



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI



İNSÜLİN'İN SIÇANLARDA ÜRİDİN DÜZEYLERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

MESUT TÜRKYILMAZ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

BURSA-2018



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI



**İNSÜLİN'İN SIÇANLARDA ÜRİDİN DÜZEYLERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Mesut TÜRKYILMAZ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mehmet CANSEV

BURSA-2018

**T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum “İnsülin’in Sıçanlarda Üridin Düzeylerine Etkisinin Araştırılması” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

**Adı Soyadı
Mesut Türkyılmaz
Tarih ve İmza
28.08.2018**

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Mesut Türkyılmaz tarafından hazırlanan “İnsülin’in Sıçanlarda Üridin Düzeylerine Etkisinin Araştırılması” konulu Yüksek Lisans tezi/...../.....günü,-..... saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı

İmza

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Mehmet Cansev

Üye

Üye

Üye

Üye

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı toplantısında alınan numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ali AYDOĞDU
Enstitü Müdürü

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

...../...../.....

Adı Soyadı: Mesut Türkyılmaz

Anabilim Dalı: Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Tez Konusu: İnsülin'in Sıçanlarda Üridin Düzeylerine Etkisinin Araştırılması

<u>ÖZELLİKLER</u>	<u>UYGUNDUR</u>	<u>UYGUN DEĞİLDİR</u>	<u>ACIKLAMA</u>
Tezin Boyutları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Dış Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İç Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kabul Onay Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Düzeni	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İçindekiler Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yazı Karakteri	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Satır Aralıkları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Başlıklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Numaraları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Eklerin Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Tabloların Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kaynaklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Prof. Dr. Mehmet Cansev

İmza:

İÇİNDEKİLER

Dış Kapak	
İç Kapak	
ETİK BEYAN.....	II
KABUL ONAY.....	III
TEZ KONTROL BEYAN FORMU.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
TÜRKÇE ÖZET.....	VII
İNGİLİZCE ÖZET.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Üridinin Kimyasal Yapısı.....	4
2.2. Dokularda Üridin Sentezi.....	6
2.2.1. Denovo Sentez.....	7
2.2.2. Kurtarma Yolağı.....	10
2.3. Üridin'in Parçalanması.....	11
2.4. Üridin'in Hücrelere Alınması.....	12
2.5. Üridin'in Katıldığı Biyokimyasal İşlevler..	12
2.5.1. Glikojen Sentezi.....	12
2.5.2. Protein ve Lipid Glikolizasyonu.....	13
2.5.3. RNA Sentezi.....	14
2.5.4. Fosfolipid Sentezi.....	15
2.6. Pankreatik endokrin hormonları	16
2.6.1. Glukagon.....	18
2.6.2. Somatostatin.....	19
2.6.3. Pankreatik polipeptit.....	19
2.6.4. İnsülin.....	20
2.6.4.1. İnsülin' in Kimyasal Yapısı.....	20
2.6.4.2. İnsülin' in Sentezi ve Pankreastan Salıverilmesi.....	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. Deney Hayvanları.....	25
3.1.1. Deneyler.....	25
3.2. Cerrahi ve Deneysel İşlemler.....	26
3.2.1. Arteria Femoralis ve Vena Femoralis'e Kateter Yerleştirilmesi.....	26
3.2.2. Hiperinsülinemik-Öglisemik Klemp.....	27
3.3. Serumun Elde Edilmesi	30
3.4. Serum Üridin Konsantrasyonlarının Ölçülmesi.....	30
3.4.1. Serum Ekstraksiyonu.....	30
3.4.2. HPLC (High Performance Liquid Chromatography, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) ile Üridin Analizi	31
3.5. Kan Glukoz, Serum İnsülin ve Glukagon Düzeylerinin Ölçülmesi.....	34
3.6. İstatistiksel Analizler	35
4. BULGULAR	36
4.1. Kan Glukoz ve Üridin Konsantrasyonlarının Açlık Durumunda ve Gıda Alımını Takiben Zamana Bağlı Değişimleri.....	36

4.2. Açlık ve Tokluk Durumlarında Serum İnsülin Konsantrasyonları.....	38
4.3. İnsülin'in subkutan yolla farklı dozlarda enjeksiyonu sonrası kan glukoz konsantrasyonlarının zamana bağlı değişimleri.....	39
4.4. İnsülin'in subkutan yolla farklı dozlarda enjeksiyonu sonrası serum üridin konsantrasyonlarının zamana bağlı değişimleri.....	40
4.5. İnsülin'in subkutan yolla farklı dozlarda enjeksiyonu sonrası serum insülin konsantrasyonlarının zamana bağlı değişimleri.....	42
4.6. Hiperinsülinemik-öglisemik klemp yöntemi uygulanarak toplanan kan örneklerinin analizi.....	43
4.7. Hiperinsülinemik-öglisemik klemp yöntemi sonrası serum üridin ve insülin konsantrasyonlarının zaman bağlı değişimleri.....	44
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	48
6. KAYNAKLAR	52
7. SİMGELER VE KISALTMALAR.....	57
8. TEŞEKKÜR	59
9. ÖZGEÇMİŞ	60



TÜRKÇE ÖZET

Bir pirimidin nükleozidi olan üridin vücutta serbest halde bulunabildiği gibi nükleotidlerin (mono-, di- ve tri-fosfatlı halleri), nükleotid şekerlerin (UDP-glukoz ve UDP-galaktoz) ve nükleik asitlerin (RNA) yapısına girerek glikojen biyosentezi, protein ve lipid glikolizasyonu gibi fizyolojik fonksiyonlarda yer alır. Nükleotid reseptörlerinin tanımlanmasıyla, pirimidin nükleozidlerinin sinirsel iletide de (pirimidinerjik transmisyon) rolü olduğu öne sürülmektedir. Üridin özellikle RNA'dan serbestleşmek suretiyle gıdalarla vücuda alınabildiği halde hücrelere nasıl alındığı tam olarak bilinmemektedir. İn vitro çalışmalarda pirimidin nükleozid taşınmasının ve dokulara alınmasının hormonlarla (insülin, glukagon) kontrol edilebileceği ve pirimidinlerin dokularda nükleotid ve nükleik asitlerin yapısına katılabileceği belirtilmiştir.

Çalışmamızda; insülin'in sıçanlarda üridin düzeylerine etkilerinin araştırılması planlanmıştır. Bu amaçla ilk olarak; açlık ve tokluk durumlarında sıçanların kan glukoz ve serum üridin düzeyleri incelendi. Arteryel kanül yerleştirilmiş olan sıçanlardan öncelikle 24 saat açlık sonrası, daha sonra da 1 saatlik beslenmeyi takiben çeşitli zaman aralıklarında kan alınarak kan glukoz ve serum üridin düzeylerinin zamana bağlı değişimleri incelendi. Benzer bir kurguda kanül takılmadan 24 saat açlık ve sonrasında 2 saatlik tokluk noktalarında sakrifiye edilen sıçanlardan kan örnekleri toplanarak serum insülin düzeyleri analiz edildi.

İkinci olarak insülin'in periton içi yolla farklı dozlarda enjeksiyonu sonrası serum üridin düzeylerinin değişimleri incelendi. İnsülin enjeksiyonunu takiben farklı zaman aralıklarında femoral arterine yerleştirilen kateterden kan toplanarak üridin, glukoz ve insülin düzeyi ölçümleri yapıldı.

Son çalışmada ise serum üridin düzeylerindeki değişimlerin glukozun hücre içine girip girmemesine bağlı olup olmadığı hiperinsülinemik öglisemik-klemp yöntemi uygulanarak araştırılmıştır.

Bulgularımız, serum insülin düzeylerinin artmış olduğu tokluk anında üridin düzeylerinin azaldığını, subkutan (s.c.) insülin uygulamasının serum üridin konsantrasyonunu doza ve zamana bağlı olarak azalttığını ve üridin düzeylerinde insülin tarafından uyarılan azalmaların hücre içine Glukoz girişinden bağımsız olduğunu göstermiştir.

Çalışmamızdan elde edilen bulgular literatürde ilk kez dolaşımdaki üridin'in hücrelere alınmasının insülin tarafından teşvik edildiğini ve bu işlemin hücrelere glukoz girişinden bağımsız olduğunu düşündürmektedir. İnsülin uyarısıyla üridin'in hücre içine alınmasının moleküler mekanizmalarının aydınlatılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Üridin, İnsülin, Hiperinsülinemik-Öglisemik klemp, hücre içine alım

İNGİLİZCE ÖZET

Uridine, a pyrimidine nucleoside, is an endogenous compound detected both in free form and in the form of mono-, di- and trinucleotides and nucleotide sugars (UDP-glucose and UDP-galactose). It is also an important part of ribonucleic acid (RNA) and plays critical roles in many physiological functions like biosynthesis of glycogen and glycosylation of proteins and lipids. With the identification of nucleotide receptors, role of pyrimidine nucleosides (pyrimidinergic transmission) in the communication of nerve cells has also been proposed. The mechanism for the uptake of uridine by the cells of body, after being released from the RNA as a food ingredient, is yet unknown. In in-vitro experiments, the transport and uptake of uridine by the tissues has been proposed to be associated with hormones (insulin, glucagon) so that uridine can be incorporated in nucleotides and nucleic acids.

The aim of our experiment was to determine the effects of insulin on levels of uridine in rats. Therefore, firstly, levels of glucose and uridine were investigated during fasting and in fully-fed animals. Blood samples from rats inserted with arterial cannulas were obtained in fasting state after 24 hour food restriction, and then at certain time points 1 hour following feeding in order to investigate time-dependent changes in glucose and uridine levels. In a separate group of animals, serum insulin levels were analyzed once during fasting state and 2 hours after feeding has started.

In a second protocol, serum uridine levels were determined after intraperitoneal injection of different doses of insulin. Following insulin injection, a catheter was placed in the femoral artery and blood samples were collected at different time intervals and were then processed for measurement of levels of uridine, glucose and insulin.

Finally, the association of cellular glucose uptake in the decreased serum uridine concentrations was investigated using hyperinsulinemic-euglycemic clamp method.

Our findings showed that serum uridine concentrations were decreased at the time of insulin increase in fully-fed animals, subcutaneous insulin administration decreased serum uridine in a dose- and time-dependent manner and that such changes in uridine concentrations were not associated with cellular uptake of glucose.

Data obtained in our study suggest, for the first time in the literature, that insulin stimulates cellular uptake of uridine and this process is independent from that of glucose. Further studies are needed in order to reveal molecular mechanisms of uridine uptake.

Key words: Uridine, Insulin, hyperinsulinemic-euglycemic clamp, cellular uptake

1. GİRİŞ

Üridin, kanda ve dokularda serbest halde bulunabildiği gibi, dokularda mono- (UMP), di- (UDP) ve tri-fosfatlı (UTP) yapıları olan nükleotidlerin, nükleotid şekerlerin (UDP-glukoz ve UDP-galaktoz), nükleik asitlerin (RNA) yapısına da katılırlar (Cansev, 2006; Lecca ve Ceruti, 2008). Üridin, glikojen biyosentezi, protein ve lipid glikolizasyonu ve pirimidinerjik transmisyon gibi birçok fizyolojik fonksiyonda rol oynar (Cansev, 2007; Lecca ve Ceruti, 2008). Vücutta bu kadar farklı işlevlerde görevli olan bu endojen bileşiğin dolaşımdaki konsantrasyonları insanda ve çeşitli hayvan türlerinde ölçülmüştür (Traut, 1994). Bu ölçümler serum üridin ve diğer pirimidin düzeylerinin tüm omurgalı canlılarda aynı olmadığı ve türler arasında bazı farklılık gösterdiği ortaya konulmuştur. Örneğin, sıçanlarda dolaşımdaki major pirimidin nükleozidi sitidin iken, insanlarda üridindir (Traut, 1994). Buna ek olarak, insanlara dışarıdan verilen sitidin, sitidin deaminaz enziminin etkisiyle büyük oranda üridine dönüşmektedir (Wurtman ve ark., 2000).

Nükleozid sirkülasyonunda plazma üridin miktarının hızlı değişimi, üridinin çeşitli dokularda pirimidin metabolizmasında rolü olabileceğini düşündürmektedir. (Dahnke ve Mosebach, 1975; Moyer ve ark., 1981). De novo pirimidin sentezinde potent inhibitör etkili fosfoasetil aspartik asit (PALA) ve pirazofurin ile yapılan çalışmalarda, bazı tümör türlerinde ribonükleik havuzunda üridin miktarında önemli bir azalma görülürken, normal dokularda ve duyarlı olmayan tümörlerde etkilenmediği gösterilmiştir (Dix ve ark., 1979; Moyer ve Handschumacher, 1979). Elde edilen sonuçlar dolaşım havuzundaki pirimidinlerin dokulardaki nükleozid azalmalarını tolere ettiğini desteklemektedir. Bu havuzların kaynağı tam olarak bilinmemektedir. Karaciğer, vasküler sistem aracılığıyla diğer dokulara pürin sağlar. Benzer bir mekanizmanın pirimidinler için de olabileceği düşünülmektedir (Levine ve ark., 1974). Üridinin karaciğer tarafından alınımının ve metabolize edilmesinin kantitatif

bir analizi yapılmış ve sonuç olarak sıçanlarda (Moyer ve ark., 1981) ve köpeklerde (Tseng ve ark., 1971) plazma üridin seviyelerinin hızlı bir şekilde değişimi gözlenmiştir. Karaciğer üridin ekstraksiyonu ve parçalanmasında önemli derecede etkilidir. Üridin katabolizmasından sorumlu enzimlerin primer yerinin karaciğer olduğunu anlamak için yapılan çalışmada, izole edilmiş sıçan karaciğerine [^3H] radyoaktif madde perfüze edilmiş ve medyumdaki radyoaktivite ile işaretlenmiş üridinin kısa sürede yarındığı bildirilmiştir (Tseng ve ark., 1971). Fizyolojik şartlarda üridin değişimleri ile ilgili yapılan çalışmada, karaciğere giren plazma üridinin hepatik ven aracılığıyla olmadığı ve muhtemelen de novo aracılığıyla elde edildiğini göstermektedir (Gasser ve ark., 1981).

İnsan serum üridin düzeyleri 3-6 mikromolar aralığında olduğu ve bazı patolojik durumlarda farklılık gösterdiği çalışmalarda bildirilmiştir. Sağlıklı bireylerde 3.75 mikromolar olarak belirlenen kan üridin konsantrasyonu, yaş ve cinsiyet uyumlu Tip II diyabetli hastalarda 4.32 mikromolar olarak ölçülmüştür (Traut, 1994; Yamamoto ve ark., 2010). Tip I Diyabeti olan çocuklarda benzer şekilde serum üridin konsantrasyonu (6.1 mikromolar) yaş ve cinsiyet uyumlu sağlıklı kontrollerin serum üridin konsantrasyonuna (2.95 mikromolar) göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (Duszinska, 2011).

İnsüline bağımlı olmayan diabetes mellitus'un (NIDDM) önemli bir özelliği olan insülin direncinin altında yatan hücrel ve moleküler mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Sıçan adipositlerinin aracılığıyla heksozaminin biyosentez yolağında gözlenen artış insülin direnci gelişimine yol açığının doğrudan bir kanıtı olabilir (Marshall ve ark., 1991). Heksozamin biyosentetik yol ile hücre içine giren glukozun yaklaşık %2-5'i son ürün olan üridin di-fosfat-N-asetilglukozamin'e (UDP-GlcNac) dönüşür. Buna ek olarak, glukozamin kinaz veya heksokinaz tarafından glukoz-6-fosfata ve sonrasında UDP-GlcNac'e dönüştürülür (Haugaard ve ark., 1977). In vivo ve in vitro yapılan çalışmalarda hücre içi artan UDP-GlcNac ve insülin resistansı oluşması arasında bir ilişkinin varlığı ortaya konulmuştur (Buse, 2006; Copeland ve ark., 2008). Buna ek olarak, üridin infüzyonu sonrasında iskelet kası üridin difosfat ve UDP-GlcNac seviyelerinde artış olduğu, aynı zamanda belirgin şekilde insülin direncini uyardığı tespit edilmiştir. Üridin ile oluşturulan insülin etkisinin azalması kasta UDP-GlcNac birikimine aracılık ettiğini göstermektedir

(Hawkins ve ark., 1997). Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, plazma üridin konsantrasyonunun insülin direncinin HOMA-IR (Homeostatic Model Assessment-Insulin Resistance) modeli ile değerlendirilmesinde yararlı olabileceği bildirilmiştir (Hamada ve ark., 2007).

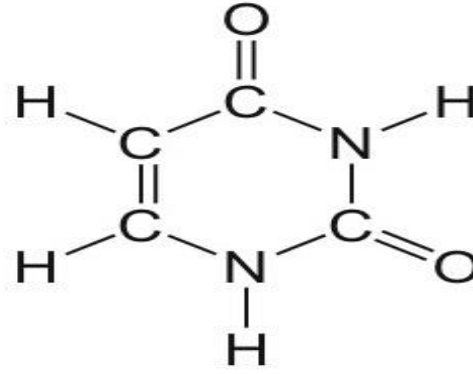
Ancak bütün bu bilinenlere rağmen, İnsülinin in vivo üridin düzeylerine etkisine dair bulguya rastlanmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızın amacı, literatürde ilk kez farklı dozlarda insülin uygulanan ve hiperinsülinemik-öglisemik model oluşturulmuş sıçanlarda üridin değişimlerini incelenmektedir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Üridinin Kimyasal Yapısı

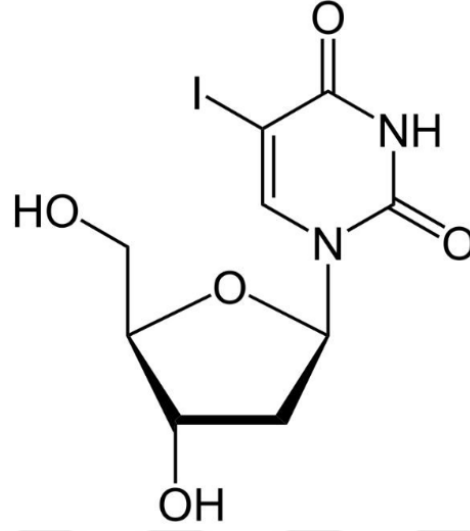
Üridin ve benzeri pirimidin bileşikleri aromatik heterosiklik organik bileşiklerdir. İki nitrojen atomu altılı halka yapısının 1 ve 3 numaralı pozisyonlarında yer alır. Pirimidinler baz, nükleozid ve nükleotid formlarında bulunmaktadır. Doğada oldukça çok görülen bileşiklerin (örn: B1 vitamini, alloksan v.b.) yapısında pirimidin bulunurken, barbitüratlar ve zidovudin gibi sentetik bileşiklerin yapısına da katılırlar. Pirimidin bazları esas olarak DNA ve RNA'nın yapısına katılırken urasil sadece RNA'nın yapısında bulunur. Pirimidin bazı olan urasilin kimyasal yapısı Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil-1: Urasilin kimyasal yapısı.

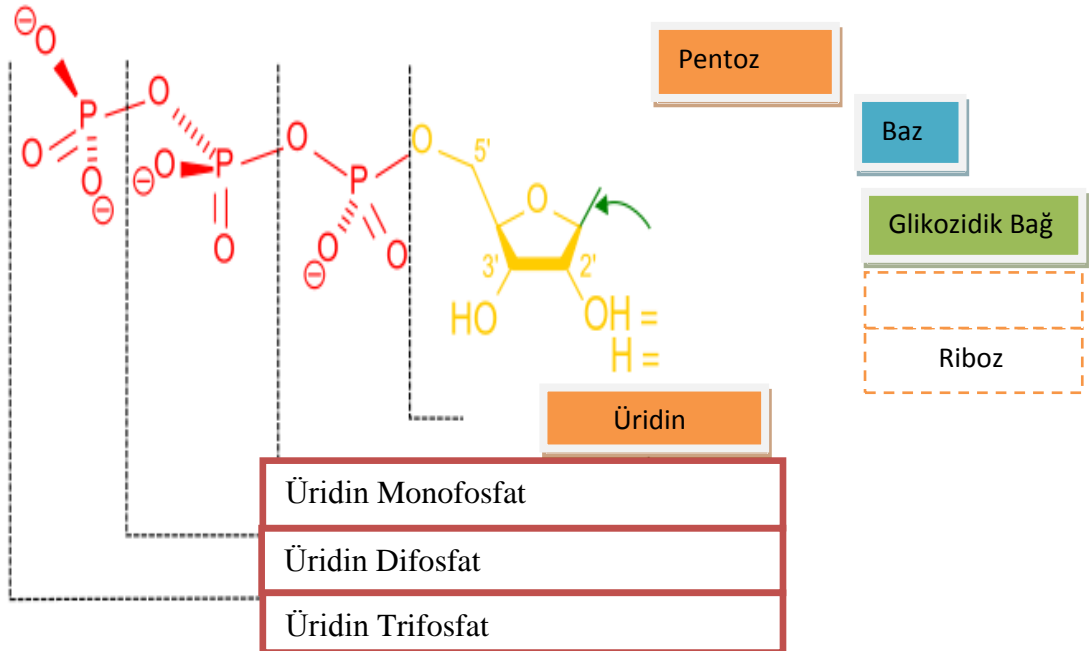
Pirimidin bazlarına, riboz veya 2-deoksiriboz formunda bir şeker molekülünün, β -N-glikozit bağı ile eklenmesi sonucu pirimidin nükleozidleri oluşur. Oluşan pirimidin nükleozidi isimlendirilirken baz isminin sonuna “-idin” takısı getirilir (örneğin; üridin, timidin). Bazlara riboz eklendiğinde oluşan nükleozidler herhangi bir takı almaz, ancak 2-deoksiriboz eklendiğinde ismin önüne “d-“ takısı getirilir.

Urasil bazı ve riboz şeker molekülü birleşimi ile oluşan pirimidin nükleozidi üridinin kimyasal yapısı Şekil 2’de verilmiştir.



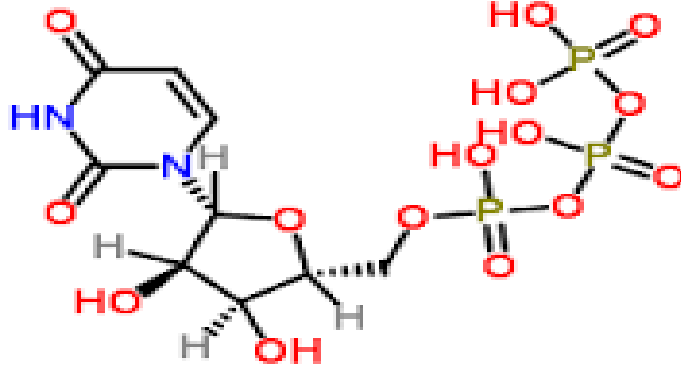
Şekil-2: Üridin nükleozidinin kimyasal yapısı.

Pirimidin nükleotidleri ise, nükleozid ve nükleozid şekerinin 5'-hidroksil grubuna kovalent bağ ile bağlanmış bir veya daha çok sayıda fosfat grubunun eklenmesiyle oluşurlar. Adlandırmaları, nükleotide eklenen fosfat gruplarının sayısına göre yapılır. Nükleozid ismine; bir, iki veya üç fosfat grubu eklendiğinde sırasıyla mono-, -di-, tri-fosfat ekleri getirilir. Üridin nükleozitlerinin kimyasal yapıları Şekil-3’de verilmiştir.



Şekil-3: Üridin nükleozitlerinin kimyasal yapıları.

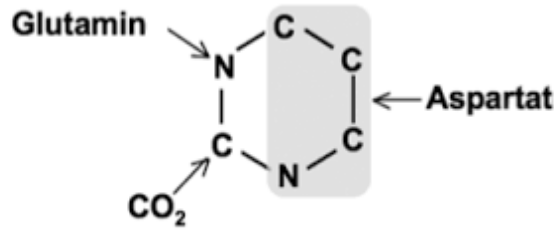
Üridin nükleozidine üç fosfat grubu eklendiğinde oluşan üridin-5'-trifosfat (UTP) nükleotidi Şekil 4'te gösterilmiştir.



Şekil-4: Üridin-5'-trifosfat nükleotidinin kimyasal yapısı.

2.2. Dokularda Üridin Sentezi

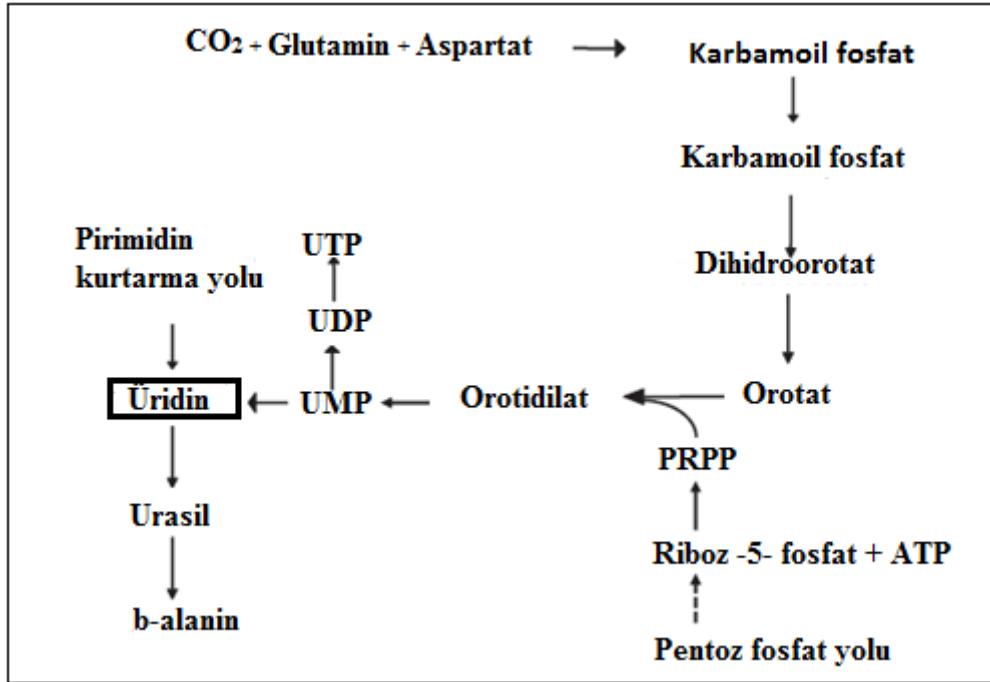
Üridin, urasil ve ribozdan oluşan bir pirimidin nükleozididir. Pirimidinler, dalak, timus ve gastrointestinal sistem hücrelerin sitosollerinde sentezlenir. Pirimidin halkasının kaynağı glutamin, karbondioksit ve aspartik asittir.



Şekil 5: Pirimidin halkasının atomları kaynağı.

Memelilerde karbamoil fosfat sentataz II enziminin katalizlemesiyle glutamin ve karbondioksitten pirimidinin ilk basamağı olan karbamoil fosfat sentezlenir. Aspartat trans karbamoilaz'ın katalizlediği bir tepkimeyle karbamoil aspartat oluşur ve devamında oluşan dihidroorotat, orotik asit oluşturmak için oksitlenir. Orotat oluşumu için gerekli olan dihidroorotat dehidrogenaz mitokondri iç membranı yerleşim gösterirken pirimidin sentezi için kullanılan diğer tüm enzimler sitozolik yerleşim gösterirler. Multifonksiyonel ve multikatalitik polipeptidlerle IMP'nin

oluşumu gerçekleşir. Pirimidin sentezinin ikinci basamağı olarak, IMP orotin 5'monofosfat'a dönüşür. Bu aşamada PRPP riboz 5-fosfat kaynağıdır. OMP, orotidilatdekarboksilaz ile asidik karboksil grubunun kaldırılmasıyla UMP'ye dönüşür. UMP, sitozolik pürin 5-nükleotidaz ile üridin'e defosforillenir.



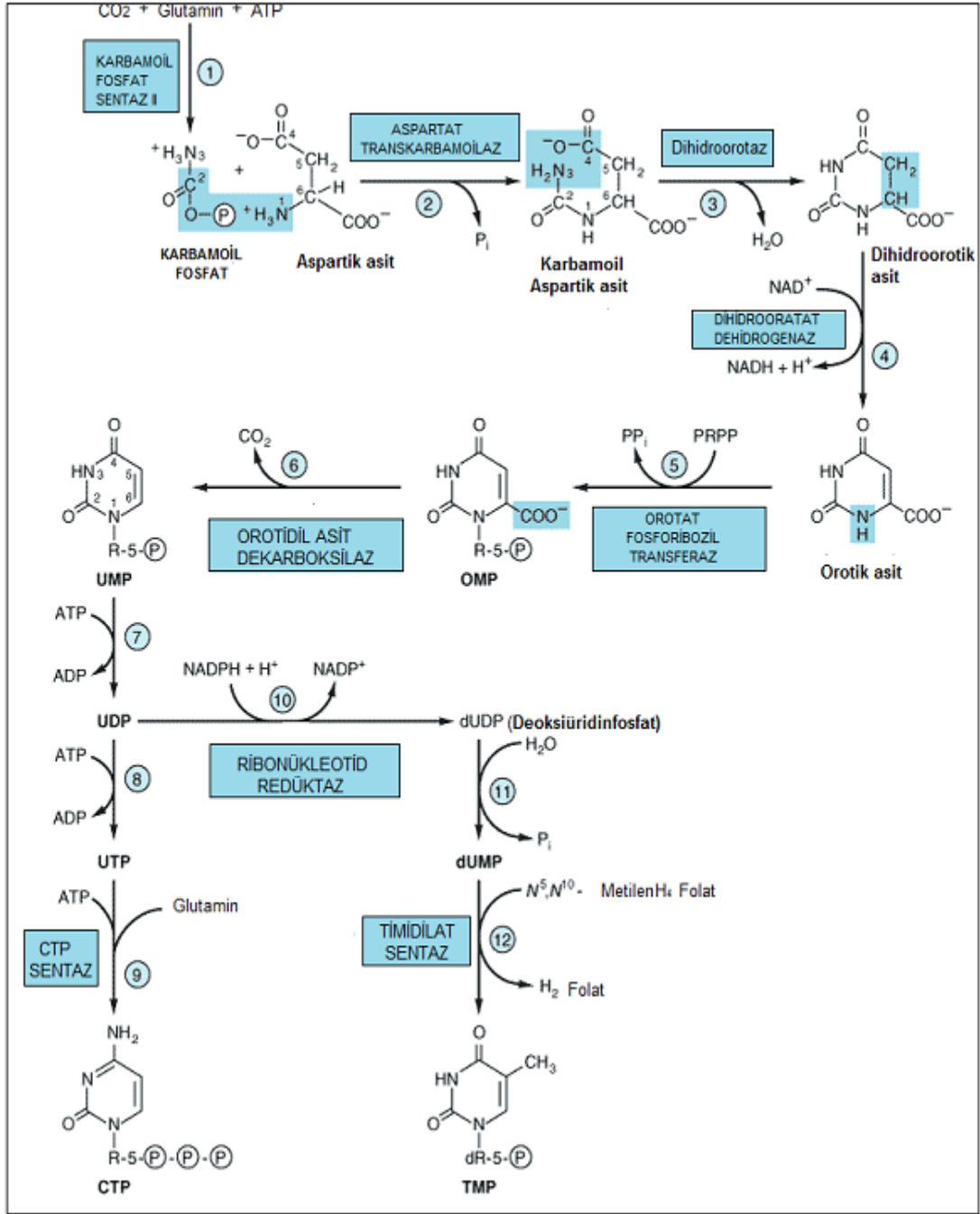
Şekil 6: Üridin sentezi.

2.2.1. De novo Sentezi

Pirimidinler vücutta *de novo yolak* ve *kurtarma yolağı* adlı mekanizmalar aracılığıyla sentezlenir (Barness, 1995).

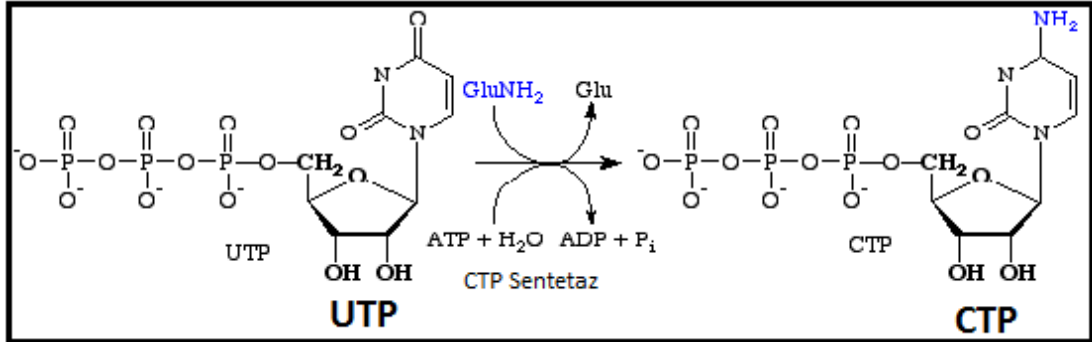
De novo yolağı, büyüme ve gelişme boyunca oldukça aktiftir (Traut ve Jones, 1996). '*De novo*' yolağı ile pirimidinler başta karaciğer olmak üzere dalak, timus, gastrointestinal sistem gibi bölgelerde bulunan çeşitli hücrelerin sitozolünde sentezlenir (Yamamoto ve ark., 2011).

Pirimidin biyosentezi karbamoil fosfat'tan üridin-5'-monofosfat (UMP) üretimi ile başlar (Şekil-6). Nükleotid kinaz enziminin katalizlediği ardışık reaksiyonlarla ATP'den elde edilen fosfat grupları UMP'ye aktarılarak sırasıyla UDP ve UTP sentezi gerçekleşir (Şekil-7).



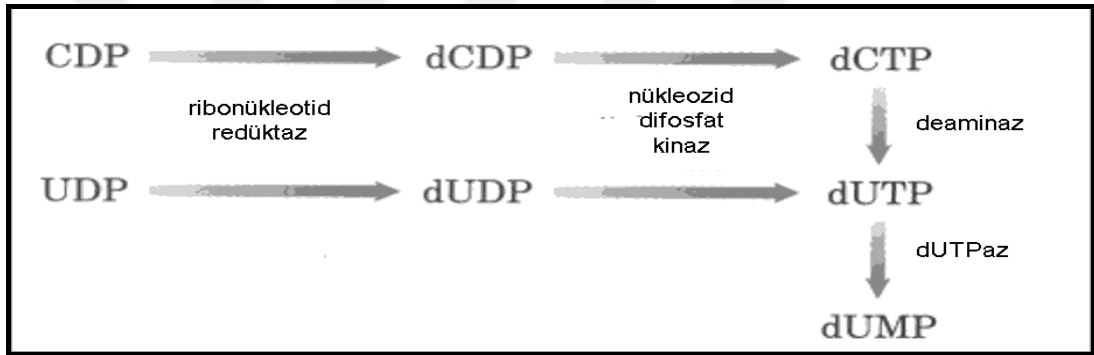
Şekil-7: Pirimidin bileşiklerinin 'de novo sentez yolağı' (Bu şekil Barness, 1995 kaynağından uyarlanmıştır).

Üridin-5'-trifosfat (UTP) CTP sentaz enziminin katalizlediği bir reaksiyonla sitidin-5'-trifosfat'a (CTP) dönüşür (Şekil-8). Sentez için gereken amin grubu glutaminden elde edilir.



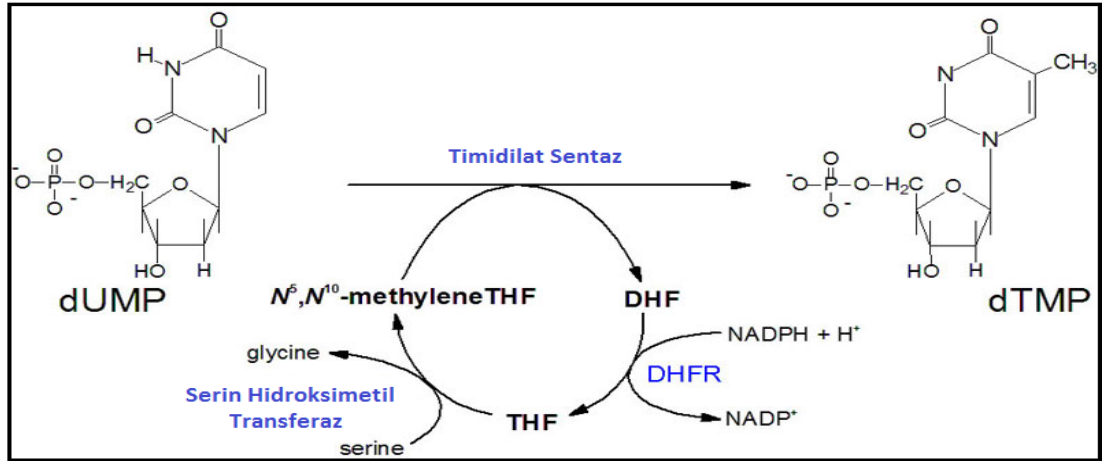
Şekil-8: UTP'den CTP sentezi.

Timin nükleotidleri DNA'nın yapısına katıldıklarından dolayı deoksi formunda sentezlenir. İlk olarak UDP ya da Sitidin difosfat'tan (CDP) dUMP sentezlenir (Şekil-9).



Şekil-9: dUMP sentezi.

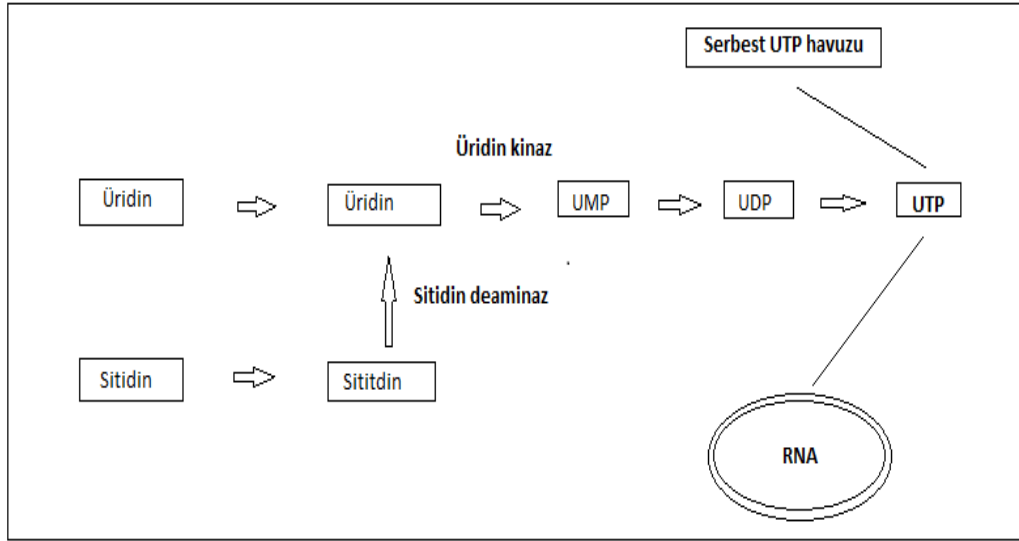
Timidilat sentaz enzimiyle katalizlenen bir reaksiyon dUMP'yi dTMP'ye dönüştürür. Sentez için gereken metil grubu (-CH₃), N5, N10-metilen tetrahidrofolat'tan sağlanır (Şekil-10).



Şekil-10: dUMP'den dTMP sentezi.

2.2.2 Kurtarma Yolağı

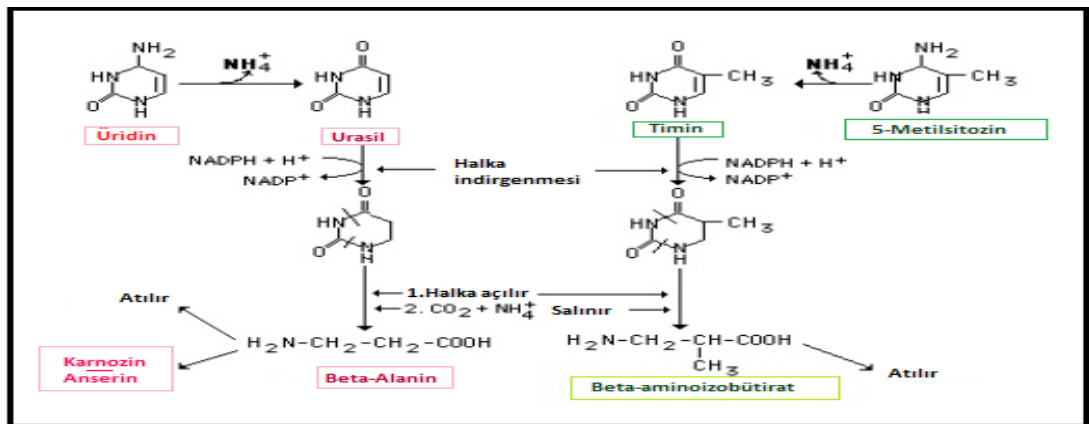
Pirimidin biyosentezinin kurtarma yolağı, DNA ve RNA yıkılması sırasında açığa çıkan baz ve nükleozitlerin geri kazanılmasını sağlar ve hücre içi nükleotid havuzlarını yerine koymanın daha az enerji harcanarak yapılan yoludur (Şekil-11). Üridin, sitidin ve timidin nükleozidlerinin kandan dokulara alınması ve nükleotidlerin bu nükleozidlerden dokuda sentezlenmesini içerir. Bu yolak, merkezi sinir sistemi gibi *de novo sentezinin* kısıtlı olduğu, buna karşın nükleotid ihtiyacının çok fazla olduğu dokularda çok önemlidir (Geiger ve Yamasaki, 1956). Üridin, insanlarda dolaşımdaki başlıca pirimindir ve plazma konsantrasyonları 3-5 μM civarındadır (Traut, 1994). Sıçanlarda sitidin'in kandaki seviyeleri üridinden yaklaşık 3 kat daha yüksektir (Cansev, 2006), ancak üridin kan beyin bariyerinden çok daha kolay bir şekilde geçer (Cansev, 2006).



Şekil-11: Pirimidin nükleotidlerin kurtarma yolu (Bu şekil Geiger ve Yamasaki, 1956 kaynağından uyarlanmıştır).

2.3. Üridin'in Parçalanması

Üridin nükleotidleri, 5'-nükleotidaz enzimlerinin katalizlediği reaksiyonla defosforile olarak üridine dönüşürler. Üridin de pirimidin nükleozid fosforilaz enzimi ile riboz-1-fosfat ve serbest pirimidin bazı urasile yıkılır. Aynı zamanda serbest pirimidin bazlarından sitozin, urasile deamine edilir. Urasilin deaminasyonu ve glikozidik bağlarının sonucu kırılması pirimidinlerin son yıkım ürünü olarak (CMP ve UMP'nin parçalanmasından) β -alanin, (dTMP'nin parçalanmasından) β -aminoizobütirat oluşur. β -aminoizobütirat ve β -alanin vücuttan atılır. Ayrıca, β -alanin beyin ve kaslarda bulunan dipeptidler olan karnozin ve anserinin yapılarına katılabilir (Şekil-12).



Şekil-12: Pirimidin bileşiklerinin parçalanması.

2.4. Üridin' in Hücrelere Alınması

Dışarıdan verilen pirimidin nükleotidleri fosfat yapılarını kaybederek üridin ve sitidin formunda kana geçerler (Wurtman ve ark., 2000) ve taşıyıcı protein ailesi olan ‘‘Konsantre Edici Nükleozid Taşıyıcısı’’ (Concentrative Nucleoside Transporter, CNT)’’ (Gray ve ark., 2004) ve ‘‘Dengeleyici Nükleozid Taşıyıcısı’’ (Equilibrative Nucleoside Transporter; ENT) (Baldwin ve ark., 2004) aracılığıyla hücre içine alınırlar. Sodyum-bağımlı yüksek afiniteli taşımadan CNT ailesi sorumlu iken, sodyum-bağımsız düşük afiniteli taşımadan ENT ailesi sorumludur. ENT aracılı nükleozid taşınması, her iki yönde plazma membrandan geçen nükleozid konsantrasyonuna bağlı iken, CNT aracılı nükleozid taşınması nükleozid konsantrasyon gradiyentine bakılmaksızın iki yönde de gerçekleşir (Griffith ve Jarvis, 2006).

CNT ve ENT aileleri farklı kromozomlarda kodlanan birden fazla alt tiplere sahiptir. Eritrosit, karaciğer, kalp, dalak, böbrek, akciğer, iskelet kası, kolon, plasenta, pankreas, ince bağırsak ve rektum gibi dokularda geniş dağılım gösterirler (Griffith ve Jarvis, 2006). Üridinin beyin hücrelerine alınması için sırasıyla kan-beyin bariyeri üzerindeki taşıyıcılarla beyin ekstraselüler sıvısına ve hücre zarında bulunan taşıyıcılar aracılığıyla hücre içine alınması gerekir. Hem CNT hemde ENT ailesinin üyeleri kan beyin bariyeri ve hücre zarında bulunmaktadır (Cansev, 2006).

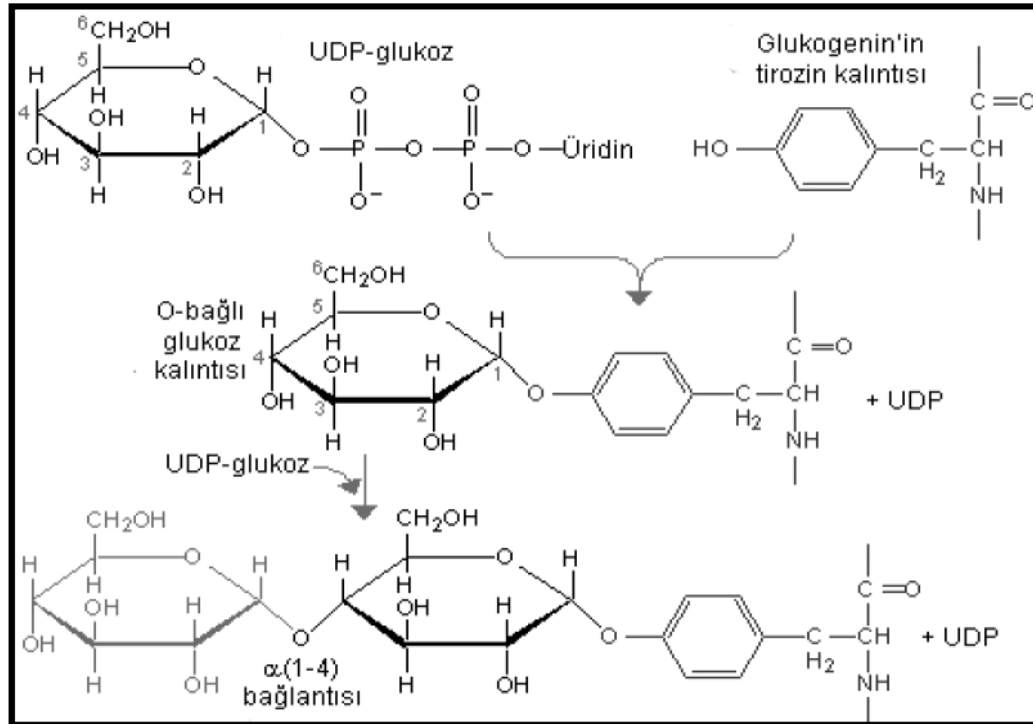
2.5. Üridinin Katıldığı Biyokimyasal İşlevler

DNA ve RNA'nın yapısında bulunmasının yanı sıra üridin nükleotidleri hücrenin büyümesi, proliferasyonu, farklılaşmasını kontrol eden biyokimyasal yollarda, glikojen sentezi, protein ve lipid glikolizasyonu, RNA sentezi ve fosfolipid sentezinde etken rol sahibidir.

2.5.1. Glikojen Sentezi

Glikojen vücudun temel glikoz depo formunu oluşturur. Polisakkarit yapıda olup başlıca karaciğer ve kaslarda sentezlenir. Ayrıca, beyin ve uterus gibi dokularda da sentezlenmektedir. Glikojen molekülünün zincir uzaması her basamakta üridin pirimidin şekeri olan UDP-glukozdan gelen bir glukoz molekülünün eklenmesiyle gerçekleşir ve reaksiyon sonucunda bir UDP molekülü serbest kalır (Haugaard ve

ark., 1977). Glikojen sentaz enziminin aktivitesi ve protein düzeyleri glukoz ve UTP varlığına bağlı olarak hücre içi UDP-glukoz seviyeleri tarafından düzenlenir. UTP konsantrasyonlarının hücre içinde azalması glikojen sentezinde de azalmaya neden olur ve kültür sıvısına üridin eklenmesiyle bu durum düzeltilebilir (Haugaard ve ark., 1977). Glukoz yoksunluğunda hücre içi UDP-glukoz depolarının boşalmasına neden olur. Bunun sonucunda glikojen sentaz aktivitesini inhibe ederek glikojen sentaz RNA'sını ve protein seviyelerini azaltır (Higuita ve ark., 2004).



Şekil-13: Glikojen Sentezi.

2.5.2. Protein ve Lipid Glikolizasyonu

Bir proteinin basit ya da kompleks bir şeker ile bağlanması golgi cisimciğinin lümeninde gerçekleşir (Sprong H ve ark., 2003). Glikoprotein yapısında temel olarak galaktoz, mannoz, fukoz, N-asetil glukozamin ve N-asetik galaktozamin bulunur. Glukoz glikoproteinlerin yapım aşamasında bol miktarda bulunur, ancak protein olgunlaşmasını takiben neredeyse tamamen çıkarılır. Şekerler kovalent olarak hem asparajine (N-glikoprotein) hem de serin, hidroksilizine (O-glikoprotein) bağlanırlar. (Hebert DN, Garman SC, Molinari M, 2005). Proteinlerdeki karbonhidrat

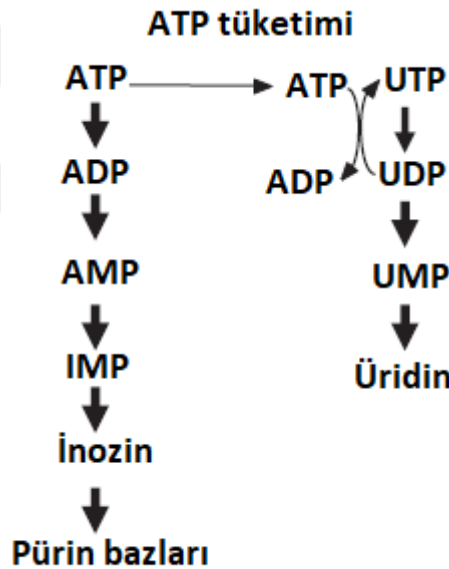
modifikasyonları çeşitli hücrel süreçlerde temel rol oynar. Örneğin, plazma zarının dış tabakasında glikoproteinlerin varlığı, oligosakaritlerin hücre dışı ortamda maruz kalmasına izin verir. Bu durum hücre adezyonuna ve hücre-hücre iletişimine katkıda bulunur ve lizozomal enzimlerin salgılanmasına neden olur. Oligosakaritlerin biyosentezinde kullanılan öncül maddeler, nükleozid difosfat veya monofosfat şekerlerdir. Fosfat rezidüleri ile karbon atomu arasındaki ester bağı yüksek enerjili bir bağıdır. Yapılan çalışmalarda, yeni sentezlenen proteinlerin doğru katlanması ve olgunlaşmasını kontrol etmek için karbonhidrat rezidülerine bağlanması gerektiğini ortaya konmuştur. Glikoprotein sentezi için kullanılan şekerler, esasen UDP nükleotidlerine bağlanarak aktive olmaya ihtiyaç duyar. O-Glikosilasyon, spesifik glikozil transferaz enzimlerinin aktivitesi sayesinde protein zincirine nükleotid bağı şeker eklenmesiyle gerçekleşirken, N-glikozilasyon, dolikol fosfat adı verilen ve nükleotid-bağılı enzimden şeker kalıntılarını alan bir lipid ara maddesinin müdahalesine ihtiyaç duyar; şeker kompleksleri oluşturur ve onları hedef proteine translokasyon yapar (Lecca D ve Ceruti S, 2008). Başka bir önemli glikozile edilmiş bileşik sınıfı, urasil şeker konjüгатları tarafından gönderilen kompleks karbonhidrat parçalarının Golgi'ye eklendiği ve hemen hemen tüm dokularda ekstrasellüler matriks biyosentezine katılan ER içinde sentezlenen bir proteik çekirdeğin oluşturduğu glikozaminoglikanlar ile temsil edilir (Aebi M ve Hennet T, 2001). Sadece proteinler değil aynı zamanda lipidler (seramidler gibi) de ER lümeninde glukozile ve galaktozile edilebilir. Seramid galaktoziltransferaz (GaIT-1) enzimi aracılık ettiği UDP-galaktoz ile galaktozile edilen seramidler: miyelin hücreleri, spermatogonya ve bazı epitel hücreleri gibi yüksek oranda ihtisaslaşmış hücrelerde eksprese edilir. UDP-galaktoz taşıyıcı, GaIT-1 enzimi ile fiziksel olarak etkileşime girer, böylece galaktozilasyon reaksiyonu için sürekli bir substrat tedarikine izin verir.

2.5.3 RNA Sentezi

RNA sentezi genelde DNA'yı bir şablon olarak kullanarak, RNA polimeraz enzimi tarafından katalizlenir. Bir hücrenin genetik talimatlarının gerekli bir bölümünü okurken ilk adımını attığı DNA nükleotid dizisinin belirli bir bölümünü (bir gen) bir RNA nükleotid dizisine kopyalamaktır. RNA ve DNA 5'-3, fosfodiester

bağları ile bağlanmış dört farklı tipte nükleotidden oluşan doğrusal polimerlerdir (Bruce Alberts ve ark., 2002). RNA sentezinin hemen öncülleri ATP, GTP, CTP ve UTP'dir. Nükleotid dizilerinde bazı sinyaller bulunur ve bu sinyaller RNA polimerazın nerede ve ne sıklıkla transkripsiyona başlayacağını ve nerede sonlanacağını gösterir.

Üridin-5'-trifosfat (UTP), transkripsiyon sırasında RNA'nın sentezinde, ayrıca metabolik reaksiyonlarda substratların aktivasyonu veya enerjisinin üretilmesinde önemli bir rol oynar. RNA sentezi esnasında ATP, UTP'yi fosfat vericisi olarak kullanır. ATP konsantrasyonundaki bir artış, urasil nükleotid yapımını hızlandırır (üridin → UMP → UDP → UTP) (Şekil-14), bu da plazma üridin konsantrasyonunda azalmaya neden olur (Yamamoto T ve ark., 2011).

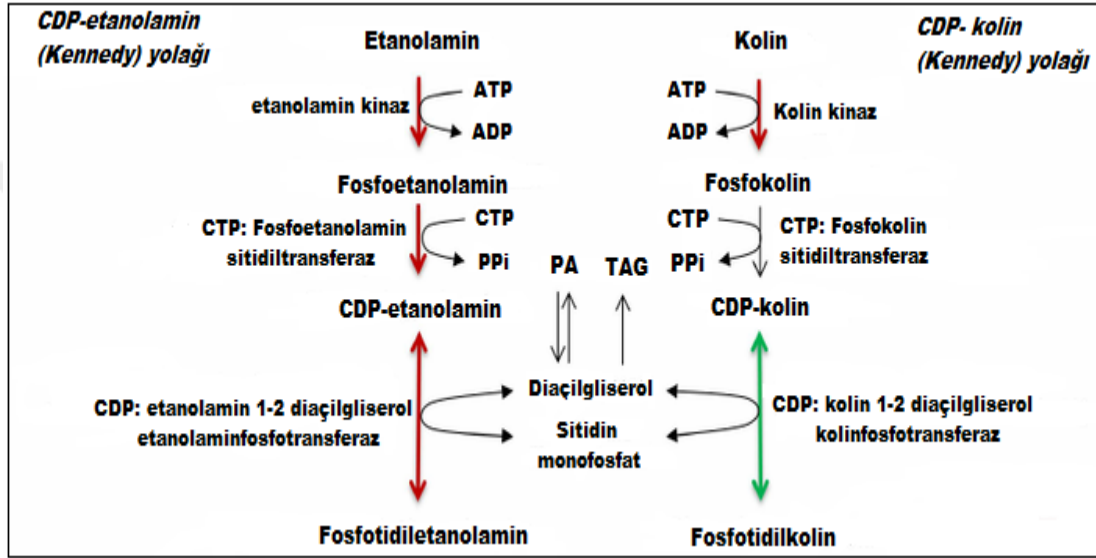


Şekil-14: ATP tüketimine bağlı olarak nükleotit yıkımı (Yamamoto T ve ark., 2011 çalışmasından uyarlanmıştır).

2.5.4. Fosfolipid Sentezi

Hücre membranları esas olarak fosfolipitlerden oluşur. Membran miktarlarını ve bütünlüğünü korumak için temel önem taşımaktadır (Lecca D ve Ceruti S, 2007). Beyindeki en bol fosfolipid olan membran fosfatidilkolin ve fosfatidiletilamin'in biyosentezi, Kennedy yolağı (şekil-15) denilen yöntemle gerçekleşir (Kennedy ve Weiss, 1956). Amin parçasının diaçilgliseril ilave edilmeden önce CDP'ye

bağlanması yoluyla aktive edilmesinin gerekmesi, CDP-kolin ya da CDP-etanolamin ve PPi'nin üretimine yol açar. CDP hücre içi havuzu, sitidinin yeniden fosforilasyonundan veya üridinin metabolizmasından türetilir. Sitidine göre kandan beyne daha etkili bir şekilde taşınması nedeniyle, dolaşımdaki üridin, beyin dokusu için CTP'nin ana kaynağını temsil eder ve sonuç olarak, UTP hücre içi seviyeleri, yeni sentezlenen fosfolipidlerin hücresel mevcudiyetini doğrudan kontrol eder.



Şekil-15: Kennedy yoluyla aracılığı ile fosfatidiletanolamin ve fosfatidilkolin sentezi.

2.6. Pankreatik endokrin hormonları

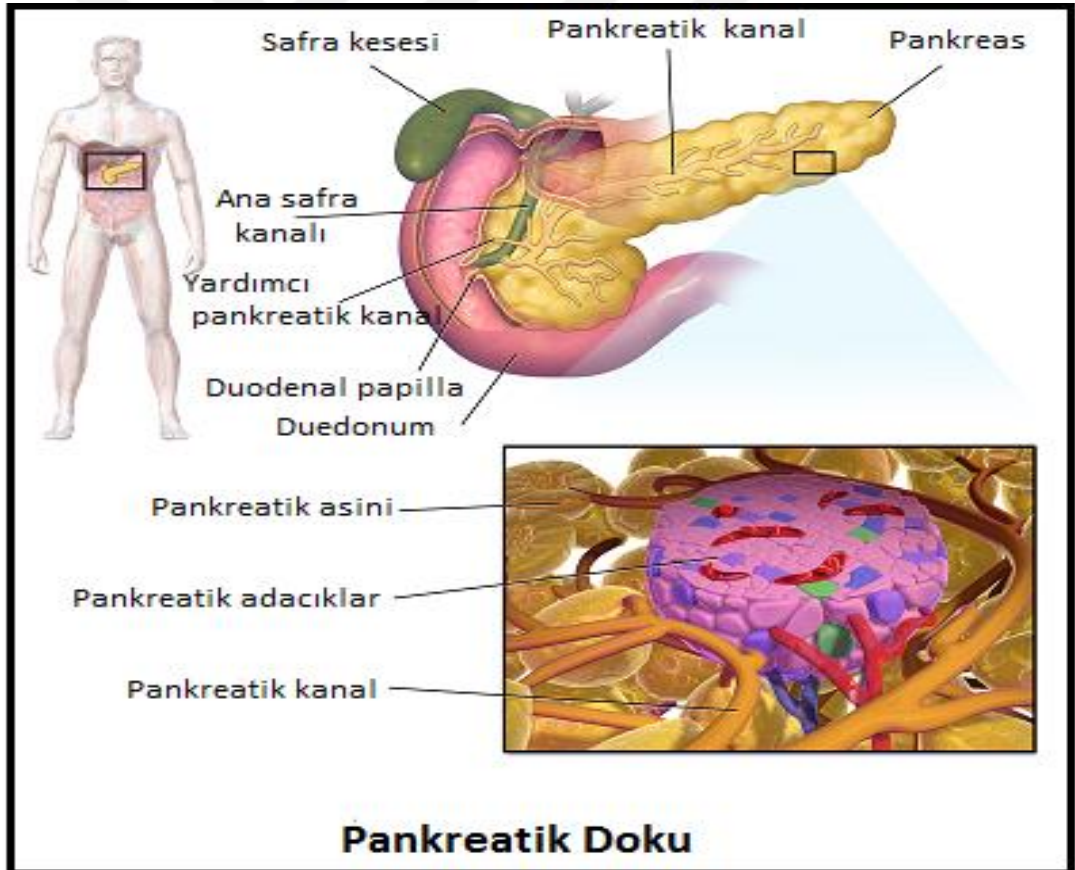
Pankreasın tanımı ve varlığının tespiti günümüzden 3500 yıl öncesine dayanmaktadır (Ricardi, 2003). Ancak 1889 yılında köpeklerde yapılan çalışmalarla pankreasın özelliklerinin incelenmesiyle, metabolik rolü ortaya konulabilmiştir. Pankreasın bütünüyle çıkarılması sonucunda kan glukoz seviyelerinde artış gözlenmiş ve diyabet hastalığının pankreasla ilişkili olabileceği sonucuna varılmıştır (Mering ve Minkowski, 1890).

Pankreas, midenin arka tarafına yerleşmiş, sarı renkte, yumuşak ve nodüler anatomik yapıya sahip bir organdır. Duedonumdan dalağa kadar uzanır. Genel kabul edilen anatomik yapısı baş kısmının duedonum kavisinden başladığı, kuyruk kısmının dalak hilusundan noktalandığı şeklindedir. Başlıca iki tip dokudan oluşur.

Bunlar: Duedonuma sindirim sıvılarını salgılayan asinüsler ve Langerhans adacıkları (şekil-16).

İnsan pankreası, içine hormonların salgılandığı küçük kapiller çevresine organize olmuş her biri yaklaşık 0.3 milimetre çapında 1-2 milyon Langerhans adacıklarına sahiptir. Bu adacıklar morfolojileri ve boyanma özellikleri ile ayırt edilen başlıca dört farklı tipte hücre içerir. Bunlar alfa, beta, delta ve F hücreleridir ve sırasıyla glukagon, insülin, somatostatin ve pankreatik polipeptid salgırlar.

Langerhans adacıklarında bu hücre tipleri arasında karşılıklı sıkı ilişki, hücrelerin birbirleriyle iletişimine ve bazı hormonların salgılanmasına diğer hormonlar tarafından doğrudan denetimine izin verir. Örneğin, insülin glukagonun, amilin insülinin salgılanmasını baskımlarken, somatostatin hem insülinin hem de glukagonun salgılanmalarını baskımlar (Guyton ve John, 2013).



Şekil-16: Pankreasın anatomisi.

Pankreasın yaklaşık %5'i endokrin hücrelerden oluşur. Endokrin hücreler, pankreasın minimal bir bölümünü oluşturmasına rağmen kan glukoz düzeyini kontrol altında tutan hormonları salgılayarak hayati bir önem taşırlar (Edlund, 2001).

2.6.1. Glukagon

Glukagon, pankreasta Langerhans adacıklarının alfa hücrelerinden sentezlenir. Kan glukoz seviyelerinde azalmasına yanıt olarak salınır ve insülin ile birlikte kan şekerini düzenler. Glukagonun primer hedefi karaciğerdir ve öncül etkisi karaciğerde c-AMP seviyelerinde artışa neden olmaktadır. Karaciğerde glikolizi inhibe ederken, glikojenolizi ve glukoneogenezisi teşvik etmektedir.

Glukagon büyük bir polipeptittir. Molekül ağırlığı 3485 olup 29 aminoasitlik bir zincirden oluşur. Glukagon sekresyonu; hem α adacıkları hem de sinir sistemi intra adacıklardan belirli aralıklarla salınan dış habercilerin hücre-içi oluşturdukları metabolik sinyallerle düzenlenir.

Glukagon; karaciğer hepatosit proliferasyonunu, enterohepatik dolaşımı ve *de novo* pürin-pirimidin sentezlerini artırır (Sand ve ark., 1992; Boer ve ark., 1991). Na^+ -bağımlı transportlar ile üridin alınımını, hem kısa süreli mekanizmayla membran hiperpolarizasyonunu, hem de uzun süreli mekanizmaları ile *de novo* sentezi taşıyıcı proteinlerin oluşumunu sitümüle ederek arttırdığı gösterilmiştir (Hawkins ve ark., 1997). İnsanlarda, glukagonun plazma üridin konsantrasyonu üzerindeki etkileri incelenmiş ve glukagon infüzyonunun idrar atılımını etkilemeden plazma üridin konsantrasyonunu azalttığı bulunmuştur (Yamamoto ve ark., 1998). Von Gierke hastalığında görüldüğü gibi glukagon, anaerobic glikolizin indüklediği ATP kullanımını ve plazma üridin konsantrasyonunu etkileyebilir (Cohen ve ark., 1985). Ancak, hipoksantin ve ksantin gibi oksipurinlerin idrardan atılımı ve plazma konsantrasyonu purin yıkımını etkilerken glukagonunun purin yıkımına önemli bir etkisi yoktur. Dolayısıyla, üridinin glukagonla indüklenen plazma konsantrasyonundaki azalma, üridinin kandan sodyum bağımlı nükleosid transport yolağı aracılığıyla hücrelere alınımındaki artıştan kaynaklanmaktadır.

2.6.2. Somatostatin

Somatostatin, bazı pankreatik ve gastrointestinal hormonların aktivitesini inhibe eden polipeptitten biridir. 14 amino asitten, diğeri de 28 amino asitten oluşmuş iki formda bulunur.

Başlangıçta büyüme hormonu salınımını inhibe eden peptit olarak düşünülmüştür (Reichlin S, 1987). Hipotalamik bir doku ekstraktının hipofiz bezinden büyüme hormonunun salınmasını engellediği için “vücut durgunluğu” anlamına gelen somatostatin olarak isimlendirilmiştir. Bu vücut durgunluğunu ifade ediyordu. Somatostatin daha sonra merkezi sinir sistemi boyunca geniş çapta dağılmış ve diğer dokularda görülmüştür.

Büyüme ve tiroid uyarıcı hormonun pituiter sekresyonu üzerinde çok iyi bilinen etkileri ile birlikte dolaşım, sinir sistemi ve pankreas fonksiyonlarında parakrin faktör olarak çok yönlü katkısı vardır (Reichlin S, 1987). Somatostatin, çoklu işlevleri, çeşitli sentez ve salım alanları, hızlı inaktivasyonu ve periferik kandaki aşırı düşük somatostatin seviyeleri göz önüne alındığında, hedefine genel sirkülasyon yoluyla ulaşılan bir hormondur. Nöronlardan salınan somatostatin, bir hipofizotropik hormon ve bir nörotransmitter veya nöromodülatör gibi davranır. Dahası, somatostatin hücre içi boşluğa salınarak parakrin bir şekilde de hareket edebilir. Pankreasda somatostatin, bitişik hücrelerden hem insülin hem de glukagonun salgılanmasını engelleyen Langerhans adacıklarının delta hücreleri tarafından üretilir (Arimura A ve Fishback JB, 1981). İnsülin, glukagon ve somatostatin, sirkülasyona giren ve çıkan besin akışını kontrol etmek üzere çalışırlar. Somatostatin ve glukagon, her biri diğer insülin salgısını etkileyen parakrin ilişkiye sahip gibi görünmektedir ve her ikisi de insülin salınım oranını etkiler.

2.6.3. Pankreatik polipeptit

Pankreatik polipeptit (PP), nöropeptit Y ve nöropeptiti YY’yi de içeren enteropankreatik hormon ailesinde yer alan 36 amino asitli düz zincir bir peptittir (Taylor IL, 1989; Kono T ve ark., 2004). Pankreatik polipeptid, ağırlıklı olarak besin alımına yanıt olarak pankreas başının ventral kısmındaki adacıklardan salgılanır ve

bir yemekten sonra 3 saat boyunca plazmada yüksek seviyelerde kalır (Schwartz ve ark., 1976; Hazelwood, 1993). İlk yapılan klinik ve hayvan çalışmalarında tokluk durumunda ekzokrin ve safra sekresyonunun düzenlenmesinde rol alabileceğini gösterilmiştir (Taylor IL, 1989; Hazelwood RL, 1993; Puntam ve ark.,1989). Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda, hepatik insülin reseptör (IR) gen ekspresyonu ve hepatosit IR kullanılabilirliğinin düzenlenmesi vasıtasıyla karaciğerin insüline duyarlılığını sağlayarak glukoz homeostazında rol aldığı gösterilmiştir (Sun YS ve ark., 1986; Spector ve ark., 1997).

2.6. 4. İnsülin

İnsülin keşfedilen ilk peptid hormondur. B-zincirinin N-terminal fenilalanini tanımlayıp insülinin gerçekten bir protein olduğu ispatlanmadan önce, tüm hormonların küçük moleküller olduğuna inanılırdı (Jensen ve Evans, 1935). İnsülin aminoasit dizisinin aydınlatılmasıyla, disülfid köprüleri ile bağlı iki zincirli heterodimer bir yapıda olduğu bilinmeye başlandı (Sanger F, 1955).

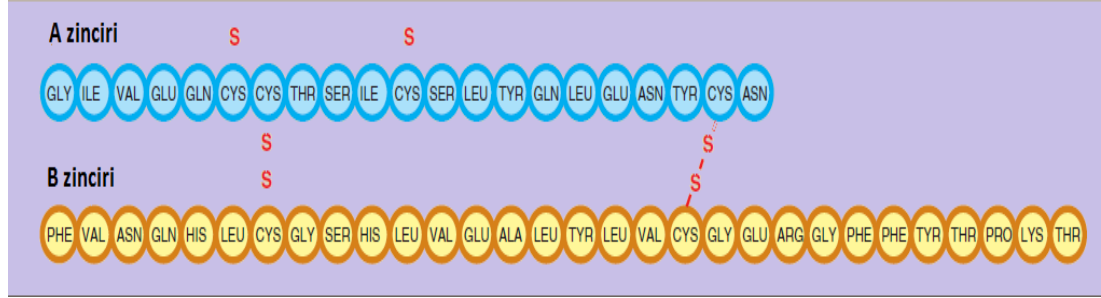
Tüm hücrelerin yaklaşık %60'ını oluşturan beta hücreleri temel olarak adacıkların ortasında yer alır ve insülin yanında insülinle birlikte salgılanan, ancak işlevi tam olarak bilinmeyen amilin hormonu salgılar.

Pankreasın metabolik fonksiyonunun ortaya çıkarılmasından sonra insülin hormonunun kan glukoz düzeylerini kontrol altında tutmak için pankreastan salgılandığı Banting ve Best'in 1922 yılında diyabetik köpeklerde yaptıkları çalışmalarla anlaşılmıştır.

2.6. 4. 1. İnsülin Kimyasal Yapısı

İnsülin küçük bir proteindir; insan insülinin molekül ağırlığı 5808'dir. Pankreasın endokrin bölümüne gömülü ve pankreasın toplam hücrelerinin sadece %1-2'sini oluşturan Langerhans adacıklarının β hücreleri tarafından üretilen bir polipeptid hormondur. İnsülin, iki disülfür köprüsü ile birbirine bağlanan A ve B olarak adlandırılan iki polipeptit zincirinde düzenlenmiş 51 amino asitten oluşur (Şekil-17). Bu iki amino asit zincirinin birbirinden ayrılması durumunda, insülin

molekülünün işlevsel etkinliği de ortadan kalkar. Aynı zamanda A zinciri aminoasit rezidüleri arasında intramoleküler disülfid bağları bulunmaktadır.

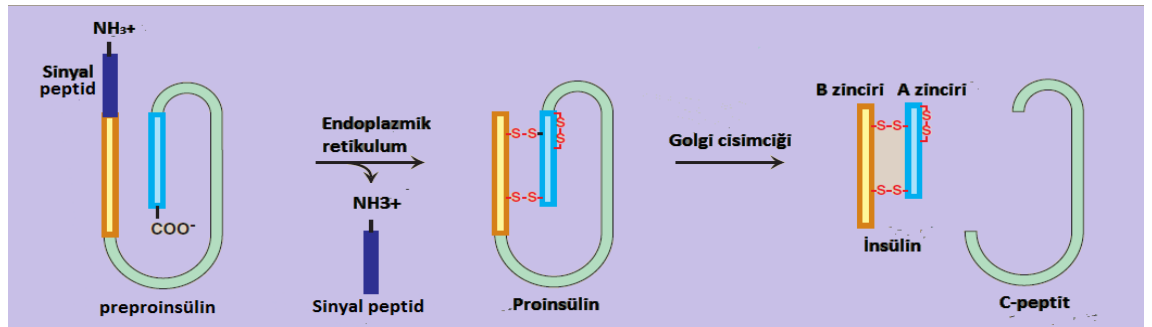


Şekil-17: İnsülin A ve B polipeptit zinciri (Bu şekil Richard ve Denise, 2006 çalışmasından uyarlanmıştır).

İnsülin, karaciğer, kas ve yağ dahil birçok dokunun hücre zarı içindeki belirli, yüksek afiniteye sahip insülin reseptörlerine bağlanır. İnsülin reseptörü α ve β alt birimlerine ayrılmış ve sonradan disülfid bağları ile bağlanmış tetramer yapıda glikolize tekli polipeptit olarak sentezlenir. Bu, sonuç olarak çeşitli biyolojik eylemler dizisine yol açan bir dizi tepkimedeki ilk adımdır.

2. 6. 4. 2. İnsülinin Sentezi ve Pankreas'tan Saliverilmesi

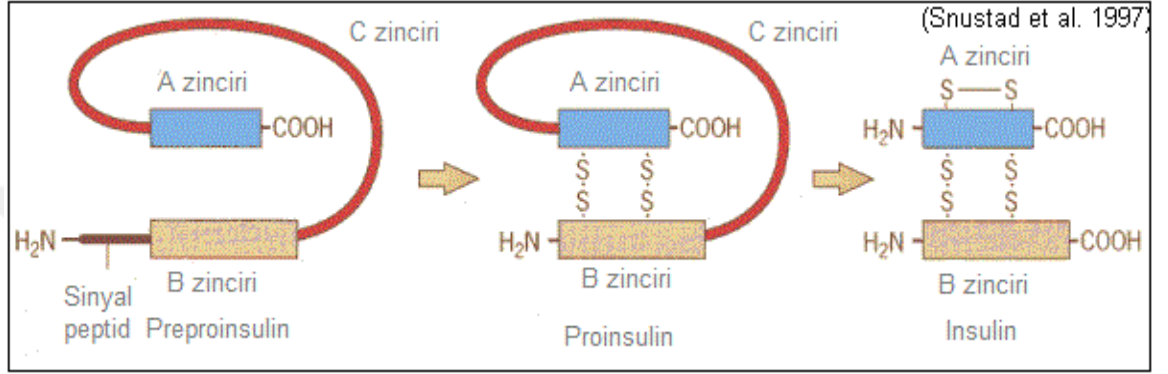
İnsülin sentezi, pankreatik β hücrelerinde endoplazmik retikuluma tutunmuş ribozomların insülin RNA'sını 110 amino asit içeren tek zincirli *preproinsülin* oluşturmak üzere translasyonu ile başlar (Chan ve ark., 1976). Yaklaşık 12.000 Dalton büyüklüğünde bu tek zincirli polipeptid (Şekil-18), amino terminalinde 24 aminoasitli sinyal peptidi ile uzatılmış proinsülinde oluşur (Weiss M ve ark., 2014).



Şekil-18: Preproinsülin'in yapısı (Bu şekil Richard ve Denise, 2006 çalışmasından uyarlanmıştır).

Molekül ağırlığı yaklaşık 11,500 Dalton büyüklüğünde olan preproinsülin, endoplazmik retikulum membranındaki translokasyondan sonra 24 amino asitli N-

terminal-sinyal peptidini kaybederek *proinsülin*'e dönüşür. Proinsülinin büyük bölümü, insülini oluşturmak üzere tekrar kesilir; Golgi aygıtında kıvrılarak disülfid köprüleri ile bağlanır, A ve B zincirleri ve C zinciri peptidi, ya da bağlayıcı peptit (C peptidi) oluşur (Şekil-19). Disülfid bağlarının alkali veya indirgeyici bir madde ile kırılması insülini aktive eder. İnsülin ve C peptidi salgı granülleri içinde paketlenir ve ekimolar miktarında salgılanırlar. Ürünün salgılanan son biçiminin yaklaşık %5-10'u hala proinsülin biçimindedir.



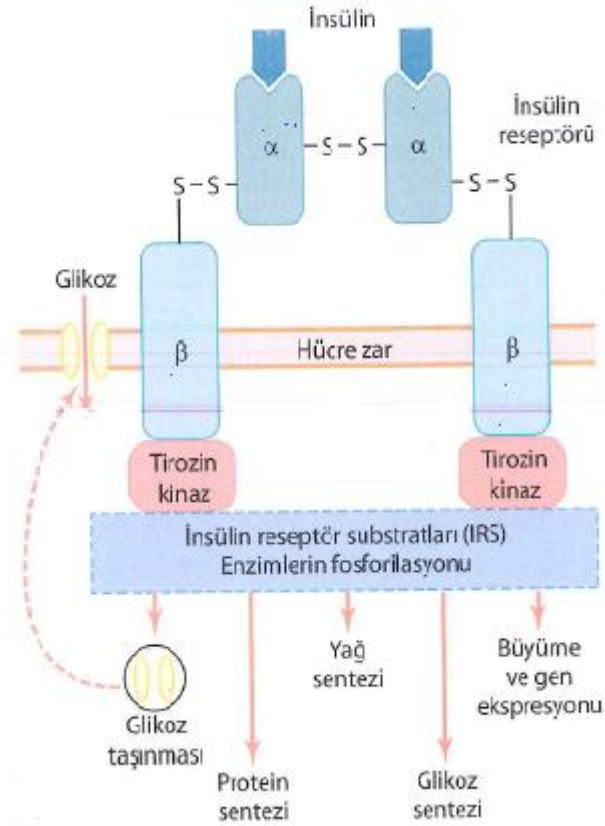
Şekil-19: İnsülin'in yapısı.

Proinsülin ve C peptidin insüline benzer herhangi bir etkisi yoktur. Ancak; C peptit büyük bir olasılıkla G-proteini ile eşleşmiş membran reseptörü olan özel bir yapıya bağlanır ve başta sodyum-potasyum ATPaz ile endotel kaynaklı nitrik oksit sentaz olmak üzere en az iki enzim sisteminin aktive olmasına neden olur. Bu enzimlerin çok sayıda fizyolojik işlevi olmakla beraber, C peptidin bu enzimlerin düzenlenmesi üzerindeki etkileri tam olarak anlaşılmış değildir.

İnsülin kana salgılandığında dolaşımında neredeyse tümüyle serbest formda dolaşır; plazmadaki ortalama yarı ömrü 6 dakika kadar olduğundan, 10-15 dakika içinde plazmadan temizlenir. Hedef hücrelerdeki reseptörlere bağlanmış olan bölümü dışında kalan insülinin tamamı başta karaciğer olmak üzere, azalan oranlarda böbrek, kas ve az miktarda diğer dokularda bulunan *insülinaz* enzimi ile yıkılır (Guyton ve John, 2013).

İnsülinin hedef hücrelerde etkisinin başlayabilmesi için insülinin 300.000 Dalton molekül ağırlığında bir membran proteinine bağlanarak onu aktive etmesi gerekir (Şekil-20). Birbirlerine disülfid köprüleriyle bağlanmış insülin reseptörü 4 alt birimin bir araya gelmesiyle oluşur. Alfa alt birimi hücre zarının dışında yer alırken, beta alt birimi hücre zarını geçerek sitoplazmaya doğru ulaşmaktadır. İnsülin dış kısımda

bulunan alfa alt birimlerine bağlanır. Beta alt birimleri arasında kurulu köprüler vasıtasıyla otofosforilasyona uğrar. Devamında yerel *tirozin kinazı* aktive eder. İnsülin reseptörü, aktivasyonu birden çok post-reseptör sinyal yolunu modüle eden bir reseptör tirozin kinaz süper ailesine aittir. Devamında insülin-reseptör substratlarının da bulunduğu çok sayıda hücre içi enzim fosforilasyonuna neden olur. Sonuçta insülin karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmalarında istenilen etkiyi oluşturmak üzere hücre içi metabolik mekanizmayı yönetir. RNA ve DNA sentezi gibi hücrelerin büyümesi ve farklılaşmasını sağlayan bir dizi hücresel işlemi düzenler.



Şekil-20: İnsülin reseptörlerinin şematik görünümü (Guyton ve John, 2013 çalışmasından uyarlanmıştır).

Hücre membranlarındaki glukoz taşıyıcılarının (GLUT-4) miktarının artışına neden olarak kas ve adipoz dokusuna glukoz alımını artırır. İnsülinin membran reseptörüne bağlanmasını izleyen zaman içinde, çok kısa sürede vücuttaki hücrelerin büyük bir oranında membranlarında glikoza karşı geçirgenlik artar. Bu durum beyindeki nöronların büyük çoğunluğu için geçerli değildir. Hücre içine taşınan glukoz fosforlanır ve karbonhidrat metabolizmasının işlevlerinde kullanılacak bir substrat haline gelir. İnsülin, karaciğerde glikojenoliz ve glikoneogenezis

inhibisyonu yoluyla glukoz üretimini azaltır (Richard H ve Denise F, 2011). Glikojen, triaçilgliserol sentezi gibi anabolik etkileri de vardır (Richard ve Denise, 2011). Glukozun karaciğer, kas ve adipoz dokusunda depolanmasını teşvik ederek karbohidrat metabolizması üzerinde belirgin etkisi vardır. Karaciğer ve kas dokusunda glikojen sentezini artırır. Yağ dokusunda triaçilgliserolü azaltan hormona duyarlı lipazın defosforilasyonu yoluyla aktivitesini inhibe ederek dolaşımdaki serbest yağ asitlerinin seviyesini düşürür. Birçok dokuda hücre içine aminoasit girişini ve protein sentezini stimüle eder.

İnsülin, dokular tarafından yakıtların kullanımını regüle eden en önemli hormondur. Glikojen, triaçilgliserol ve protein sentezini desteklemektedir (Pamela ve ark., 1994). Membran enzimlerini aktive ve inaktive edebilir, birçok protein ve RNA'nın sentez veya yıkım hızını değiştirebilir, hücre büyüme ve farklılaşmasını etkileyebilir (Millar ve Dawnay, 1995).

Bazı durumlarda insülin yeterli miktarda salınmasına rağmen etkili bir şekilde kullanılamaz ve insülin direnci oluşur. Yapılan çalışmalarda; kısa süreli üridin uygulamasının farelerde karaciğer insülin resistansını indüklediği (Yasuyo ve ark., 2014), insanlarda sistemik insülin resistansı ile üridin konsantrasyonu arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (Hawkins ve ark., 1997; Dudzinska ve ark., 2013). Azalmış karaciğer sinyal aktivitesi ve artmış glikonogenezis kan glukoz seviyelerinin artışına açıkça katkıda bulunmaktadır. Ancak, üridinin insülin sinyal aktivitesini nasıl baskıladığı belirsizdir. Olası mekanizmanın protein glikolizasyonu ve fosforilasyonu arasındaki çapraz-etkileşimi ile olduğu düşünülmektedir. Protein glikolizasyonunu teşvik ederek, insülinin regüle ettiği proteinlerin fosforilasyonunu olumsuz etkileyebilir (Hart ve ark., 2011).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Çalışmada Sprague-Dawley türü, 300-350 g canlı ağırlıkta, 5 aylık yaşta, erkek sıçanlar (Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi, Uludağ Üniversitesi, Bursa) kullanıldı. Sıçanlar, çalışmadan on gün önce deney hayvanları merkezinden alınıp, dört tanesi bir kafese konularak bakıldı. Sıçanlar 12 saat aydınlık - 12 saat karanlık (07.00-19.00 arası aydınlık) döngüsü olan ısı kontrollü (22-24° C) odalarda tutulup, yem ve su alımları serbest bırakıldı. Tüm deneyler Amerikan National Institutes of Health (NIH) tarafından yayımlanmış “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” adlı kılavuzun önerileri doğrultusunda yapıldı.

Bu çalışma Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı (Karar tarihi: 04.02.2014, Karar no: 2014-03/04).

3.1.1. Deneyler

Çalışmamızda 3 farklı deney tasarlandı.

Deney I: Bu deneyin amacı açlık ve tokluk koşullarında sıçanların kan dolaşımında bulunan insülin, glukoz ve üridin konsantrasyonlarını tespit etmektir. Bu amaçla iki farklı deney kurgulandı.

Deney IA: Bu deneyde açlık ve tokluk durumlarında sıçanların kan glukoz ve serum üridin düzeylerinin zamana bağlı değişimleri incelendi. Öncesinde femoral arter kateteri yerleştirilen sıçanlar 24 saatlik aç bırakılmayı takiben açlık esnasında bir kere ve 1 saatlik serbest gıda alımını takiben belli zaman aralıklarında femoral artere yerleştirilen kateterden kan örnekleri elde edildi.

Deney IB: Bu deneyde açlık ve tokluk durumlarında sıçanların serum insülin düzeyleri incelendi. Açlık durumu oluşturmak için yirmi dört saat aç bırakılan ve tokluk durumu oluşturmak için gıda alımı 1 saat süreyle serbest bırakılan sıçanların gıda alımının başlamasını takiben iki saat sonra sakrifiye edilmesi suretiyle elde edilen serum örneklerinden insülin düzeyleri ölçüldü.

Deney II: İnsülin'in subkutan yolla farklı dozlarda (0.1 U, 0.5 U ve 1 U) enjeksiyonu sonrası kan glukoz, serum üridin ve insülin düzeylerinin zamana bağlı değişimleri incelendi. İnsülin enjeksiyonunu takiben farklı zaman aralıklarında femoral artere yerleştirilen kateterden kan örnekleri toplandı.

Deney III: Serum üridin düzeylerindeki değişimlerin glukozun hücre içine girişine bağlı olup olmadığı hiperinsülinemik-öglisemik klemp yöntemi uygulanarak toplanan kan örneklerinin analizi ile değerlendirildi.

3.2. Cerrahi ve Deneysel İşlemler

Sıçanlar inhalasyon anestezisi altında opere edildi. Sevofluran anestezik olarak kullanıldı. İndüksiyon sevofluran (%4, %100 O₂) ile ve idamesi %2 sevofluranla gerçekleştirildi. Anestezi altında sol femoral ven (ilaç enjeksiyonu için) ve sol femoral arter (kan örneği toplamak için) içleri heparinli tuzlu su (100 IU/ml) dolu olan PE50 kateter ile kanülasyonu yapıldı. Bütün işlemler aseptik teknikler sağlanarak yapıldı. Cerrahi ekipmanlar, deney tüpleri ve heparinize serum fizyolojik %70 etil alkol ile dezenfekte edildi.

3.2.1. Arteria Femoralis ve Vena Femoralis'e Kateter Yerleştirilmesi:

Anestezi altındaki sıçanlarda sol femoral arter ve femoral vene içleri heparinli tuzlu su (100 IU/ml) ile doldurulan polietilen kateter (PE50) yerleştirildi. Bu amaçla, cerrahi yapılacak bölge uygun dezenfektanlar ile temizlendikten sonra tüyler bir alet yardımıyla uzaklaştırıldı ve sonrasında deriye yaklaşık 1 cm'lik bir insizyon yapıldı. Bacak kasları arasında bulunan sol a. femoralis ve v. femoralis dikkatlice çevre dokulardan ve damar ile birlikte seyreden nervus femoralis'den izole edilerek serbestleştirildi. Damarlar cerrahi ipler aracılığıyla mikro disseksiyon forsepsi kullanılarak askıya alındı ve kan akımı durduruldu. Askıdaki damarlara, üst bölgesinden 45 derece olacak şekilde kateterin girebileceği kesi yapıldıktan sonra, kateterler bu kesiden kalp yönüne (arter için) ve bacağı (ven için) doğru damar içine yerleştirildi ve ipler ile damar üzerinden sabitlendi. Kateter karın derisine sabitlendi. Daha sonra her iki kateterde sıçanların cilt altından itilerek sırtından çıkartıldı. Cerrahinin yapıldığı bölge 3/0 ipek sütür ile kapatıldı. Cerrahi sonrası açıklığı kontrol etmek ve pıhtılaşmayı önlemek amacıyla 100 U/ml heparinli serum fizyolojik

ile yıkanarak kateter test edildi (Şekil-21). Kafeslere konulmadan önce uyanıklık ve hareket kabiliyetlerini tekrar kazandığı gözlemlendi. Günlük olarak ağrı, enfeksiyon, ağırlık parametreleri ve kateter açıklığı kontrol edildi. Sıçanların iyileşmesi için 3-5 gün beklenildi.



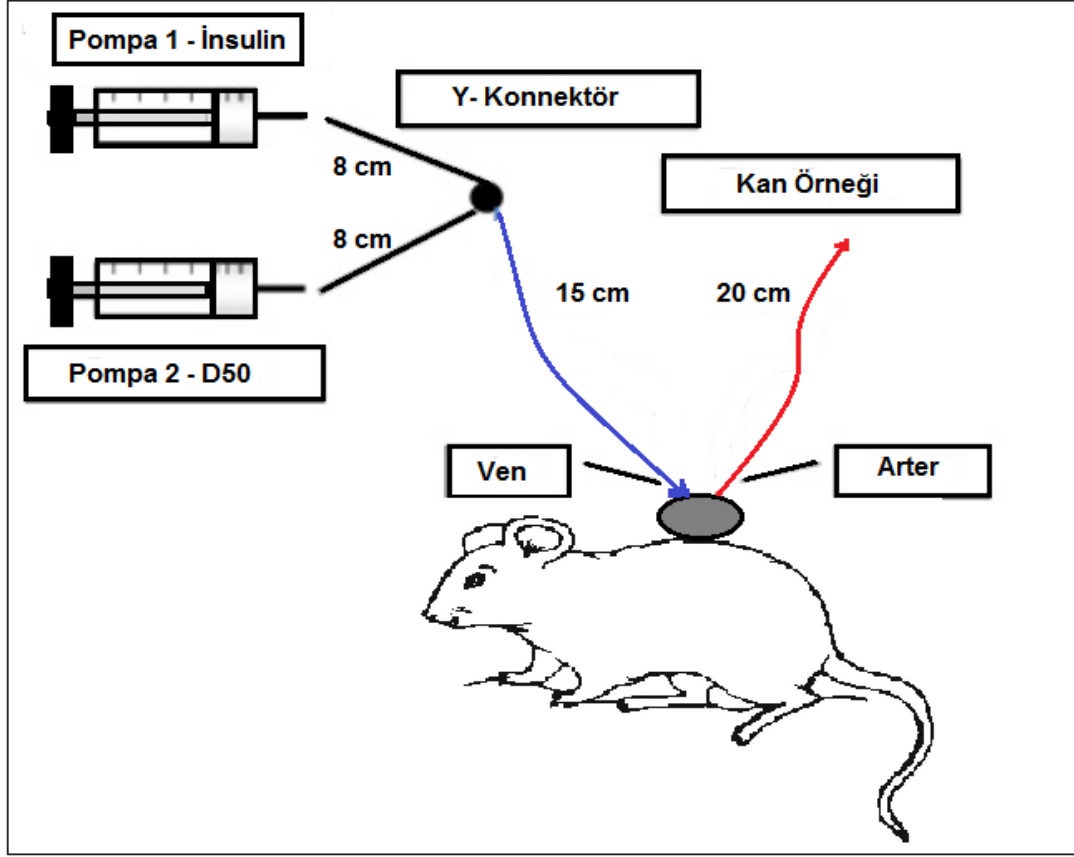
Şekil-21: Femoral arter ve ven kanülasyonu.

3.2.2. Hiperinsülinemik-Öglisemik Klemp

Klemp Modeli Kurulumu ve Hazırlanması :

Post-cerrahi sonrası sıçan ağırlıkları önemli olacağından hiperinsülinemik-öglisemik klemp uygulanacak sıçan ağırlıkları önceden kaydedildi. Deneyde sadece

pre-cerrahi öncesi ağırlıklarını geri kazanmış sıçanlar kullanıldı. Ağırlık ölçümleri aynı zamanda enjekte edilecek insülin ve glukoz oranının belirlenmesi içinde önem taşımaktadır. Sıçanlar yemek sonrası glukoz kaynağını minimize etmek için 5 saat önceden aç bırakıldı. Şekil-22’de görüldüğü gibi infüzyon düzeneği oluşturuldu.



Şekil-22 Hiperinsülinemik-Öglisemik Klemp (Curtis ve ark., 2011 çalışmasından uyarlanmıştır).

PE50 bağlantı kanülünün uzunluğu infüzyon pompası ile Y konnektör arasında 8 cm, Y konnektör ile sıçan arasında venül hat 15 cm, arter hat 20 cm olacak şekilde ayarlandı. İnfüzyon öncesi olası inme'nin önlenmesi için pıhtı yada hava kabarcığının olmamasına dikkat edildi.

Fizyolojik Hiperinsülinemik-Öglisemik Şartların Oluşturulması :

İnsülin (Sigma-Aldrich, Insulin human) %3 plazma içeren serum fizyolojik içinde seyreltildi. Enjektör içine alınarak infüzyon pompasındaki yuvasına yerleştirildi ve kanül bağlantısı yapıldı. Aynı şekilde; %50 dekstroz hazırlanarak infüzyona hazır bir şekilde pompadaki yuvasına yerleştirildi. İnfüze edilecek insülin miktarı sıçan ağırlığına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Burada, 4

mU/kg/dakika olacak şekilde 2 µl/dakika hızında tatbik edildi. Uygulanan doz, yüksek fizyolojik dozdur. İnsülin ve %50 dekstroz infüzyonu başladıktan sonra her 5 dakikada bir glukoz değerleri ölçüldü. İstikrarlı glukoz değerleri oluşana kadar glukoz infüzyon hızında değişiklikler yapıldı. Bazal kan glukoz seviyeleri 5.0-5.5 mM aralığında olmalıdır. Bu süreç, deneysel protokole, sıçan türüne ve deney koşullarına bağlı olarak 30 dakika ile 120 dakika arasında zaman almaktadır. İstikrarlı kan glukoz seviyeleri oluşturulduktan sonra 15 dakikalık aralıklarla 180 dakika boyunca kan örnekleri toplandı. Kan örneği alındıktan sonra pıhtılaşmayı önlemek için arteryal hat 10 U/ml heparinli serum fizyolojik ile küçük volümlerde yıkandı. Deney sonrası sıçanlar dekapite edildi.

Tablo-1: Klemp işlemi süresince beklenen veriler.

Zaman (dakika)

	Zaman	Glukoz (mM)	GIR (ul/dak.)	Zaman Değişikliği (dak.)	
A	0	5	0	-	İnsülin infüzyonu 0. dakikada başlatıldı.
B	5	3	4	6	İnsülin infüzyonunun 5. dakikasında glukoz infüzyonu başlatıldı.
C	10	6.8	2	11	Kan glukoz seviyelerinin yüksek olmasından dolayı glukoz infüzyon oranını düşürüldü.
D	15	4.2	3	16	Kan glukoz seviyelerinin düşük olmasına bağlı glukoz infüzyon oranı artırıldı.
E	20	5.5	2.5	21	Kan glukoz seviyeleri az oranda yüksek olduğundan infüzyon oranı 2.0 ve 3ul/dak. arasında değiştirildi.
F	25	4.8	2.75	26	Kan glukoz seviyeleri az oranda düşük olduğu için infüzyon oranı 2.5 ve 3ul/dak. arasında değiştirildi.

Kısaltmalar: mM: milimolar, GIR: Glikoz infüzyon oranı, dak.: Dakika.

Hematokrit Ölçümü :

Hematokrit değerleri deney boyunca kan volümünden emin olabilmek için ölçüldü. Ölçüm sırasında mikrohematokrit pipetine alınan kan örnekleri santrifüj edildi. Santrifüjden çıkan mikrohematokrit pipeti skala yardımı ile değerlendirildi. Genel olarak, hematokrit seviyeleri başlangıç volümünden %10'dan daha düşük olmaması gerekir.

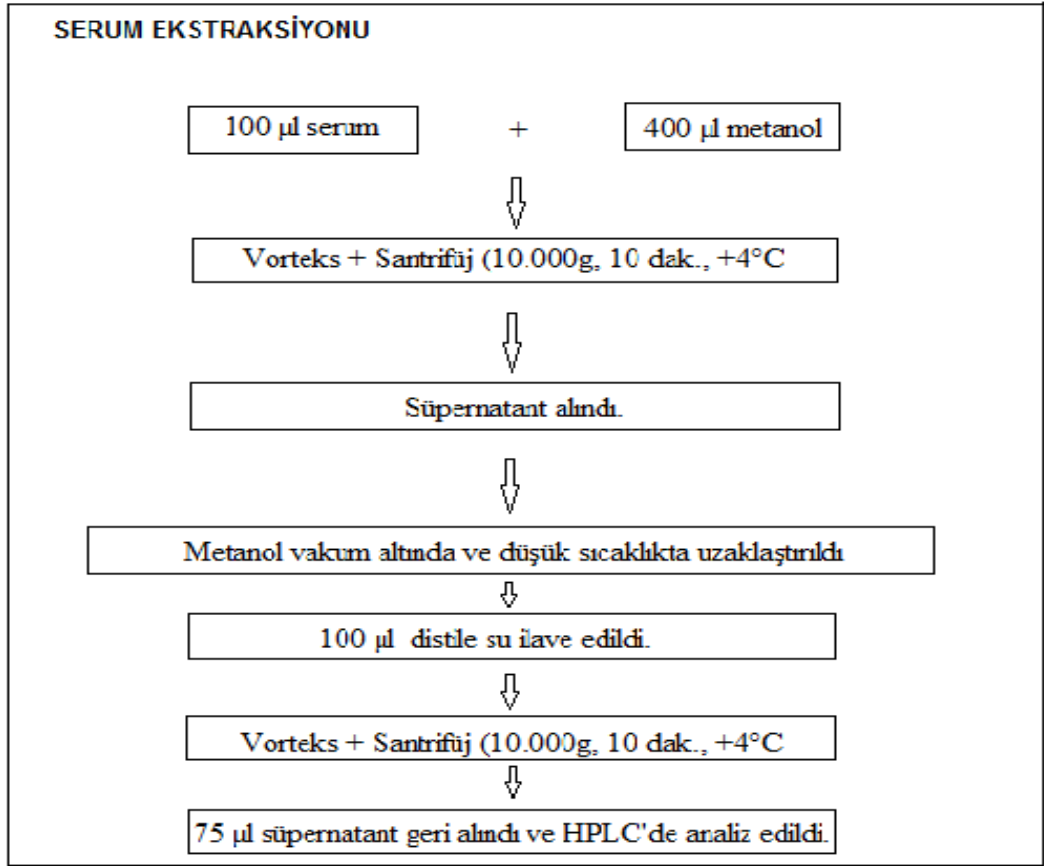
3.3. Serumların Elde Edilmesi

Çalışma gruplarından elde edilen kanlar beklemeden 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı, eppendorf tüplerine konuldu. Analiz edilene kadar -20 °C'de dondurularak saklandı.

3.4. Serum Üridin Konsantrasyonlarının Ölçülmesi

3.4.1. Serum Ekstraksiyonu

-20 °C'de dondurulmuş haldeki serumlar, oda sıcaklığında bekletilerek çözüldü. Vorteks ile karıştırılmasının ardından, 100 µl serum örneklerinin üzerine 400 µl metanol eklenerek tekrar vortekslendi ve 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Bu örneklerin 400 µl'si geri alınarak ve liyofilizatörde kurutuldu. Kurutulan örnekler 100 µl distile suda çözüldü ve mikrofüjde santrifüj edildikten sonra HPLC'ye enjekte edilerek analiz edildi (Şekil-23).



Şekil-23 Kan Örneklerinden Serum Ekstraksiyonu.

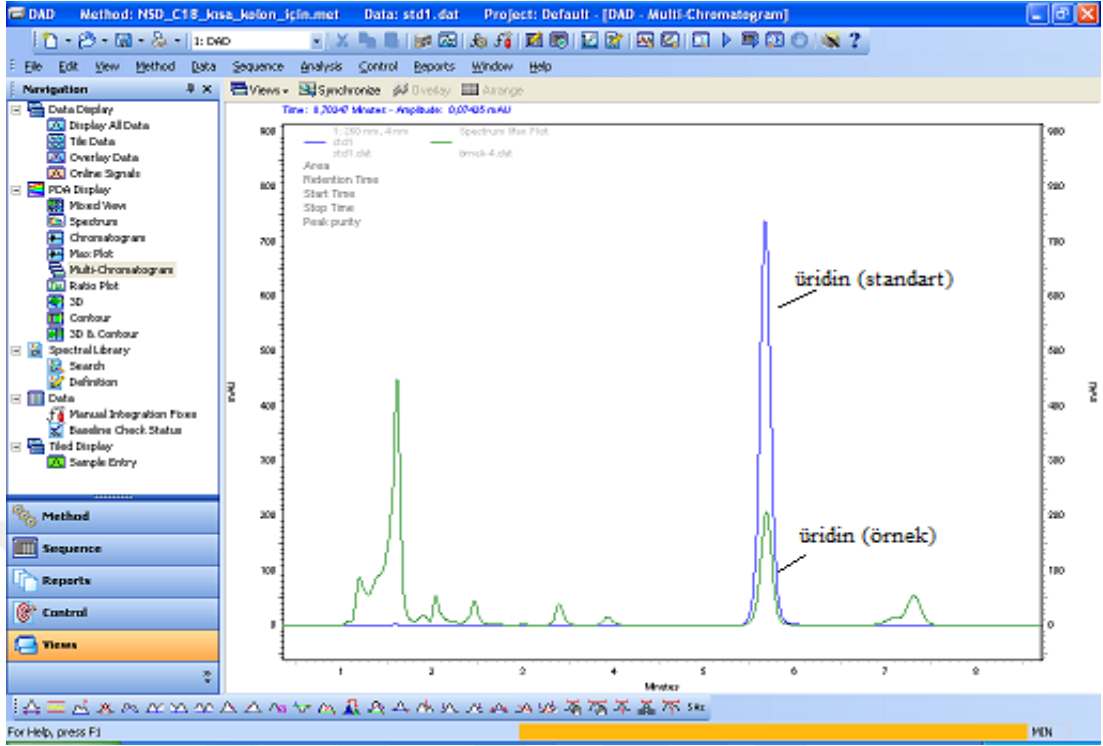
3.4.2. HPLC (High Performance Liquid Chromotography, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) ile Üridin Analizi

Serum üridin analizleri HPLC sistemi (Hitachi, Tokyo, Japonya) kullanılarak yapıldı (Şekil-24). Sistemde diode array dedektör ve koruyucu kolon (Supelco Discovery HS C18 Supelguard, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ve ters faz analitik kolon (Thermo Scientific Hpersil ODS, 5µm, 150mmx4,6mm I.D) kullanıldı. Serum üridin 4 mM'lik K₂HPO₄, pH: 5.5 mobil fazı ile 1 ml/dk akış hızında ayrıştırıldı. Serum örneklerindeki üridin pikleri 260 nm boyunda dedekte edildi. Piklerin analizi standart piklerle eş zamanlı olarak karşılaştırılarak yapıldı.

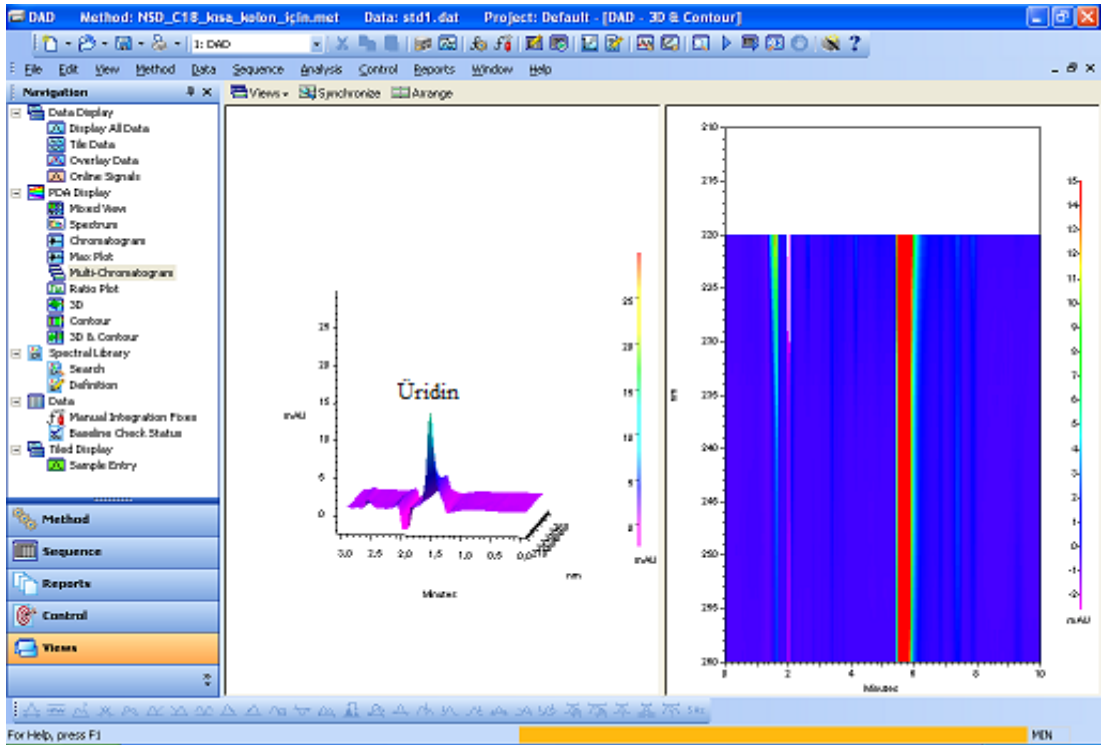


Şekil-24: HPLC Sistemi.

Üridin nükleozidinin kan serum örneğinde tespitine dair örnek kromatogram ve diode array dedektör görüntüsü sırasıyla Şekil 25 ve Şekil 26’de görülmektedir.



Şekil-25: Standart baz alınarak serumda üridin tespitine dair temsili kromatogram.



Şekil-26: Serum örneğinde üridin tespitine dair temsili diode array dedektör görüntüsü.

3.5. Kan Glukoz ve Serum İnsülin Düzeylerinin Ölçülmesi

Kan glukoz düzeylerinin ölçümü için yukarıda belirtilen gruplardan belirtilen zaman aralıklarında toplanan kan örneklerinden önce kan glukoz ölçüm cihazı (Optima, Tayvan) stripine sıçanlardan elde edilen birkaç damla kan örneğinin damlatılmasıyla gerçekleştirildi. Belirtilen tüm zaman aralıklarında ölçümler iki kez yapılarak iki ölçümün ortalaması alındı.

Deneyler sırasında toplanan kan örneklerinde serum insülin düzeylerini ölçmek amacıyla ELISA yöntemi kullanıldı. ELISA yöntemi, özgül antijen-antikor bağlanmasının antikorlara alkalen fosfataz veya horseradish peroksidaz gibi bir enzim bağlanması ve bu enzim substratının renkli ürünlere dönüştürülmesi ve gösterilmesi esasına dayanan immunohistokimyasal ölçüm tekniğidir. ELISA yöntemi ile özgül antikor kullanılarak örnek içindeki antikor miktarı ölçülür. ELISA'nın direkt, indirekt, sandviç ve kompetitif çeşitleri vardır. Çalışmalarımızda sandviç ELISA metodunu uyguladık. Bu yöntemde kuyucukların iç kısmı antikorla kaplanır ve bloklanır. Antijen içeren örnek kuyucuklara pipetlenir. Yıkama ile bağlanamayan antijenler uzaklaştırıldıktan sonra, antijene spesifik olarak bağlanabilen enzimle işaretli antikor eklenir. Yıkama tekrarlanarak bağlanmamış serbest haldeki enzim-antikor konjugatları uzaklaştırılır. Ortama enzim substratı eklenerek meydana gelen renk değişiminin spektrofotometrik ölçümü yapılır.

Çalışmamızda insülin ölçümleri için SunRed Inc. (201-11-0708) firmasından temin ettiğimiz Rat İnsülin ELISA Kit'ini kullandık.

Hayvanlardan dekapitasyon ya da arter kanülü aracılığıyla 250-300 µl kan örneği toplanıp +4 °C'de 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve serumlar ependorflarda ayrı ayrı isimlendirildi ve ölçüm yapılacağı güne kadar -80°C'de muhafaza edildi.

Analiz Prosedürü:

1. – 80 °C'de saklanan serum örnekleri buz içinde yavaş bir şekilde erimesi sağlandı.
2. Eriyen örnekler +4 °C'de 3000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi ve üst kısmı (süpernatanı) alındı.
3. ELISA kiti çalışmadan 30 dakika önce ortam sıcaklığında bekletildi.

4. Her kuyuya 50 µl belirtilen oranlarda dilue edilmiş standard, kontrol ve 40 µl örnek pipetlendi ve üzerine 10 µl antikor (standartlar hariç) ve 50 µl Str-HRP eklendi.
5. Üzeri şeffaf membran ile kapatılarak 60 dakika boyunca 37°C'de inkübe edildi.
6. Her kuyuya 350 µl Yıkama Solüsyonu eklendi ve aspire edildi. Bu işlem 3 kez tekrarlandı. Son yıkamadan sonra kuyucuklarda su kalmaması için plak ters çevirilerek temiz bir peçeteye içinde kalan sıvı aktarıldı.
7. Her kuyuya sırasıyla Chromogen A ve Chromogen B solüsyonları 50 µl pipetlendi, shakerda 37°C'de 10 dakika inkübe edildi.
8. Her kuyuya 50 µl Stop solüsyonu eklendi. Reaksiyon sonrası mavi renk sarıya dönüştü.
9. 10-15 dakika bekleme süresi sonrası optik dansite 420 ve 450 nm'de tayin edildi (BioTek, ELX808'de ölçüm yapıldı).

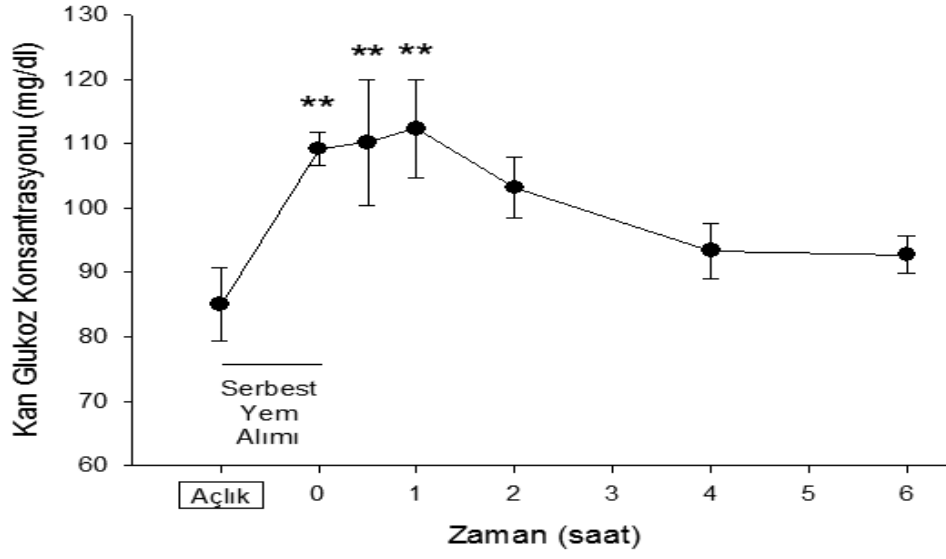
3.6. İstatistiksel Analizler

Çalışmada istatistiksel analizler SigmaPlot® (versiyon 12.0) programı kullanılarak yapıldı. Veriler ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. İkili karşılaştırmalar için Student's t testi kullanıldı. Aynı grupta tekrarlanan ölçümlerin istatistiksel analizi için Tek Yönlü (One-Way) Tekrarlı Ölçümler (Repeated Measures; RM) Değişkenlik Analizi (Analysis of Variance; ANOVA) kullanıldı. Birden fazla dozun ve zaman aralığının bulunduğu çalışmalarda grup içi ve gruplar arası farklılıklar İki Yönlü (Two-Way) RM ANOVA'yı takiben post-hoc Tukey testi ile analiz edildi. Çalışmadaki tüm analizlerde p değerinin 0.05'ten küçük olduğu değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Kan Glukoz ve Serum Üridin Konsantrasyonlarının Açlık Durumunda ve Gıda Alımını Takiben Zamana Bağlı Değişimleri

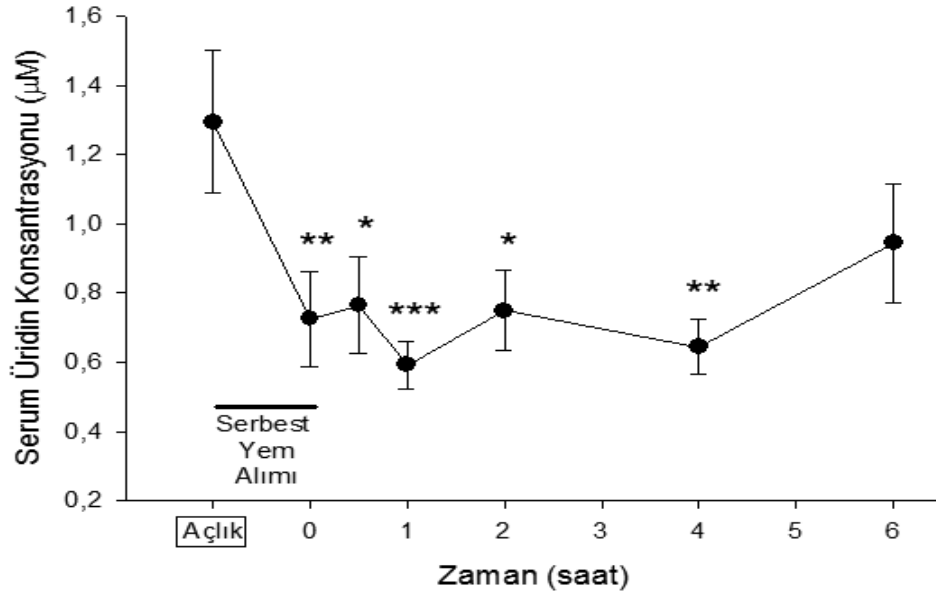
Çalışmamızın Deney IA kısmında açlık durumunda ve serbest gıda alımını takiben oluşturulan tokluk şartlarında kan glukoz ve serum üridin düzeylerinin zamana bağlı değişimlerini gözlemek için sıçanlara (n=13) femoral arter kanülasyonu yapıldı. Açlık düzeylerini belirlemek için 24 saat aç bırakılan sıçanlardan arteryel kanülden strip üzerine birkaç damla veya polipropilen eppendorflar içine 200-250 µl kan örneği alındıktan sonra sıçanların yem tüketimleri serbest bırakıldı. Gıda alımının 1 saat boyunca serbest bırakılmasını takiben 0, 0.5, 1., 2., 4., ve 6. saatlerde strip üzerine damlatılan kan örneklerinden kan glukoz takipleri yapılırken aynı zaman aralıklarında eppendorflar içine toplanan kan örneklerinden serum üridin konsantrasyonları ölçüldü. Açlık durumu oluşturulan sıçanlarda kan glukoz seviyeleri ortalaması $85 \pm 5,7$ mg/dl olarak tespit edildi. Bir saatlik serbest yem tüketiminin ardından kan glukoz seviyeleri 0. dakikadan itibaren anlamlı bir şekilde artış gösterip anlamlılık 1. saate kadar devam etti ve en yüksek değere (112.3 ± 7.6 mg/dl) ulaştı ve takiben zamanla ilişkili şekilde azaldı (Şekil-27).



Şekil-27: Kan Glukoz Seviyelerinin Açlık ve Bunu Takip Eden Tokluk Döneminde Zamana Bağlı Değişimi.

Kan glukoz seviyeleri arteryel kateterizasyonun ardından alınan kan ile ölçüldü. Veriler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir ve bu grupta 6 deney hayvanı sonuçlarının ortalamasıdır. İstatiksel değerlendirme Tek Yönlü RM ANOVA ile yapılmıştır. $**p<0.01$, açlık durumu ile kıyaslandığında anlamlı olarak yüksektir.

Gıda alımı serum üridin konsantrasyonlarını ilk dakikalardan itibaren zamana bağlı olarak anlamlı bir şekilde azalttı. Sıçanların yem tüketimi serbest bırakılmadan önce ortalama serum üridin konsantrasyonları yaklaşık $1.29 \pm 0.2 \mu\text{M}$ seviyelerinde ölçüldü. Serum üridin seviyesindeki azalma 1. saatte maksimum seviyeye ($0.59 \pm 0.07 \mu\text{M}$) ulaştı. Anlamlılık 4. saate kadar devam etti ve daha sonra başlangıç değerlerine yaklaştı (Şekil-28).

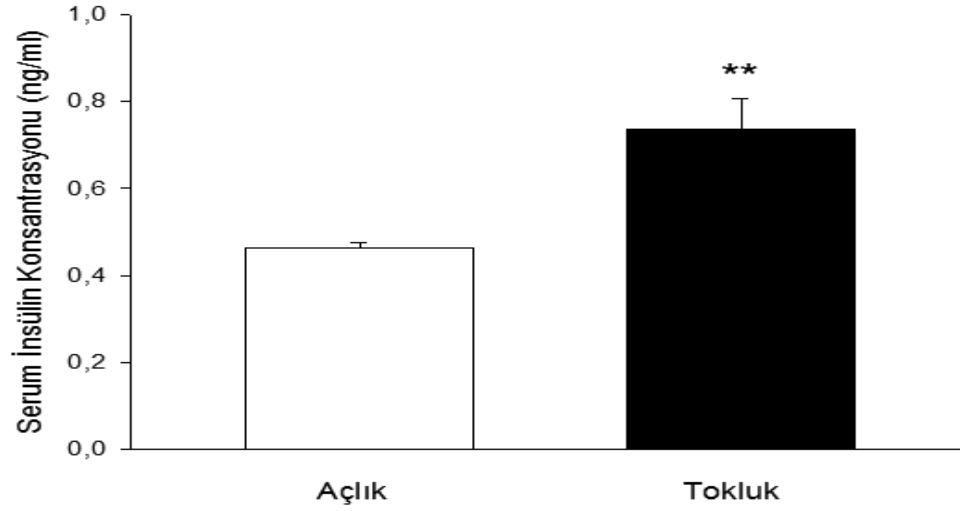


Şekil-28: Açlık ve Tokluk durumlarında serum üridin seviyelerinin zamana bağlı değişimi.

Kan örnekleri arter kanülünden alındı. Santrifüj edildikten sonra serum ekstrakte edildi. Serum üridin seviyeleri HPLC ile ölçüldü. Veriler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir ve bu grupta 6 deney hayvanı sonuçlarının ortalamasıdır. İstatistiksel değerlendirme Tek Yönlü RM ANOVA ile yapılmıştır. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; açlık durumu ile kıyaslandığında anlamlı olarak yüksektir.

4.2. Açlık ve Tokluk Durumlarında Serum İnsülin Konsantrasyonları

Çalışmamızın Deney IB kısmında açlık durumu oluşturmak için 24 saat aç bırakılan sıçanlardan ($n=10$) açlık esnasında ve ayrıca yem alımları 1 saat boyunca serbest bırakılan ($n=10$) sıçanlardan yem alımlarının başlamasından itibaren 2. saatte anestezi altında dekapitasyon yapılmak suretiyle polipropilen eppendorf içine kan örnekleri toplandı. Alınan örnekler $+4$ °C'de 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek, elde edilen serumlarda insülin düzeyleri ölçüldü. Açlık durumunda ortalama serum insülin konsantrasyonu 0.463 ± 0.01 ng/ml iken, tokluk durumunda ortalama 0.737 ± 0.07 ng/ml ölçülerek anlamlı farklılık gösterdi (Şekil-29).



Şekil-29: Açlık ve Tokluk durumlarında kan serum insülin konsantrasyonları.

Kan örnekleri dekapitasyonun hemen ardından alınarak santrifüj edildi ve serum insülin seviyeleri ELISA ile ölçüldü. Veriler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir ve her bir grup 10 deney hayvanı sonuçlarının ortalamasıdır. İstatistiksel değerlendirme Student t-testi ile yapılmıştır. ** $p < 0.01$, açlık durumu ile kıyaslandığında anlamlı olarak yüksektir.

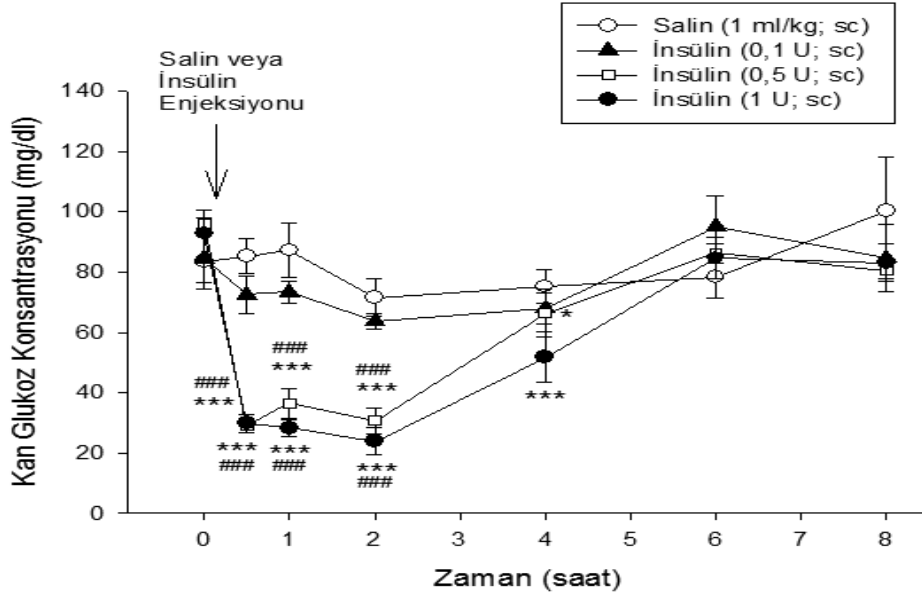
4.3. İnsülinin Subkutan Yolla Farklı Dozlarda Enjeksiyonu Sonrası Kan Glukoz Konsantrasyonlarının Zamana Bağlı Değişimleri

İnsülin uygulaması, subkutan yolla 0.1 U, 0.5 U ve 1 U (1 ml/kg) dozlarında yapıldı ve sonrasında femoral artere yerleştirilen kanülden kan örneği alınarak glukoz konsantrasyonlarının zamana bağlı değişimleri gözlemlendi. Kontrol grubu sıçanlara salin (%0.9 tuzlu su) 1 ml/kg olacak şekilde subkutan yolla uygulandı.

Subkutan yolla 0.1 U insülin uygulaması, kan glukoz değerlerini insülin tedavisi öncesine (0. dakika) veya aynı zaman noktalarındaki salin tedavisine göre anlamlı olarak değiştirmedir.

Ancak subkutan yolla uygulanan 0.5 U ve 1 U insülin tedavisi sıçanlarda glukoz konsantrasyonlarını anlamlı derecede azalttı. Dördüncü saate kadar 40 mg/dl altında kalarak başlangıç değerlerine göre anlamlı düşüşünü sürdüren kan glukoz konsantrasyonları, daha sonra artma eğilimi gösterdi ve deney sonunda başlangıç seviyelerine geri döndü. Aynı gruplar salin enjeksiyonu yapılan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, kan glukoz konsantrasyonlarında 2. saate kadar anlamlı şekilde azalma görüldü. Kan glukozu belirli bir zaman dilimine kadar doğrusal artış gösterdi ve sonunda başlangıç seviyelerine geri döndü (Şekil-30). İki Yönlü RM ANOVA

insülin tedavisinin ($F[3,114]=12.639$; $p<0.001$), zamanın ($F[6,114]=31.624$, $p<0.001$) ve tedavi x zaman etkileşiminin ($F[18,114]=5.382$, $p<0.001$) kan glukoz düzeyleri üzerine anlamlı etkileri olduğunu gösterdi.



Şekil-30: İnsülinin subkutan yolla farklı dozlarda enjeksiyonu sonrası kan glukoz konsantrasyonlarının zamana bağlı değişimleri.

Kan glukoz seviyeleri arteriyel kateterizasyonun ardından alınan kan ile ölçüldü. Veriler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. Gruplar; salin grubu (n=6), 0.1 U insülin grubu (n=6), 0.5 U insülin grubu (n=6), 1 U insülin grubu (n=6) deney hayvanı sonuçlarının ortalamasıdır. İstatiksel değerlendirme İki Yönlü RM ANOVA ile yapılmıştır. * $p<0.05$, *** $p<0.001$; aynı tedavinin 0. dakika değeri ile kıyaslandığında, ### $p<0.001$; aynı noktadaki salin değeri ile kıyaslandığında anlamlı olarak azalmaktadır.

4.4. İnsülinin Subkutan Yolla Farklı Dozlarda Enjeksiyonu Sonrası Serum Üridin Konsantrasyonlarının Zamana Bağlı Değişimleri

İnsülin uygulaması, subkutan yolla 0.1 U, 0.5 U ve 1 U (1 ml/kg) dozlarında, kontrol grubu sıçanlara salin uygulaması (%0.9 tuzlu su) 1 ml/kg olacak şekilde yapıldı ve sonrasında femoral artere yerleştirilen kanülden 0, 0.5, 1., 2., 4., 6. ve 8. saatlerde kan örneği alınarak serum üridin konsantrasyonlarının zamana bağlı değişimleri gözlemlendi.

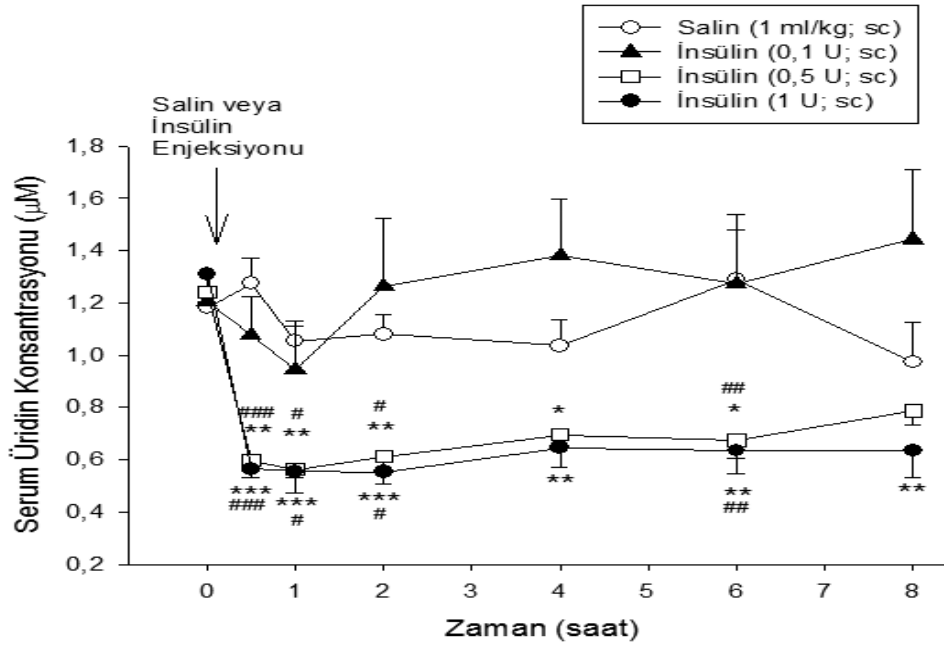
Subkutan yolla 0.1 U insülin uygulaması sonrası serum üridin düzeyleri salin kontrollerine kıyasla anlamlı bir farklılık göstermedi.

Subkutan yolla 0.5 U insülin uygulamasından 1 saat sonra ise başlangıçta $1.24 \pm 0.03 \mu\text{M}$ olarak ölçülen serum üridin konsantrasyonları $0.56 \pm 0.03 \mu\text{M}$ seviyelerine kadar azalarak zamana bağlı ve istatistiksel olarak anlamlı düşüş gösterdi. Bu dozda

insülin tedavisi aynı zaman noktalarındaki kontrol grubu salin değerleriyle kıyaslandığında serum üridin konsantrasyonlarında 4. ve 8. saat haricinde istatistiksel olarak anlamlı azalmaya neden oldu.

Benzer şekilde 1 U subkutan insülin uygulaması da serum üridin konsantrasyonlarını zamana bağlı olarak düşürdü. Bu düşüş başlangıçta 1.31 ± 0.05 μM olarak ölçülen serum üridin konsantrasyonlarını tedaviden 2 saat sonra maksimum olacak şekilde 0.55 ± 0.05 μM seviyelerine kadar tespit edildi. Serum üridin konsantrasyonlarındaki azalma aynı zaman noktalarındaki kontrol grubu salin değerleriyle karşılaştırıldığında 4. ve 8. saat haricinde istatistiksel olarak anlamlı şekilde devam etti (Şekil-31).

İki Yönlü RM ANOVA insülin tedavisinin ($F[3,118]=18.170$; $p<0.001$), zamanın ($F[6,118]=5.758$, $p<0.001$) ve tedavi x zaman etkileşiminin ($F[18,118]=2.103$, $p<0.01$) serum üridin düzeyleri üzerine anlamlı etkileri olduğunu gösterdi.



Şekil-31: İnsülinin subkutan yolla farklı dozlarda enjeksiyonu sonrası serum üridin konsantrasyonlarının zamana bağlı değişimleri.

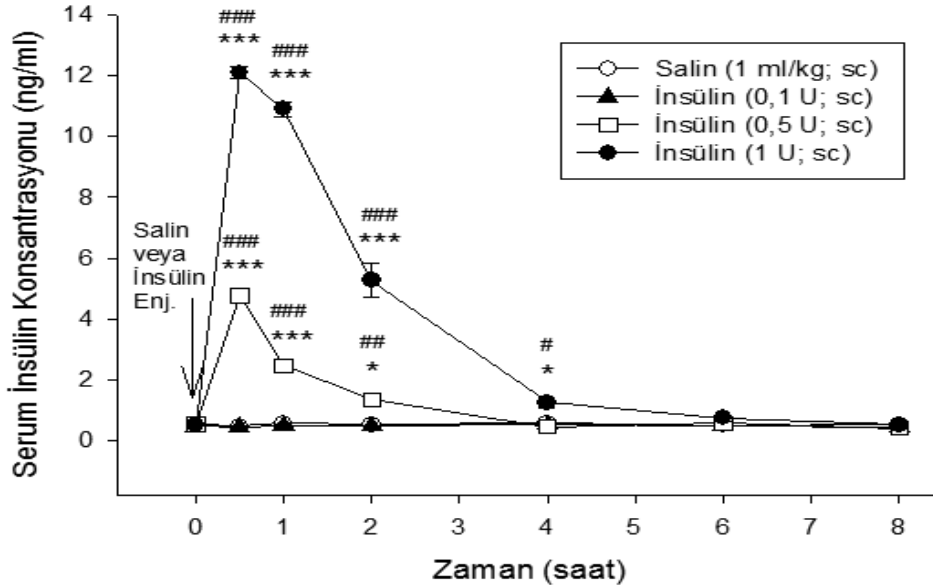
Kan örnekleri artere yerleştirilen kanül aracılığıyla alındı. Santrifüj edildikten sonra serum ekstrakte edildi. Serum üridin seviyeleri HPLC ile ölçüldü. Veriler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. Gruplar; salin grubu (n=6), 0.1 U insülin grubu (n=6), 0.5 U insülin grubu (n=6), 1 U insülin grubu (n=6) deney hayvanı sonuçlarının ortalamasıdır. İstatistiksel değerlendirme İki Yönlü RM ANOVA ile yapılmıştır. * $p<0.05$, *** $p<0.001$; aynı tedavinin 0. dakika değeri ile kıyaslandığında, ### $p<0.001$; aynı noktadaki salin değeri ile kıyaslandığında anlamlı olarak azalmaktadır.

4.5. İnsülin'in Subkutan Yolla Farklı Dozlarda Enjeksiyonu Sonrası Serum İnsülin Konsantrasyonlarının Zamana Bağlı Değişimleri

Subkutan yolla 0.1 U insülin uygulaması, tedavinin başlangıcındaki (0. dakika) veya aynı zaman noktalarındaki salin tedavisi ile kıyaslandığında serum insülin düzeylerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadı.

Buna karşılık, subkutan yolla 0.5 U veya 1 U insülin uygulamasından sonra serum insülin düzeyleri anlamlı ölçüde artış gösterdi. Uygulama öncesi serum insülinin başlangıç düzeyleri 0.5 ng/ml civarında iken, 0.5 U ve 1 U subkutan uygulaması sonrası ilk 30 dakikada maksimum seviyeleri olan sırasıyla 4.76 ± 0.2 ng/ml ($p < 0.001$) ve 12.1 ± 0.2 ng/ml ($p < 0.001$) değerlerine ulaştı. Her iki doz insülin uygulaması sonrası 4. saate kadar anlamlı yüksekliğini sürdüren serum insülin düzeyleri 8. saatin sonunda başlangıç seviyelerine geri döndü (Şekil-32).

İki Yönlü RM ANOVA insülin tedavisinin ($F[3,90]=788.676$; $p < 0.001$), zamanın ($F[6,90]=359.044$, $p < 0.001$) ve tedavi x zaman etkileşiminin ($F[18,90]=226.962$, $p < 0.01$) serum insülin düzeyleri üzerine anlamlı etkileri olduğunu gösterdi.



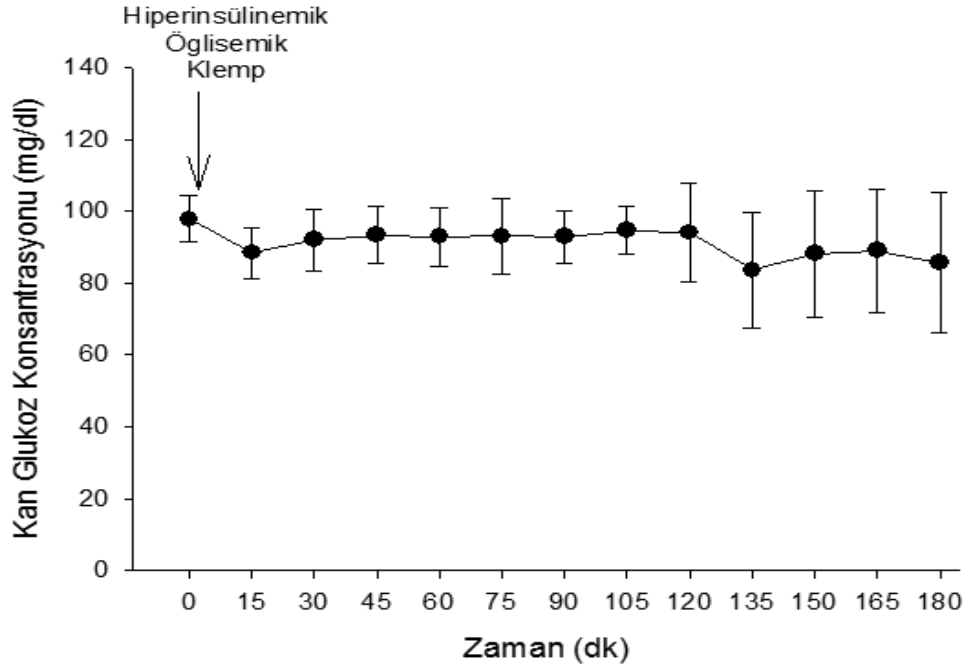
Şekil-32: İnsülinin subkutan yolla farklı dozlarda enjeksiyonu sonrası serum insülin konsantrasyonlarının zamana bağlı değişimleri.

Kan örnekleri artere yerleştirilen kanül aracılığıyla alındı. Santrifüj edildikten sonra serum ekstrakte edildi. Serum insülin seviyeleri ELISA ile ölçüldü. Veriler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. Gruplar; salin grubu (n=5), 0.1 U insülin grubu (n=4), 0.5 U insülin grubu (n=4), 1 U insülin grubu (n=6) deney hayvanı sonuçlarının ortalamasıdır. İstatistiksel değerlendirme İki

Yönlü RM ANOVA ile yapılmıştır. * $p<0.05$, *** $p<0.001$; aynı tedavinin 0. dakika değeri ile kıyaslandığında, ### $p<0.001$; aynı noktadaki salin değeri ile kıyaslandığında anlamlı olarak azalmaktadır.

4.6. Hiperinsülinemik-öglisemik Klemp Yöntemi Uygulanarak Toplanan Kan Örneklerinin Analizi

Serum üridin düzeylerindeki değişimlerin insülin'e bağlı olup olmadığı hiperinsülinemik öglisemik klemp yöntemi uygulanarak toplanan kan örneklerinin analizi ile değerlendirildi. İnfüze edilecek insülin miktarı sıçan ağırlığına bağlı olarak yüksek fizyolojik doz olan 4 mU/kg/dakika olacak şekilde 2 µl/dakika hızında uygulandı. İnsülin ve % 50 dekstrozu infüzyonu başladıktan sonra her 5 dakikada bir glukoz değerleri ölçüldü. İstikrarlı kan glukoz seviyeleri oluşturulduktan sonra 15 dakikalık aralıklarla 180 dakika boyunca kan örnekleri toplandı (Şekil-33).



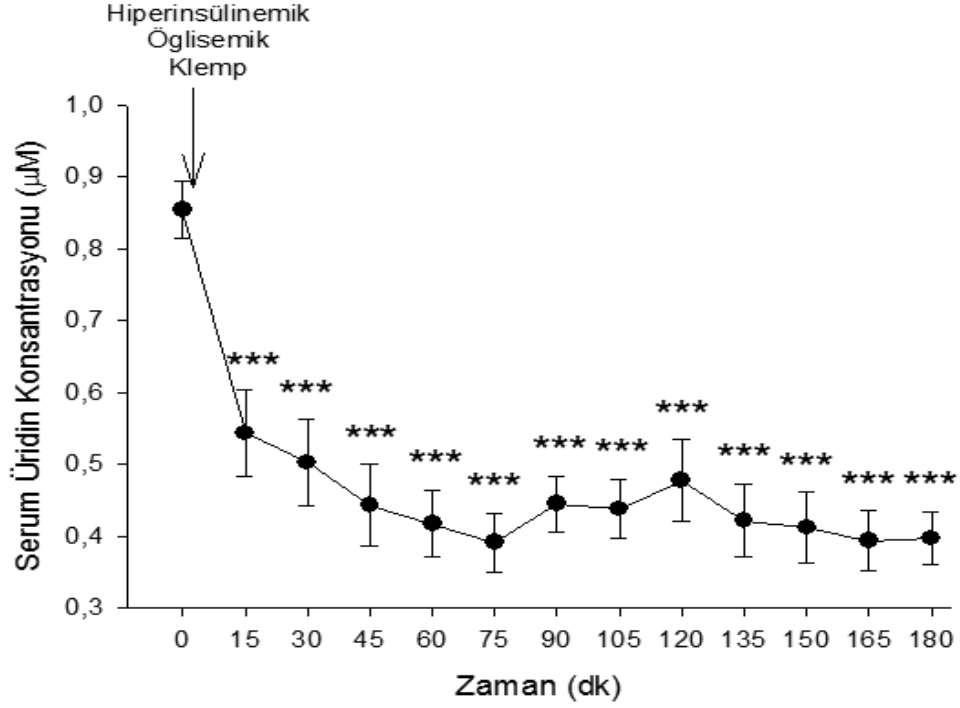
Şekil-33: Hiperinsülinemik-öglisemik klemp yöntemi uygulanarak istikrarlı kan glukoz seviyelerinin oluşturulması.

Kan glukoz seviyeleri arteriyel kateterizasyonun ardından alınan kan ile ölçüldü. Veriler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir ve bu grupta 5 deney hayvanından elde edilen sonuçların ortalamasıdır. İstatiksel değerlendirme Tek Yönlü RM ANOVA ile yapılmıştır. Hiperinsülinemik-öglisemik klemp uygulaması 0. dakika değeri ile kıyaslandığında, kan glukoz konsantrasyonlarında anlamlı farklılık görülmemiştir.

4.7. Hiperinsülinemik-öglisemik Klemp Yöntemi Sonrası Serum Üridin ve İnsülin Konsantrasyonlarının Zaman Bağlı Değişimleri

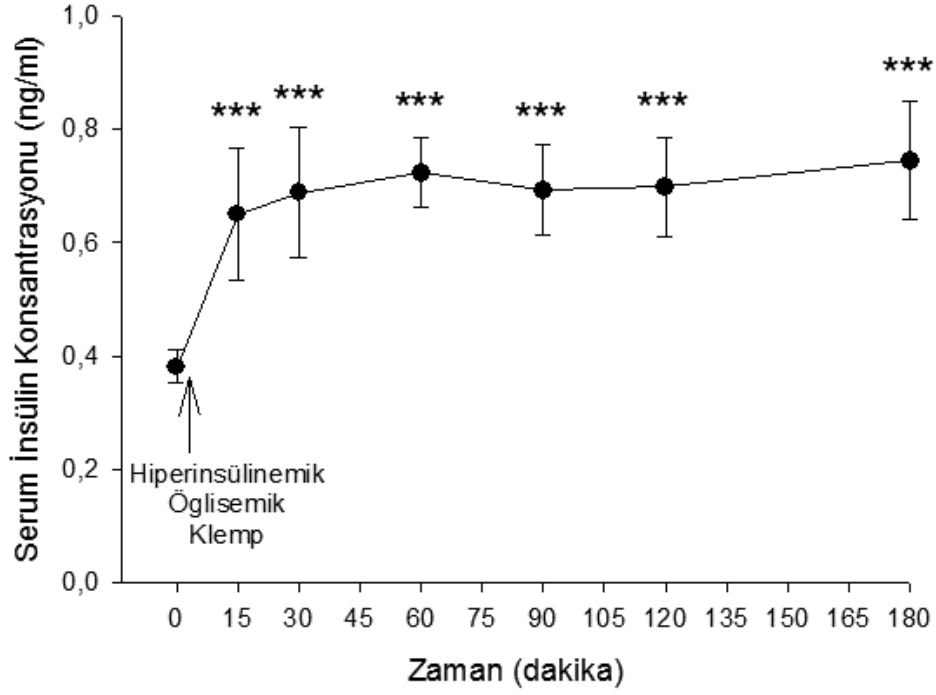
Hiperinsülinemik-öglisemik klemp modeli ile istikrarlı kan glukoz seviyelerinin elde edilmesini takiben 15 dakikalık aralıklarla 180 dakika boyunca toplanan kan

serum örneklerinden üridin ölçümü yapıldı. Başlangıç (0. dakika) üridin konsantrasyonu ($0.85 \pm 0.04 \mu\text{M}$) ile kıyaslandığında, incelenen tüm zaman aralıklarında serum üridin konsantrasyonlarının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edildi (Şekil-34).



Şekil-34: Hiperinsülinemik-öglisemik klemp yöntemi sonrası serum üridin konsantrasyonlarının zamana bağlı değişimleri. Kan örnekleri artere yerleştirilen kanül aracılığıyla alındı. Santrifüj edildikten sonra serum ekstrakte edildi. Serum üridin seviyeleri HPLC ile ölçüldü. Veriler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir ve bu grupta 5 deney hayvanından elde edilen sonuçların ortalamasıdır. İstatistiksel değerlendirme Tek Yönlü RM ANOVA ile yapılmıştır. *** $p < 0.001$ 0. dakika değer ile kıyaslandığında.

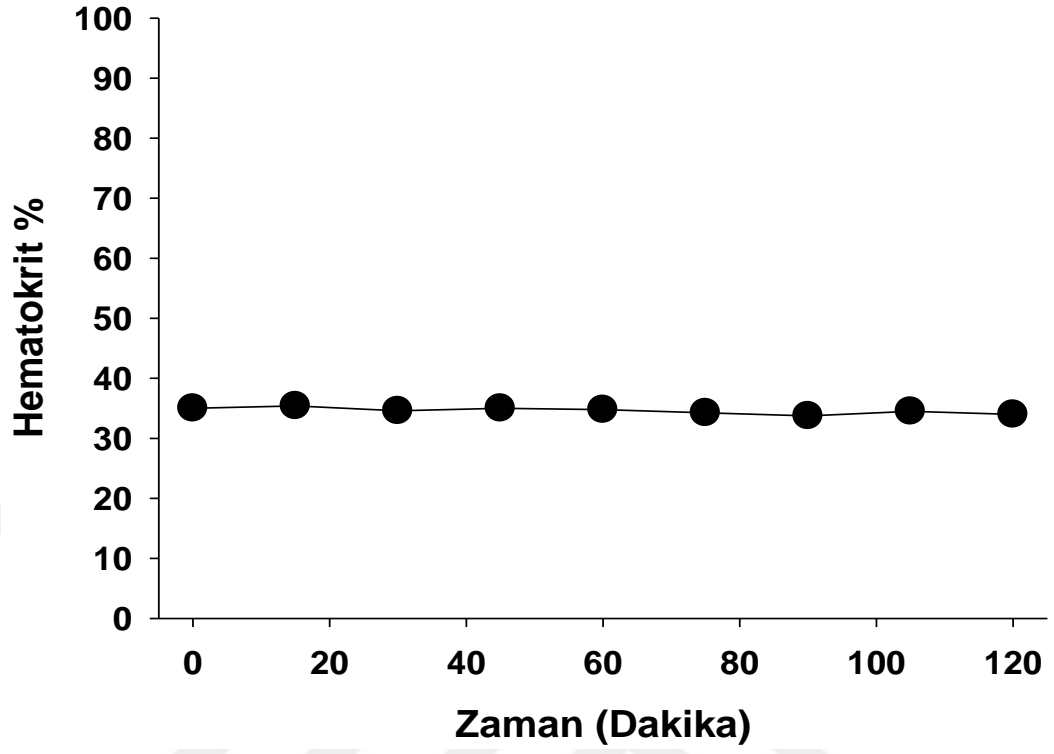
Hiperinsülinemik-öglisemik klemp uygulanan sıçanların serum insülin konsantrasyonları başlangıçtaki insülin konsantrasyonu ile kıyaslandığında, deney sonuna kadar serum insülin konsantrasyonlarının istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği gözlemlendi (Şekil-35).



Şekil-35: Hiperinsülinemik-öglisemik klemp yöntemi sonrası serum insülin konsantrasyonlarının zamana bağlı değişimleri.

Kan örnekleri artere yerleştirilen kanül aracılığıyla alındı. Santrifüj edildikten sonra serum ekstrakte edildi. Serum insülin seviyeleri ELISA ile ölçüldü. Veriler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir ve bu grupta 5 deney hayvanından elde edilen sonuçların ortalamasıdır. İstatiksel değerlendirme Tek Yönlü RM ANOVA ile yapılmıştır. *** $p < 0.001$ 0. dakika değer ile kıyaslandığında.

Hiperinsülinemik-öglisemik klemp uygulanan sıçanların deney boyunca kan volümünden emin olabilmek için hemotokrit ölçümleri yapıldı. Genel olarak, hematokrit seviyeleri başlangıç volümünden % 10'dan daha düşük olmayan sonuçlar değerlendirildi (Şekil-36).



Şekil-36: Klemp süresince zamana bağlı hematokrit seviyeleri. Bu grupta 5 deney hayvanı sonuçlarının ortalamasıdır. İstatiksel değerlendirme Tek Yönlü RM ANOVA ile yapılmıştır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Temel metabolik hormonlardan biri olan insülin vücutta glukozun ve amino asitlerin hücrelere alınmasını sağlar, glukojen ve yağ sentezini arttırır, ve glukojenoliz, lipoliz ve proteoliz süreçlerini baskılar. Ancak insülinin pürin veya pirimidin metabolizması üzerine etkileri bilinmemektedir. Bu nedenle çalışmamızda, insülinin bir pirimidin nükleozidi olan üridin üzerine in vivo etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla sıçanlarda açlık ve tokluk durumlarında serum üridin düzeylerinin belirlenmesini takiben, farklı dozlarda insülin uygulamasının üridin konsantrasyonları üzerine etkileri analiz edilmiş ve son olarak üridin düzeylerindeki değişimlerinin glukozun hücre içine alımına bağlı olup olmadığı araştırılmıştır. Bulgularımıza göre serum üridin düzeyleri tokluk durumunda ve subkutan yolla uygulanan insülin sonrası anlamlı olarak azalmıştır. İnsülin sonrası gözlenen düşüşler doza ve zamana bağlı olarak gerçekleşmiştir. Hiperinsülinemik-öglisemik klemp çalışmaları ile de üridin düzeylerinde gözlenen bu değişimlerin hücre içine glukoz girişinden bağımsız olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bulgular literatürde ilk kez insülinin serum üridin düzeylerini düzenlediğini ve insülin uygulaması sonrası serum üridin konsantrasyonlarında gözlenen azalmanın hücre içine glukoz girişinden bağımsız olduğunu göstermiştir.

Üridin, dokularda ve kan dolaşımında serbest olarak veya fosfatlı nükleotid formunda bulunmaktadır (Cansev, 2006). İnsanlarda kan dolaşımındaki ana pirimidin bileşiği olan üridin konsantrasyonları (Wurtman ve ark., 2000), farklı çalışmalarda 3-8 mikromolar arasında olduğu bildirilmiştir (Yamamoto ve ark., 2011). Üridin'in bazı metabolik bozukluklar sırasındaki kan konsantrasyonları da çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir. Örneğin, diyabet hastalarında kan üridin konsantrasyonlarının anlamlı bir şekilde değiştiği gösterilmiştir. Yamamoto ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada sağlıklı bireylerde kan üridin konsantrasyonu 3.75 ± 1.04 mikromolar iken, Tip II diyabeti olan yaş ve cinsiyet uyumlu hasta bireylerde anlamlı olarak daha yüksek (4.32 ± 0.64 mikromolar) olarak

bildirilmiştir. Tip I diyabet tanısı almış çocuklarda serum üridin konsantrasyonu sağlıklı kontrollerin serum üridin seviyeleri ile karşılaştırıldığında iki kat daha yüksek bulunmuş ve UTP yıkım ürünü olan üridin konsantrasyonu ile HbA1C seviyeleri arasında pozitif korelasyon olduğu gösterilmiştir (Dudzinska, 2011). Bu çalışmalar, insülinin kan üridin düzeylerinin regülasyonu üzerine etkisi olabileceğini düşündürmektedir.

Bu bulgulara destek niteliğindeki in vitro çalışmalarda Peck ve arkadaşları (Peck ve ark., 1971) insülin uygulamasının izole kemik hücrelerinde işaretlenmiş üridinin RNA ve urasil nükleotidlerinin sentezine katılmasını stimüle ettiğini göstermiştir. Diyabetik sıçanlarda kalp ve diyafram kasında UTP miktarının azaldığı ve insülin tedavisinin azalan UTP konsantrasyonunu normal seviyelere geri getirdiği bulunmuştur (Gertz ve Haugaards, 1979). Diyabetli sıçanlardan elde edilen kardiyak ve iskelet kasındaki üridin kinaz aktivitesi sağlıklı sıçanlarla karşılaştırıldığında daha azdır. Ayrıca, in vitro koşullarda streptozosin ile oluşturulan diyabetik sıçanların hemidiyaframında normal sıçanlardan elde edilen hemidiyaframa göre daha az UTP sentezlendiği gösterilmiştir (Gray ve ark., 2004). Benzer sonuçlar Rilemma tarafından meme bezi eksplantlarında yaptığı çalışmalarla elde edilmiştir (Rilemma, 1975). Deneylerin sonuçları pirimidin nükleotid metabolizmasının insülin tarafından regüle edildiğini ve glikojen biyosentezi sırasında üridinin UTP'ye dönüşümünde hız kısıtlayıcı bileşen olan üridin kinaz enziminin aktive edilmesinde insülinin önemli rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Bu gözlemlerden yola çıkılarak insülinin in vivo pirimidin metabolizması üzerinde etkileri olabileceği çıkarımına varılmış ve çeşitli koşullarda serum üridin düzeylerinin analiz edildiği bu çalışma planlanmıştır. Çalışmada ilk olarak açlık ve takiben tokluk durumu oluşturulan sıçanlarda kan glukoz, serum üridin ve insülin düzeyleri ile bu düzeylerin yem tüketimi sonrası nasıl değiştiği incelenmiştir. Açlık durumu oluşturulan sıçanlarda kan glukoz seviyeleri ortalaması 85 ± 5.7 mg/dl olarak tespit edilmiş, bir saatlik yem tüketiminin ardından anlamlı bir şekilde artış gösterip 1. saatte en yüksek değere (112.3 ± 7.6 mg/dl) ulaşmıştır (Şekil-27). Ancak gıda alımı serum üridin konsantrasyonlarını ilk dakikalardan itibaren zamana bağlı olarak anlamlı bir şekilde azaltmıştır. Sıçanların yem tüketimi serbest bırakılmadan

önce ortalama serum üridin konsantrasyonları yaklaşık $1.29 \pm 0.2 \mu\text{M}$ seviyelerinde iken 1. saatte maksimum azalma ($0.59 \pm 0.07 \mu\text{M}$) gözlenmiştir. Serum insülin konsantrasyonu ise açlık durumunda ortalama $0.463 \pm 0.01 \text{ ng/ml}$ iken, tokluk durumunda ortalama $0.737 \pm 0.07 \text{ ng/ml}$ ölçülerek anlamlı farklılık gösterdi (Şekil-29). Bu sonuçlar, yem tüketimine bağlı artan kan glukoz seviyelerinin düşürülmesi için salınan insülinin serum üridin düzeyleri üzerine etkisi olabileceğini düşündürmekte ve bu hipotez önceden yapılan çalışmalarla büyük ölçüde paralellik göstermektedir (Duszinska, 2011).

Bu gözleme dayanarak çalışmanın ikinci basamağında farklı dozlarda subkutan yolla insülin uygulaması yapılan gruplarda doza ve zamana bağlı üridin değişimleri incelenmiştir. Subkutan yolla uygulanan 0.1 U insülin kan glukoz düzeylerini etkilemezken, 0.5 U ve 1 U insülin tedavisi sıçanlarda glukoz konsantrasyonlarını anlamlı derecede azaltmıştır. Dördüncü saate kadar 40 mg/dl altında kalarak başlangıç değerlerine göre anlamlı düşüşünü sürdüren kan glukoz konsantrasyonları, daha sonra artma eğilimi göstermiş ve deney sonunda başlangıç seviyelerine geri dönmüştür (Şekil-30). Benzer şekilde 0.1 U subkutan insülin uygulaması üridin düzeylerini etkilemezken, 0.5 ve 1 U insülin uygulamaları serum üridin konsantrasyonlarını zamana bağlı olarak anlamlı şekilde düşürmüştür (Şekil-31). Bu düşüşler 0.5 ve 1 U insülin uygulamalarından sonra serumda tespit edilen insülin düzeyleri artışları ile uyumlu idi (Şekil-32).

Çalışmamızda bu aşamaya kadar elde edilen sonuçlar, dışarıdan insülin uygulamasına bağlı serum üridin konsantrasyonlarındaki bu değişimlerin hücre içi glukoz girişine bağımlı olup olmadığı sorusunu akla getirmiştir. Bu durumu test etmek için hiperinsülinemik-öglisemik model oluşturulmuştur. Sıçanlara fizyolojik yüksek dozlarda olacak şekilde insülin ve hücre içi glukoz düzeylerini bazal seviyeler olan 5.0-5.5 mM aralığında sabit tutmak amacıyla %50 dekstrozu infüze edilmiştir. Bu modelde kan glukoz düzeyleri zaman içinde sabit seyrederken (Şekil-33) serum üridin düzeylerinde ise anlamlı şekilde azalmalar gözlenmiş ve bu durum deney boyunca devam etmiştir (Şekil-34). Başlangıç serum üridin konsantrasyonu $0.85 \pm 0.1 \mu\text{M}$ iken, 180. dakikaya kadar belirli zaman aralıklarında toplanan kan örneklerinde serum üridin konsantrasyonları 0.4-0.5 μM seviyelerinde ölçülmüştür.

Elde edilen bulgular, literatürde ilk kez dışarıdan verilen insülin tedavisiyle üridin düzeylerindeki azalmanın hücre içine glukoz girişinden bağımsız olduğunu göstermiştir.

Pirimidin bileşikleri taşıyıcı protein ailesi olan CNT ve ENT aracılığıyla hücre içine alınırlar (Cansev, 2006). Sodyum-bağımlı yüksek afiniteli taşımadan CNT ailesi sorumlu iken, sodyum-bağımsız düşük afiniteli taşımadan ENT ailesi sorumludur. Üridinin beyin hücrelerine alınması için sırasıyla kan-beyin bariyeri üzerindeki taşıyıcılarla önce beyin ekstraselüler sıvısına ve daha sonra hücre zarında bulunan taşıyıcılar aracılığıyla hücre içine alınması gerekir. Hem CNT hem de ENT ailesinin üyeleri kan beyin bariyeri ve hücre zarı üzerinde bulunmaktadır (Cansev, 2006). Çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre insülin etkisiyle kanda azalan üridinin dokularda kullanılmak üzere hücre içine alınması muhtemeldir. Aç bırakılan sıçanlarda yapılan çalışmada diyet desteğinin ince barsakta ve karaciğerde CNT düzeylerinin ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir (Lopez-Navarro ve ark., 1996; Mercader ve ark., 1996). Pawelczyk ve arkadaşlarının sıçanlarda yapmış oldukları çalışmada diyabetik kalp, karaciğer ve böbrek dokularında ENT ve CNT nükleozid taşıyıcılarının mRNA seviyelerinde önemli değişiklikler gösterilmiştir (Pawelczyk ve ark., 2003). Sıçan T ve B lenfositlerinde yapılan hücre kültüründe, nükleozid taşıyıcılarının ekspresyon seviyeleri glukoz ve insülin tarafından birbirinden bağımsız ve farklı olarak regüle edildiği gösterilmiştir (Sakowicz ve ark., 2004). Bu amaçla ilgili organlarda bu etkiye aracılık eden transporter mekanizmaların ortaya çıkarılması doku metabolizması hakkındaki bilgilerimizi attıracaktır.

Sonuç olarak, sıçanlarda yaptığımız çalışmamızda literatürde ilk kez dışarıdan verilen insülin tedavisiyle serum üridin konsantrasyonları incelenmiş, elde edilen bulgular doza ve zamana bağlı azalmalar olduğunu gösterilmiştir. Ayrıca, yaptığımız çalışmalar yine literatürde ilk kez dışarıdan verilen insülin tedavisiyle kan serum üridin düzeylerindeki azalmanın hücre içine glukoz girişinden bağımsız olduğunu göstermiştir.

6. KAYNAKLAR

Arimura A and Fishback JB (1981) Somatostatin: regulation of secretion. *Neuroendocrinology* 33(4):246-56.

Aebi M and Hennet T (2001) Congenital disorders of glycosylation: genetic model systems lead the way. *Trends Cell Biol* 11:136-41.

Baldwin SA, Beal PR, Yao SYM, et al (2004) The equilibrative nucleoside transporter family, SCL29. *Pflugers Arch* 447:43-735.

Barnes LA (1995) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 7th edition, McGraw-Hill, New York, page 4605.

Boer P, Mamet R, Sperling O (1991) Acceleration of purine synthesis in mouse liver by glycogenolytic hormones. *Biochem Med Metab Biol* 46(2):95-185.

Bruce Alberts, Alexander Johanson, Julian Lewis et al (2002). *Molecular biology of cell*, 4th edition, Garland Science, New York, chapter 6.

Buse MG (2006) Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab* 290(1): E1-E8.

Cansev M (2006) Uridine and cytidine in the brain: their transport and utilization. *Brain Res Rev*, 52(2):389-397.

Cansev M (2007) Involvement of uridine-nucleotide-stimulated P2Y receptors in neuronal growth and function. *Cent Nerv Sys Agent Med Chem* 7: 223-229.

Chan S J, Keim P and Steiner D F (1976) Cell-free synthesis of rat preproinsulins: characterization and partial amino acid sequence determination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73:1964-1968.

Cohen JL, Vinik A, Faller J et al (1985) Hyperuricemia in glycogen storage disease type I. Contributions by hypoglycemia and hyperglucagonemia to increased urate production. *J Clin Invest* 75(1):251-7.

Copeland RJ, Bullen JW, Hart GW (2008) Cross-talk between GlcNAcylation and phosphorylation: roles in insulin resistance and glucose toxicity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab* 295(1): E17-28.

Curtis CH, Dustin SH, Virginia LJ et al (2011) Hyperinsulinemic-Euglycemic Clamp in the Conscious Rat. *Journal of Visualized Experiments* doi: 10.3791/2432.

Dahnke H, Mosebach (1975) In vivo studies on the metabolism of pyrimidine nucleosides. *Physiol. Chem* 356.

Dix DE, Lehman CP, Jakubowski A et al (1979) Pyrazofurin metabolism, enzyme inhibition, and resistance in L5178Y cells. *Cancer Research* 39 (11): 4485-90.

Dudzinska W (2011) Uridine correlates with the concentration of fructosamine and HbA1c in children with type 1 diabetes. *Acta Paediatr* 100: 712-716.

Dudzinska W, Lubkowska A, Jakubowska K, Suska M, Skotnicka E(2013) Insulin resistance induced by maximal exercise correlates with a post-exercise increase in uridine concentration in the blood of healthy young men. *Physiol Res* 62(2):163–70. PMID: 23234409.

Edlund H (2001) Developmental biology of pancreas. *Diabetes* 50;5-9.

Geiger A, Yamasaki S (1956) Cytidine and uridine requirement of the brain. *J Neurochemistry* 1:93-100.

Gerrits G, Monnens L, Deabreu RA, et al (1991) Disturbances of purine and pyrimidine metabolism in young children with chronic renal failure. *Nephron* 58: 310-314.

Gertz BJ, Haugaards ES (1979) Effect of diabetes and fasting on the uridine triphosphate content and uridine kinase activity of rat cardiac and skeletal muscle. *Metabolism*, 28: 358–62,1979.

Gray JH, Owen RP, Giacomini KM (2004) The concentrative nucleoside transporter family, SCL28. *Pflugers Arch* 447:728-34.

Griffith DA, Jarvis SM (1996) Nucleoside and nucleobase transport systems of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 29;1286(3): 153-81.

Gomez-Angelats M, Del B, Mercader J (1996) Hormonal regulation of concentrative nucleoside transport in liver parenchymal cells.

Guyton CA, John EA (2013) *Textbook of Medical Physiology (Tıbbi Fizyoloji)* Çeviren: YEGEN BA, 12. Baskı, Nobel Yayınevi, İstanbul, s:963-979.

Hamada T, Mizuta E, Yanagihara K et al (2007) Plasma levels of uridine correlate with blood pressure and indicators of myogenic purine degradation and insulin resistance in hypertensive patients. *Circ. J* 71(3): 354–356.

Harkness R, Lund R (1983) Cerebrospinal fluids concentrations of hypoxanthine, xanthine, uridine and inosine: high concentrations of the ATP metabolite, hypoxanthine, after hypoxia. *J Clin Pathol* 36: 1-8.

Hart GW, Slawson C, Ramirez-Correa G et al (2011) Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Ann Rev Biochem* 80:825–58. doi: 10.1146/annurev-biochem-060608-102511 PMID: 21391816.

Haugaard ES, Frantz KB, Haugaard N (1977) Effect of uridine on cellular UTP and glycogen synthesis in skeletal muscle: stimulation of UTP formation by insulin. *Proc Natl Acad Sci* 74:2339-42.

Hawkins M, Angelov I, Barzilai N et al (1997) The tissue concentration of UDP-N-acetylglucosamine modulates the stimulatory effect of insulin on skeletal muscle glucose uptake. *J Biol Chem* 272(8):4889-95.

Hazelwood RL (1993) The pancreatic polypeptide (PP-fold) family: gastrointestinal, vascular, and feeding behavioral implications. *Proc Soc Exp Biol Med.* 202(1):44-63.

Hebert DN, Garman SC, Molinari M (2005) The glycan code of the endoplasmic reticulum: asparagine-linked carbohydrates as protein maturation and quality control tags. *Trend Cell Biol* 15:364-70.

Higuita JC, Thelestam M, Katz A (2004) Glucose starvation results in UDP-glucose deficiency and inactivation of glycogen synthase. *Arch Biochem Biophys* 425:242-8.

Jensen H and Evans (1935) Studies on crystalline insulin: the nature of the free amino groups in insulin and the isolation of phenylalanine and proline from crystalline insulin. *J Biol Chem* 108: 1-9.

Kennedy EP, Weiss SB (1956) The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides. *J Biol Chem* 222:193-214.

Kono T Wang XP Fisher WE et al (2004) Pancreatic polypeptide, *Encyclopedia of endocrine diseases*. Vol 3 Elsevier; San Diego: 488-96.

Lecca D, Ceruti S (2008) Uracil nucleotides: from metabolic intermediates to neuroprotection and neuroinflammation. *Biochem Pharmacol* 75:1869-1881.

Levine RL, Hoogenraad NJ, Kretzmer N (1974) A review : Biological and clinical aspects of pyrimidine metabolism. *Pediatr Research* 8: 724.

Lopez-Navarro AT, Ortega MA, Peragon J et al (1996) Deprivation of dietary nucleotides decreases protein synthesis in the liver and small intestine in rats. *Gastroenterology* 110: 1760-1769.

Marshall S, Bacote V, Traxinger RR (1991) Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *J Biol Chem* 266: 4706-4712.

Mercader J, Gomez-Angelats M, Del Santo B et al (1996) Nucleoside uptake in rat liver parenchymal cells. *Biochem* 317: 835-842.

Mering J, Minkowski O (1890) Diabetes mellitus nach pancreas extirpation. *Arch Exp Pathol Pharma* 26-37.

Millar DJ, Dawnay AB (1995) Heat sterilization of PHD fluid promotes advanced glycation end product (AGE) formation. *J Am Soc Nephrol* 6(3):551.

Moyer JD, Handschumacher RE (1979) Selective inhibition of pyrimidine synthesis and depletion of nucleotide pools by N-L-aspartate. *Cancer Research* 39 (8): 3089-94.

Moyer JD, Oliver JT, Handschumacher RE (1981) Salvage of circulating pyrimidine nucleosides in the rat. *Cancer Research* 41: 3010.

Nance WE, Waadenburg PJ (1959) The biology of twinning in man *Medicine* 38: 403.

Pamela C, Champe Richard A, Harvey JB (1994) Lippincott's Biochemistry, 2nd edition, Lippincott company, PA;269-277.

Pawelczyk T, Podgorska M, Sakowicz M (2003) The effect of insulin on expression level of nucleoside transporters in diabetic rats. *Mol Pharmacol* 63: 81-88.

Peck WA., Messinger K., Carpenter J (1971) Regulation of pyrimidine ribonucleoside incorporation in isolated bme cels. Stimulation by insulin and by 2-3dihydroxy-1,4 dithiobutane(dithriothreitol) *J Biol Chem* 246:4439-46.

Putnam WS, Liddle RA, Williams JA (1989) Inhibitory regulation of rat exocrine pancreas by peptide YY and pancreatic polypeptide. *Am J Physiol* 256 (4 Pt 1):G698-703.

Reichlin S (1987) Secretion of somatostatin and its physiologic function *J Lab Clin Med* 109(3):320-6.

Ricardi C (2003) Islet transplantation. A brave new world. *Lilly Lecture* 52(7): 1595-603.

Richard Harvey, Denise Ferrier (2011) Lippincott's Biochemistry, 5th edition, Lippincott company, PA; 19103.

Rilemma JA (1975) Rapid effects of insulin on uridine metabolism in mammary gland explants. *Am J Physiol* 228: 1531-4.

Ronquist G, Niklasson F (1984) Uridine, xanthine and urate contents in human seminal plasma. *Arch Androl* 13: 63-70.

Sakowicz M, Szutowicz A, Pawelczyk T (2004) Insulin and glucose induced changes in expression level of nucleoside transporters and adenosine transport in rat T lymphocytes. *Biochem Pharmacol* 68: 1309-1320.

Sand TE, Thoresen GH, Refsnes M et al (1992) Growth-regulatory effects of glucagon, insulin, and epidermal growth factor in cultured hepatocytes. Temporal aspects and evidence for bidirectional control by cyclic AMP. *Dig Dis Sci* 37(1):84-92.

Sanger F (1959) Chemistry of insulin; determination of the structure of insulin opens the way to greater understanding of life processes. *Science* 129:1340-1344.

Sprong H, Degroote S, Nilsson T et al (2003) Association of the golgi UDP-galactose transporter with UDP-galactose: ceramide galactosyltransferase allows UDP-galactose import in the endoplasmis reticulum. *Mol Biol Cell* 14:3482-93.

Schwartz TW, Rehfeld JF, Stadil F et al (1976) Pancreatic-polypeptide response to food in duodenal-ulcer patients before and after vagotomy. *Lancet* 1(7969):1102-5.

Spector SA, Frattini JC, Zdankiewicz PD et al (1997) Insulin receptor gene expression in chronic pancreatitis: the effect of pancreatic polypeptide. *Surg Forum* 48:168-71.

Sun YS, Brunicardi FC, Druck P et al (1986) Reversal of abnormal glucose metabolism in chronic pancreatitis by administration of pancreatic polypeptide. *Am J Surg* 151(1):130-40.

Taylor IL (1989) Pancreatic polypeptide family: pancreatic polypeptide, neuropeptide Y and peptide YY. 2nd ed. Bethesda: American Physiological Society 3: 3-491.

Traut W (1994) Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Mol Cell Biochem* 140(1):1-22.

Traut TW, Jones ME (1996) Uracil metabolism UMP synthesis from orotic acid or uridine and conversion of uracil to beta-alanine: enzymes and cDNAs. *Prog Nucleic Acid Res Molecular Biology* 53:1-78.

Tseng J, Barelkovski J, Gurpide E (1971) Rates of formation of blood-borne uridine and cytidine in dogs. *Am J Physiol* 221(3): 869-78.

Weiss M, Steiner DF, Philipson LH et al (2014) Insulin biosynthesis, secretion, structure and structure-activity relationships. PMID: 25905258.

Wurtman RJ, Regan M, Ulus I et al (2000) Effect of oral CDP-choline on plasma choline and uridine in humans. *Biochem Pharmacol* 60: 989-992.

Wurtman R, Ulus IH, Cansev M et al (2006) Synaptic proteins and phospholipids are increased in gerbil brain by administering uridine plus docosahexaenoic acid orally. *Brain Research* 1088:83-92.

Yamamoto T, Moriwaki Y, Takahashi S (1998) Effect of glucagon on the plasma concentration of uridine. *Metabolism* 47 (6):695-8.

Yamamoto T, Inokuchi T, Ka T et al (2010) Relationship between plasma uridine and insulin resistance in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nucleos Nucleot Nucl* 29: 504-508.

Yamamoto T, Koyama H, Kurajoh M, et al (2011) Biochemistry of uridine in plasma. *Clin Chim Acta* 412: 1712-1724.

Yasuyo U, Giuseppe P, Le TT (2014) Uridine affects liver protein glycosylation, insulin signaling, and heme biosynthesis. Plos One 9(6):e99728.doi:10.1371/journal.pone.0099728.

Zhao J, Levy E, Fraser W et al (2014) Circulating docosahexaenoic acid levels are associated with fetal insulin sensitivity. Plos One 9:1-7.

7. SİMGELER ve KISALTMALAR

ATP: Adenozin- 5'-tri-fosfat

CMP: Sitidin mono-fosfat

CDP: Sitidin di-fosfat

CDP-etanolamin: Sitidin di-fosfat-etanolamin

CDP-kolin: Sitidin di-fosfat-kolin

CTP: Sitidin-5'-tri-fosfat

CNT: Konsantre edic nükleozid taşıyıcı

DNA: Deoksi ribonükleik asit

GLUT: Hücre membranındaki glukoz taşıyıcısı

GTP: Guanozin-5'-tri-fosfat

ENT: Dengeleyici nükleozid taşıyıcısı

HOMA-R: Homeostaz modeli değerlendirilmesi

IR: İnsülin reseptör

IMP: İnozin mono-fosfat

Mm: Milimolar

NIDDM: insüline bağlı olmayan diabetes mellitus

OMP: Orotidil mono-fosfat

PALA: Fosfoasetil aspartik asit

PE: Poli etilen

PP: Pankreatik polipeptit

RNA: Ribonükleik asit

S.C.: Subkutan

U: Ünite

UDP: Üridin di-fosfat

UDP-GlcNac: Üridin di-fosfat-N-asetilglukozamin

UDP-glukoz: Üridin di-fosfat-glukoz

UDP-galaktoz: Üridin di-fosfat-galaktoz

UMP: Üridin mono-fosfat

UTP: Üridin-5'-tri-fosfat



8. TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve yüksek lisans eğitimim boyunca benden hiçbir emek ve yardımını esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, her durumda anlayış ve sabır gösteren danışman hocam Prof. Dr. Mehmet CANSEV'e, başta Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Sinan ÇAVUN olmak üzere, Prof. Dr. Mine Sibel GÜRÜN, Prof. Dr. R. Levent BÜYÜKUYSAL, Prof. Dr. Vahide SAVCI, Prof. Dr. Gökhan GÖKTALAY ve Doç. Dr. M. Sertaç YILMAZ'a , hayata dair çok şey öğrendiğim Uzm. Kimyager Sami AYDIN'a, laboratuarda öğrenme sürecinde büyük desteklerini gördüğüm ve beraber çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum Uzm. Dr. Fulya ORHAN, Uzm. Biyolog Esra ÖRENLİLİ YAYLAGÜL ve Uzm. Ecz. Gözde SÖZER'e, çalışkanlık, bilimsel beceri ve pozitif duruşu ile örnek aldığım Veteriner Hekim Doç. Dr. Deniz BAĞDAŞ ve Doç. Dr. Betül ÇAM'a, dostluğunu hiçbir zaman eksik etmeyen, sıradışı eğlenceli kişiliği ile üzüntülerimi unutturan, samimiyeti ve sağlam karakteri ile her zaman güven veren Uzm. Ecz. Merve GÜRBÜZOĞLU'na, tezimin her aşamasında zorunlu desteğini ve arkadaşlığını esirgemeyen, tezimi benim kadar sahiplenen, hüznü ve mutlu olduğum her anımda yanımda olan, arkadaştan da ötesi en büyük desteğim Kimyager Özlem AKTAŞ'a, beraber çalıştığım ve yardımlarını gördüğüm arkadaşlarım Uzm. Dr. Hasret ÖZBÖLÜK, Ecz. Dr. Zülfiye GÜL, Araş. Gör. Tıbbi Biyolog Çiğdem SEVİM, Ecz. Berfu Mergen, Araş. Gör. Biyolog Büşra ÖCALAN, Dr. Ayşen ÇAKIR, Dr. Cihan ÇAKIR'a, tüm araştırma görevlileri, doktora ve yüksek lisans öğrencilerine, tüm resmi ve idari işlerimizin sorunsuz bir şekilde yürümesini sağlayan Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü sekreterimiz Özlem KAYGISIZ, hiçbir beklenti olmaksızın yardımlarını eksik etmeyen, arkamızı toplayan, gülyüzü ile daima pozitif enerji veren Ayşe KARAMAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Maddi ve manevi anlamda her zaman yanımda olan sevgili eşim Neşe TÜRKYILMAZ'a, varlığı ile hayatıma güzellik katan tüm eğitim süreçlerimde benden emek ve desteklerini esirgemeyen sevgili anne ve babama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

9. ÖZGEÇMİŞ

7 Eylül 1984 yılında Bursa'da doğdum. İlk öğrenimimi Ahmet Hamdi Tanpınar İlköğretim Okulu'nda, orta ve lise öğrenimimi Atatürk Anadolu Lisesi'nde tamamladım. 2002 yılında Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümün'den mezun oldum. Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime devam etmekteyim. Evliyim.



BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

TEZ ÇOĞALTMA VE ELEKTRONİK YAYIMLAMA İZİN FORMU

Yazar Adı Soyadı	Mesut TÜRKYILMAZ
Tez Adı	İNSULİN'İN SIÇANLARDA ÜRİDİN DÜZEYLERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI
Enstitü	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Tıbbi Farmakoloji
Bilim Dalı	Tıbbi Farmakoloji
Tez Türü	Yüksek Lisans
Tez Danışman(lar)ı	Prof. Dr. Mehmet CANSEV
Çoğaltma (Fotokopi Çekim) İzni	<input checked="" type="checkbox"/> Tezimden fotokopi çekilmesine izin veriyorum <input type="checkbox"/> Tezimin sadece içindekiler, özet, kaynakça ve içeriğinin % 10 bölümünün fotokopi çekilmesine izin veriyorum <input type="checkbox"/> Tezimden fotokopi çekilmesine izin vermiyorum
Yayımlama İzni	<input checked="" type="checkbox"/> Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasına izin veriyorum <input type="checkbox"/> Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasının ertelenmesini istiyorum 1 yıl <input type="checkbox"/> 2 yıl <input type="checkbox"/> 3 yıl <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasına izin vermiyorum

Hazırlamış olduğum tezimin yukarıda belirttiğim hususlar dikkate alınarak, fikri mülkiyet haklarım saklı kalmak üzere Uludağ Üniversitesi Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı tarafından hizmete sunulmasına izin verdiğimi beyan ederim.

Tarih: 28/08/2018

İmza: