaktadır [24].

### **3.5. O N-asetil glikozaminin (O-GlcNAc) Modifikasyonun Diyabetik Komplikasyonlarla İlişkili Organ ve Dokularda Fonksiyonları**

İnsulin, anti-apoptotik PI3K-Akt yolağının aktivasyonu ile hayatta kalımda büyük ölçüde rol oynamaktadır. HBP yolağı ve proteinlerin O-GlcNAc modifikasyonunun artışı süresince, çoklu sistemlerde yer alan PI3K-aktivasyon yolağı indirgemekte ve bu dokularda apoptozisin başlamasında önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca, O-GlcNAc modifikasyonu, organ yetmezliğine yol açan makro ve mikrovasküler komplikasyonları tetikleyen, endotel hücrelerde nitrik oksit üretimini de düzenlemektedir. O-GlcNAc'ın vasküler düzenlemedeki rolü ile ilişkili olarak yapılan çalışmalar yardımıyla kalp dokusundaki rolü kanıtlanmıştır. Kalp dokusunda proteinlerin O-GlcNAc ile modifikasyonunun hiperglisemi/insulin direnciyle başlatılan mitokondrial fonksiyon kaybı, kontraktıl hasarlar ve aterosklerozda oluşturan bir mekanizma olduğu görülmüştür. Ek olarak O-bağı N-asetilglikozaminaz (OGA) proteinlerinin ve O-GlcNAc ile modifiye edilmiş proteinlerinin seviyeleri diyabetin başlangıcı ve diyabeti olan hastalardaki eritrositlerde artış göstermiştir. Böylece diyabetin erken teşhisi ve etkili tedavisi için bir belirteç olmaktadır [20].

## 3.6. Proteoglikanlar ve Diyabet

Proteoglikanlar, fazla sayıda O-glikozil grubu şekerleri içeren glikoproteinlerdir. Bunlar çekirdek proteinlerinden ve onun etrafına eklenmiş glikozaminoglikan (Glycosaminoglycan, GAG) zincirlerden oluşmaktadır [24].

### 3.6.1. Heparan sülfat içeren proteoglikanlar

Perlekan insanda ve farede adacıklarda,  $\beta$  hücrelerinde eksprese olmakta ve bu hücrelerden salınmaktadır. Hücre yüzey heparan sülfatlarının transkripsiyon faktörlerinden BETA 2/NeuroD ve PDX-1'in beta hücre kültürlerinde, hücre sel alımında kritik olduğu gösterilmiştir. Adacık heparan sülfatın degradasyonu ya da adacık heparan sülfat sentezinin transgenik olarak bozulduğu çalışmalarda, bu durumu takiben, insulin salınımının ve adacık morfolojisinin bozulduğu gözlenmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, heparan sülfatın  $\beta$  hücrelerinin hayatta kalımında anahtar rol oynadığını göstermiştir [25]. Ancak adacıklarda, diğer proteoglikanların ve/veya GAG'ların varlığı henüz belirlenmemiştir. Yapılan bir çalışmada tip 1 diyabetli obez olmayan diyabetik (Non-obese diabetic, NOD) farelerde, Langerhans adacıklarındaki bozulma yani insulitis boyunca hyaluronan saptanmıştır ve hyaluronan içeriği pankreas kanserinde tüm pankreasta artış göstermiştir [26].

Genel olarak heparan sülfat proteoglikanları,  $\beta$  hücre fonksiyonu ve hayatta kalımında önemlidir [27]. Adacık amyloid depoları azalan  $\beta$  hücre kütlesi ile ilişkilidir ve tip 2 diyabette gözlenen ilerlemiş  $\beta$  hücre fonksiyon kaybına katkıda bulunmaktadır. Sözü geçen bu depolar insülinle birlikte salınan bir  $\beta$  hücre ürünü olan amylin içermektedir (IAPP- Islet amyloid polypeptide). Tip 2 diyabette, pankreatik adacıkların, amyloid depolarında perlekan ve heparan sülfatlar bulunmuştur. Perlekan ve heparan sülfatlar, glikozaminoglikan yapılarıdır. İnsan amylini ile gerçekleştirilen deneylerde, fibril oluşumunu arttırdığı gözlenmiştir. Adacık amyloidlerindeki proteoglikanların kökeni bilinmemektedir. Ancak immunohistokimyasal kanıtlar yardımı ile perlekanın normal  $\beta$  hücrelerde de olduğunun gösterilmiştir. Bu durum  $\beta$  hücrelerinin amylinle etkileşen ve böylece adacık amyloid oluşumunun, önemli rol oynayan proteoglikanları sentezlenmesi ve

salgılanmasında görevli olabilecekleri hipotezi önerilmiştir. Perigo ve arkadaşları 2003'de yaptıkları bir çalışmada, ölümsüz (immortal) islet  $\beta$  hücre hattında, transforme  $\beta$  hücrelerin ( $\beta$ TC3) proteoglikan sentezleyip - sentezlemediğini, salgılayıp - salgılamadığını, bu proteoglikanların doğasını tanımlamayı ve amylin ile etkileşim yeteneklerinin belirlenmesini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda, proteoglikanların heparan ve kondroitin/dermatan sülfat olduğunu ve perlekanın amyloid depolarda bulunduğunu göstermişlerdir. Perlekan, heparan sülfatın glikozaminoglikan zincirlerini ve heparinin amyloidojenik peptit  $A\beta$ 'ya bağlandığını, böylece amyloid fibril oluşumunu arttırdığını göstermişlerdir. Araştırmacılara göre, bu pankreatik  $\beta$  hücrelerinin proteoglikan sentezlediğini kanıtlayan ilk makaledir. Tip 2 diyabette gözlenen  $\beta$  hücre fonksiyon kaybı, amylinin ve heparan sülfat yapıları proteoglikanların (Heparan sulphate proteoglycans, HSPG) hücre içindeki üretimi, trafiği ve/veya salınımındaki değişikliklerle ilişkilidir. Amylin-proteoglikan kompleksinin direkt etkileşim ve oluşumu, adacık amyloid birikimini teşvik etmekte ve tip 2 diyabette gözlenen  $\beta$  hücre kütlelerinde, fonksiyonunda kayba uğramasına yol açmaktadır [28].

### **3.7. Glikosfingolipitler ve Diyabet**

Glikosfingolipitler (Glycosphingolipids, GSLs), ökaryotik hücrelerde sık görülen hücre membran bileşenleridir. Glikosfingolipitler; seramidler ve glukoz, galaktoz, sialik asit rezidülerinin bulunduğu şeker zincirlerinden oluşan amfipatik moleküllerdir. Seramid kısmı hidrofobik, şeker kısmı hidrofilik özelliğe sahiptir. Bu moleküller membrana gömülü olmakla birlikte, Golgi aygıtı, nuklear membran ve mitokondri gibi hücre için yapılarda da bulunmaktadır. Glikosfingolipitler, hücre sinyal yollarında; sinyal ve düzenleyici moleküller olarak, hem birincil, hem de ikincil mesajcılar olarak önemli bir rol oynamaktadırlar [29].

Sialik asit içeren glikosfingolipitler ve gangliositler, reseptör aktivitesininin ligandları hücre sinyallerinde, düzenleyiciler olarak görev alırlar. İnsulin reseptörü, sialilparaglobosit (sialylparagloboside) ve monosialodiheksozilgangliosit (monosialodihexosylganglioside, GM3) gangliositleri, çözülebilir insülin reseptörünün, iç tirozin kinaz aktivitesini inhibe etmekte ve GM3 kültür hücrelerinde insülin reseptörü sinyalinin miktarının düştüğü gözlenmektedir. Bundan yola çıkarak

yapılan çalışmalarda, GM3 gangliosinin aşırı ekspresyonunun tip 2 diyabet patogeneğinde, insulin reseptör sinyalinin negatif düzenlemesiyle rol oynadığı düşünülmektedir. Bu amaçla yapılan bir çalışmada, GM3 gangliosinin fizyolojik rolü ve insulin reseptör sinyalinin in vivoda ilişkisi ve etkileşimini belirlemek için, farelerin GM3'ü kodlayan *GM3S* geni mutasyona uğratılmıştır. GM3 sentezinden yoksun farelerde, ligandın bağlanmasından sonra iskelet kasında insulin reseptörünün fosforilasyonunun arttığı görülmüştür. Aynı şekilde bu farelerde yapılan glikoza ve insüline tolerans testleri de etkili sonuçlar göstermiştir. Bu mutant farelere yüksek yağ diyeti ile indüklenen insülin direncinden de korunmuşlardır. Böylelikle, GM3 gangliosidinin insülin duyarlılığını düzenlemede önemli rol oynadığı düşünülmektedir [30].

### 3.7. Diyabet ve Sülfatidler

Diyabet rahatsızlığında sülfatidlerin rolüne baktığımızda, sülfatidler glikozilfosfatidil inositol çıpası içeren glikoproteinlerdir. İlk olarak tanımlanan lipopolisakkarit (Lipopolysaccharide, LPS) reseptörlerinden biri hücre farklılaşma kümesi 14'tür (Cluster of differentiation, CD14). Bu yapı serumda lipopolisakkarit bağlayan protein (Lipopolysaccharide binding protein, LPS-LBP) kompleksini tanımaktadır. CD14 insanlarda, temel olarak monosit, makrofaj ve diğer immun sistem hücrelerinde bulunmaktadır. İnsan pankreas  $\beta$  hücrelerinde de çok miktarda yer alır. LPS, Langerhans adacıklarında, özellikle  $\beta$  hücreler tarafından nitrik oksit sentaz ekspresyonunu başlatmasıyla, LPS'lerin adacıklarda fonksiyonel tanınmayı gerçekleştirdiği görülmektedir. İnsanda glikolipit orjini, sülfatid ve onun öncüsü  $\beta$ -galaktozilseramid'in (Beta-galactosylceramide,  $\beta$ -GalCer) genellikle sinir dokularında ifade edildiği belirlenmesine rağmen, pankreas beta hücrelerinde de ifade edildiği belirlenmiştir. Bu glikolipitler, mononükleer hücrelerde farklı interlökin tiplerinin (Interleukin, IL) IL-1 $\beta$ , IL-6 ve tümör nekrozis faktörü  $\alpha$  (Tumor necrosis factor alpha, TNF $\alpha$ ) üretimini düzenlemektedir.  $\beta$  hücrelerde sülfatid ve insulin aynı hücresel bölümlerde bulunmaktadır. Sülfatid, insulinin işlenmesi, sürdürülmesi ve salınımıyla ilişkilidir,  $\beta$ -GalCer hücre içi öncüdür ve endoplazmik retikulumda sülfatide çevrilmektedir. İnsulin granülleri ve plazma membranının da bulunmaktadır. İnsulin granüllerinde sülfatid miktarı,  $\beta$  hücrelerin artan metabolik

aktivitesiyle birlikte düşmektedir. Böylece, sülfatid ve  $\beta$ -GalCer tip 1 diyabetin patogeneğinde potansiyel olarak rol oynamaktadır. Örneğin, sülfatidin insulin salınımı üzerinde negatif geri besleme özelliğine sahip olduğu gösterilmiştir. Çalışmalar, sülfatidin  $\beta$  hücre dinlenmesini indükleyen insulin salınımı boyunca hücre dışına salındığını ortaya koymaktadır. Aynı zamanda sülfatit, CD14 kompleksini bağlayan, ekzojen uyarı sinyalini engelleyen CD14 kompleksinin ayrılmasını başlatmaktadır. Böylece,  $\beta$  hücreler için potansiyel olarak ortaya çıkan stresli bir durumda, iltihap ve yangılar oluşumunda buldukları doku ortamını korurlar [31].

### **3.8. $\beta$ Hücrelerin Belirlenmesi ve Sınıflandırmasında İşaretleyici Olarak Sialik asit polimerli Nöral hücre adezyon molekülü (PSA-NCAM)**

$\beta$  hücrelerin belirlenmesi ve sınıflandırmasında işaretleyici olarak kullanılan sialik asit polimerli nöral hücre adezyon molekülü (Poly-sialylated neural cell adhesion molecule, PSA-NCAM) yetişkin memelilerde pankreas  $\beta$  hücreleri, uzun dönemli dinamik değişikliklere uğramaktadırlar. Gebelik gibi belirli fizyolojik durumlarda ve obezite gibi fizyopatolojik durumlarda, glukozu karşı artan  $\beta$  hücre yanıtı ile paralel olarak  $\beta$  hücre sayısının ve  $\beta$  hücre olgunluğunun artışı devam etmektedir. Bu tip 2 diyabette önemlidir; bunun nedeni son yıllara kadar insulin salınımının bozulmasının tam olarak fonksiyonel  $\beta$  hücrelerinin sayısında azalma ile ilişkili olduğuna inanılmaktaydı. Bu nedenle, bazı tedavi yaklaşımlarında  $\beta$  hücre kütlelerinin korunması amaçlanmıştır. Benzer şekilde pek çok deneysel modelde,  $\beta$  hücre rejenerasyonu başlamasına çalışılmıştır. Ancak, pankreas fonksiyonunda gelişme derecesi, rejenerasyon süreci boyutuyla paralel gözlenmemiştir. Bu da tüm rejeneratif  $\beta$  hücrelerin tam fonksiyonel olgunluğa sahip olmadığını göstermektedir.  $\beta$  hücre kütleindeki çeşitlilik ve pankreas fonksiyonu arasındaki ilişkiyi açıklamak için, farklı fonksiyonel olgunluktaki  $\beta$  hücre alt popülasyonlarını belirlemek gerekliliği ortaya çıkmıştır. Normal yetişkin farelerde yapılan çalışmalarda, pankreasın iki  $\beta$  hücre alt popülasyonuna ayrıldığı gözlenmiştir. Birincisi, yüksek redoks potansiyeline ve yüksek glikoz yanıtına sahiptir. İkincisi, düşük redoks potansiyeline sahiptir ve glikoza çok daha az duyarlıdır. Beta hücrelerin hangi alt

populasyona ait olduğunu belirlemek için PSA-NCAM belirteç olarak kullanılmıştır. N-CAM (Neural Cell Adhesion Molecule, NCAM), hücre adezyonunu teşvik eden bir immunoglobulin süper ailesi üyesidir. Ancak,  $\alpha$ 2-8 bağlı sialik asit polimerinin (Poly sialic acid, PSA) NCAM'e bağlanması, NCAM'in adheziv özelliğini düzenlemekte ve hücre adezyonunu azaltmaktadır. Memelilerde, PSA-NCAM sinir sisteminin gelişimiyle ve dokunun yeniden oluşumuyla ilişkilidir. Doğumdan sonra, PSA-NCAM yetişkin farelerin beyininde devamlılık göstermekte ve glial hücre göçü gibi morfolojik değişimlerde rol oynamaktadır. Aynı zamanda yetişkinlerde pankreas  $\beta$  hücrelerinde de eksprese olmaktadır. Ek olarak, insulin salgılayan  $\beta$  hücre hattında (INS-1), PSA-NCAM insulin salgı granüllerinin membranında bulunmaktadır ve glukozla uyarılan insulin salınımı esnasında hücre membranında görülmektedir. İnsulin granüllerinde, PSA-NCAM molekülünün etkisinde gerekli moleküllerin elektronegatifliği için katyon stoğuna katkıda bulunmaktadır. PSA-NCAM'in adacık fonksiyonundaki rolü, NCAM nakavt (Knockout) farelerde NCAM eksikliği, PSA içeriği toplamında kayıplara yol açmıştır. Bu farelerde,  $\beta$  hücrelerinin büyük kısmının sitoplazmasında bulunan granüllerin dışarı bırakılması (degranüle olması), insulin salınımının bozulduğuna işaret etmektedir. Bu veri, PSA-NCAM'in insulin içeren salgı granüllerinin, normal çevirimiyle ilişkili olduğunu göstermektedir. Diğer hücrelerden ayrılmış  $\beta$  hücrelerinde PSA-NCAM içeriği ile glukozla yanıt olarak insulin salgılama yetenekleri arasında oldukça güçlü bir paralellik gözlenmiştir. İmmünohistokimyasal çalışmalarda, floresan işaretleme ile PSA-NCAM ile yüksek miktarda işaretlenen  $\beta$  hücrelerinde, PSA-NCAM ile düşük miktarda işaretlenen hücrelerden daha fazla insulin salgılandığı belirlenmiştir. Böylelikle PSA-NCAM varlığı farklı  $\beta$  hücre alt populasyonlarını ayırmak ve fonksiyonel aktivitelere göre belirlemek için iyi bir araçtır [32].

## 4. GLİKOKONJUGATLAR VE LEKTİNLER

### 4.1. Lektinlerin genel özellikleri

Lektinler, bitkilerin çoğunda ve bazı hayvanlarda bulunan karbohidrat bağlayan proteinlerdir. Lektin terimi, seçmek anlamına gelen Latince ‘‘Legere’’ kelimesinden türetilmiştir. Lektinler, immun sistemde herhangi bir antijenik uyarılmaya yol açmayan, antikora benzer bağlanma kapasitesine sahiptir. Hücre yüzeyini döşeyen glikoproteinlerin ve glikolipitlerin karbohidrat kısımlarını seçici olarak bağlamaktadır.

Yapısal olarak ve karbohidratlara bağlanma özelliklerine göre farklı sınıflara ayrılmaktadırlar. Tek bir sınıflandırma bulunmamaktadır. Bazıları yapılarına göre; erythrine C lektinler, konkavalin (Concavalin) C lektinler, *Ulex europeus* lektinler ve C tipi lektinler olarak sınıflandırılmaktadır. Glukoz/mannoz, galaktoz ve N-asetil-D-galaktozamin, L-fukoz ve sialik asitlere bağlanma affinitelerine göre dört gruba ayrılmaktadır. Diğer bir sınıflandırmada ise, yapısal ve evrimsel sekans benzerliklerine göre, tip I lektinler; beta prizma lektinler (B tipi), kalsiyuma bağımlı lektinler (C tipi), fikolinler-fibrinojen/kolajen bölgesi içeren lektinler (F tipi), sarımsak ve kardelen lektinleri (G tipi), hyaluronin bağlı proteinler (H tipi), immunoglobulin superailisi lektinleri (I tipi), Jacob ve ilişkili lektinler (J tipi), legümlü bitki tohumu lektinleri (L tipi), alfa mannozidaz ilişkili lektinler (M tipi), rasin lektin (R tipi), *Tachypleus tridentatus* lektini (T tipi), buğday ruşeymi agglutinini (Wheat germ agglutinin, WGA, W tipi) ve *Xenopus* yumurtası lektinidir (X tipi). Herhangi bir evrimsel bağlantı olmayan lektin benzeri proteinler olarak önerilen tip II lektinler ise; aneksinler, beş değerlikli bölge içeren pentraksinler, alfa dekstroglukanlardaki G domainli glikanlar, fungal gluklanlar ve glikoproteinlerin GlcNAc rezidülerinde CD11b/CD18 glikoproteinleridir (beta-integrinler, CR3). Lektinlerin, basit ya da kompleks oligosakkaritlere bağlanması tersinir ve kovalent olmayan bir bağlanmadır. Lektinler, hem sıcaklığa (70°C’de 30 dakikadan daha fazla) hem de proteolitik enzim ve mide asidiyle parçalanmaya dirençlidir [33]. Bazı lektinler parçalanmakta ve yaklaşık olarak %1-5 oranında barsaklarda geri emilmekte ve kana karışmaktadır, bu da immun yanıtı sebebiyet vermektedir [34].

Lektinler ilk olarak, Hermann Stillmark tarafından 1888’de hintyağı bitkisi

(*Ricinus communis*) tohumlarında keşfedilmiş, 1945'te William Boyd tarafından lektinlerin bazılarının kan grubuna özgü olduğu bulunmuştur. W. Boyd, lima fasülyesi tohumunda bulunan lektinlerin A kan grubu ile aglutine olduğunu bildirmiştir. İlerleyen zamanda, bitki, hayvan hücreleri, bakteriler ve virüsler de tanımlanmaya devam edilmiştir. Geçen pek çok yıl boyunca birincil ve üç boyutlu yapıları aydınlatılmıştır. Hayvan lektinlerinde yürütülen yapısal çalışmalar, lektinlerin çoğunun karbohidrat bağlama aktivitelerinin, karbohidrat tanıma domaini (Carbohydrate recognition domain, CRD) olarak bilinen aminoasit rezidüleriyle sınırlı olarak üretildiğini göstermiştir. Son zamanlara kadar, lektinlerin medikal önemiyle ilişkili çalışmalar, hastalığın oluşumundaki rolleri ya da immun sistem düzenleyicileri olmaları üzerine odaklanmıştır. 1950ler, 1960lar, ve 1970lerin başında, belirli hastalıklar üzerindeki rolleri daha çok ele alınmıştır. Lektinler üzerine yapılan çalışmaların çoğu, öncelikle; hastalıkların farklı aşamalarının teşhisinde belirteç olarak kullanımı olmakla birlikte, sonraları terapötik ajanlar olarak potansiyellerine değinilmeye başlanmıştır.

Lektinlerin, biyolojik fonksiyonları tartışmalıdır. Şeker taşınımı ya da karbohidrat depolanması ile ilişkili oldukları düşünülmektedir. Lektinlerden bazıları, kök nodüllerinin oluşturan simbiyotik *Rhizobium* bakterilerinin bağlanması ile ilişkilidir. Adezyon ve aglütinasyondaki özel rolleri nedeniyle, bazı mikroorganizmalar ve konukçu organizma arasında simbiyotik ve patojenik etkileşimlerde önemli oldukları düşünülmektedir. Çok yüzeyli biyolojik özelliklere sahip oldukları için, hücre yüzeyinin yapısı ve fonksiyonlarını incelemek üzere işaretleyici-taşıyıcı (prob) olarak kullanılmışlardır [33]. Endojen lektinler, hücre-hücre tanımları, hücre-ekstrasellüler matriks etkileşimleri, gametin dölleme, embriyonik gelişim, hücre büyümesi, hücre farklılaşması, hücre sinyali, hücre adezyonu ve göçü, apoptozis, immun düzenleme ve inflamasyon, konukçu-patojen etkileşimleri, glikoprotein katlanması ve taşınması, mitozun başlaması ve homeostazisin bulunduğu biyolojik süreçlere aracılık etmektedir. Lektinler, tıpta teşhis ve tedavide, biyokimyasal araçlar olarak kullanılmaktadırlar [34].

## 4.2. Buğday tohumu lektini (Wheat Germ Agglutinin, *-Triticum vulgaris-*, WGA)

Buğday tohumu lektini (Wheat germ agglutinin, WGA), 16 disülfid köprüsüyle birleşen benzer glisin-sisteince zengin alt birimlerden oluşan 36 kDa ağırlığında homodimerik bitki lektinidir. Hücre yüzeyinde yer alan N-asetil-D-glukozamin ve sialik asitleri tanımaktadır. Dört karbohidrat bağlayan bölgelerden-birimden oluşur. Her biri iki bağlanma bölgesine ve ara yüze sahiptir. Sekiz bağlama bölgesi, eş zamanlı fonksiyoneldir [35]. Yapılan bir aminoasit sekansına göre, polipeptit zinciri başına 171 aminoasit düşmektedir. Asidik ortamda monomerlerine ayrılmaktadır.

İlk defa Aub ve ark. (1963) bitişik tümör hücrelerinden aldıkları maddeyle, buğday tohumu lipaz preparasyonunda, bu lektinin varlığını bildirmiştir. Birkaç yıl sonra, aglütinasyon gösteren buğday tohumundan yola çıkılarak WGA adı verilmiş; Nagata ve Burger (1972), LeVine ve ark. (1972) tarafından izole ve kristalize edilmiştir. Klasik yöntemler kullanılarak saflaştırılmıştır. 6-amino-1-heksil-2-asetamido-2-deoksi- $\beta$ -D-glukopiranozilamin-Sefaroz 4B (6-amino-1-hexyl-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranoside-Sepharose 4B), *p*-aminobenzil-1-tio- $\beta$ -D-glukopiranozid (*p*-aminobenzyl-1-thio- $\beta$ -D-glucopyranoside), 2-asetamido-*N*-(6-aminoheksanol)-2-deoksi- $\beta$ -D-glukopiranozilamin-Sefaroz 4B (2-acetamido-*N*-(6-aminohexanoyl)-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosylamine-Sepharose 4B), immobilize ovomukoid ve kitin üzerinde afinite kromatografisi yapılmıştır [36].

Genetik olarak uzak türlerde, izolektinlerinin varlığı Allen ve ark., tarafından bildirilmiş, Rice ve Etzler tarafından karakterize edilmiştir. Bol miktarda bulunan iki izolektini 1 ve 2 çapraz dimerize olacak kadar benzer yapıdadır. Bu birbirine çok yakın izolektinler birbirlerinden, histidin içerikleri, elektroforetik hareketlilik ve çözünürlük özellikleriyle ayrılmaktadır.

X-ray difraksiyon (Kırınım) çalışmaları, WGA molekülünün, yapısal olarak benzer A, B, C ve D adında dört domainden oluştuğunu, her birinde merkezi hidrofobik domain çekirdek rolündeki dört homolog disülfid köprüsü içerdiğini göstermiştir. İki lektinin eş yapılı kristallerinden toplanan x-ray verilerinde izolektin 2'de protein şeker-ligand etkileşimlerde önemli olan B domaininde iki histidin görülürken, izolektin 1'de görülmemiştir. Aminoasit sekanslama çalışmalarıyla, iki

histidinin pozisyonu (59 ve 66) belirlenmiş ve dört yapısal domain arasında yüksek seviyede sekans benzerliği ortaya çıkarılmıştır. Sekans temel alınarak, molekülün ortak bir atasal genden geldiği ve gen duplikasyonu sonucu evrimleştiği ön görülmüştür [37].

### **4.3. WGA ile yapılan çalışmalar**

Antonina M. Yashchenko ve ark., 2012'de yaptıkları çalışmada, streptozotosin ile başlatılan diyabetik sıçanların karaciğerindeki karbohidrat değişimlerini incelemek için lektin histokimyasını kullanmıştır. Çalışmanın sonucunda WGA'nın kontrol sıçanlarının karaciğerinde, sinüzodial kılcal damarların bazal membranına, portal kanal ve merkezi venüllerin endotel duvarına tutunduğu görülmüştür. Diyabetik sıçanlarda, sinüzodial kılcal damarlara tutunma azalmış, fakat portal kanal ve merkezi venüllerin endotelinde değişim gözlenmemiştir. Hem kontrol hem de diyabetik modellerde safra kanalı WGA pozitifdir. Ancak diyabet oluştuğunda, safra kanalına lektin bağlanmasının yoğunluğu artmakta, bu da artan safra akışına neden olmaktadır. Bu çalışmayla WGA'nın safra kanalı için alternatif bir histokimyasal belirteç olduğu kanıtlanmıştır [38].

Lidiya Petrova ve ark., 2014'de yaptıkları çalışmada kanser hücrelerini belirlemek için, normal hücrelere nazaran tümör hücrelerine daha çok bağlanan WGA'yı kullanmıştır. Bu protein prostat kanser hücrelerinin yüzeyindeki sialik asit ve N-asetil-D-glukozaminlere bağlanmakta ve hücre içine girmektedir. WGA, doksorubisin, paklitaksel, bufalin gibi antikanser ajanların kanser hücrelerine ulaşmasında, taşıyıcı molekül olarak rol oynamaktadır. Petrova vd., Hematoporfirin IX, Mn- ve Fe-porfirin adlı üç antikanser ajanın WGA'ya bağlanmasını incelemiştir. WGA-porfirin kompleksinin ilerleyen zamanda tümör hücrelerine uygulanabileceği sonucuna ulaşmışlardır [39].

Marie Louise Ward ve David J. Crossman 2014'de yaptıkları çalışmada, diyabetik kardiyomiyopatide bozulmuş kontraktilitenin altında yatan mekanizmaları araştırmıştır. Kardiyak miyositlerde, uyarılma-kasılma sisteminde önemli olan t-tübüllerin diyabetik kalpte bir değişikliğe uğrayıp uğramadığını görmek için, t-tübüller WGA ile işaretlenmiş ve konfokal lazer tarama mikroskopunda incelenmiştir. Diyabetik miyositlerin t-tübül sisteminde T-gücünde (sarkomer gücü)

az miktarda bir düşüş olduğu görülmüştür [40].

Itzhak Levi, Yael Segev ve Esther Priel'in 2012'de yaptıkları çalışmada, Tip-1 diyabetin böbrek, karaciğer ve pankreasta topoizomeraz I aktivitesine olan etkilerini saptamada, Topoizomeraz I (Topo-1) proteinin in vivo O-GlcNAc ile modifikasyonunu belirlemek için, WGA'yı kullanmıştır. Daha önce böbrek hücre hattından türetilen topo 1'in presipite olduğu ve serbest O-GlcNAc varlığının presipitasyonu engellediği daha önce Noach vd. tarafından 2007'de kanıtlanmıştır. Agaroz-WGA nüklear protein ekstraktına eklenmiş ve sodyum-dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezinde (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) görüntülenmiştir. Western blot analizleri spesifik anti topo-I ya da anti-OGT antikolarıyla yapılmıştır. Topo-I proteini agaroz WGA ile birlikte presipite olmuştur. Densitometrik analiz, diyabetik böbrekte diyabetik olmayana göre daha çok presipitasyon olduğunu göstermiştir. Pozitif kontrol olan OGT proteini de agaroz-WGA ile presipite olmuş ve presipitasyon diyabetik böbrekte normal böbreğe nazaran iki kat fazla olmuştur. Bu sonuçlar topo-I ve OGT enziminin diyabetik böbrekte yüksek seviyede O-GlcNAc ile modifiye olduğunu göstermektedir. Diğer organlar; karaciğer ve pankreasta da sonuçlar aynıdır [41].

Pankreas kanser hücreleri, normal hücrelere göre hücre yüzeylerinde çok sayıda sialik asit eksprese etmektedir. Kanser hücrelerinde görülen membran glikoprotein anomalileri, bu hücrelerin daha agresif biyolojik davranış ve metastazik potansiyel göstermelerine sebebiyet vermektedir. Çeşitli lektinler, normal ve neoplastik hücrelerin hücre yüzey karbohidrat kompozisyonlarını belirlemek için kullanmıştır. WGA'nın neoplastik hücre membranlarına daha çok bağlandığı görülmüştür. R.E. Schwarz ve ark. 1999'da yaptıkları çalışmada, pankreas kanser hücrelerinde WGA'nın in vitro toksisitesini göstermek amacıyla, pankreatik kanser hücre hatlarında test etmişlerdir. Bu etki karbohidrat aracılıdır, sialik asit ve GlcNAc bağlama yeteneğine bağlıdır. Lektin blot sonuçlarında, nöraminidaz uygulanmadan önce tüm hücre hatlarında WGA, membrana etkili bir şekilde bağlanmıştır. Nöraminidaz uygulaması sonucu sialik asitlerin ayrılmasıyla, tüm hücre hatlarında WGA bağlanmasında önemli derecede düşüş gözlenmiştir. WGA tüm hücre hatlarında güçlü bir toksisite göstermiştir. WGA, lektin-dirençli kanser kültür hücreleri oluşturmak için kullanılmış ve oluşan kolonilerin çoğu metastaz yeteneklerini önemli seviyede kaybetmiştir. WGA'nın membrana bağlanması apoptotik yanıtın başlamasında gereklidir [42].

## 5.MATERYAL-METOD

### 5.1.Deneyde Kullanılacak Doku Materyalinin Eldesi ve Hazırlanması

Çalışmamızda  $254 \pm 11$  gr ağırlığında, 8 Kontrol ve 8 Yağlı diyet grubuna ait erkek Sprague–Dawley sıçan ( $n=16$ ) kullanılmış ve deney hayvanları İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsünden alınmıştır. Deney hayvanlarında uygulanacak deneysel metodlar için İ.Ü. Hayvan Etik Kurulundan izin alınmıştır (No: 48/2013).

Hayvanlar tel tabanlı paslanmaz çelik kafeslerde,  $24-25^{\circ}\text{C}$ 'de 12 saat gündüz 12 saat gece siklusunda bakılmıştır. Hayvanlar rastgele seçim ile 2 gruba ayrılmış: Kontrol grubu ( $n=8$ ), total kalorilerinin %10'unu yağdan karşılamak üzere kontrol diyeti ile beslenmiştir (3.7 kcal/g günlük diyet, TD.06416 Harlan Laboratories, Madison, Wisconsin, USA); Yağlı Diyet Grubundaki hayvanlar ise ( $n=8$ ), total kalorilerinin %60'ını yağdan karşılamak üzere yağlı diyet ile beslenmiştir (5.1 kcal/g diet, TD.06414 Harlan Laboratories, Madison, USA) Tüm hayvanlar 16 hafta boyunca beslenmişlerdir. Bu süre boyunca yemek ve su kısıtlaması yapılmamıştır. Deney sonlandırılmadan önce hayvanların kilo değişimleri ölçülmüş ve kontrol grubu için  $361 \pm 14$  g (Vücut Kitle İndeksi artışı %41,4), yağlı diyet grubu için ise  $364 \pm 22$  g (Vücut Kitle İndeksi artışı %42,5) olarak belirlenmiştir.

Deney hayvanı ötenazi yapılacağı gün beslenmeleri kesilmiştir. Hayvanlar sodium pentobarbital (50 mg/kg, intraperitoneal (i.p.) injeksiyon) ile anesteziye alınarak, kardiyak kan alımı ile sakrifiye edilmiştir. Hızlı bir şekilde pankreas dokusu alınmış, fiksatif'in (%10 Formol) daha etkili olmasını sağlamak amacı ile küçük parçalara ayrılarak, fiksatif solusyonu içine atılmıştır.

Tespit edilen pankreas dokusu takip cihazına alınarak parafin bloklara gömülmüştür (Thermo Scientific), bloklardan mikrotom (Thermo Scientific) yardımı ile 4 mikron ( $\mu$ ) kalınlığında ince kesitler alınmış ve Poly-L-Lysin (PLL) kaplı lamalar üzerine yerleştirilmiştir. Boyama öncesi lamalar deparafinizasyon aşamalarından geçirilerek işleme alınmıştır. Bu amaçla lamalar önce 2X10dk Ksilolde bırakıldıktan sonra azalan alkol serilerinden (%100, %96, %80 ve %70) geçirilerek boyama aşamasına alınmıştır. Daha sonra bu kesitlere florescein işaretli lektin

uygulanmıştır. Kesit alınan pankreas dokularında ayrıca histolojik boyama da yapılmıştır. Hematoksilen+Eosin ile boyanan pankreas kesitleri ışık mikroskobunda incelenerek genel pankreas yapısı irdelenmiştir.

## 5.2. Floresan İşaretleme Prosedürü

Denemede kullanılması planlanan Fluorescein işaretli Wheat Germ Aglutinin (*Triticum vulgare* (WGA) FL-1021 Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) ilgili firmadan satın alınmıştır. Kesitler üzerine önce deparafizasyon yöntemleri uygulanmıştır. Bu basamağı takiben FITC işaretli ürünün kullanım sertifikasındaki uygulamalar dikkate alınarak hazırlanan boya yardımı ile işaretleme yapılmıştır. Uygun sürede ve seyreltmede işaretleme uygulamasını takiben, preparatlar %0.05 Tween-20 içeren PBS içinde 10-15 dakika oda sıcaklığında yıkanmış, kurumaya bırakılmıştır. Kurumayı takiben üzerlerine DAPI içeren özel kapatıcı solüsyonu (Fluoroshield Mounting Medium with DAPI, ab 104139, Abcam) damlatılarak preparatlar kapatılmıştır. Kapatılan örnekler, Nikon Eclipse 80i Floresan Mikroskobu ile incelenmiş, DAPI ve FITC filtresi kullanılarak fotoğraflanmıştır. Elde edilen mikrograflar aynı makinede yer alan, NIS Elements programı ile proses edilmiştir.

## 6. SONUÇLAR

Yapılan çalışmamızda, normal pankreas dokusu içeren hayvanlarda Pankreas dokusu hücrelerinin, zar yüzeylerinde görülen değişiklikler, farklı şeker rezidülerini işaretleyebilen Fluorescein (FITC) işaretli lektin yardımıyla görünür hale getirilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla polylyzin kaplı lamalar üzerinde yer alan 4 µ'luk kesitler Nikon Eclipse 80i Fluoresan Mikroskobu ile mikrografları alınarak görüntülenmiştir. Elde edilen mikrograflar aynı makinede yer alan, NIS Elements programı ile analiz edilmiştir.

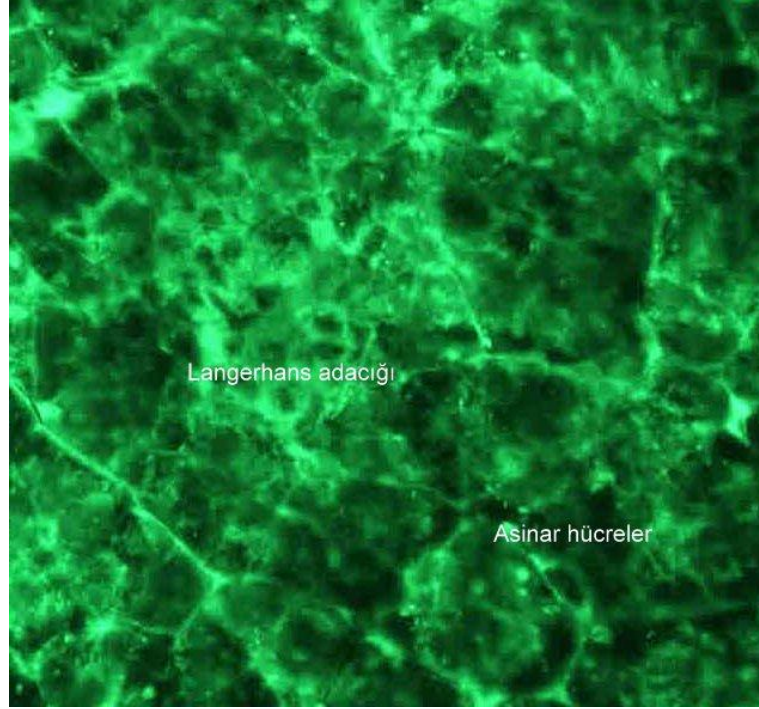
Çalışmamızda kullanılan lektin Fluorescein işaretli Wheat Germ Agglutinin (FITC-WGA) lektinidir. WGA, N-Asetilglukozamin oligomerlerini, sialik asidi (GlcNAc, Neu5Ac) işaretlemekle beraber (Vector Laboratories) özellikle β-GlcNAc tipi sialik asidi işaretlemektedir [43]. Çalışmamızda bu verilere göre elde edilen mikrografların sonuçları değerlendirilmiştir.

### 6.1. FITC-WGA Lektini İşaretleme Sonuçları

FITC-WGA lektini ile yapılan çalışmamızda; N-Asetilglukozamin oligomerlerini, sialik asidi (GlcNAc, Neu5Ac) ve özellikle β-GlcNAc tipi sialik asit birimleri gösterilmek istenmiştir. Kontrol grubuna ait pankreas kesitlerinde, her ne kadar görüntüler çok net olmasa da; hem ekzokrin pankreas, yani kanallı bez hücreleri, asiner hücre yüzeylerinde; hem de kanalsız bez, diğer bir deyişle endokrin pankreas hücresi olan β-hücrelerinde oldukça yaygın ve yoğun olarak bu birimler işaretlenmiştir (Şekil 3.1). Aynı kesitler, hücre çekirdeğini boyayan DAPI boyası ile de boyanmış, böylece nükleus farklılıkları da değerlendirilmiştir. Sadece nükleusları boyanmış mikrograflar ile N-Asetilglukozamin oligomerlerini, sialik asidi (GlcNAc, Neu5Ac ) ve β-GlcNAc tipi sialik asit birimlerini işaretleyen FITC-WGA lektini ile boyanmış mikrograflar karşılaştırılarak (Merged) boyama aynı anda (Şekil 3.3 a-c)'de gösterilmiştir.

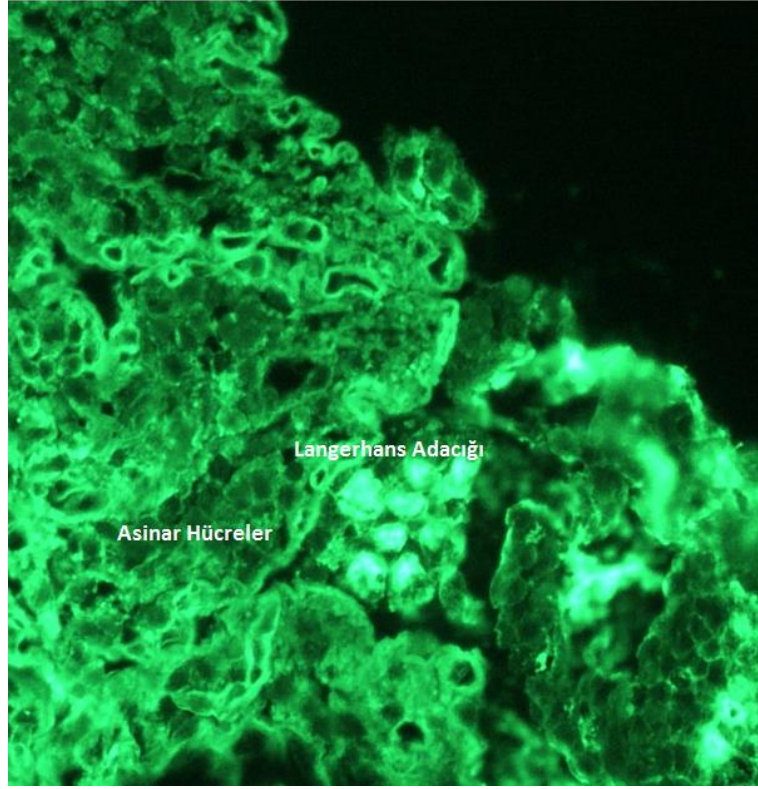
Buna göre; kontrol grubuna ait, sağlıklı pankreas kesitlerinde; hem kanallı bezleri oluşturan asiner hücre yüzeylerinde, hem de kanalsız bezleri oluşturan Langerhans adası β-hücreleri yüzeylerinde FITC-WGA lektinin işaretlediği N-Asetilglukozamin oligomerlerini, sialik asidi (GlcNAc, Neu5Ac ) ve özellikle β-

GlcNAc tipi sialik asit birimleri yaygın ve yoğun olarak görülmektedir. Bu sonuç bize, FITC-WGA lektininin N-Asetilglukozamin oligomerlerini, sialik asidi (GlcNAc, Neu5Ac ) ve özellikle  $\beta$ -GlcNAc tipi sialik asit birimlerini işaretlendiğini göstermektedir (Şekil 3.3.b).



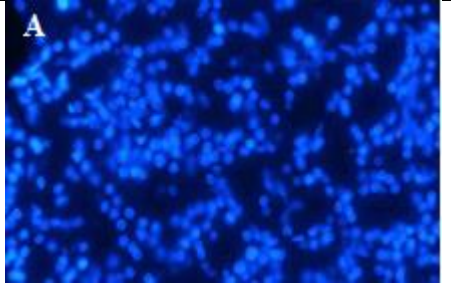
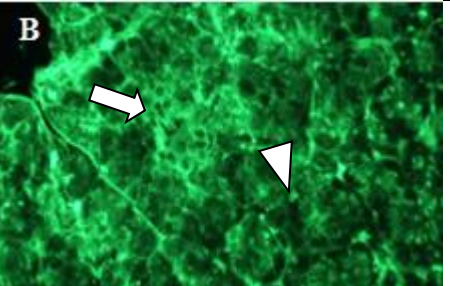
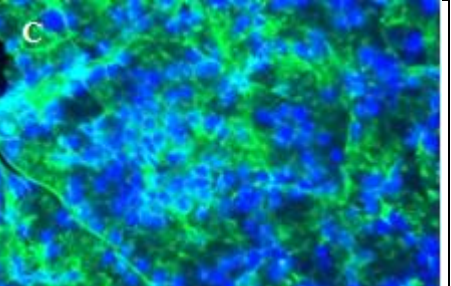
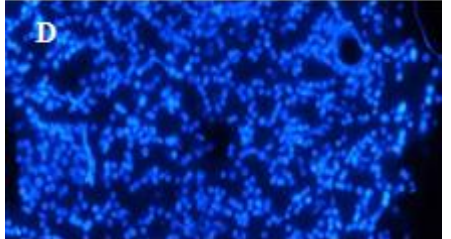
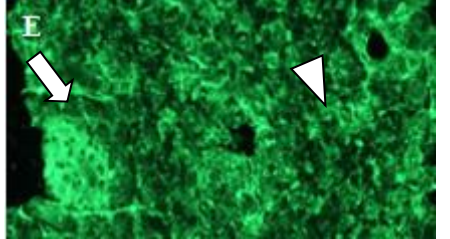
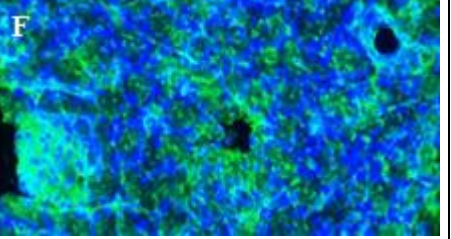
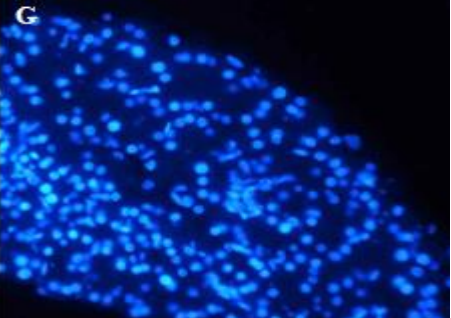
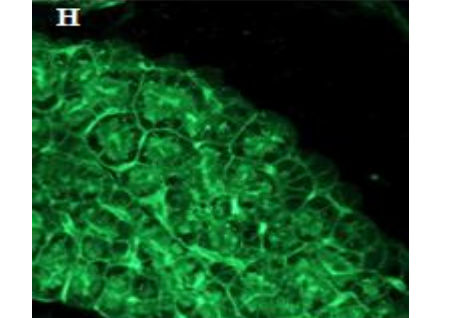
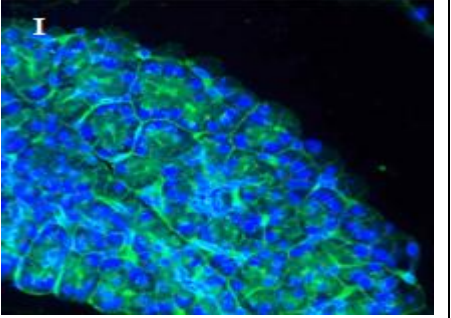
Şekil 6.1: FITC - WGA ile işaretlenmiş kontrol pankreas kesitleri. Hem hücreleri olan asiner hücre yüzeylerinde (Ekzokrin bez), hem de Langerhans adacığı hücreleri ( $\beta$ -hücreleri, Endokrin bez) yüzeylerinde N-Asetilglukozamin oligomerlerinin, sialik asidin (GlcNAc, Neu5Ac) ve  $\beta$ -GlcNAc tipi sialik asit birimlerinin görüntüleri.

Yağlı diyet grubuna ait pankreas kesitlerine FITC-WGA lektini ile bakıldığında, hem ekzokrin pankreas oluşturan asiner hücre yüzeylerinde, hem de kanalsız bezleri oluşturan  $\beta$ -hücre yüzeylerinde N-Asetilglukozamin oligomerlerini, sialik asidi (GlcNAc, Neu5Ac ) ve özellikle  $\beta$ -GlcNAc tipi sialik asit birimleri kontrol grubu FITC-WGA lektini ile işaretleme sonucundan farklı olarak tüm pankreas dokusu hücrelerinde daha fazla ve yoğun ışığa göstermektedir (Şekil 3.2). Yine yağlı diyetle beslenen sıçan pankreas dokusu kesitlerine de DAPI boyaması uygulanmış ve FITC-WGA ve DAPI floresan boyamaları karşılaştırılmıştır. Mikrografların sonuçları da bu verileri desteklemektedir (Şekil 3.3 d-f).

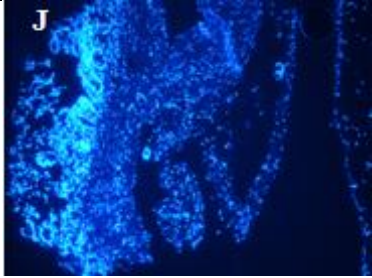
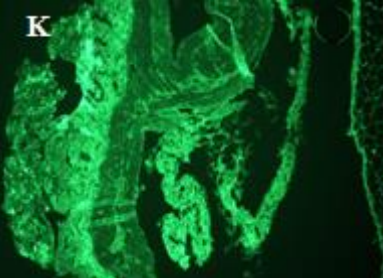
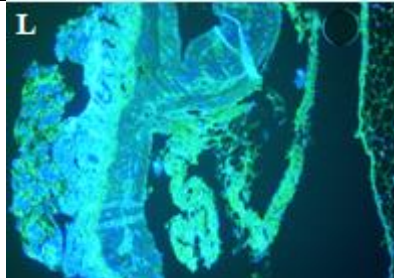
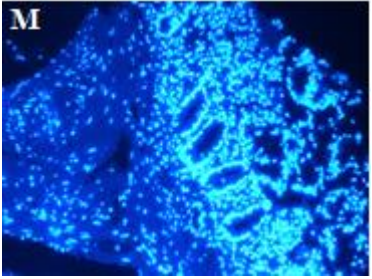
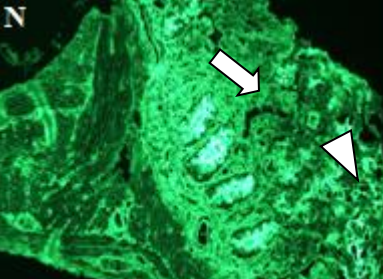
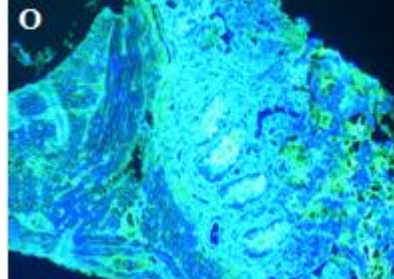
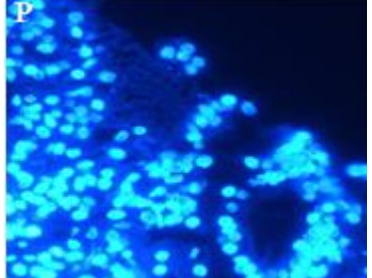
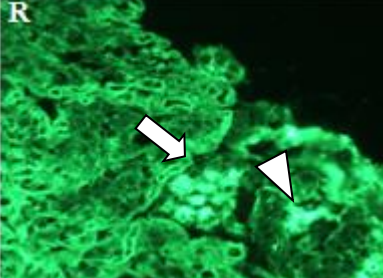
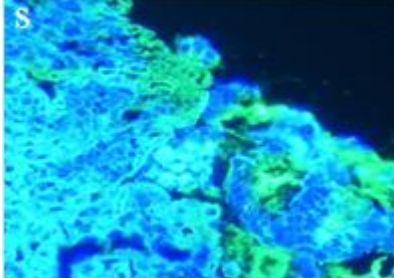


Şekil 6.2: FITC – WGA ile işaretlenmiş yağlı diyet pankreas kesitleri. Hem asiner hücre yüzeylerinde (Ekzokrin bez), hem de Langerhans adacığı (  $\beta$ - hücreleri, Endokrin bez) hücrelerinde artan N-Asetilglukozamin oligomerlerinden, sialik asitten (GlcNAc, Neu5Ac) ve özellikle  $\beta$ -GlcNAc tipi sialik asit birimlerinin görüntüleri.

Buna göre; yağlı diyet grubuna ait, sağlıklı pankreas kesitlerinde; kontrol pankreas dokusundan çok daha fazla FITC-WGA lektini ile işaretlenen, diğer bir değişle artan sayıda N-Asetilglukozamin oligomerlerinden, sialik asitten (GlcNAc, Neu5Ac ) ve özellikle  $\beta$ -GlcNAc tipi sialik asit birimlerinin varlığından söz edebiliriz. Bu değerlendirmeyi DAPI boyaması sonuçlarında bir artma olmaması da desteklemektedir. Bu sonuç bize işaretli FITC-WGA lektinin bağlandığı şeker birimlerinin arttığı sonucuna getirir (Şekil 3.3.e).

Örnek	DAPI Boyaması	FITC – WGA Lektini	Merged
Pankreas Kontrol Dokusu (16x10X)			
Pankreas Kontrol Dokusu (10X)			
Pankreas Kontrol Dokusu (20X)			

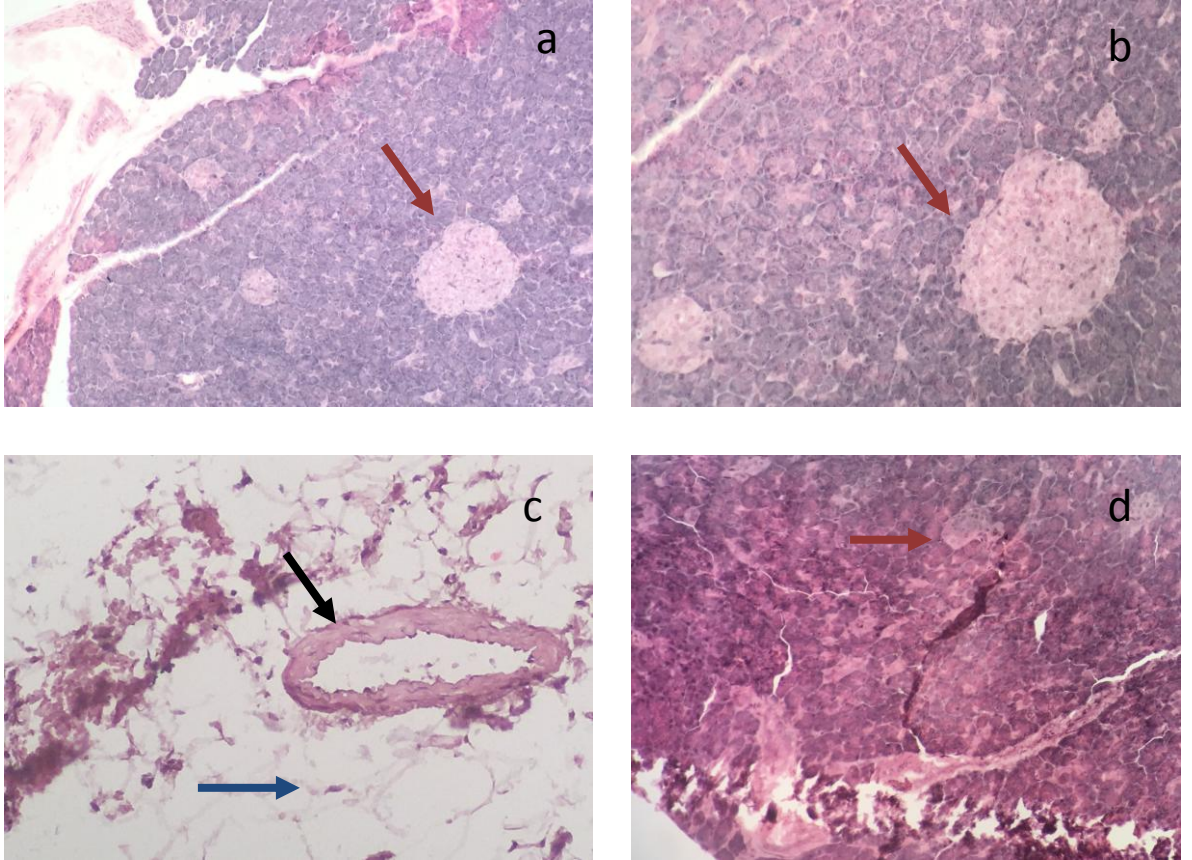
Şekil 6.3. FITC – WGA (Wheat Germ Agglutinin) ile yapılan denemenin sonuçları: (A-I) Kontrol diyetli gruba ait pankreas kesitlerinde, hem asinar hücre yüzeylerinde ( $\Delta$ ), hem de  $\beta$ -hücrelerinde ( $\rightarrow$ ) artan N-Asetilglukozamin oligomerlerinden, sialik asitten (GlcNAc, Neu5Ac) ve özellikle  $\beta$ -GlcNAc tipi sialik asit birimlerini gösteren yaygın floresan işaretli lektin ışınları yer alıyor.

Örnek	DAPI Boyaması	FITC – WGA Lektini	Merged
Pankreas Yağlı Diyet Dokusu (80X)			
Pankreas Yağlı Diyet Dokusu (160X)			
Pankreas Yağlı Diyet Uygulaması (320X)			

Şekil 6.3. FITC– WGA (Wheat Germ Agglutinin) ile yapılan yağlı diyet denemesinin sonuçları: (J-S) Yağlı diyet grubuna ait pankreas kesitlerinde, hem ekzokrin pankreas hücreleri olan, asinar hücre yüzeylerinde ( $\Delta$ ), hem de endokrin pankreas hücreleri olan  $\beta$ -hücre yüzeylerinde ( $\rightarrow$ ).

## 6.2. Histolojik Boyama Sonuçları

Doku kesitleri floresan işaretleme yanında aynı zamanda histolojik değerlendirmeler için Hematoksilin+Eosin boyaması yapılarak incelendi. Kontrol grubu kesitlerinde normal pankreas yapısı, adacıklar gözlenirken, yağlı diyet grubuna ait pankreas dokusunda yağlanmanın şiddetle arttığı adacık sayısının azaldığı tespit edildi (Şekil 3.4).



Şekil 6.4: Histolojik boyama sonuçları. a) Kontrol grubu kesitlerinde normal pankreas yapısına uygun boyutlarda ve sayıda adacıklar gözlenmektedir. b) Kontrol grubu kesitlerinde normal pankreas yapısına uygun boyutlarda ve sayıda adacıklar gözlenmektedir. c) Yağlı diyet grubuna ait pankreas doku kesitlerinde ise yağlanmanın şiddetle arttığı adacık sayısının azaldığı tespit edilmiştir. d) Yağlı diyet grubuna ait pankreas doku kesitlerinde ise yağlanmanın şiddetle arttığı adacık sayısının azaldığı tespit edilmiştir. → Langerhans adacığı, → doku içi damar kesiti, → yağ hücrelerini göstermektedir. (Büyütme 20X)

## 7. TARTIŞMA

Bu çalışmamızda, farklı pankreas dokusu hücre yüzeylerinde yer alan şeker rezidü farklılıklarının incelenmesinde kontrol diyeti ve yağlı diyet uygulanmış; basit anlamda bir çeşit obezite ile uyarılmış, metabolik sendrom modeli oluşturulmuş deney hayvanında pankreas dokusu hücre zarları glikan birimlerinin, lektin bağlı floresan boyalar ile özgün olarak işaretlenmede kullanılabilirliği araştırılmıştır.

Bilindiği üzere oligosakkaridler ve polisakkaridler, genellikle protein ve lipid birimlerine eklenmiş olarak, bütün hücrelerin yüzeylerinde yer alan, yoğun bir Glikokaliks tabaka oluştururlar. Bu tabakanın hücreler için önemi, başta ortam koşulları olmak üzere, tüm hücrel ilişkileri ya da daha genel bir tanımla tüm tanıma-tutunma mekanizmasını oluşturuyor olmalarından gelir [43]. Bu özellikleri ile yüzey glikanları, organ ve doku hücrelerinin özgün olarak seçilmesi için ideal moleküller olarak görülmektedirler. Çalışmamızda kullanılan işaretleyici moleküllerin varlığı ve özgün bağlantılar oluşturması; yani hassas seçiciliği, dolayısıyla güvenilirliği son derece önemlidir.

Glikokonjugatlar, bütün hücrelerin yüzeyinde bulunan, yoğun bir glikokaliks tabaka oluşumunu sağlayan hücre yüzey molekülleridir. Glikobiyoloji alanında yapılan araştırmalar ile bu glikokonjugatların çeşitli ve karmaşık biyolojik rolleri olduğu tespit edilmiştir. Hücrelerde bulunan bu tabaka sayesinde hücrelerin bulunduğu ortamın koşullarına cevap vermesi mümkün olurken, aynı zamanda komşu hücreler ile etkileşimleri düzenlenmektedir. Bunların yanı sıra hücrelerin konumlanmalarının belirlenmesinde glikokonjugatların etkin rol oynadıkları da bilinmektedir [43], [44], [45]. Yapılan literatür çalışması ile glikokonjugatların lektin ve floresan işaretleyicilerle hassas işaretlenebilmesi, hücrelerin doğru olarak seçilmeleri [46], [47], yönlendirilmiş tedavi [48], [49] ve yapay organ [50] çalışmalarında, destekleyici olarak pek çok metabolik hastalığın tedavisinde kullanılabilmelerini mümkün kılacağı görüşü hakimdir [51], [52]. Literatür çalışmasından da anlaşılacağı gibi yüzey glikoproteinleri ve proteoglikanları, genel anlamda hücre yüzeyinde yer alan glikokonjugatlar hücrelerin yaşamlarını devam ettirebilmeleri için hayati öneme sahiptir.

Bu amaçla yapılan tez projemizde; kontrol ve yağlı diyet uygulanmış ve kısmen obeziteye bağlı metabolik sendrom modeli oluşturulmuş sıçanlarda endokrin ve ekzokrin pankreas dokusu hücre zarlarında yer alan glikokonjugatların

yapısındaki sialik asitlerin hassas olarak belirlenebilirliği Fluorasein işaretli Wheat Germ Agglutinin (FITC-WGA) yardımıyla irdelenmiştir. Wheat Germ Agglutinin (WGA) N-Asetilglukozamin oligomerlerini, sialik asidi (GlcNAc, Neu5Ac) işaretlemekle beraber, özellikle  $\beta$ -GlcNAc tipi sialik asidi işaretleme kabiliyetinde bir lektindir [1]. Çalışmamızda bu verilere göre elde edilen mikrografların sonuçları değerlendirilmiştir. Fluorescein işaretli WGA lektini ile kontrol grubunda yapılan çalışmamızda; her ne kadar görüntüler çok keskin olmasa da; hem ekzokrin pankreas, yani kanallı bez hücreleri, asiner hücre yüzeylerinde; hem de kanalsız bez, diğer bir deyişle endokrin pankreas hücresi olan  $\beta$ -hücrelerinde oldukça yaygın ve yoğun olarak bu birimler işaretlenmiştir (Şekil 3.1). Aynı kesitler, hücre çekirdeğini boyayan DAPI boyası ile de boyanmış, böylece nukleus farklılıkları da değerlendirilmiştir. Sadece nukleusları boyanmış mikrograflar ile N-Asetilglukozamin oligomerlerini, sialik asidi (GlcNAc, Neu5Ac) ve  $\beta$ -GlcNAc tipi sialik asit birimlerini işaretleyen FITC-WGA lektini ile boyanmış mikrograflar karşılaştırılmış (merged) boyama aynı anda (Şekil 3.3 a-c)'de gösterilmiştir.

Buna göre; kontrol grubuna ait, sağlıklı pankreas kesitlerinde; hem kanallı bezleri oluşturan asiner hücre yüzeylerinde, hem de kanalsız bezleri oluşturan Langerhans adası  $\beta$ -hücreleri yüzeylerinde FITC-WGA lektinin işaretlediği N-Asetilglukozamin oligomerlerini, sialik asidi (GlcNAc, Neu5Ac) ve özellikle  $\beta$ -GlcNAc tipi sialik asit birimleri yaygın ve yoğun olarak görülmektedir. Bu sonuç bize, FITC-WGA lektininin N-Asetilglukozamin oligomerlerini, sialik asidi (GlcNAc, Neu5Ac) ve özellikle  $\beta$ -GlcNAc tipi sialik asit birimlerini işaretlendiğini ve kontrol grubu yüzeylerinde bu sialik asit rezidülerinin/birimlerinin yoğun olarak bulunduğunu göstermektedir (Şekil 3.3.b).

Çalışmamızda kullanılan diğer grubumuz olan yağlı diyet grubuna ait pankreas kesitleri FITC-WGA ile işaretlenerek bakıldığında, hem ekzokrin pankreas oluşturan asiner hücre yüzeylerinde, hem de kanalsız bezleri oluşturan  $\beta$ -hücre yüzeylerinde N-Asetilglukozamin oligomerlerini, sialik asidi (GlcNAc, Neu5Ac) ve özellikle  $\beta$ -GlcNAc tipi sialik asit birimlerinin miktarlarının kontrol örneklerine göre daha da fazla olduğu görülmektedir. Bu sonuca tüm pankreas dokusu hücrelerinin mikrograflarında görülen ışımının artmış ve yoğunlaşmış olmasının kesin olarak görülmesi ile varılmıştır (Şekil 3.2). Yine yağlı diyet grubuna ait kesitlere de DAPI boyaması ve her iki floresan boyamanın karşılaştırılmış sonuçları da eklenmiştir.

Bu sonuçlarda elde edilen veriyi desteklemektedir (Şekil 3.3 d-f).

Buna göre; yağlı diyet grubuna ait, sağlıklı pankreas kesitlerinde; kontrol pankreas dokusundan çok daha fazla FITC-WGA lektini ile işaretlenen/diğer bir deyişle artan sayıda, N-Asetilglukozamin oligomerlerinden, sialik asitten (GlcNAc, Neu5Ac ) ve özellikle  $\beta$ -GlcNAc tipi sialik asit birimlerinin varlığından söz edebiliriz. Bu değerlendirmeyi DAPI boyaması sonuçlarında bir artma olmaması da desteklemektedir. Bu sonuç bize işaretli FITC-WGA lektinin bağlandığı şeker birimlerinin yağlı diyetle /hatalı beslenme ve/veya obezite ile arttığı sonucuna getirir (Şekil 3.3.e).

Bu sonucu biraz daha açıklamak gerekirse; yağlı diyete maruz bırakılan, diğer bir deyişle metabolik sendrom modeli oluşturulan deney hayvanlarına ait pankreas dokusu kesitlerinde; hem ekzokrin pankreası oluşturan asiner hücrelerde, hem de endokrin dokuyu oluşturan langerhans adası hücrelerinin yüzeylerinde kontrol grubuna göre daha yoğun miktarda pozitif işaretleme görülmektedir. Bu sonuç N-Asetilglukozamin oligomerleri, sialik asit (GlcNAc, Neu5Ac ) ve  $\beta$ -GlcNAc tipi sialik asit birimlerinin miktarının beslenmeye bağlı olarak arttığının bir göstergesidir. Diğer bir deyişle, hücre yüzeylerinde tanıma tutunma mekanizmasında görevli şeker birimlerinin arttığını, kiloya ve/veya hatalı beslenmeye bağlı olarak meydana gelen bu durumun daha fazla bağlanma noktası oluşturarak canlıda meydana gelen ve/veya gelebilecek başta *Diabetes mellitus* gibi bir otoimmün rahatsızlık olmak üzere, tüm otoimmün rahatsızlıklar için işaretleyici gibi düşünülebilir.

Yukarıda bildirildiği gibi konuya yönelik yaptığımız glikokaliks literatür araştırmasında; hücre yüzeylerinde bulunan spesifik glikoproteinlerin ya da şeker dizilimlerinin etkin rol oynayabilecekleri sonucuna ulaşılmıştır. Bu doğrultuda hücre yüzeyinde bulunan glikoproteinlerin yapılarına uygun lektin molekülleri ile işaretlenmeleri ile oldukça hassas bir seçicilik sağlanabileceği düşünülmüştür. Bu amaçla çalışmamızda, özellikle farklılaşmada etkili olan ve değişim gösterdiğini düşündüğümüz N-Asetilglukozamin oligomerlerini, sialik asit (GlcNAc, Neu5Ac) rezidülerini işaretlemeyi hedefledik. Bununla beraber FITC-WGA özellikle  $\beta$ -GlcNAc tipi sialik asit rezidülerini de özgün olarak işaretlemektedir. Mikrograflardan yola çıkarak bu yöntemin kullanılabilirliğinin olduğu, bununla beraber biraz daha geliştirilerek gerekirse sayısal veriler yardımıyla desteklenmesi verilerin güvenilirliğini kuvvetlendirecektir. Buna ek olarak mikroskopik

incelemelerin geliştirilmesi de daha net ve hassas mikrograflara ulaşmayı sağlayacaktır.

Tüm bunlar ışığında tez çalışmamız planlanan amacına ulaşmış ve FITC-WGA lektini kullanılarak gerçekleştirilen işaretleme metodu ile N-Asetilglukozamin oligomerleri, sialik asit (GlcNAc, Neu5Ac) ve özellikle  $\beta$ -GlcNAc tipi sialik asit endokrin pankreas ve ekzokrin pankreas dokusu hücrelerinde işaretlenmiş ve sonuçları irdelenmiştir.

Bu sonuçlardan yola çıkarak tez çalışmamızda kullanılan oldukça hassas olan bu yöntemin geliştirilmesi ve çeşitlendirilmesi ile gelecekte metabolik hastalıklara yönelik erken tanı ve/veya tedavi çalışmalarında (ör: diyabet ve kanser gibi) hücre tiplerine özgün glikan rezidüsü ve/veya rezidüleri varlığının tespiti yapılabilir. Kullanılan bu yöntem ile karışık hücre süspansiyonlarında potansiyel hasta hücrelerin özgün seçiliminin daha kolay ve nispeten daha hızlı bir hale getirilebilmesi mümkün olabilir ve çalışmamız bu alanda yapılmış öncül çalışmalardan biri olarak kabul edilebilir.

## KAYNAKLAR

- [1] Bals R., Welsch U., (1997), “Lectins and antibodies to blood group antigens as markers for the basal cells of the human respiratory epithelium”, *Microscopy Research Technology*, Sep1, 38(5), 505-511.
- [2] Opie E.L., (1910), “Disease of the Pancreas: Its Cause and Nature”, 2nd Edition, Philadelphia: JB Lippincott.
- [3] Howard J.M., Hess W., (2002), “History of the Pancreas: Mysteries of a Hidden Organ”, 1st Edition, Toledo, Ohio.
- [4] de Leiva-Hidalgo A., Brugués-Brugués E., de Leiva-Pérez A., (2011), “From pancreatic extracts to artificial pancreas: History, science and controversies about the discovery of the pancreatic antidiabetic hormone VIII: Step by step towards the artificial pancreas”, *Avances en Diabetologia*, 27(1), 27-38.
- [5] Web 1, (2014), <http://www.pancreapedia.org/?q=node/8098>, (Erişim Tarihi: 22/10/2014).
- [6] Web 2, (2014), [http://pancreasmd.org/education\\_home.html](http://pancreasmd.org/education_home.html), (Erişim Tarihi: 22/10/2014).
- [7] Web 3, (2014), <http://aquaticpath.phhp.ufl.edu/fhm/visceral.html>, (Erişim Tarihi: 24/10/2014).
- [8] Web 4, (2014), <http://instruction.cvhs.okstate.edu/Histology/HistologyReference/HRD2frame.html>, (Erişim Tarihi: 24/10/2014).
- [9] Web 5, (2014), <http://courses.md.huji.ac.il/histology/digestiveglands/VIII-14.html>, (24/10/2014).
- [10] Elayat A.A., el-Naggar M.M., Tahir M., (1995), “An immunocytochemical and morphometric study of the rat pancreatic islets”, *Journal of Anatomy*, 186(3), 629-637.
- [11] Web 5, (2014), <http://www.igis.com/igis-digest/xiith-igis-symposium/i-birth-and-death-of-the-%CE%B1-cell/>, (Erişim Tarihi: 25/10/2014).
- [12] Longnecker D.S., (1982), “Pathology and Pathogenesis of Diseases of the Pancreas”, *American Association of Pathologists*, 107(1), 103-121.
- [13] Tuğ E., Tuğ T., (2003), “Kistik Fibrozis ve Moleküler-Genetik Yaklaşımlar”, *Toraks Dergisi*, 4(2), 198-204.

- [14] Cubilla A.L., Fitzgerald P.J., (2006), "Morphological Lesions Associated with Human Primary Invasive Nonendocrine Pancreas Cancer", *Cancer Research* 36, 2690-2698.
- [15] American Diabetes Association, (2012), *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*", *Diabetes Care*, 35(1), 64-71.
- [16] Varki A., (1992), "Diversity in the sialic acids", *Glycobiology*, 2(1), 25-40.
- [17] Sudha R., Toora B.D., Sarkar G., Sarkar M., (2012), "Serum Sialic Acid in Relation to Erythrocyte Sedimentation Rate and HbA 1c of Type 2 Diabetic Patient", *National Journal of Basic Medical Sciences*, 2(4), 316-319.
- [18] Hayes R.G., Lockwood H.D., (1986), "The Role of Cell Surface Sialic acid in Insulin Receptor Function and Insulin Action", *The Journal of Biochemistry*, 261(6), 2971-2798.
- [19] Kavalier S., Morinaga H., Jih A., Fan W., Hedlund M., Varki A., Kim J.J., (2011), "Pancreatic  $\beta$ -cell failure in obese mice with human-like CMP-Neu5Ac hydroxylase deficiency", *the Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 25, 1887-1893.
- [20] Vaidyanathan K., Wells L., (2014), "Multiple Tissue Specific roles for the O-GlcNAc Post-Translational Modification in the Induction of and Complications Arising from Type II Diabetes", *The Journal of Biological Chemistry*, 34466-34471.
- [21] Issad T., Masson E., Pagesy P., (2010), "O-GlcNAc modification, insulin signaling and diabetic complications", *Diabetes & Metabolism*, 423-435.
- [22] Hart G.W., Slawson C., Ramirez-Correa G., Lagerlof O., (2011), "Cross Talk Between O-GlcNAcylation and Phosphorylation: Roles in Signaling, Transcription and chronic Disease", *Annual Review of Biochemistry*, 80, 825-858.
- [23] Zachara E.N., Hart G.W., (2004), "O-GlcNAc a sensor of cellular state: the role of nucleocytoplasmic glycosylation in modulating cellular function in response to nutrition and stress", *Biochimica et Biophysica Acta*, 13-28.
- [24] Taylor M.E., Drickamer K., (2006), "Introduction to Glycobiology", 2nd Edition, Oxford University Press.
- [25] Ziolkowski A.F., Popp S.K., Freeman C., Parish C.R., Simeonovic J., (2012), "Heparan sulfate and heparanase play key roles in mouse  $\beta$  cell survival and autoimmune diabetes", *The Journal of Clinical Investigation*, 122(1).

- [26] Weiss L., Slavin S., Reich S., Cohen P., Shuster S., Stern R., Kaganovsky E., Okon E., Rubinstein A.M., Naor D., (2000), "Induction of resistance to diabetes in non-obese diabetic mice by targeting CD44 with a specific monoclonal antibody", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(1), 285-290.
- [27] Hull R.L., Johnson P.Y., Braun K.R., Day A.J., Wight T.N., (2012), "Hyaluronan and Hyaluronan Binding Proteins are Normal Components of Mouse Pancreatic Islets and are Differentially Expressed by Endocrine Cell Types", *Journal of Histochemistry*, 60(10), 749-760.
- [28] Perigo S.P., Hull R.L., Kahn S.E., Wight T.N., (2003), "Proteoglycans synthesized and secreted by pancreatic islet  $\beta$  cells bind amylin", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 413, 182-190.
- [29] Yamashita T., (2011), "Glycosphingolipid Modification: Structural Diversity, Functional and Mechanistic Integration of Diabetes", *Diabetes&Metabolism Journal*, 35, 309-316.
- [30] Yamashita T., Hashiramato A., Haluzik M., Mizukami H., Beck S., Norton A., kono M., Tsuji S., Daniotti J.L., Werth N., Sandhoff R., Sandhoff K., Proia R.L., (2003), "Enhanced insulin sensitivity in mice lacking ganglioside GM3", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(6), 3445-3449.
- [31] Osterbye T., Funda D.P., Fundova P., Mansson J.E., Hogenova H.T., Buschard K., (2010), "A subset of human pancreatic beta cells Express functional CD14 receptors: a signaling pathway for beta cell-related glycolipids, sulfatide and  $\beta$ -galactosylceramide", *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 26, 656-667.
- [32] Bernard-Kargar C., Kassis N., Berthault M.F., Pralong W., Ktorza A., (2001), "Sialylated Form of the Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM), A New Tool for the Identification and Sorting of  $\beta$ -Cell Subpopulations with Different functional Activity", *Diabetes*, 50(1), 125-130.
- [33] Kumar K.K., Chandra K.L., Sumanthi J., Reddy G.S., Shekar P.C., Reddy G.S., (2012), "Biological role of lectins: A review", *Journal of Orofacial Sciences*, 4(1), 20-25.
- [34] Kapoor C., Vaidya S., Kaur H., Jain A., (2014), "Role of lectins in clinical settings", *Clinical Cancer Investigation Journal*, 3(6), 472-477.
- [35] Majee B.S., Biswas R.G., (2013), "Exploring plant lectins in diagnosis, prophylaxis and therapy", *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(47), 3444-3451.
- [36] Liener I.E., Sharon N., Goldstein I.J., (1986), "The Lectins, Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine", 1st Edition, Academic Press.

- [37] Wright C.S., Olafsdottir S., (1986), "Structural Differences in the Two Major Wheat Germ Agglutinin", *The Journal of Biological Chemistry*, 261(16), 7191-7195.
- [38] Yaschchenko A.M., Pankevych L.V., Lutsky A.D., (2012), "Rat liver carbohydrate alterations in streptozotocin-induced diabetic rats", *European Journal of Anatomy*, 16(29), 82-90.
- [39] Petrova L., Kulina H.i Trifonov A., Russev G., Marinova K., Bogoeva V., (2013), "Binding of antitumor compounds to wheat protein", *Biotechnology&Biotechnological Equipment*, 27(3), 3857-3860.
- [40] Ward M.L., Crossman D.J., (2014), "Mechanisms underlying the impaired contractility of diabetic cardiomyopathy", *World journal of Cardiology*, 6(7), 577-584.
- [41] Levi I., Priel E., (2012), "Type 1 diabetes affects topoisomerase I activity and GlcNAcylation in rat organs: Kidney, liver and pancreas", *Glycobiology*, 22(5), 704-713.
- [42] Schwarz R.E., Wojciechowicz D.C., Picon A., Schwarz M.A., Paty P.B., (1999), "Wheatgerm agglutinin-mediated toxicity in pancreatic cancer cells", *British Journal of Cancer*, 80(11), 1754-1762.
- [43] Lanctot P.M., Gage F.H., Varki A.P., (2007), "The Glycans of Stem Cells", *Current Opinion in Chemical Biology*, 11(4), 373-380.
- [44] Patil S.A., Chandrasekaran E.V., Matta K.L., Parikh A., Tzanakakis E.S., Neelamegham S., (2012), "Scaling-down the size and increasing the throughput of glycosyltransferase assays: Activity changes upon stem-cell differentiation", *Analytical Biochemistry*, 425(2), 135-144.
- [45] Yu R.K., Itokazu Y., (2014), "Glycolipid and Glycoprotein Expression During Neural Development", *Glycobiology of the Nervous System, Advances in Neurobiology*, 9, 185-222.
- [46] Lawrence R., Brown J.R., Lorey F., Dickson P.I., Crawford B.E., Esko J.D., (2014), "Glycan-based Biomarkers for Mucopolysaccharidoses", *Molecular Genetics and Metabolism*, 111, 73-83.
- [47] Kawabe K., Tateyama D., Toyoda H., Kawasaki N., Hashii N., Nakao H., Matsumoto S., Nonaka M., Matsumura H., Hirose Y., Morita A., Katayama M., Sakuma M., Kawasaki N., Furue M.K., Kawasaki T.K., (2013), "A novel antibody for human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells recognizes a type of keratan sulfate lacking oversulfated structures", *Glycobiology*, 23(3), 322-336.
- [48] Sethuraman N., Stadheim T.A., (2006), "Challenges in therapeutic glycoprotein", *Current Opinion in Biotechnology*, 17(4), 341-346.

- [49] Abdelkrim H., Juan D.B., Jane W., Mohamed A., Bernat S., (2009), "The Immun Boundaries for Stem Cell based Therapies: Problems and Prospective Solutions", *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(8A), 1464-1475.
- [50] Gagiannis D., Gossrau R., Reutter W., Zimmermann-Kardmann M., Horstkorte R., (2007), "Engineering the sialic acid in organs of mice using N-propanoylmannosamine", *Biochimica et Biophysica acta*, 1770, 297-306.
- [51] Gangaram-Panday S.T., Faas M.M., de Vos P., (2007), "Towards stem-cell therapy in the endocrine pancreas", *Trends in Molecular Medicine* 13, 164-173.
- [52] Varki A., (2008), "Sialic acids in human health and disease", *Trends in Molecular Medicine* 13, 164-173.
- [53] Varki A., (2008), "Sialic acids in human health and disease", *Trends in Molecular Medicine*, 14(8), 351-360.

## ÖZGEÇMİŞ

Tuğçe UYGUR, 1990 yılında İzmir’de doğdu. 2008 yılında başladığı Ege Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Ağırlıklı Biyoloji bölümünü 2012 yılında tamamladı. Aynı yıl yüksek lisans eğitimine Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda başladı.