



**SIÇANLARDA GLUKOZ HOMEOSTAZININ
DÜZENLENMESİNDE GLUKAGONUN MERKEZİ SİNİR
SİSTEMİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Kevser TANBEK
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Süleyman SANDAL
Doktora Tezi – 2020**

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SIÇANLARDA GLUKOZ HOMEOSTAZININ DÜZENLENMESİNDE
GLUKAGONUN MERKEZİ SİNİR SİSTEMİNDEKİ ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Kevser TANBEK

**Fizyoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof.Dr. Süleyman SANDAL**

Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TDK 2019-1969 proje numarası ile desteklenmiştir.

**MALATYA
2020**

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	VI
ABSTRACT.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
TABLolar DİZİNİ.....	XI
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Glukoz Homeostazı.....	3
2.2. Glukoz Homeostazında Karaciğer	4
2.3. Glukoz Homeostazında Kas Doku.....	6
2.4. Glukoz Homeostazında Yağ Doku	7
2.5. Glukoz Homeostazında Pankreas	8
2.5.1.İnsülin	10
2.5.2. Glukagon.....	11
2.6. Glukoz Homeostazında Beyin	13
2.6.1. Agouti-İlişkili Protein.....	17
2.6.2. Nöropeptit Y	18
2.6.3. Kokain ve Amfetamin İlişkili Transkript.....	19
2.6.4. Proopiomelanokortin	20
2.7. Glukoz Homeostazında Pankreasın Nöronal Kontrolü.....	21
3. MATERYAL VE METOT	24
3.1. Deney Hayvanlarının Temini.....	24
3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması.....	24
3.3. Deney Protokollerinin Tasarımı.....	25
3.4. Cerrahi Operasyonlar	26
3.4.1. Ozmotik Mini Pompaların Yerleştirilmesi	26
3.4.2. Pankreatik Denervasyon İşlemi	27
3.5. Glukagon Çözeltilisinin Hazırlanması	29
3.6. Yapay BOS Çözeltilisinin Hazırlanması.....	30
3.7. Doku ve Kan Örneklerinin Alınması	30
3.8. Biyokimyasal Analizler	30

3.8.1. Plazma İnsülin, Glukagon ve Glukoz Analizleri	30
3.8.2. Pankreas Dokusundan Norepinefrin Analizi	33
3.9. Western Blot Protein Analizi	34
3.9.1. Protein İzolasyonu	34
3.9.2. Protein Konsantrasyonu Ölçümü	36
3.9.3. Jel elektroforezi.....	37
3.9.4. Jelden Membrana Protein Transferi.....	39
3.9.5. Antikorlar ile İnkübasyon	41
3.9.6. Görüntüleme ve Değerlendirme.....	42
3.10. İmmüno Floresan Analizi	42
3.10.1. Cryostat Cihazı ile Kesit Alımı.....	42
3.10.2. İmmüno Floresan Boyama.....	43
3.10.3. Görüntüleme ve Değerlendirme.....	44
3.11. İstatistiksel Analizler	44
4. BULGULAR.....	45
4.1. Yem Tüketimi ve Vücut Ağırlığı Değişim Bulguları	45
4.2. Sıçanların Kan Glukoz Düzeyleri	48
4.3. Sıçanların Kan İnsülin Düzeyleri.....	50
4.4. Sıçanların Kan Glukagon Düzeyleri	52
4.5. Sıçanların Kan Epinefrin Düzeyleri.....	54
4.6. PD Gruplarında Sıçanların Pankreas Dokusu NE Düzeyleri	56
4.7. Sıçanların Pankreas Dokusu Western Blot Bulguları	58
4.7.1. Sıçanların Pankreas Dokusu İnsülin Western Blot Bulguları	58
4.7.2 Sıçanların Pankreas Dokusu Glukagon Western Blot Bulguları	60
4.8. Sıçanların Beyin Dokusu Western Blot Bulguları	62
4.8.1. Sıçanların Beyin Dokusu AgRP Western Blot Bulguları	62
4.8.2 Sıçanların Beyin Dokusu POMC Western Blot Bulguları.....	64
4.9. Sıçanların Pankreas Dokusu İmmüno Floresan Bulguları.....	66
4.10. Sıçanların Beyin Dokusu IF Bulguları.....	68
4.10.1. Sıçanların Beyin Dokusu AgRP IF Bulguları	68
4.10.2 Sıçanların Beyin Dokusu POMC IF Bulguları	70
5. TARTIŞMA	73
5.1. Glukoz Homeostazında Glukagonun Merkezi Sinir Sistemindeki Rolü	74

5.2. İcv Glukagon Uygulamasının Pankreas Dokusu ve Endokrin Sekresyonu Üzerine Etkileri	76
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	80
KAYNAKLAR	82
EKLER.....	93
Ek 1: Özgeçmiş	93
Ek 2: Etik Kurul Belgesi	94



TEŞEKKÜR

Çalıőmam boyunca bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren, tez danıőmanım Prof. Dr. Süleyman SANDAL'a, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji AD Başkanı Prof. Dr. Sedat YILDIZ'a, Anabilim Dalımızın kıymetli Hocaları Prof. Dr. Alaadin POLAT, Prof. Dr. Halil DÜZOVA, Prof. Dr. Nurettin AYDOĞDU, Doç. Dr. Suat TEKİN ve asistanlığa birlikte başladığımız yol arkadaşım Arő. Grv. Dr. Ümit YILMAZ'a teşekkür ederim.

Tezimin laboratuvar çalıőmaları aşamasında bilgi ve tecrübelerini yanı sıra laboratuvar altyapılarıyla da destek olan Prof. Dr. Ahmet KOÇ'a, histolojik değerlendirmeler için Prof. Dr. Mehmet GÜL ve histoloji anabilim dalı asistanı Arő. Grv. Semir Gül'e teşekkür ederim.

Tez çalıőmama maddi destek sağlayan **İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi**'ne, deney hayvanlarının temini ve bakımını sağlayan **İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi**'ne ve çalıőanlarına teşekkür ederim.

Hayatım boyunca varlıkları ve dualarıyla her zaman yanımda olan, güç veren, destek olan, yol gösteren kıymetli aileme teşekkür ederim.

Kevser TANBEK

ÖZET

Sıçanlarda Glukoz Homeostazının Düzenlenmesinde Glukagonun Merkezi Sinir Sistemindeki Etkilerinin Araştırılması

Amaç: Kan glukoz homeostazının sağlanmasında glukoz metabolizmasının kontrolünde önemli olan hormonal mekanizmaların düzenlenmesi esastır. Bu çalışmanın amacı merkezi glukagonun akut ve uzun süreli infüzyonunun MSS'deki muhtemel etkisinin pankreasın endokrin salgıları üzerindeki düzenleyici rolünü aydınlatmaktır.

Materyal ve Metot: Çalışma akut (120 dk) ve uzun (7 gün) intraserebrovasküler (icv) glukagon uygulanan iki ayrı protokol şeklinde planlandı. Glukagon ve çözücü (yapay Beyin Omurilik Sıvısı; yBOS) pankreatik denervasyondan (PD) sonra akut gruplarda mikro enjektör, uzun süreli gruplarda ozmotik mini pompa (1µg/10µl/dk) ile icv uygulandı. 90 adet 220-280 g ağırlığında erkek *Wistar albino* sıçan Kontrol, yBOS (120 dk), Glukagon (120 dk), PD+yBOS (120 dk), PD+Glukagon (120 dk), yBOS (7 gün), Glukagon (7 gün), PD+yBOS (7 gün), PD+Glukagon (7gün) olacak şekilde gruplara (n=10) ayrıldı. ELISA yöntemi ile serum glukagon, insülin ve epinefrin seviyeleri, beyin AgRP/POMC ve pankreas insülin/glukagon seviyeleri Western Blot ve immünofloresan yöntemiyle değerlendirildi.

Bulgular: Kısa süreli icv glukagon uygulamasının etkilerinin incelendiği protokolde glukagon seviyesindeki artış ve kan glukozu, insülin ve glukagon seviyelerindeki azalma kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p \leq 0.05$). Glukagon uygulamasının uzun süreli etkilerinin incelendiği protokolde yBOS (7 gün) grubuyla kıyaslandığında, PD (7 gün) ve PD+Glukagon (7 gün) gruplarında POMC ve AgRP seviyelerinde azalma istatistiksel olarak anlamlıdır ($p \leq 0.05$). PD (7 gün), Glukagon (7 gün) ve PD+Glukagon (7 gün) uygulanan gruplarda yem tüketimi ve vücut ağırlığındaki artış, pankreas glukagon seviyelerindeki artış ve insülin seviyelerindeki azalma kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlıdır ($p \leq 0.05$).

Sonuç: Çalışma bulgularımız glukagonun glukoz homeostazı üzerinde kan glukozu ve otkrin etkilerin yanısıra çok daha fazla rolü olabileceğini ve bu etkinliğini hem periferal hem de merkezi olarak iştahın düzenlenmesinde de rolünün olabileceğine dair kanıtlar sağlamıştır. Pankreastan salgılanan glukagon beyinde bir nörohormon gibi etki göstererek kan glukozunda etkili olan merkezi yollarında uyarımını sağlamıştır.

Anahtar Kelimeler: Beyin, Glukagon, Glukoz homeostazı, İnsülin, Pankreas

ABSTRACT

Investigation of the Effects of Glucagon on Central Nervous System in Regulating Glucose Homeostasis in Rats

Aim: The regulation of hormonal mechanisms that are important in the control of glucose metabolism is essential in maintaining blood glucose homeostasis. This study aims to elucidate the possible effect of the acute/long term infusion of central glucagon on the CNS as the regulatory role on the endocrine secretions of the pancreas.

Materials and Methods: This study was planned as two separate protocols to examine acute (120 min) and long term (7 days) intracerebrovascular (icv) glucagon effect. Glucagon and solvent (artificial Cerebrospinal Fluid; aCSF) were administered after pancreatic denervation (PD) by micro injector and osmotic mini pump (1µg/10µl/min) in acute and long-term groups respectively. 90 male *Wistar albino* rats weighing 220-280 g were divided into groups (n = 10). Control, aCSF (120 min), Glucagon (120 min), PD+ aCSF (120 min), PD+Glucagon (120 min), aCSF (7 days), Glucagon (7 days), PD+aCSF (7 days), PD+Glucagon (7 days) were divided into groups (n = 10). Serum glucagon, insulin and epinephrine levels analyzed by ELISA method, brain AgRP/POMC and pancreatic insulin/glucagon levels were evaluated by western and IF method.

Results: In the protocol in which the effects of short-term icv glucagon administration were examined, the increase in glucagon level and the decrease in blood glucose, insulin and glucagon levels were statistically significant compared to the control group ($p \leq 0.05$). In the protocol where the long-term effects of glucagon administration were examined, the decrease in POMC and AgRP levels in PD (7 days) and PD+Glucagon (7 days) groups was statistically significant when compared to the aCSF (7 days) group ($p \leq 0.05$). Increase in feed consumption and body weight, pancreatic glucagon levels and decrease in insulin levels in PD (7 days), Glucagon (7 days) and PD+Glucagon (7 days) groups were statistically significant compared to the control group ($p \leq 0.05$).

Conclusions: Our study findings provided evidence that glucagon may have a much greater role in glucose homeostasis besides blood glucose and autocrine effects, and that this activity may have a role in appetite regulation both peripherally and centrally. In addition, glucagon secreted from the pancreas acted as a neurohormone in the brain, stimulating the central pathways on blood glucose.

Key words: Brain, Glucagon, Glucose homeostasis, Insulin, Pancreas

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AgRP	: Agouti-related protein
ARC	: Arkuat Nükleus
BDNF	: Beyin türevli nörotrofik faktör
°C	: Santigrad Derece
CART	: Kokain ve Amfetamin ile Düzenlenen Transkript
DM	: Diabetes Mellitus
g	: Gram
GLUT	: Glukoz Transporter Protein
HbA1c	: Glikozillenmiş Hemoglobin
HDL	: Yüksek yoğunluklu lipoprotein
icv	: intraserebroventriküler
L	: Litre
M	: Molarite
MCH	: Melanin konsantre edici hormon
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mmol	: Milimol
MSS	: Merkezi sinir sistemi
n	: Denek Sayısı (Adet)
nm	: Nanometre
nmol	: Nanomol
NPY	: Nöropeptit Y
pmol	: Pikomol
POMC	: Proopiomelanokortin
PVH	: Paraventriküler Hipotalamik
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
rpm	: Devir/Dakika (Revolution per minute)
TrkA	: Tyrosine kinase receptor A
VMH	: Ventromedial alan
µg	: Mikrogram
µmol	: Mikromol

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Plazma glukoz kullanımını ve regülasyonunda rol alan organlar	4
Şekil 2.2. Pankreas α ve β langerhans adacık hücrelerinin kan glukozuna hücrese cevapı	8
Şekil 2.3. İnsülin ve glukagon salınımının hormonal kontrolü	9
Şekil 2.4. Proinsülin ve insülinin amino asit dizilimi	10
Şekil 2.5. Proglukagon peptid yapısı ve glukagon hormonunun amino asit dizilimi	12
Şekil 2.6. Enerji metabolizmasının düzenlenmesinde rol alan hipotalamik bölgeler	14
Şekil 2.7. Paxinos & Watson sıçan beyin atlasında arkuat nükleus bölgeleri (50)	15
Şekil 2.8. Besin alımı ve enerji dengesinde rol alan arkuat nükleus nöronları (51)	15
Şekil 2.9. POMC peptidazlar ile dokuya özgü daha küçük aktif moleküllere dönüşür(83)	21
Şekil 2.10. Glukagon hormonunun merkezi uygulamasının mevcut literatür bilgileri doğrultusunda açıklanmaya çalışılan etki yolları ve mekanizmaları	23
Şekil 3.1. Merkezi olarak tek doz uygulanan glukagonun kısa süreli (120 dk) etkisinin incelendiği çalışma protokolü.....	25
Şekil 3.2. Merkezi olarak bir hafta (uzun süreli) uygulanan glukagonun etkisinin incelendiği çalışma protokolü.....	26
Şekil 3.3. Beyin infüzyon kiti ve ozmotik mini pompanın yerleştirilmesi.....	27
Şekil 3.4. Sıçan dorsoventral kesitinde pankreatik sinirlerin şematik gösterimi PD işlemi esnasında çekilmiş fotoğrafta pankreatik sinir liflerinin gösterimi	27
Şekil 3.5. Pankreatik denervasyon cerrahi operasyon basamakları	29
Şekil 3.6. İnsülin ELISA kiti referans standartlarının seri dilüsyonu	32
Şekil 3.7. Glukagon ELISA kiti referans standartlarının seri dilüsyonu	32
Şekil 3.8. Epinefrin ELISA kiti referans standartlarının seri dilüsyonu	33
Şekil 3.9. Norepinefrin ELISA kiti referans standartlarının seri dilüsyonu	34
Şekil 3.12. ELISA analizlerinde kullandığımız ELISA plate reader	36
Şekil 3.13. SDS jellerin hazırlanması	38
Şekil 3.14. Çalışmamızda kullanılan 4 jelli dikey elektroforez tankı ve güç kaynağı ...	39
Şekil 3.15. Blotlama işleminden sonra proteinlerin jelden PVDF membrana transfer basamakları	40

Şekil 3.16. PVDF membrana transfer edilen proteinlerin süt tozu çözeltisinde bloklama işlemi	40
Şekil 3.17. PVDF membranın +4°C’de primer antikor ile inkübasyonu ve yıkama aşamaları	41
Şekil 3.18. Çalışmamızda kullandığımız Western Blot görüntüleme sistemi	42
Şekil 3.19. İmmünofloresan analizleri için kroyostat ile beyin ve pankreas kesitlerinin hazırlanması	43
Şekil 4.1. 7 gün süreyle merkezi olarak glukagon uygulanmasının sıçanların vücut ağırlığı % değişimi üzerine etkileri	46
Şekil 4.2. 7 gün süreyle merkezi glukagon uygulanmasının sıçanların haftalık yem tüketimi üzerine etkileri	47
Şekil 4.3. Merkezi olarak glukagon uygulanmasının sıçanların kan glukozu değişimi üzerine etkileri	48
Şekil 4.4. Merkezi olarak glukagon uygulanmasının sıçanların kan glukozu değişimi üzerine etkileri	49
Şekil 4.5. Merkezi olarak glukagon uygulanmasının sıçanlarda serum insülin düzeyi üzerine etkileri	51
Şekil 4.6. Merkezi olarak glukagon uygulanmasının sıçanlarda serum glukagon düzeyi üzerine etkileri	53
Şekil 4.7. Merkezi olarak glukagon uygulanmasının sıçanlarda serum epinefrin düzeyi üzerine etkileri	55
Şekil 4.8. Pankreatik denervasyon cerrahi uygulanmasının sıçanlarda pankreas dokusu norepinefrin düzeyi üzerine etkileri	57
Şekil 4.10. Merkezi olarak glukagon uygulanmasının sıçanlarda Glukagon/ β -Aktin oranına etkisi	61
Şekil 4.11. Merkezi olarak glukagon uygulanmasının sıçanlarda AgRP / β -Aktin oranına etkisi	63
Şekil 4.12. Merkezi olarak glukagon uygulanmasının sıçanlarda POMC/ β -Aktin oranına etkisi	65
Şekil 4.13. Sıçanların pankreas dokusu üçlü immünofloresan boyama. Sıçan pankreas adacık hücrelerini gösterimi.	67
Şekil 4.14. Sıçanların beyin dokusu ikili immünofloresan boyama.	69
Şekil 4.15. Sıçanların beyin dokusu ikili immünofloresan boyama.	71

TABLolar DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 3.1. SDS-poliakrilamid jelin içerdđđđ kimyasal maddeler ve jelin yoğunluđđđna göre deđđđşen madde miktarları.	37
Tablo 3.2. Western Blot analizlerinde kullanılan primer ve sekonder antikörlerin katalog numaraları ile dilüsyon oranları	41
Tablo 3.3. İmmünofloresan analizlerinde kullanılan primer ve sekonder antikörlerin katalog numaraları ile dilüsyon oranları	44
Tablo 4.1. 7 gün süreyle merkezi olarak glukagon uygulanmasının sıçanların vücut ađđđrlıđđđ % deđđđşimleri.	46
Tablo 4.2. 7 gün süreyle merkezi olarak glukagon uygulanmasının sıçanların haftalık yem tüketimi üzerine etkileri.....	47
Tablo 4.3. Gruplara göre sıçanların haftalık ortalama kan glukoz düzeyleri (mg/dl)	50
Tablo 4.4. Merkezi olarak glukagon uygulanmasının sıçanlarda serum insülin düzeyleri.	52
Tablo 4.5. Merkezi olarak glukagon uygulanmasının sıçanlarda serum glukagon düzeyleri.	54
Tablo 4.6. Merkezi olarak glukagon uygulanmasının sıçanlarda serum epinefrin düzeyleri.	56
Tablo 4.7. Pankreatik denervasyon cerrahi uygulanmasının sıçanlarda pankreas dokusu norepinefrin düzeyi üzerine etkileri.	58
Tablo 4.8. Merkezi olarak glukagon uygulanmasının sıçanlarda insülin/ β -Aktin oranına etkisi.	60
Tablo 4.9. Merkezi olarak glukagon uygulanmasının sıçanlarda Glukagon/ β -Aktin oranına etkisi	62
Tablo 4.10. Merkezi olarak glukagon uygulanmasının sıçanlarda AgRP/ β -Aktin oranına etkisi	64
Tablo 4.11. Merkezi olarak glukagon uygulanmasının sıçanlarda POMC/ β -Aktin oranına etkisi	66

1.GİRİŞ

Sağlıklı bireylerde, günün herhangi bir saatinde, yemekler sırasında ve yemekler arası kısa veya uzun süren açlık dönemlerinde, kan şekeri seviyesi belirli sınırlar içinde sabit seyretmektedir. Glukoz homeostazi olarak isimlendirilen bu biyolojik ayar, dört ayrı organın işlevi ile gerçekleşmektedir. Bu organlar, karaciğer, pankreas (endokrin fonksiyon), kas ve yağ dokularıdır. Glukoz homeostazisi çeşitli fizyolojik süreçlerin bir sonucudur ve birçok hormon bu dengenin korunmasında rol alır. İnsülin, glukagon, kortizol, epinefrin ve büyüme hormonu bu dengeyi düzenleyen endokrin hormonların en önemlilerindedir (1). Diğer birçok düzenleyici hormon, molekül ve sinirsel uyarılar bu hormonların sentez, salınım ve etkinliğini değiştirerek kan glukoz homeostazında etki gösterir (2).

İnsülin ve glukagon, etkileri bakımından bir paranın iki yüzü gibidirler ve periferde etkilerini zıt fizyolojik koşullarda gösterirler. Hipoglisemi glukagon sekresyonunda uyarıma, hiperglisemi ise inhibisyona yol açarken insülin sekresyonu için durum tam tersidir. Glukagonun ana eylemi, glikojenoliz ve glukoneojenez yollarını uyararak karaciğer tarafından glukoz üretimini arttırarak kan glukoz düzeyini arttırmaktır. İnsülin ise artmış kan glukozuna cevap olarak artar, yağ ve kas doku içerisine glukozun alımını arttırarak artmış kan glukozunu normal seviyelere düşürür. İnsülin hormonu beyinde iştah ile ilgili nöronlar üzerine etki ederek besin alımını etkilediği ayrıca karaciğer tarafından glukoz üretimini etkileyerek kan glukoz homeostazında rol oynadığına dair kuvvetli deliller mevcuttur (3). Glukagonun periferdeki insüline zıt etkisinin, beyinde insülinin etkin olduğu bölgelerde nasıl olduğu ise henüz tam olarak açıklanamamıştır (4). Beyinde glukagonun bağlanma bölgeleri olfaktör tüberkül, hipokampus, anterior hipofiz, amigdala, septum, medulla, talamus, olfaktör bulbus ve hipotalamusta tespit edilmiştir. Glukagonun intraseroventriküler (icv) olarak uygulanmasının beyindeki iştah merkezlerini etkilemesi ve besin alımını değiştirerek kan glukoz homeostazında rol oynaması muhtemeldir (5-7).

Bu tez çalışması ile glukagonun merkezdeki muhtemel etkilerinin ve etki mekanizmasının nasıl olacağına dair kanıtlar elde edilmeye çalışıldı. Merkezi olarak glukagon uygulandığında insülinin etki gösterdiği iştah merkezlerinde nasıl bir etki yaptığı ve bu etkiyi perifere nasıl yansıttığına dair yollar incelendi. Kan glukoz homeostazında kilit rol alan pankreastan insülin ve glukagon salınımı üzerine sinirsel

yansımaları araştırıldı. Endokrin bir bez olan pankreasın sinirsel kontrolünde merkezi sinir sisteminin (MSS) rolü ve bu merkeze pankreastan salınan glukagonun etkileri incelendi. Periferdeki kan glukoz homeostazındaki düzenleyici mekanizmanın tam olarak bilinmeyen bir parçasının (glukagon yönüyle) açıklanmasına katkı sağlamak amaçlandı.

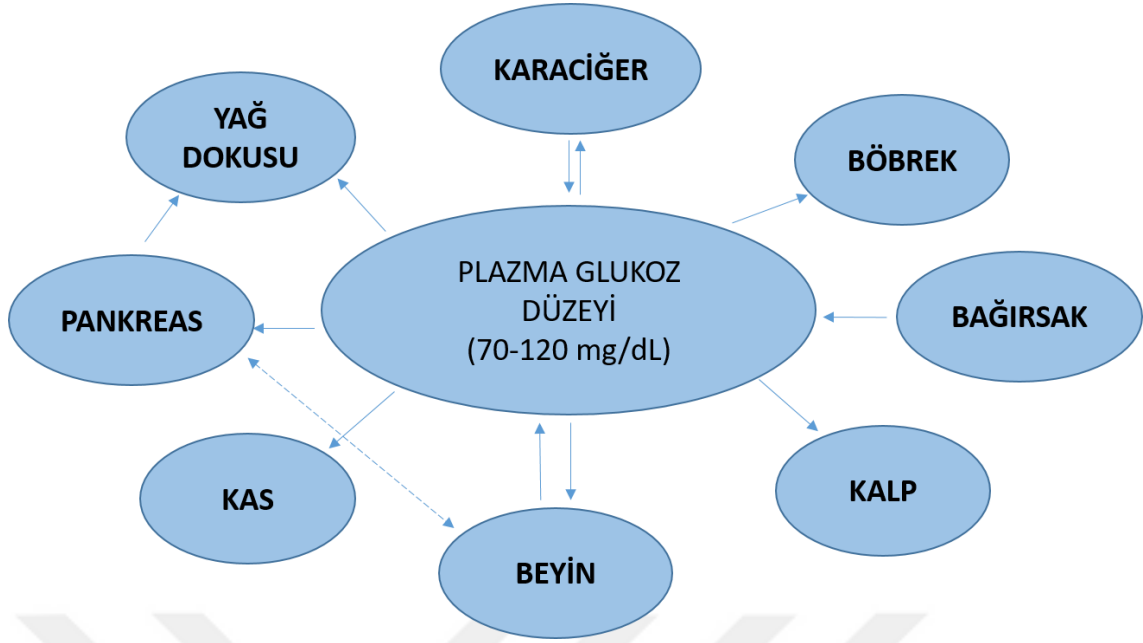


2.GENEL BİLGİLER

2.1. Glukoz Homeostazi

Glukoz, sindirimi, dokulara alınması, karaciğerde depolanması ve yeniden sentezlenerek tekrar kana verilmesine kadar tüm metabolik süreç ve yolları sıkı bir şekilde düzenlenmiş en önemli enerji kaynağıdır. Kan glukoz seviyesi, beslenme veya aktivite durumundaki değişikliklere rağmen, gün boyunca oldukça stabildir. Bu stabilite glukoz homeostazisi olarak adlandırılan çeşitli fizyolojik süreçlerin bir sonucudur ve birçok organ koordineli bir şekilde bu dengenin korunmasında rol alır. Glukoz homeostazi karaciğer, pankreas (endokrin salgı), kas ve yağ dokularının karşılıklı koordinasyonu ile gerçekleşmektedir. İnsülin, glukagon, kortizol, epinefrin ve büyüme hormonu bu organlar arasındaki koordinasyonu sağlayan endokrin hormonların en önemlilerindedir (1).

Glukoz homeostazının sağlanmasında, glukoz metabolizmasının kontrolünde önemli olan hormonal mekanizmaların düzenlenmesi esastır (8). Kan dolaşımında glukozun varlığı, pankreasın β -adacık hücrelerinden insülinin üretimini ve salınmasını uyarır. İnsülin varlığı birçok dokuda glukozun hücre içine alınmasını, hormonal ve nöronal uyarıların oluşumunu tetikler. Böylece tüm sistem bu dengenin sağlanması için çalışır. İnsülinin keşfinden uzun yıllar sonra bile glukoz homeostazisinin sadece periferik süreçlerle düzenlendiği düşünülmüştür. Bununla birlikte, kan glukozundaki değişikliklerde hormonal dengenin sağlanmasında nöronal kontrol sistemlerinin de etkin olduğu ve tedavi süreçlerinde nöronal etkilerin göz önüne alınarak uygulanan tedavi yöntemlerinin daha etkili olacağı son yıllarda yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (9).



Şekil 2.1. Plazma glukoz kullanımı ve regülasyonunda rol alan organlar

2.2. Glukoz Homeostazında Karaciğer

Glukoz homeostazında, pankreas, kas ve yağ dokuların da çok önemli işlevleri bulunmakla birlikte karaciğerin merkezi rolü çok özel bir yer tutar. Karaciğer kan şekeri kaynağı olmanın dışında, gerektiğinde glukozu sistemik dolaşıma verip kan glukozunu artırır ve gerektiğinde dolaşımdan glukozu alıp depo ederek kan glukozunu düşürür. Böylece kan glukozunu düzenlemedeki rolünü gerçekleştirir.

Sağlıklı bireylerde, bazal (postabsorptif) şartlarda karaciğerin ürettiği glukoz ile beyin ve insüline duyarlı dokuların kullandığı glukoz birbirine eşittir. Bu yüzden normal şartlarda postabsorptif dönem boyunca kan glukoz düzeyi daima normoglisemik kalır. Sağlıklı bir karaciğerin saatte ürettiği 10 g glukozun, 6 g'ı beyin, 4 g'ı ise karaciğer, kas ve yağ dokusu gibi insüline duyarlı dokularda kullanıldığı bir denge mevcuttur.

Açlıkta kan glukozunun düzenlenmesi ise karbonhidrat metabolizmasının en kompleks ve bir çok sistemin rol aldığı reaksiyonlar zincirine bağlıdır. Süre açısından açlık; postabsorptif dönem (emilimden sonraki 6-12 saat), kısa süreli açlık (emilimden sonraki 12-72 saat) ve uzamış açlık (2 hafta veya daha uzun süreyle yiyeceğin yenmemesi) olarak üç evreden oluşur. Postabsorptif dönemde kan glukozu karaciğer glikojeninin mobilizasyonu ile karşılanır. Kısa süreli açlıkta öncelikle glikojenoliz hızlanarak karaciğer glikojeninin tümünü mobilize eder. Glikojenin miktarı sınırlı olduğu için 12 saatte tükenir ve arkasından glikoneogenez devreye girer (10). Bu dönemde kana

verilen glukoz sadece hayati organlar tarafından kullanılır. Glikoneogenezin aşırı artış gösterdiği uzamış açlık döneminde, doku proteinlerini korumak için hiperglukagonemi, beynin yağ asitleri ve keton cisimlerinin enerji kaynağı olarak kullanmasını sağlar. Bu dönemde, plazmada artmış serbest yağ asitleri glukozun periferik dokular tarafından kullanılmasını engellerken (11) keton cisimleri, MSS de dahil pek çok doku tarafından yakıt olarak kullanılır. Glukagon artışı ile paralel bir şekilde, üçüncü faz olarak da bilinen bazal insülin salgısı azalmaktadır. Bu azalma, adacık β -hücrelerinin glukozu cevabının azalmasının bir sonucudur. Moleküler düzeyde yapılan çalışmalar, postabsorptif dönemde cAMP düzeyinin azaldığını (12), uzamış açlık döneminde ise glikokinaz aktivitesinin azaldığını (13) göstermiştir.

Glukoz, öncelikle ilkel bir mekanizma ile karaciğerin glukoz üretimini düzenlemektedir. Herhangi bir endokrin müdahale olmaksızın glukoz üretimi hepatosit içindeki glukoz yoğunluğu ile kontrol edilmektedir. Yemekler sırasında portal ven ile karaciğer hücresine giren glukoz önce fosforilaz enziminin aktivitesinin azalmasını sağlayan allosterik mekanizmayı aktive ederek glikojenolizi frenler yani hepatositin glukoz üretimini durdurur (hepatik inhibisyon). Kan glukoz düzeyinin belirli bir düzeye ulaşmasını takiben karaciğer hücresi glukozu kullanmaya başlar. Hormonal düzenleyici mekanizmaların da devreye girmesiyle glikojen sentetazın aktivitesi artar ve glikojen depolanır. Diğer yandan glikoliz aracılığı ile enerji oluşturarak kan glukoz miktarını azaltır.

İkinci mekanizma olarak önerilen endokrin düzenlemede ise karaciğerin kana glukoz verme eşiğini belirleyen hormonlar rol alır. İnsülin bu eşik seviyesini aşağıya indirirken başta glukagon ve kortizol olmak üzere pek çok karşı düzenleyici (kontregülatuar) hormon kan glukoz seviyesini arttırır. Açlıkta kandaki endojen glukagon artışı güçlü bir şekilde glikojenoliz yoluyla hepatik glukoz üretimini uyarır. Glukagon miktarındaki 10 $\mu\text{l/ml}$ 'lik bir artış hepatik glukoz üretimini %25 oranında arttırabilir (14).

Daha gelişmiş canlılarda bu iki mekanizmaya ilave olarak adrenal medulla ve MSS aracılığı ile düzenlenen bir mekanizma daha mevcuttur. Bu mekanizma, yukarıda açıklanan iki mekanizmadan farklı olarak normal koşullarda değil sadece şiddetli hipoglisemide veya yaşamı tehdit eden stres hallerinde devreye girmektedir. Glukoz homeostazı açısından intrinsek hepatik düzenleme, endokrin sistem ve acil nörohormonal mekanizmalar arasında önemlilik derecesi düşünmek doğru bir yaklaşım değildir. Şöyle

ki ilkel dzenleme, karaciğer hücresinin biyokimyasal - enzimatik ayar fonksiyonunda saklı bulunurken endokrin dzenleme, gelişmiş bir organizmayı dış ortama karşı bağımsız kılabilen daha duyarlı bir denge sağlar. Acil dzenleme ise çok gelişmiş canlıların MSS gibi kendisi için hayati ve tamamen özgülleşmiş dokularını hipoglisemiden koruma yoludur.

Acil durumlarda kasların glukoz kullanımı artmakta ve bu artış hepatic glukoz üretimi ile dengelenmektedir. Pankreasa gelen adrenerjik uyarıların pankreas üzerindeki etkileri reaksiyonları başlatır. Adrenerjik uyarılar, adacık α hücrelerinden aşırı glukagon salgılatırken β -hücrelerinin insülin sekresyonunu inhibe eder. Böylece beyin ve kaslar dışındaki dokulara glukoz girişi azalır ve kasların aşırı glukoz kullanmasına rağmen normoglisemi ve serebral kullanımı korunmuş olur. Fizyolojik glukagon seviyesinin yağ dokudan gliserolün (15), kas dokudan ise glukoneojenik amino asit (16) mobilizasyonuna direkt etkisi yoktur. Bu işlevdeki dzenlenme sistemik azalan insülin seviyesinden kaynaklanmaktadır (14).

Ağır bir hasarın yarattığı hipovolemik şokta glukoregülasyon yine karaciğerin aşırı glukoz üretimi ile önlenir. Hipovolemik şokta serebral kan akımı azalır, iyi perfüze edilemeyen beyin dokusuna arteriyel yolla bol miktarda glukozun ulaştırılması hayatidir. Beyine giden azalmış kan akımı, yükselmiş arteriyel glukoz sayesinde iyi tolere edilmektedir (11). Bunun gerçekleşebilmesi için, beyin pankreas dokusu adacık sistemini tümü ile kontrolü altına alır ve adrenerjik uyarılarıyla, glukagon salgısı artarken insülin salgısı azalır (17). Bu hallerde stress hormonları olarak sınıflandırılan büyüme hormonu, β -endorfin ve kortizol de glukagon salgısının artışına destek olmaktadır. Ayrıca kortizolün glukagonun hepatic etkisini arttırdığı gösterilmiştir (18).

2.3. Glukoz Homeostazında Kas Doku

Besin alımını takiben kanda glukoz konsantrasyonu belirgin bir şekilde artarken yağ asidi konsantrasyonu azalır. Kandaki glukoz, kas ve karaciğer dokusunda glikojen formunda depo edilirken yağ dokuda ise trigliserid depo şekillerine dönüştürülür. Amino asitler ise protein yapıların oluşumuna katıldığından enerji yönünden ön plana çıkmazlar. Besin alımından sonra kanda artan glukoz düzeyi ile birlikte bir polipeptit hormon olan insülin seviyesi de 4-5 kat artarken glukagon hormon düzeyi düşer.

Rezorpsiyon fazında ana enerji substratı glukoz, esas hormon da insülinidir. İskelet kası ve tokluk periyodunda karaciğer hücrelerinde glikojen formunda depolanmış olan

glukoz, açlık periyodunda harcanarak kan glukozu sabit bir seviyede tutulur. İskelet kasında glukoz 6-fosfataz bulunmadığından kasdaki depo glikojen kan glukozuna doğrudan katkı yapamaz. Anaerobik glikolizle kasda oluşan laktat, karaciğere taşınır ve glukoneojenezle glukoz sentezlenerek tekrar kan yolu ile kasa taşınır (Cori siklusu).

2.4. Glukoz Homeostazında Yağ Doku

Sinir hücreleri gibi eritrosit, lökosit ve renal medulla hücreleri de gereksinim duydukları enerjiyi yalnızca glukozdan karşılayabilirler. Bu nedenle, dolaşımdaki glukozun belirli değerler aralığında dengede tutulması önemlidir (19,20). Yeterli miktarda karbonhidrat alındıktan sonra, bu karbonhidratların sindirilerek emilmesi yolu ile kana geçen glukozun %50'si glikoliz ile enerjiye; %30-40'ı yağlara; %10'u da glikojene çevrilir ve bu şekilde yedek enerji deposu korunur (21). Açlıkta plazmadaki glukoz, aminoasit ve triaçilgliserol düzeyleri düşerken, insülin salınımında azalma glukagon salınımında ise artma olur. İnsülin/glukagon oranındaki azalma ile beraber dolaşımda glukoz miktarı azalır ve triaçilgliserol, glikojen ve proteinler kan glukozunu dengelemek için yıkılır. Oluşan bu katabolik durumda karaciğer, yağ dokusu, kas ve beyin arasındaki substrat değişimi sırasında öncelikle beyin ve glukoz gereksinimi olan diğer dokuların enerji gereksinimi için gereken plazma glukoz düzeyi sağlanmaya çalışılır. Diğer dokuların enerji gereksiniminin karşılanabilmesi için de yağ dokusundan yağ asitlerinin ayrılması ve karaciğerde keton cisimlerinin yapımı ve dolaşıma katılması artar (22).

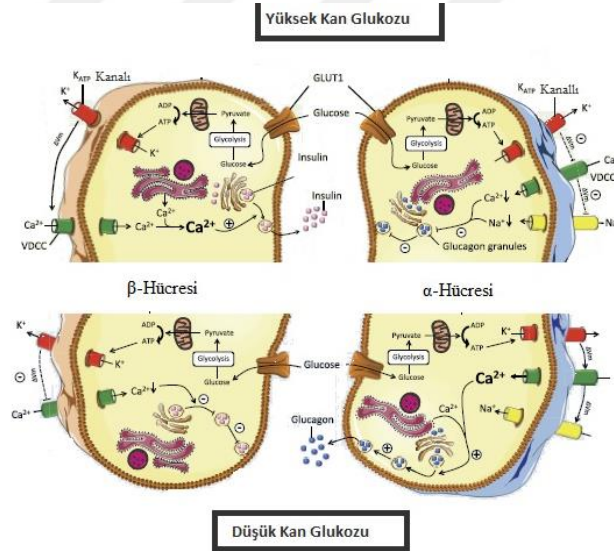
Yağ ve kas hücreleri var olan insüline cevap vermez ve glukozu hücre içine almazsa kan şekeri yükselir. Bu durumda karaciğer glukoz üretimini durdurur ve dolaşımdaki fazla glukozu hücre içerisine alarak glikojen halinde depolar. Ancak insülin direnci olan kişilerde karaciğer glukoz üretmeye ve ürettiği glukozu kana salmaya devam eder. İnsülin direncine etkisi olan üçüncü bir doku da yağ dokusudur. Yağ dokusu basit bir besin deposu olmayıp, kendi hormonları olan endokrin bir bez gibi fonksiyon gösterir. Sağlıklı bir kişide insülin kanda dolaşan yağların, yağ dokusunda toplanmasını sağlarken insülin direnci gelişmiş kişilerde yağ dokusu dolaşımdaki yağları hücre içerisine alamadığı gibi kana yağ asitleri salgılar. Kan glukoz seviyesinin düşmemesi, yağların dolaşımdan temizlenememesi ve yağ asitlerinin artması pankreası daha fazla insülin salgılamaya zorlar. Pankreasın bu durumda insülin salgısını daha fazla artıramaması nedeniyle kan glukoz düzeyi artar ve tip 2 diyabet ortaya çıkar.

2.5. Glukoz Homeostazında Pankreas

Pankreas, hem ekzokrin hem de endokrin işlevi olan miks bir bezdir. Ekzokrin fonksiyonu, özel ve asinar hücreler tarafından pankreas salgısının sindirim sistemine salgılanması ile ilişkilidir. Asinar hücreleri pankreas kütlelerinin %90'ından fazlasını oluşturur.

Endokrin fonksiyonu ise Langerhans adacıklarının α ve β hücreleri tarafından salgılanan ve kana verilen hormonlarla ilişkilidir. α hücreleri glukagon adı verilen hiperglisemik bir hormon salgılayan, β hücreleri insülin adı verilen hipoglisemik bir hormon salgılayanlardır. Bu iki hormon, kan glukozunun düzenlenmesinde aktif olarak rol oynarlar. Langerhans adacık hücreleri pankreas kütlelerinin sadece %2'sini oluşturur.

İnsülin ve glukagon pankreas dokusundan sentezlenen ve fizyolojik koşullarda kan glukoz homeostazında birbirine zıt etki gösteren hormonlardır. Bu hormonların sentezi kana salınımı ve hücrelerin bunlara karşı duyarlılıkları glukoz metabolizmasının düzenlenmesinde önemlidir. Diğer birçok düzenleyici hormon ve molekül bu hormonların sentez, salınım ve etkinliğini değiştirerek kan glukoz homeostazında etki gösterir (2).



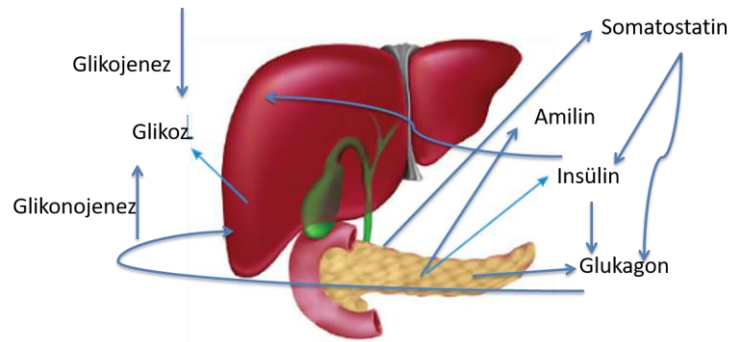
Şekil 2.2. Pankreas α ve β langerhans adacık hücrelerinin kan glukozuna hücresel cevabı

Yemekler sırasındaki glukoregülasyonda besin öğelerinin emilimine, Vagus sinirinin (sefalik faz refleksi insülin salgılanması) ve gastrointestinal hormonların (enterik faz insülin salgılanması) sağladığı optimal insülin salgısı öncülük eder. Sefalik erken faz

insülin salgısı, insüline duyarlı dokuların glukozu kullanmasını sağlar. Ayrıca, besinlerin sindirim aşamasında salgılanan somatostatin, besin emilimini ve kullanımını dengeleyerek, plazmada tehlike yaratacak birikimleri önler (23).

2011 yılında yapılan bir çalışmada fare ve insan pankreasındaki otonomik innervasyon immünokimyasal olarak karşılaştırılmış ve adacıklar arasındaki sinir mimarisinde farklılıklar olduğu ileri sürülmüştür (24). İnsanda daha seyrek görülen parasempatik aksonlardan kolinerjik uyarılar farede α ve β hücre sayısını azaltmaktadır. Fare pankreas dokusunda sempatik aksonlar glukagon ve somatostatin salgılayan pankreas adacık hücrelerinin çevresinde mevcuttur. Ancak insanlarda sempatik aksonlar endokrin hücreler ile temas etmezler bunun yerine damar düz kas hücrelerinin iç yüzeylerinde yayılım gösterirler. Bu bilgiler ışığında insanlarda, sempatik sinir sisteminin doğrudan uyarılması yerine dolaylı olarak adacık arteriyollerinin vazokonstriksiyonunu sağlayarak insülin salınımını kontrol ettiği öne sürülmektedir (25).

Glukagon salınımı üzerindeki tüm bu olası etkilerin ne ölçüde etkileşime girdiği ve hangi faktörlerin (varsa) baskın olduğu belirsizdir. Görünüşe göre adacık sekresyonunun entegre kontrolü üzerinde hem yerel hem de beyin etkinliği söz konusudur. Yapılan çalışmalarda deneysel olarak indüklenen hipoglisemi sırasında (artan glukagon ile gelişen patofizyolojik durum), glukagonu uyarabilen otonomik faktörlerin farklı etki gösterdikleri ileri sürülmektedir. Bu otonomik faktörler kan glukoz düzeyinin 80 mg/dL'nin seviyelerinde lokal adacık hücrelerinden insülin salınımının azaldığı, çoğunlukla düşük fizyolojik kan şekeri aralığında meydana gelir. Glukoz seviyeleri bu değerden daha az düşerse, otonom faktörlerin sıralı aktivasyonu devreye girer. Başlangıçta parasempatik ve sonra sempatoadrenal (dolaşımdaki katekolaminlerin artışı) stimülasyon; kan glukoz düzeyi 40 mg/dL'nin altında hipoglisemi meydana geldiğinde ise sempatik pankreas aktivasyonu başlar (26).

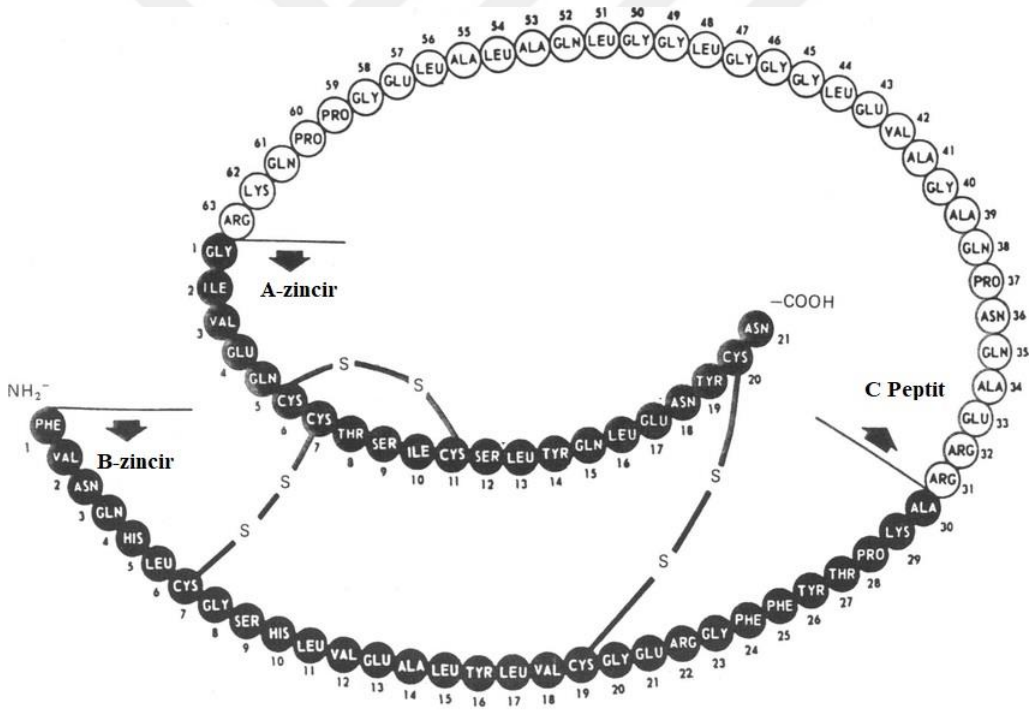


Şekil 2.3. İnsülin ve glukagon salınımının hormonal kontrolü

Pankreas innervasyonu ilk olarak 19. ve 20. yüzyılın başlarında tanımlandı. Yapılan çalışmalar pankreasın ekzokrin ve endokrin sekresyonlarının düzenlenmesinde parasempatik ve sempatik uyarıların etkin olduğunu göstermiştir. Parasempatik sistem insülin salgılanmasını uyarırken, sempatik sistem ise glisemiye artırmak için insülini azaltıp ve glukagon salgısını uyararak etki gösterir.

2.5.1.İnsülin

Pankreasın endokrin salgı yapan Langerhans adacık hücrelerinin %70-80'nini oluşturan β hücreleri tarafından proinsülin halinde sentezlenen 51 amino asitten oluşan bir hormondur. Proinsülinin %95'i insüline dönüşür. Proinsülin insülinin %5 aktivitesine sahiptir ve yarı ömrü insülinden daha uzundur. İnsülin aktivitesi göstermeyen C peptid kısmının ayrılması ve S-S bağlarının kurulmasıyla aktif insülin formuna dönüşür.



Şekil 2.4. Proinsülin ve insülinin amino asit dizilimi

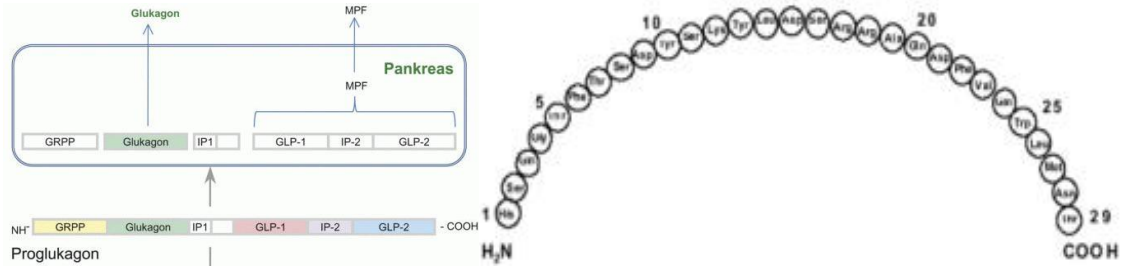
İnsülin geni, insülinin sentezlendiği ve salınmadan önce granüllerde depolandığı pankreatik β -adacık hücrelerinde eksprese edilir. β -hücrelerinden insülin salınımı kan glukoz düzeyindeki artış ile başlar. Eğer sekretuar uyarı devam ederse gecikmiş ve uzamış bir cevap olarak aktif insülin sentezi başlar. İnsülin sentezini ve salınımını

başlatan en önemli uyarıcı glukozdur. Glukozun pankreas hücre metabolizmasındaki etkileri otonomik sinir sisteminin normal kolinerjik etkileri ile birleşerek β -hücrelerinden insülin sekresyonunu sağlar. İntestinal hormonlar, lösin, arjinin gibi bazı aminoasitler ve sulfonilüre grubu bazı ajanlar insülin sekresyonunu başlatır ama insülin sentezi üzerine etkileri yoktur. İnsülinin anabolik bir hormon olarak başlıca fonksiyonları: Glukoz ve amino asitlerin transmembrana ulaşımı, karaciğer ve iskelet kaslarında glikojen oluşumu, glukozun trigliseridlere dönüşümü, nükleik asit ve protein sentezidir. Metabolizmada insülinin başlıca fonksiyonları ise vücut ağırlığının üçte ikisini teşkil eden kalp kası, fibroblast, yağ hücreleri ve çizgili kas hücreleri içerisine GLUT4 üzerinden glukoz transportunu sağlamak ve transport hızını arttırmaktır (27, 28).

İnsülinin etkisi, hedef hücre membranının yüzeyindeki reseptörüne bağlanması ile başlar. İnsan vücudundaki farklı birçok hücrede insülin reseptörü mevcuttur. Özellikle yağ, karaciğer ve kas hücrelerinin insüline biyolojik yanıt oluşturmaları, insülinin bu dokulardaki reseptörüne bağlanması ile oluşur. İnsülin reseptörleri insülini hızlı, yüksek özgüllükle ve pikomolar düzeyinde bile tanıyabilecek affiniteyle bağlarlar. İnsülin reseptörü, tek bir gen tarafından kodlanan, iki protein altünite içeren membran glikoproteini olup büyüme faktörü reseptör ailesi üyesidir. İnsülin molekülünü bağlayan 135000 kDa büyüklüğündeki α -altünitesi daha büyüktür ve tamamıyla hücre dışı yerleşimlidir. Daha küçük olan 95000 kDa büyüklüğündeki β -subunit ile α -subunit disülfid bağı ile bağlıdır. β -subunit hücre membranını boydan boya geçerek sitoplazmaya kadar ulaşır ve hücre içindeki kısımda özelleşmiş sinyal yollarını başlatan tirozin kinaz aktivitesine sahiptir (28).

2.5.2. Glukagon

Glukagon, pankreasın α -adacık hücreleri tarafından salgılanan 29 aminoasit içeren peptid yapılı bir hormondur. Primer olarak karaciğerde metabolize olur ve renal yolla plazmada inaktive edilir. Etki başlama zamanı intravenöz (iv) uygulamada 5-20 dk, intramüsküler (im) uygulamada 30 dk ve subkutan uygulamada 30-45 dk'dır. Eliminasyon yarı ömrü plazmada iv uygulamada 8-18 dk ve im uygulamada 26-45 dk'dır. Yarı ömrü kısa olduğu için tedavi amaçlı kullanımlarda etkisinin devamı için infüzyona gerek vardır.



Şekil 2.5. Proglukagon peptid yapısı ve glukagon hormonunun amino asit dizilimi (29)

Glukagon salgılanması kan glukoz seviyesine göre belirlenir. Hipoglisemi glukagon sekresyonunda uyarıma neden olurken hiperglisemi inhibisyona yol açar. Glukagonun ana eylemi, glikojenoliz ve glukoneojenez yollarını uyararak karaciğer tarafından glukoz üretimini arttırmaktır. İnsülinin karşı dengesindeki bu etki birçok enzim aktivitesi ve gen transkripsiyonu seviyelerindeki modülasyonunun neticesinde ortaya çıkar (30).

Glukagon sekresyonuna dair yapılan prelinik çalışmalarda, α -hücre kütlesi ve glukagon salgılanmasının amino asitler tarafından kontrol edildiği, buna karşın glukagonun üreajenez ve glukoneojenez yoluyla hepatik amino asit döngüsüne katkıda bulunabileceğini ve böylece yeni bir endokrin geri bildirim sistemi oluşturabileceği ileri sürülmektedir (31-33).

Glukagon birçok etkisini adipoz doku, kalp, pankreas β -hücreleri, gastrointestinal sistem, tiroid, böbrek ve MSS dahil olmak üzere ekstrahepatik dokularda gösterir (34). Sıçanlarda glukagon reseptör proteininin varlığı esas olarak karaciğer ve böbreklerde daha az oranda da kalp, yağ dokusu, dalak, adrenal bezler, pankreas ve beyin dokularında gösterilmiştir. Kan-beyin bariyerini geçebilen glukagonun (35) olfaktör tüberkül, hipokampus, anterior hipofiz, amigdala, septum, medulla, talamus, olfaktör bulbus, hipotalamus ve beyin sapı gibi beyinde bağlanma bölgelerinin varlığı tespit edilmiştir (4, 36). Glukagonun klasik reseptör sinyalleme kaskadı bileşenleri olan cAMP ve protein kinaz A'da beyin nöronlarında belirlenmiştir (37). Glukagonun glukoz homeostazı üzerine doğrudan periferik etkilerinin araştırıldığı çok sayıda çalışma olmasına karşın glukagonun merkezi uygulamasının periferik glukoz homeostazını nasıl etkilediğine dair yeterli sayıda çalışma ve literatür bilgisi bulunmamaktadır. Bu durum sadece farklı hayvan türleri üzerinde yapılan birkaç çalışma ile aydınlatılmaya çalışılmıştır (38-40).

Beyin dokusunda glukagon da dahil olmak üzere proglukagondan türetilen peptitlerin de bağlandığı glukagon reseptörleri, MSS'de yaygın olarak eksprese edilir (41) ve farklı beyin bölgelerine taşınır (42). Bununla birlikte glukagon etkisini, ağırlıklı olarak beyin sapında ve daha az ölçüde hipotalamusta gösterir (43).

Deneysel bir çalışmada intraserebroventriküler (icv) olarak uygulanan yüksek doz glukagon enjeksiyonunun, hayvanlarda geçici olarak hipoglisemiye neden olduğu ve sürekli enjeksiyonda ise hipogliseminin devam ettiği rapor edilmiştir (44). Glukagonun merkezi olarak glukoz düşürücü etkinliğini göstermek için beyin-karaciğer ekseninde planlanan bir başka çalışmada ise vagotomize köpeklerde pankreotektomi yapılarak pankreatik hiperglisemi engellenmiş ve özellikle hipotalamusun medyobazal bölgesine çok daha düşük dozlarda uygulanan glukagonun, glukoz düşürücü etkisinin daha fazla olduğu rapor edilmiştir (44, 45). Glukagonun icv olarak uygulanmasının beyindeki iştah merkezlerini etkilemesi ve besin alımını değiştirerek kan glukoz homeostazında etkili olması muhtemeldir. Ancak periferde insülünine zıt fizyolojik koşullarda etki gösteren glukagonun, insülünün MSS'de etki mekanizmasına karşı nasıl etki gösterdiği tam olarak aydınlatılmamıştır.

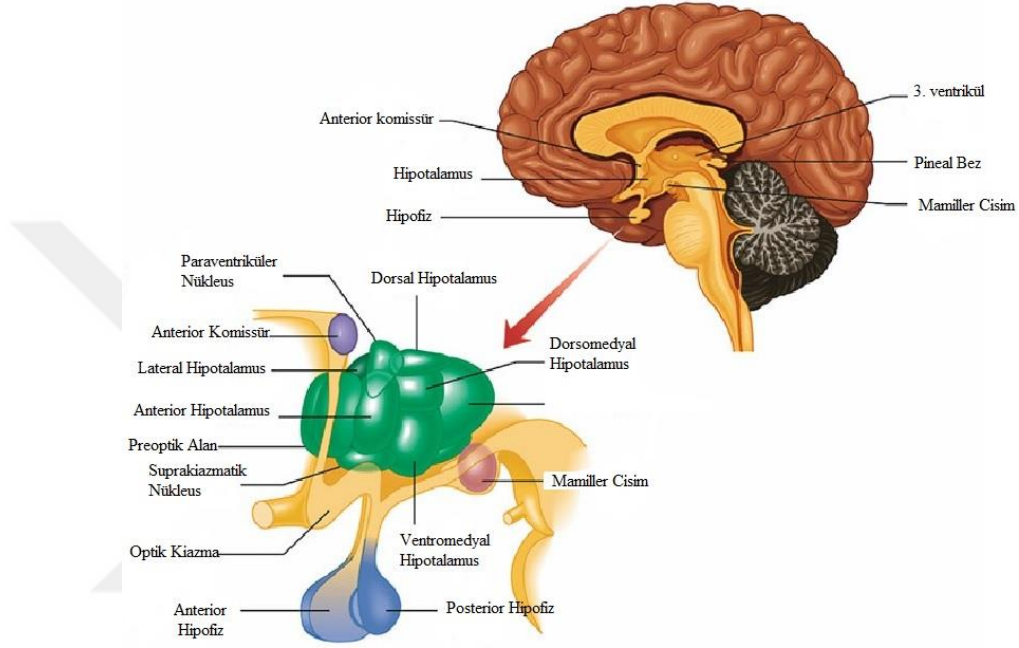
2.6. Glukoz Homeostazında Beyin

Kan glukoz homeostazında beynin etkin rol aldığına dair ilk literatür bilgisi Fransız fizyolog Clude Bernard tarafından 1856 yılında tavşanlarda 4. ventrikülde gerçekleşen dejenerasyonun glukozüriye neden olduğunu belirttiği çalışmadır (46). Claude Bernard, glukozun kana verilmesinde üretici (desassimilateur) adını verdiği sinirlerin, dokuların şekeri kullanmasında ise tüketici (assimilateur) olarak isimlendirdiği sinir liflerinin görev aldığını açıklamıştır. Dördüncü ventrikül tabanına bir iğne batırıldığında tavşanda meydana gelen hiperglisemiyi, beyinden çıkıp karaciğere ulaşan bir sinir grubunun (*nervus vagus*) bu sırada uyarılarak karaciğerden glukozu serbestleştirdiği şeklinde yorumlamıştır. Bundan dolayı bu sinirlere üretici sinirler adını vermiştir. Aynı mantıkla, beyinden çıkan diğer sinirler uyarıldığında periferik dokularda glukozun kullanılmasını artırmasından dolayı bu sinir grupları da tüketici sinirler olarak sınıflandırılmışlardır.

Glukoz homeostazında MSS'nin rolü bu sinir gruplarının koordineli bir şekilde çalışmalarını düzenlemektir. Sağlıklı bir organizmada bu iki sinir grubu uyumlu bir tarzda çalışarak kan glukoz seviyesini sabit tutmaktadır. Diyabette ise üretici sinirler aşırı çalışıp

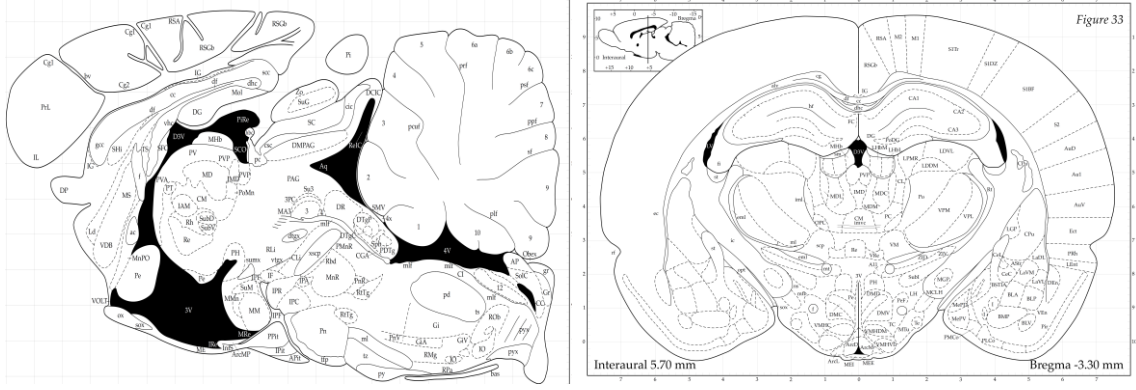
dokuların tükettiğinden fazla glukozu karaciğerden kana verdirdikleri için hiperglisemi meydana gelmektedir.

Aksonal projeksiyonlarla birbirine bağlı anatomik olarak farklı çekirdeklerden oluşan hipotalamus enerji dengesini düzenlemek için merkezi ve çevresel bilgileri birleştirir. Enerji metabolizmasının düzenlenmesinde hipotalamustaki arkuat nükleus, ventromedial, dorsomedial, paraventriküler ve lateral bölgeler önemli roller oynar (47).

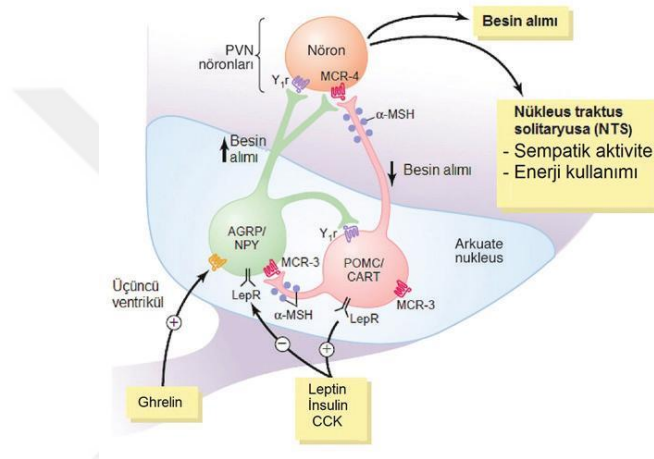


Şekil 2.6. Enerji metabolizmasının düzenlenmesinde rol alan hipotalamik bölgeler (48)

İnsanlarda hipotalamusta arkuat nükleus veya infundibular çekirdek kendi nöronları ile etkileşen periferik peptitlerin (ghrelin, leptin, peptit YY) kan-beyin bariyerini aşmasına ve sinyal iletmesine izin verir. Beyindeki bu alanlar gıda alımını azaltan ve kilo kaybına sebep olan proopiomelanokortin (POMC) ve kokain ve amfetamin ilişkili transkript (CART)'ın nöronlarının yanı sıra bunun tam tersi etki gösteren gıda ve kilo alımını artıran aguti-ilişkili protein (AgRP) ve nöropeptit Y (NPY) nöronlarını içerirler. Bu nöronlar ve peptitler açlık ve tokluk duygularını ve sonuç olarak kilo alımı ve kaybını kontrol ederler (49).



Şekil 2.7. Paxinos & Watson sıçan beyin atlasında arkuat nükleus bölgeleri (50)



Şekil 2.8. Besin alımı ve enerji dengesinde rol alan arkuat nükleus nöronları (51)

Son yıllarda yapılan bir çalışmada, serebral iskeminin farelerde insülin sekresyonunda artışa neden olduğu, bunun altında yatan mekanizmanın ise beyin dokusunda hasarlanan nöronların hayatta kalabilmesi için nerve growth factor/tyrosine kinase receptor (NGF/TrkA) miktarını arttırarak pankreas β -hücrelerinden insülin sentezini arttırdığı ileri sürülmüştür. Böylelikle artan insülin düzeyinin beyin dokusunda hasarlı nöronların hayatta kalabilmesi ve farklılaşması için gerekli olan glukozun hücre içine alımını arttırdığı bildirilmiştir (52). Yapılan bir başka çalışmada ise sıçanlarda merkezi uygulanan beyin türevli nörotrofik faktör (BDNF)'nin, pankreastan salınan insülin miktarını değiştirmeksizin glukagon miktarını azaltarak glukoz üretimini azalttığı gösterilmiştir (53). Beyinde farklı bölgelerin, özellikle hipotalamusta arkuat nükleus, ventromedial alan, traktus solitarius çekirdeğinin yanı sıra vagus sinirinin hücre gövdesinin de glukoz homeostazının regülasyonunda önemli olduğu kanıtlanmıştır (54).

İnsülin-leptin-melanokortin sistemi ve ATP duyarlı potasyum kanalları (K-ATP) dahil olmak üzere birçok hormon ve hücrel sinyal sistemlerinin, beyin mekanizmaları yoluyla glukoz homeostazisi üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir (55). Beyin sadece kan glukozundaki değişimlere karşı hormonal uyarıları düzenlemekle kalmaz aynı zamanda besin alımını da değiştirerek etki gösterir. Melanin konsantre edici hormon (MCH) ve oreksin A-B gibi oreksinejik etki gösteren hormonların, lateral hipotalamik alan ve perifornikal bölgede üretildiği ve besin alımını artırdıkları bilinmektedir (56, 57).

Son yıllarda bu aileye katılan diğer bir hormon ise NPY ile birlikte arkuat nükleusta üretilen, aguti geninin bir ürünü olan AgRP normalde alfa melanosit uyarıcı hormon (α -MSH) ile birlikte çalışır. Fazla üretildiği durumlarda obezitenin geliştiği gözlenmektedir. Besin alımını baskılayan nöropeptitler ise arkuat nükleusun perikarya bölümünde üretilen POMC ve α -MSH'dır (58). Besin alımının normal fizyolojik kontrolünde AgRP'nin rolü net bir şekilde bilinmemektedir ancak insan ve farelerde gen mutasyonlarına bağlı oluşan aşırı beslenme ve şişmanlık durumlarının yüksek AgRP ile paralellik gösterdiği bildirilmiştir (59). Vücudun enerji depoları azaldığında hipotalamusun arkuat çekirdeklerinin aktifleşen iştah açıcı nöronlarından NPY serbestlenir. Aynı zamanda POMC nöronlarının deşarjındaki azalmaya bağlı olarak, melanokortin yolunun aktivitesi azalır ve iştah daha fazla uyarılır (60). Hipotalamus POMC ve CART'ın üretimi vasıtasıyla tokluğun da ana regülatörü olarak görev yapar. İnsanlardaki hipotalamusla ilgili olarak adipoz doku tarafından üretilen bir peptit olan leptinin, arkuat nükleusdaki POMC'nin α -MSH dönüşümünü uyardığı düşünülmektedir. α -MSH, G protein bağlı reseptörlerine bağlanıp cAMP seviyesini artırarak beyinde paraventriküler nükleus ve diğer pek çok yerde iştah kontrolünde ve enerji homeostazında anahtar rol oynayan melanokortin reseptörü-4 (MCR-4) ifadesini artırır. Rodentlerde α -MSH'ın icv uygulanması beslenmeyi engeller ve vücut ağırlığını azaltır. Daha önce belirtildiği gibi AgRP, MCR-4'ün bir antagonistidir. Bu nedenle AgRP'nin aşırı ifade edildiği veya MC4R hasarlı fareler hiperfajik ve obezdirler. Bununla birlikte yapılan deneysel çalışmalarda farelerin α -MSH'ye karşı duyarlı olmadıkları da rapor edilmiştir (61).

Bu bilgiler doğrultusunda beynin, kan glukozundaki değişimleri algılayarak nöronal, endokrin sinyaller ve diğer hormonların etkinliği ve miktarlarını değiştirerek bu dengenin sağlanmasında etkin rol oynadığı düşünülmektedir.

2.6.1. Agouti-İlişkili Protein

Beyinde AgRP/NPY nöronları tarafından üretilen bir nöropeptit olan AgRP, güçlü oreksijenik aktiviteye sahip hipotalamik MCR-3 ve MCR-4'ün endojen bir antagonistidir (61, 62). 132 aminoasitlik bir protein olan AgRP'nin α -MCR önleyici aktivitesi, proteinin C terminali bölgesinde 87-132 amino asitleri arasında yer alan sistin köprüsü bölümüdür.

AgRP, hipotalamik arkuat nükleusun medial kısmındaki güçlü oreksijenik aktivite gösteren NPY üreten nöronlar tarafından üretilir. Merkezi AgRP üretiminin bir başka bölgesi hipotalamik çekirdektir. Hem AgRP hem de NPY ekspresyonunun leptin tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir. AgRP geninin delesyonu önemli bir metabolik fenotip meydana getirmemesine karşın AgRP mRNA ekspresyonundaki azalmanın kilo artışı ile birlikte artan metabolik hız ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (63). AgRP'nin merkezi uygulaması kemirgenlerde hiperfajiye ve vücut ağırlığında artışa neden olurken hiperfaji önlendiğinde bile vücut ağırlığını artırıcı metabolik etkiler gösterebilir. Yapılan bir çalışmada AgRP'nin icv olarak uygulandığı sıçanlarda hiperfaji görülmemesine rağmen plazma leptin seviyesinin iki kat, insülin konsantrasyonunun 1.5 kat arttığı ve yağ doku kütlesinde de önemli artışlar meydana geldiği gösterilmiştir (64).

İnsanlarda ve kemirgenlerde adrenal bezler, akciğer, testis, yumurtalık, iskelet kası ve yağ dokusunda AgRP mRNA'sı izole edilmiştir. Adrenal bezdeki AgRP'nin MC4R'nin aracılık ettiği glukosteroid üretimini antagonize ettiği gösterilmiştir (65).

İnsan ve sıçan serumunda, AgRP benzeri aktivite seviyelerinin pikogram aralığında olduğu rapor edilmiştir. Serum AgRP düzeylerinin obez insanlarda zayıf kontrollere kıyasla daha yüksek olduğu, sıçanlarda ise serum AgRP düzeylerinin açlık ile arttığı bildirilmiştir (66).

AgRP'nin oreksijenik etkisi 72 saate kadar sürebilir. AgRP ve mü-opioid reseptörlerin deney hayvanlarında aşırı yemeye neden olduğu ve yağdan zengin beslenmeye yönelttiği; MSS'ye AgRP uygulandığında ise hayvanların özellikle yüksek yağlı besin tercihinin arttığı görülmüştür (67). Yapılan bir çalışmada ise AgRP salınımı inhibe edilmiş farelerin normallere göre besin alımı ve vücut ağırlığında farklılık olmaksızın yüksek yağlı besinlerle beslendikleri bildirilmiştir (68).

AgRP nöronlarının K-ATP kanallarının glukoza bağımlı modülasyonuna dahil olup olmadığı tam anlamıyla açık değildir. AgRP nöronlarında K-ATP kanalları eksprese edilmesine rağmen bazı nöronların POMC nöronları ile ortak bir projenitör paylaştığı için

AgRP nöronlarının kan insülin seviyelerine duyarlı oldukları, sadece az bir kısmının glukozu duyarlı olduğu bildirilmiştir (69).

2.6.2. Nöropeptit Y

İlk olarak 1982'de izole edilen NPY, 36 aminoasitten oluşan, pankreatik polipeptid ailesinden olan ve yaygın olarak merkezi ve periferik sinir sisteminde bulunan bir polipeptittir. Beslenme, merkezi otonom işlevler, öğrenme, stres yanıtları, cinsel ve motor davranışlar da dahil olmak üzere birçok nöroendokrin işlevin düzenlenmesinde görev aldığı gösterilmiştir (70). NPY özellikle motivasyon ve duygusallık ile ilgili kortikal ve limbik bölgelerde yüksek oranlarda bulunur. Periferik sinir sisteminde ise perivasküler sinir pleksuslarında, adrenal medullada, adrenerjik sinir uçlarında nöradrenalin ile birlikte etki gösterir (71, 72). Çoğunlukla sempatik sinirlerde bulunan NPY seyrek olarak parasempatik sinirlerde de tespit edilmiştir (72, 73). MSS'de özellikle serebral korteks, hipokampus, talamus, hipotalamus ve beyin sapı bölgelerindeki nöronlarda mevcuttur (72). NPY içeren sinir hücrelerinin gövdeleri arkuat nükleus, lokus sereleus ve traktus solitariusta da yaygın olarak bulunur. Bu sinirlerin terminal bölgeleri ise hipotalamus, beyin sapı ve diğer limbik alanlara uzanmaktadır. NPY hücrelerinin MSS'de yaygın dağılım göstermesi nörobilişsel, affektif ve somatosensorial alanlarda işlev gösterdiğini düşündürmektedir (73).

NPY beyinde bol miktarda bulunur ve santral sinir sisteminde en güçlü oreksijenik peptiddir. NPY ayrıca insülin sekresyonunu azaltan pankreatik adacıklarda mevcuttur. NPY gen delesyonunun adacık fonksiyonundaki etkilerini araştıran son zamanlardaki bir çalışma (74) NPY delesyonunun adacık hipertrofisi ile ilişkili bazal sekresyonunda ve glukoz ile indüklenen insülin sekresyonunda orta dereceli bir atışa sebep olduğunu göstermiştir. Bu çalışmanın bir bulgusu NPY ve Y1 reseptör mRNA'larının fare modelinde azalmış olarak bulunmasıdır; bu da obez ve diyabetik durumlarda insülin ihtiyacının artması ile mücadele ederken NPY sinyal iletiminin potansiyel olarak azaldığını düşündürmektedir.

Fare ve maymun çalışmalarında tekrarlayan stresin, yüksek yağlı ve şekerli diyetin, NPY salgılamasını uyararak karın bölgesinde yağ birikmesine neden olduğu gösterilmiştir. Son yıllarda araştırmacılar iştah hormonları ile oynayarak vucutta karın-basen gibi bölgelerde arzu edilmeyen yağ kütlesi artışının azaltılabileceğini düşünmektedirler (75).

Strese yanıt olarak abartılı diyetle bağı gelişen obezitede, NPY aracılığı ile karın beyaz yağ dokusunun oluşma mekanizmasının araştırıldığı bir çalışmada, strese maruz bırakmanın glukokortikoid aracılığı ile abdominal yağ dokusunda sempatik sinirlerden NPY salınımını arttırdığı, NPY ve reseptörlerinin up-regülasyonunu sağladığı bulunmuştur (76).

NPY-1R ve NPY-5R, iştahın uyarılması ile ilişkiliyken, NPY-2R ve NPY-4R reseptörlerinin uyarılması iştahın baskılanmasıyla ilişkilidir. Anoreksiya nervozalı hastalarda beyin omurilik sıvısı (BOS) β -endorfin konsantrasyonunun azaldığı ve tedaviden sonra normale döndüğü buna karşın aynı hastalarda yüksek bulunan BOS NPY düzeylerinin tedaviden sonra normal seviyesinin altına düştüğü belirlenmiştir. Bunun hastalarda yemek yemeyi uyarmak için gelişen bir uyum mekanizması olduğu ancak reseptörlerdeki down-regülasyon nedeniyle etkisiz kaldığı şeklinde yorumlanmıştır (77).

2.6.3. Kokain ve Amfetamin İlişkili Transkript

Hipotalamustaki bir diğer önemli tokluk regülatörü 102 amino asitli bir prekürsör protein olarak sentezlenen CART'dır. Hayvan modellerinde arkuat nöronlarda POMC ile birlikte, insanlarda ise bundan farklı olarak AgRP ve NPY ile birlikte ifade edilmektedir (78). Bu prekürsör proteinin yıkımı ile oluşan çeşitli CART fragmanları dokularda belirlenebilir. POMC nöronlarına benzer şekilde CART nöronları da doğrudan leptin tarafından pozitif bir şekilde uyarılır. CART nöronları endokrin düzenleme, stres, duyuşal değerlendirme, güçlendirme ve mükafat ile ilişkilidir (79, 80). Obez farelerde bozulan leptin sinyalleri ile birlikte arkuat nükleusda azalan CART mRNA ifadesinin periferal leptin uygulamaları ile arttığı rapor edilmektedir. CART 82-103 antikörünün icv enjeksiyonu ile normal sıçanlarda gıda alımı artmakta, bunun aksine endojen CART peptitleri ile beslenme baskılanmaktadır. Bu çalışmalar CART peptitlerinin beyin tarafından beslenme üzerine etkisinin gıda alımının endojen bir inhibitörü olduğunu göstermektedir (80, 81).

Ayrıca hipotalamustaki bazı CART nöronlarının NPY sinirleri ile sinaps yaptığı gösterilmiştir. Bu bulgu CART'ın vücut ağırlığının düzenlenmesinde önemli rolü olabileceğini düşündürmektedir. Şimdiye kadar CART'ın etkilerine aracılık eden reseptör ya da non-peptid CART ligandları bildirilmemiştir.(81)

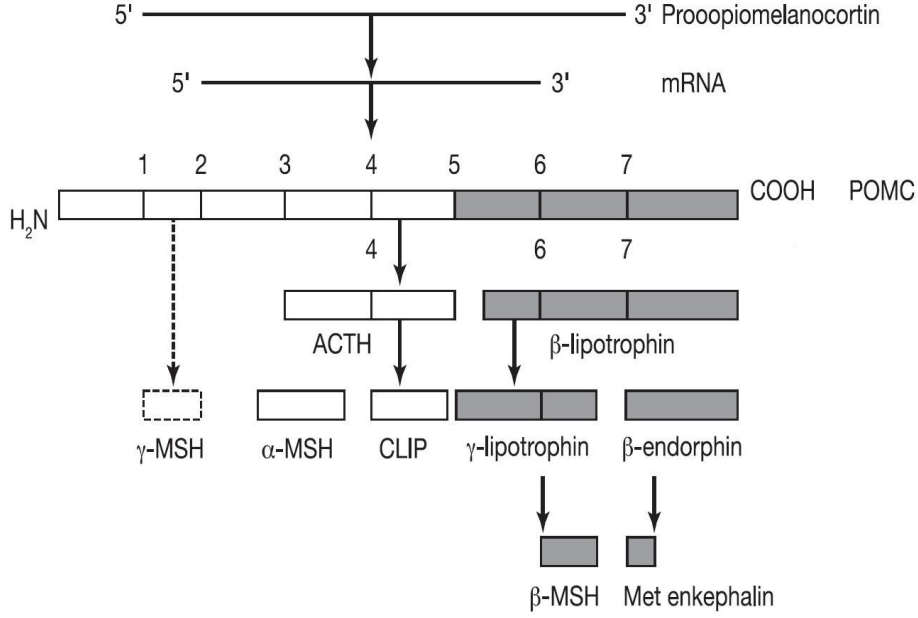
2.6.4. Proopiomelanokortin

POMC, 241 amino asit kalıntısına sahip bir öncü polipeptittir. POMC, ön hipofizin 285 amino asit uzunluğunda polipeptit öncüsü pre-pro-opiomelanocortin'den (POMC öncesi) kortikotroplarda, translasyon sırasında 44 amino asit uzunluğunda bir sinyal peptidi sekansının çıkarılmasıyla sentezlenir. POMC merkezi melanokortin sisteminin bir parçasıdır. POMC geni hipotalamusta arkuat nükleus, hipofiz bezi, deri ve bağışıklık sistemi gibi pek çok dokuda ifade edilmektedir. POMC'nin işlenmesi, temel protein dizilerinin içerdiği bölgelerin glikosilasyonları, asetilasyonları ve proteolitik bölünme ile gerçekleşir. Bununla birlikte, bu parçalanma yerlerini tanıyan proteazlar dokuya özgüdür. Hipotalamus, plasenta ve epitel dahil olmak üzere bazı dokularda, ağrı ve enerji homeostazı, melanosit uyarımı ve bağışıklık modülasyonunda rol alan peptitlere parçalanır. Bunlar, adrenokortikotropin ve P-lipotropin peptitlerinde bulunan birkaç farklı melanotropin, lipotropin ve endorfinlerdir. Bu peptitlerin her biri uygun stimülasyona yanıt olarak ekzositoz ile hücrelerden salınan büyük yoğun çekirdekli veziküller halinde paketlenir.

POMC, dokuya özgü posttranslasyona uğrar ve oluşan ürün bu dokuda ifade edilen endoproteazlara bağlı kalır. Anterior hipofiz bezinde POMC, öncelikle prohormon dönüştürücü 1 enzimi ile adrenokortikotropine (ACTH) dönüştürülür. Primatlar haricindeki memelilerde, ara hipofizde (pars intermedia) prohormon dönüştürücü 2, deri/ten renginin kontrolünde rol alan α -MSH üretmek için ACTH'yi parçalara ayırır. ACTH, adrenal korteksten glukokortikoidlerin salgılanmasını düzenleyen bir peptit hormonudur. β -Endorfin ve Met-enkefalin, beyinde yaygın etkilere sahip endojen opioid peptitlerdir.

Hipotalamustan salınan kortikotropin, ön hipofizdeki kortikotrop hücreleri uyararak POMC'nin enzimatik olarak parçalanmasına neden olur. POMC'nin parçalanması ile ön hipofizde ACTH'nin yanı sıra β -lipotropin, β -endorfin; ara hipofizde ise α -MSH sentezlenir.

Hipofizin ara lobundan salgılanan α -MSH, derideki melanositlerden üretilen melanin salınımında etki gösterirken, ventromedial nükleustaki nöronlar tarafından üretilen α -MSH, iştahın düzenlenmesinde etkili olan POMC nöronlarını stimülasyonu sonucunda toklukluğun düzenlenmesinde etkili olur (82).



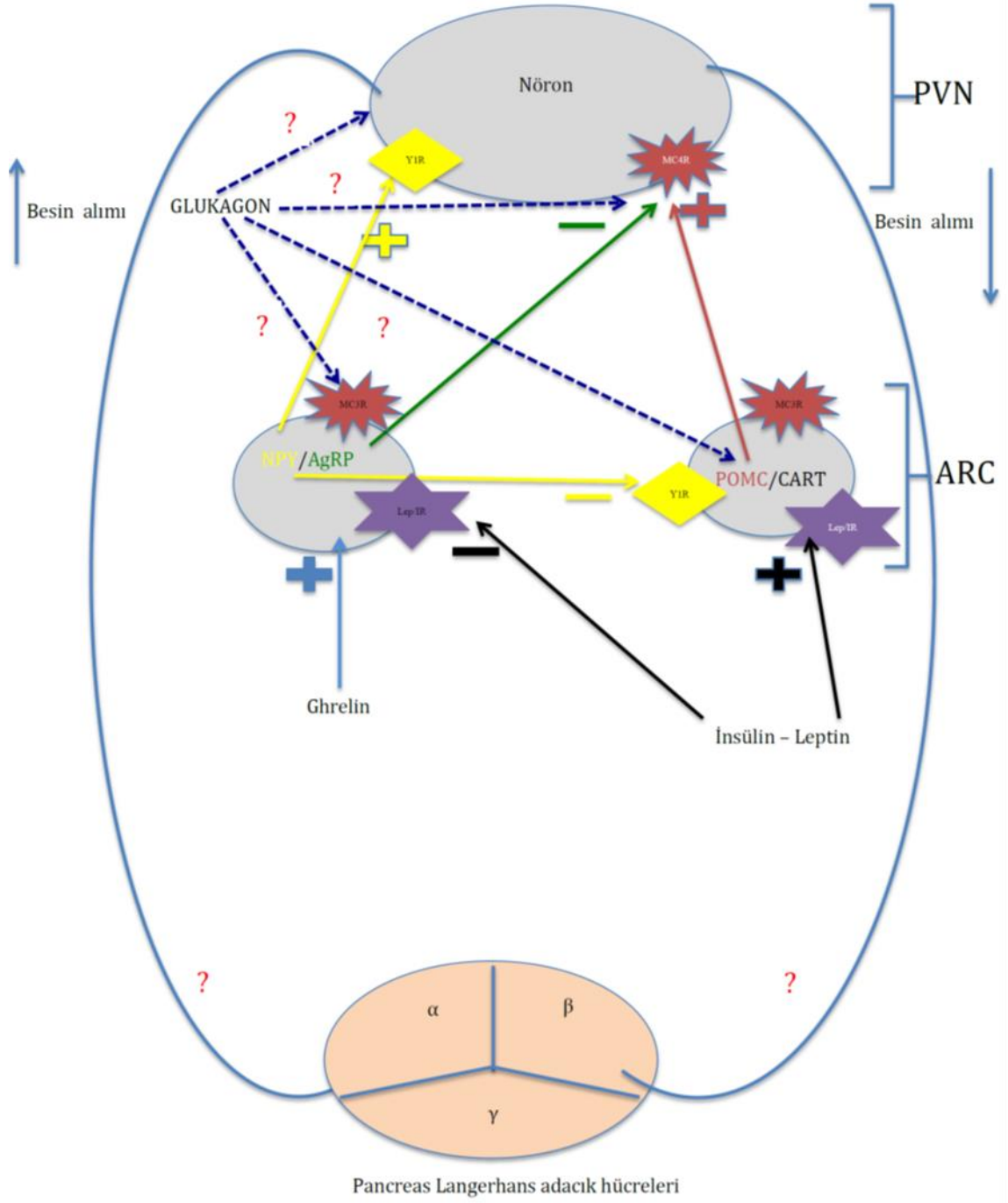
Şekil 2.9. POMC peptidazlar ile dokuya özgü daha küçük aktif moleküllere dönüşür(83)

2.7. Glukoz Homeostazında Pankreasın Nöronal Kontrolü

İnsülin, besin alımından sonra kan glukozunun yükselmesiyle pankreas β -hücrelerinden salınan ve glukoz homeostazisi için önemli bir hormondur. İnsülin hızlı etkisini glukozun hücre içine alımını artırarak ve endojen glukoz üretimini baskılayarak ortaya koyar. Geç etkisini ise hepatositler üzerine doğrudan (84, 85); ekstrahepatik dokularda da insülin sinyalinin etkilediği nöral ve/veya humoral medyatörler ile glukoz üretimini inhibe ederek gösterir (86-88). İnsülin etkinliğinin düzenlenmesinde merkezi ve periferik sinir sisteminin rolü hayati önem taşımaktadır. Özellikle de beyinde arkuat nükleusda bulunan insülin reseptörlerinin aktivasyonu, glukoz homeostazının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Arkuat nükleusda insülin sinyalinin aktivasyonu, yüksek sistemik insülin seviyeleri yokluğunda, endojen glukoz üretiminin önemli düzeyde inhibisyonu ile kan glukoz düzeyini azaltmak için yeterlidir (88). Aksine, arkuat nükleusdaki insülin etkisinin, insülin antikorları ile inhibisyonu, insülin reseptörlerinin oligonükleotidler ile azaltılması ya da insüline bağımlı fosfosinositid 3-kinazlar (PI3K) aktivasyonunun inhibe edilmesi, dolaşımdaki insülinin endojen glukoz üretimini baskılayabilme yeteneğinin azalmasına yol açar. Bu sebeple insülinin hipotalamik etkisi endojen glukoz üretimi üzerinde sistemik insülinin tam inhibitör etkisi (bozulmamış bir

insülin sinyal kaskatı gerektiren insülin reseptörü, insülin reseptör substratı ve PI3K'ın aktivasyonu) için gereklidir (88, 89). İnsülinin arkuat nükleusda nöral aktiviteyi nasıl modüle ettiği ve sinyallerin karaciğere nasıl ulaştığı halen tam olarak aydınlatılamamıştır. Arkuat nükleusdaki insülin, α -MSH, AgRP ve NPY gibi nöropeptidlerin salınımını ve biyosentezini değiştirebilir (90, 91). Başka bir çalışmada da arkuat nükleusdaki insülin aktivasyonunun, K-ATP kanallarını aktive ederek etkisini gösterdiği ileri sürülmüştür (92). K-ATP kanallarının aktivasyonu hepatik glukoz üretimi ve glukoneojenez inhibisyonu yoluyla daha düşük kan glukozunu sağlamaya tek başına yeterli olduğu bildirilmiştir (89). Ancak arkuat nükleusa bir K-ATP kanal blokörü olan glybenclamide uygulandığında, merkezi insülinin endojen glukoz üretimi üzerindeki kısmen baskılayıcı etkilerinin ortadan kalktığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (88, 89).

Literatürdeki bilgilere göre insülinin etkilerinin ve ARC-PVN aksında meydana getirdiği değişikliklerin çokça araştırıldığı anlaşılmaktadır. Ancak glukoz homeostazında insülin ile birlikte düzenleyici rol oynayan glukagonun özellikle merkezi etkilerinin yeterince araştırılmadığı görülmektedir. İnsülin ve glukagon, etkileri bakımından bir paranın iki yüzü gibidirler ve periferde etkilerini zıt fizyolojik koşullarda gösterirler. Glukagonun periferdeki insüline zıt etkisinin, merkezde (paraventriküler nükleus ve arkuat nükleus bölgelerinde) insülinin etkin olduğu bölgelerde nasıl olduğu tam olarak bilinmemektedir. Tez çalışmamız ile glukagonun merkezdeki muhtemel etkilerinin ve etki mekanizmasının nasıl olduğuna dair kanıtlar elde edilmeye çalışılmıştır. Çalışmamızın mevcut literatür bilgileri doğrultusunda açıklanmaya çalışılan yollar ve etki mekanizmaları Şekil 2.10'da özetlenmiştir. Böylece merkezi olarak glukagon uygulandığında kan glukoz homeostazında kilit rol alan insülin ve glukagon üzerine periferdeki yansımalarını inceleyerek kan glukoz homeostazındaki düzenleyici mekanizmanın tam olarak bilinmeyen bir parçasının (glukagon yönüyle) açıklanmasına katkı sağlanmaya çalışılmıştır.



Şekil 2.10. Glukagon hormonunun merkezi uygulamasının mevcut literatür bilgileri doğrultusunda açıklanmaya çalışılan etki yolları ve mekanizmaları

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Deney Hayvanlarının Temini

Bu çalışma için etik kurul onayı İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan alınmış olup (22.03.2019 tarih, 2018/A-45 protokol numaralı) ekte sunulmuştur. Hayvanların bakımı ve tüm uygulamalar İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Üretim Merkezi (İÜ-DEHÜM)'nde etik kurul protokolünde belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.

Proje dahilinde değerlendirilecek olan parametreler daha önceki literatürde belirtilen değerlere göre yapılan istatistiksel güç analizi ile grup sayısı ve her grupta kaç sıçan olacağı (örneklem büyüklüğü) belirlendi. Buna göre I. Tip hata miktarı (α) 0.05, testin gücü ($1 - \beta$) 0.8 ve etki büyüklüğü 0.82 (büyük) grup sayısı 9 iken gruplar arası anlamlı bir fark bulunabilmesi için gerekli olan minimum örneklem büyüklüğü Western Blot analizleri için her gruptan en az 5, immünofloresan analizler için her gruptan en az 5 farklı sıçana ait doku olacak şekilde her grupta 10 olmak üzere çalışmadaki toplam hayvan sayısı 90 olarak belirlendi (93).

3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması

Bu çalışmada 220-280 g ağırlığında 90 Adet erkek *Wistar Albino* sıçan kullanıldı. Sıçanlar 9 gruba ($n=10$) ayrıldı. Deneyler süresince $21 \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklık ve 12 saat ışık/karanlık periyoduna sahip ortamda tutulan hayvanlar, normal musluk suyu ve standart sıçan yemi ile *ad libitum* olarak beslendiler.

Gruplar:

Kontrol : Herhangi bir uygulama yapılmadı ve son gruptaki hayvanlarla eş zamanlı olarak sakrifiye edildiler.

yBOS (120 dk) : Bu gruptaki hayvanlara icv olarak tek doz yBOS (10 $\mu\text{l}/1$ dk) uygulaması yapıldı. Hayvanlar uygulamadan 2 saat sonra sakrifiye edildi.

Glukagon (120 dk) : Bu gruptaki hayvanlara icv olarak tek doz glukagon (1 $\mu\text{g}/10$ $\mu\text{l}/1$ dk) uygulaması yapıldı ve hayvanlar uygulamadan 2 saat sonra sakrifiye edildiler.

PD+yBOS (120 dk) : Bu gruptaki hayvanlara PD yapıldı ve icv olarak tek doz yBOS (10 $\mu\text{l}/1$ dk) uygulamasından 2 saat sonra sakrifiye edildiler.

PD+Glukagon (120 dk): Bu gruptaki hayvanlara PD yapıldı ve icv olarak tek doz glukagon (1 µg/10 µl/1 dk) uygulamasından 2 saat sonra sakrifiye edildiler.

yBOS (7 gün) : Bu gruptaki hayvanlara ozmotik mini pompalarla icv olarak 7 gün süreyle yBOS infüzyonu (10 µl/saat) yapıldı ve 7 günün sonunda sakrifiye edildiler.

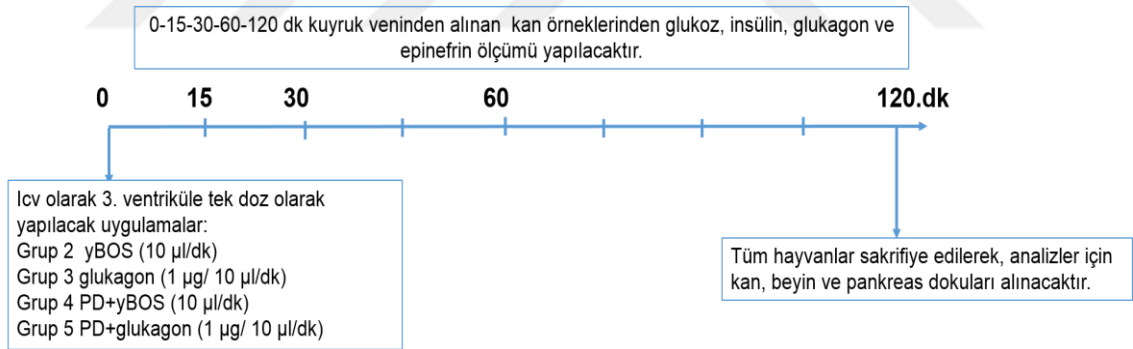
Glukagon (7 gün) : Bu gruptaki hayvanlara ozmotik mini pompalarla icv olarak 7 gün süreyle glukagon (1 µg/10 µl/saat) infüzyonu yapıldı ve 7 günün sonunda sakrifiye edildiler.

PD+yBOS (7 gün) : Bu gruptaki hayvanlara PD yapıldı ve ozmotik mini pompalarla icv olarak 7 gün süreyle yBOS infüzyonu (10 µl/saat) sonunda sakrifiye edildiler.

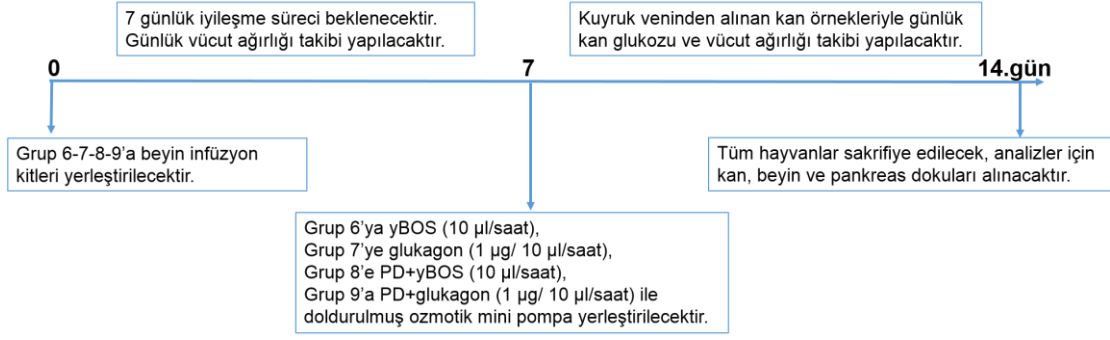
PD+Glukagon (7 gün): Bu gruptaki hayvanlara PD yapıldı ve ozmotik mini pompa kullanılarak icv olarak 7 gün süreyle glukagon (1 µg/10 µl/saat) infüzyonu sonunda sakrifiye edildiler.

3.3. Deney Protokollerinin Tasarımı

Çalışma, akut (120 dk; şekil 3.1’de) ve uzun süreli (7 gün; şekil 3.2’de) etkinin inceleneceği iki ayrı protokol şeklinde yürütüldü.



Şekil 3.1. Merkezi olarak tek doz uygulanan glukagonun kısa süreli (120 dk) etkisinin incelendiği çalışma protokolü



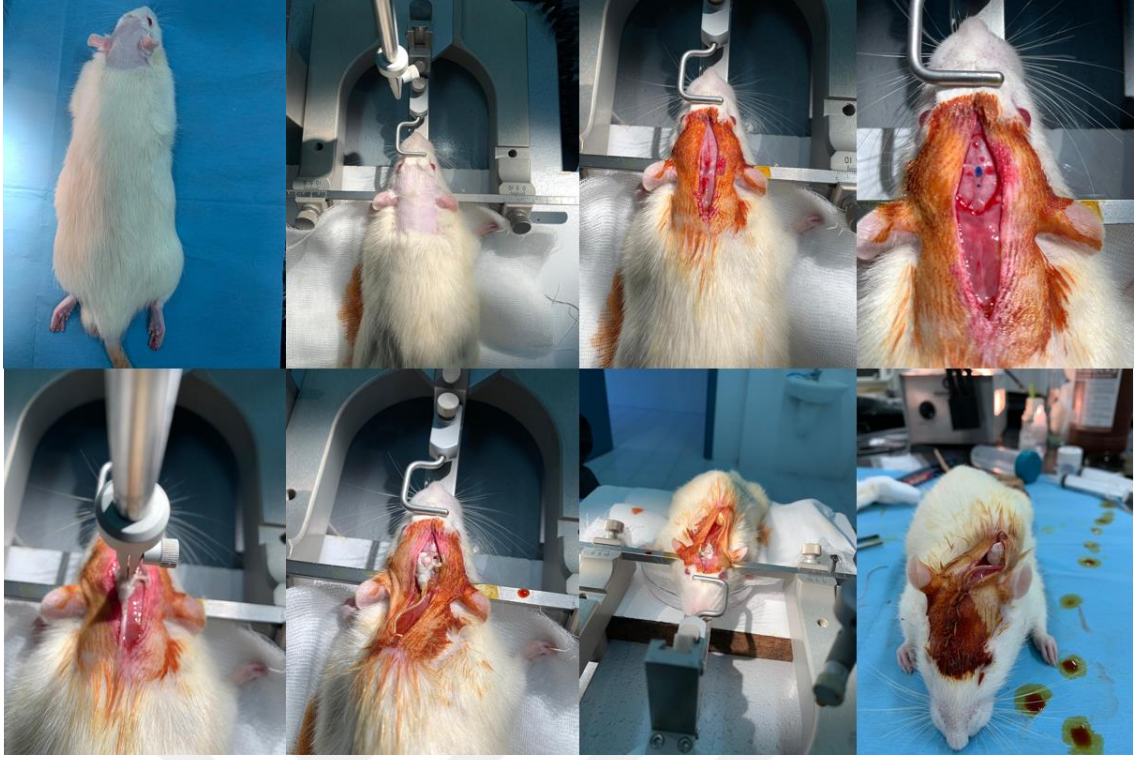
Şekil 3.2. Merkezi olarak bir hafta (uzun süreli) uygulanan glukagonun etkisinin incelendiği çalışma protokolü

3.4. Cerrahi Operasyonlar

3.4.1. Ozmotik Mini Pompaların Yerleştirilmesi

Sıçanlar, ip olarak 70 mg/kg ketamin ve 8 mg/kg xylazine uygulanarak anestezi altına alındı. Anestezi altına alınan sıçanların kafa derileri traş edildi ve stereotaksik cihaza yerleştirildi. Sonrasında Bregma noktası referans alınarak 3. ventrikülün lokalizasyonu Paxinos-Watson Stereotaksik Sıçan Beyin Atlası'nda belirtilen koordinatlara göre (Bregmadan 2.5 mm posterior ve dura materden 8 mm vertikal) belirlendi (94). Sıçanların kafatası duraya zarar vermeden matkapla delinip içerisinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde yBOS ile doldurulmuş beyin infüzyon kiti (PlasticsOne 3280 OP-SPC OP Connector Cannulas 28-21GA Cut 8mm) yerleştirildi. Yerleştirilen beyin infüzyon kiti dental yapıştırıcı ile sabitlendi. Daha sonra dikilerek kapatıldı. Bu işlemden sonra sıçanların 7 günlük iyileşme süreci beklenildi. Bu 7 günlük iyileşme sürecinin sonrasında çalışmada glukagon etkilerinin uzun süreli inceleneceği protokol gruplarına 7 gün boyunca 10 µl/saat infüzyon yapma özelliğine sahip ozmotik mini pompalar (Alzet 2ML1) yerleştirildi. Glukagon (7 gün) ve PD+Glukagon (7 gün) gruplarına glukagon infüzyonu (1 µg/10 µl/saat), yBOS (7 gün) ve PD+yBOS (7 gün) gruplarına ise yBOS (10 µl/saat) infüzyonu bir hafta boyunca ozmotik mini pompalar aracılığıyla yapıldı.

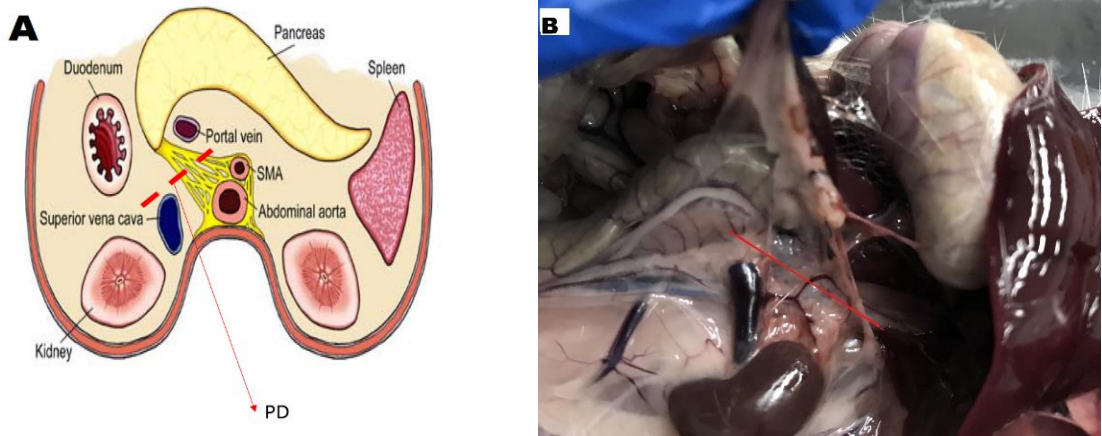
Kısa süreli etkinin inceleneceği gruplarda ise yine aynı anestezi uygulamaları yapıldı. Glukagon (120 dk) ve PD+Glukagon (120 dk) tek doz glukagon (1 µg/10 µl/dk) (95, 96), yBOS (120 dk) ve PD+yBOS (120 dk) gruplarına ise tek doz yBOS (10 µl/dk) hamilton enjektörü ile icv olarak verildi.



Şekil 3.3. Beyin infüzyon kiti ve ozmotik mini pompanın yerleştirilmesi

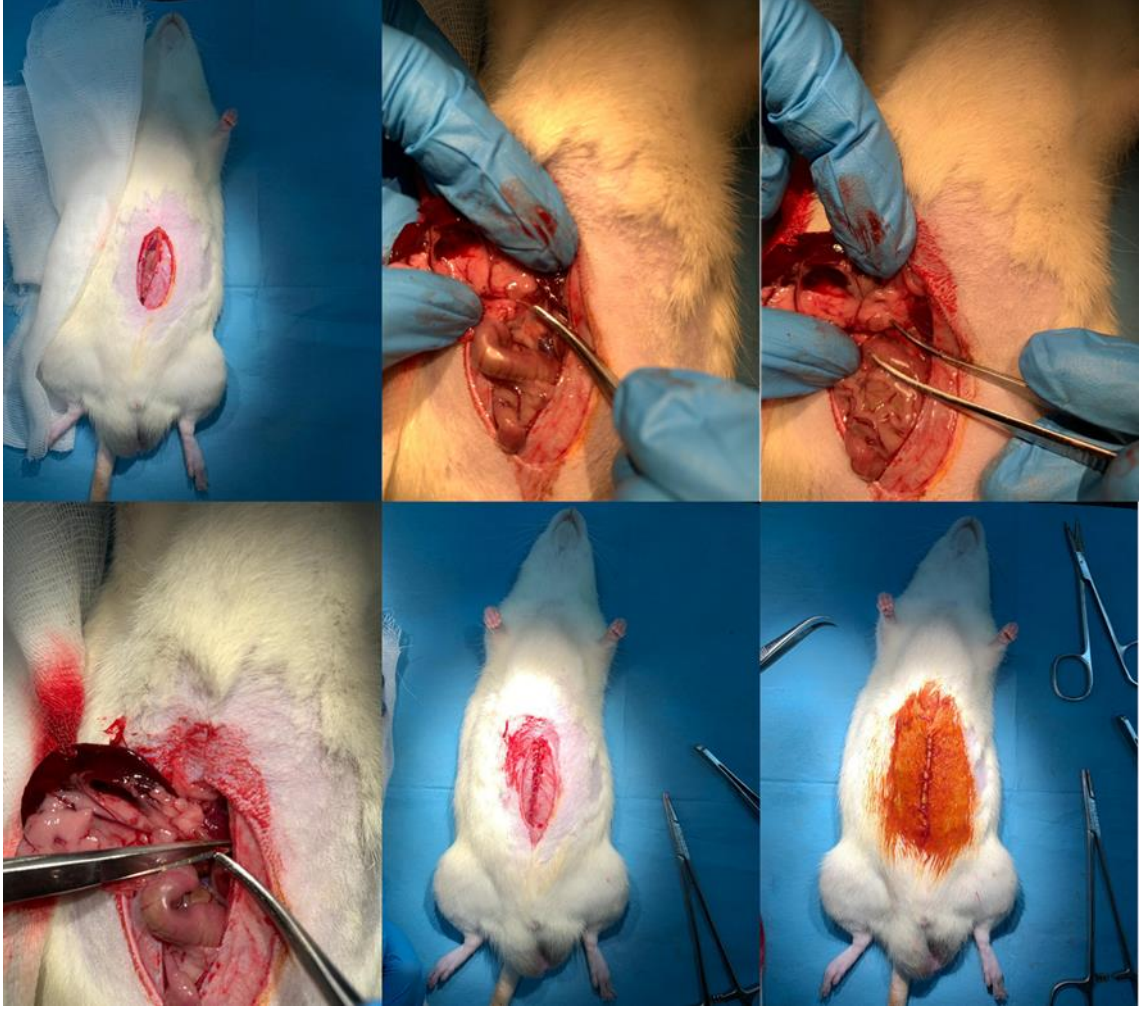
3.4.2. Pankreatik Denervasyon İşlemi

PD yapılacak sıçanlar, ip olarak 70 mg/kg ketamin ve 8 mg/kg xylazine ile anestezi altına alındı ve pankreatik vagal ve splanknik sinirler kesilerek PD yapıldı (53, 97, 98). PD operasyonu literatürde anlatılan deneysel model anlatımına bağlı kalınarak yapıldı.



Şekil 3.4. Sıçan dorsoventral kesitinde pankreatik sinirlerin şematik gösterimi (A). PD işlemi esnasında çekilmiş fotoğrafta pankreatik sinir liflerinin gösterimi (B).

PD işlemleri orta hat laparotomisi tekniğiyle yapıldı. Pankreas sinirleri splenik arter ve süperior ve inferior pankreatik arterler boyunca uzananlardır. Splenik arteri tanımlamak için kalın ve ince bağırsaklar nemlendirilmiş gazlı bezle sarıldı ve karın boşluğunun dışında sağa kaydırıldı. Dalak mobilize edildi, nemli bir gazlı bezle sarıldı sol taraftaki konumundan sağa, yatay eksen etrafında 180° döndürülerek görünür duruma getirildi. Dalak arterinin ilk çatallanması orjinden yaklaşık olarak 5 mm sonradır. Splenik nörovasküler demetin görülebilirliğini arttırmak için üzerine iki damla %1'lik toluidin mavisi çözeltisi damlatıldı. Sinirler koyu maviye boyanadı ve arterin solunda açıkça görülür hale gelince rezeke edildi. Daha sonra dalak, karın boşluğuna yerleştirildi. Biraz daha omentum kesildi ve üst pankreatikoduodenal arter, gastroduodenal arter orjin bölgelerine yerleşmiş sinirlerde toluidin mavisi ile boyanarak, arter ve ven arasında sinirler görüntülendi ve rezeke edildi. Son olarak, alt pankreatikoduodenal sinir, mezenterdeki arter ve vene paralel olarak boyanmış sinirlerde rezeke edildi. Operasyon minimal kan kaybı ile tamamlandı. Bağırsaklar karın boşluğuna yerleştirildi daha sonra batın iki kat halinde kesik sütürlerle kapatıldı (98).



Şekil 3.5. Pankreatik denervasyon cerrahi operasyon basamakları

Denervasyon işleminin kontrolü denervasyon yapılan gruplardan rastgele seçilen 3 sıçana ait pankreas doku homejenatlarından yapılan norepinefrin düzeylerinin ölçümü ile sağlandı (98). Denerve olan gruplardaki pankreas dokusu norepinefrin düzeylerinin kontrol gruplarına göre anlamlı derecede azalmış olduğu ölçülerek PD teyit edildi.

Aynı anestezi altında PD+Glukagon (120 dk) ve PD+yBOS (120 dk) gruplarına hamilton enjektörü ile tek doz; PD+Glukagon (7 gün) ve PD+yBOS (7 gün) gruplarına ise ozmotik mini pompalar yerleştirilerek (7 gün) icv yBOS ve glukagon uygulamaları yapıldı ve Şekil 3.1 ve Şekil 3.2'teki çalışma planı uygulandı.

3.5. Glukagon Çözeltisinin Hazırlanması

Glukagon, biyolojik emniyet kabiniinde steril şartlarda hazırlanan yBOS içerisinde 1 µg /10 µl olacak şekilde hazırlandı (99).

3.6. Yapay BOS Çözeltisinin Hazırlanması

Glukagonun çözüldüğü ve çözücü gruplara verilmek üzere çalışmadan önce yBOS hazırlandı. yBOS 126 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2.4 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 11 mM D-glukoz, 1.4 mM NaH₂PO₄ ve 25 mM NaHCO₃ konsantrasyonda hazırlandı. Çözelti asiditesi ph 7.4 olarak ayarlandı. Daha sonra kabin içerisinde hazırlanan çözelti 0.22 µm por çapındaki steril vakumlu filtre kullanılarak süzüldü ve UV-C ışın ile biyolojik emniyet kabini içerisinde steril edildi. Kullanıncaya kadar +4⁰C’de saklandı.

3.7. Doku ve Kan Örneklerinin Alınması

Kontrol ve kısa süreli etkinin inceleneceği gruplardaki sıçanların kan örnekleri kuyruk venlerinden çalışmanın 0-15-30-60 ve 120. dakikalarında ksilazin-ketamin anestezisi altında kapiller tüplere steril aletler kullanılarak alındı ve sakrifiye edildi. Uzun süreli etkilerin incelendiği gruplarda ise 7. günün sonunda tüm hayvanlardan steril aletler kullanılarak kan örnekleri alındı ve sakrifiye edildi. Analizler için uygun olacak şekilde biyokimya tüplerine alınarak 3000 rpm de 10 dakika boyunca +4⁰C’de santrifüj edildi (Centurion K2015R Serisi Soğutmalı Santrifüj, Centurion Scientific Ltd Fenton, USA) ve serumları ayrıldı. Kan, beyin ve pankreas dokuları alındı. 3. ventriküle enjeksiyon/infüzyon yapıldığı, beyin kesitleri alınırken beyin atlasındaki görüntüler ile karşılaştırılarak doğrulandı. Alınan kan ve doku örnekleri analizlere kadar -80 ⁰C’de saklandı.

3.8. Biyokimyasal Analizler

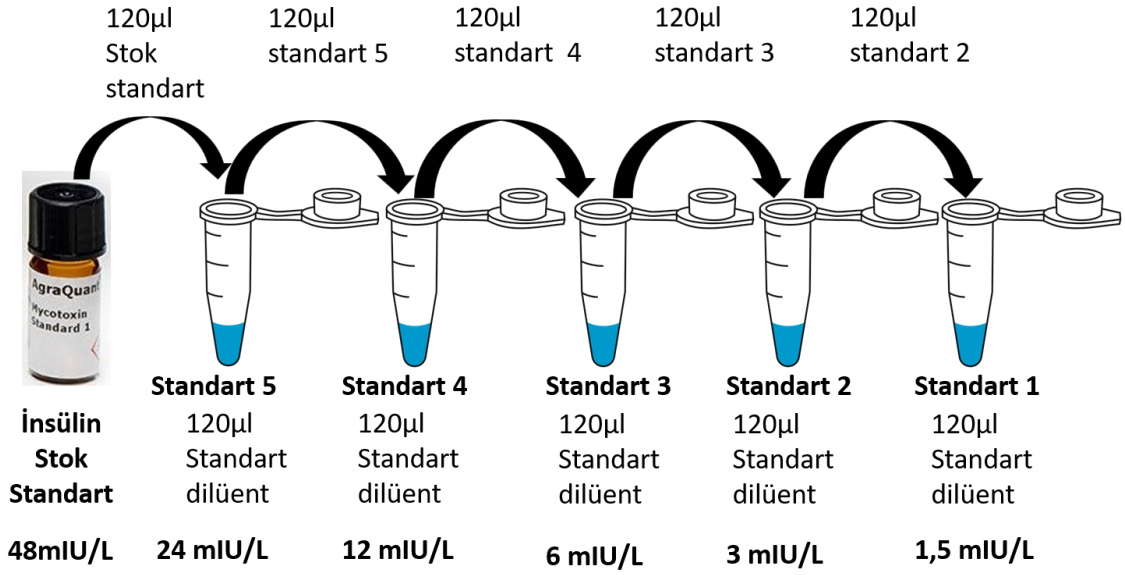
3.8.1. Plazma İnsülin, Glukagon ve Glukoz Analizleri

Tek doz uygulama yapılan gruplardaki sıçanlardan enjeksiyondan sonra, 2 saat boyunca 0-15-30-60-ve 120. dakikalarda kuyruk veninden alınan kanlardan; uzun süreli uygulama yapılan gruplarda ise her gün kuyruk veninden alınan kan örneklerinden biosensor şeker ölçüm cihazı ve stripleri (On Call, G113-11, Acon Labs USA) ile kan glukoz tayinleri yapıldı.

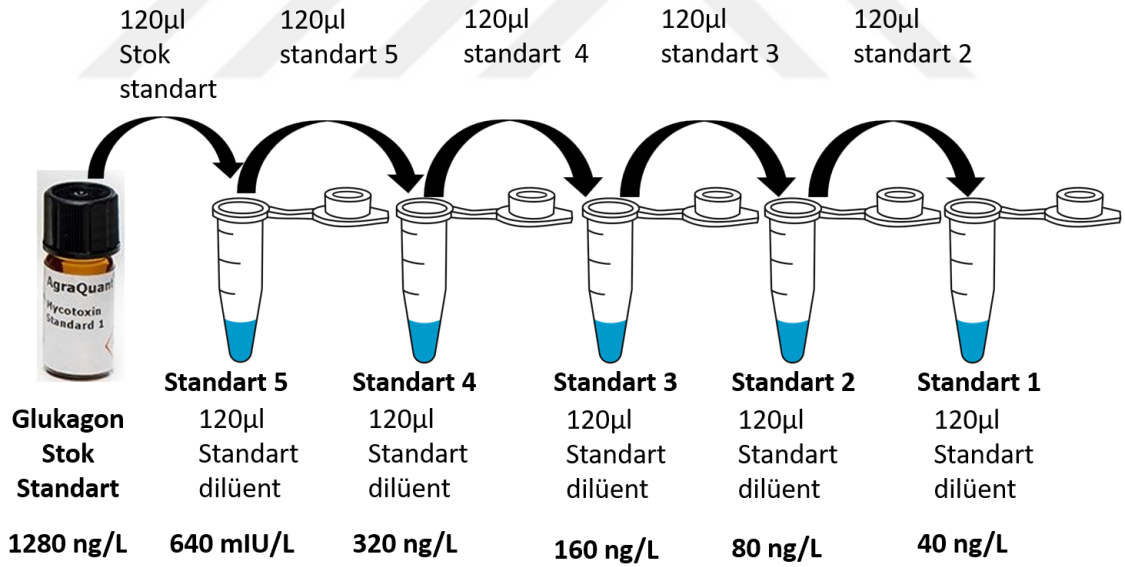
Plazma glukagon, insülin ve epinefrin düzeyleri ise tek doz uygulaması yapılan sıçanlarda enjeksiyondan sonra, 2 saat boyunca yine aynı zaman aralıklarında kuyruk veninden alınan kanlardan ve uzun süreli uygulama yapılan gruplarda da 7. günün

sonunda sıçanlar dekapite edilerek alınan kan plazma örneklerinden ELISA yöntemi ile tayin edildi.

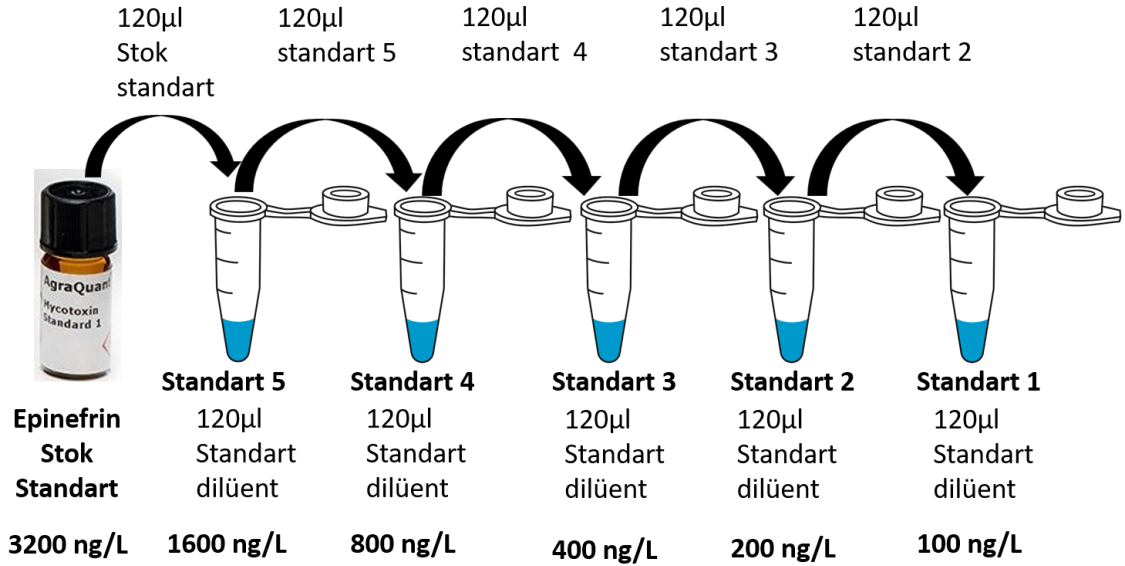
ELISA yöntemi ile insülin (Katalog No:201-11-0708 Sunred Biotechnology Company, China), glukagon (Katalog No:201-11-1673 Sunred Biotechnology Company, China), epinefrin (Katalog No:201-11-0546 Sunred Biotechnology Company, China) analizi kullanılan ticari kit protokollerine bağlı kalınarak çalışıldı. Çalışma öncesi kit içerisindeki standart stok solüsyonları insülin için Şekil 3.6, glukagon için Şekil 3.7, epinefrin için Şekil 3.8 örneğinde belirtildiği gibi 5 aşamalı seyreltilme işlemi yapılarak belirli konsantrasyonlarda standart örnekleri hazırlandı. Numune konsantrasyonun belirlenmesinde kullanılan standart grafiğinin doğruluğunu arttırmak için standart örnekleri dublike olarak çalışıldı. Standart numunelerinden her bir kuyucuğa 50 µl, numune örneklerinden 40 µl üzerlerinede 10 µl antibody eklendikten sonra tüm kuyucuklara 50 µl Horseradish peroksidaz işaretli-Streptavidin eklendi. Kuyucukların üzeri kapatılarak 60 dakika 37°C’de inkübasyona bırakıldı. Kuyucuklar beş kez, 350’şer µl dilüe edilmiş yıkama tamponu (10X) ile yıkandı. Kit içeriğinde hazır bulunan kromojen A’dan 50 µl, kromojen B’den 50 µl her kuyucuğa pipetlendi. Kuyucukların üzeri kapatılarak 10 dakika 37°C’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun sonunda 50 µl durdurma solüsyonu her kuyucuğa pipetlendi. Durdurma solüsyonu eklendikten sonra 15 dakika içinde kuyucuklardaki renk yoğunluğu 450 nm’de laboratuvar alt yapımızda mevcut BioTek Synergy-HTX ELISA otomatik plak okuyucusunda spektrofotometrik olarak okutuldu. Cihaza uyumlu software Gene 5 yazılımı ile standart verilerine göre numune konsantrasyonları otomatik olarak hesaplandı.



Şekil 3.6. İnsülin ELISA kiti referans standartlarının seri dilüsyonu



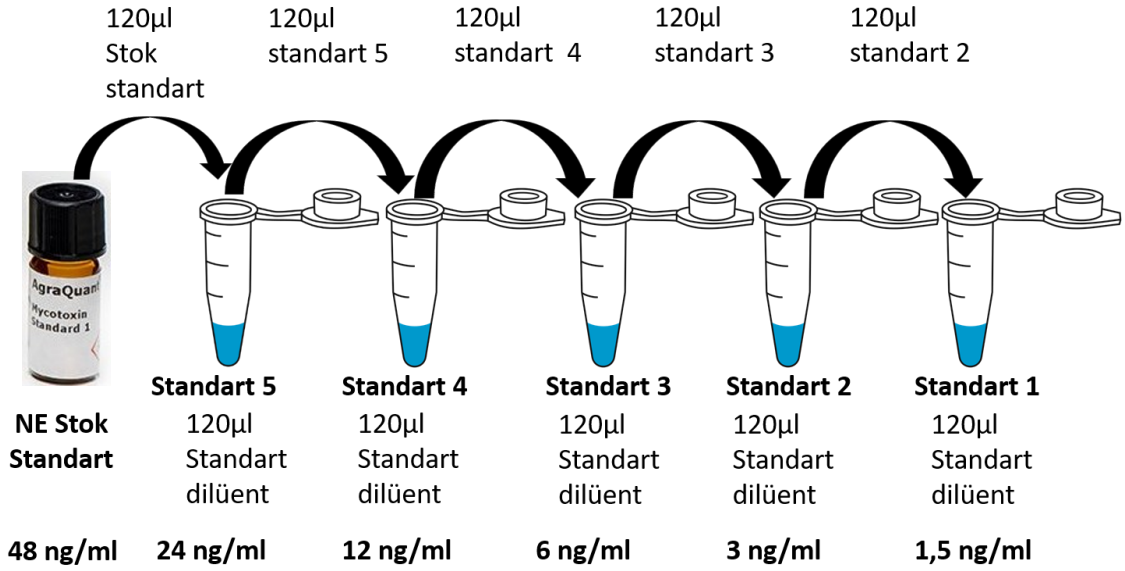
Şekil 3.7. Glukagon ELISA kiti referans standartlarının seri dilüsyonu



Şekil 3.8. Epinefrin ELISA kiti referans standartlarının seri dilüsyonu

3.8.2. Pankreas Dokusundan Norepinefrin Analizi

Literatürde pankreatik denervasyon işleminin kontrolü olarak değerlendirilen pankreas doku NE ölçümü ticari ELISA kiti (Katalog No:201-11-0515) Sunred Biotechnology Company, China) ile yapıldı. Doku homojenatlarını hazırlanmasında hemoliz kanlarının test sonucunu değiştireceğinden dokularda kalan kanın uzaklaştırılması için PBS tamponu (0.01 M, pH = 7.4) ile dokular yıkandı. Dokular tartıldı ve 100 µg doku parçalarına 900 µl PBS uygun olacak şekilde vidalı homojenizatör tüplerine alındı. Homojenatlar daha sonra süpernatantı elde etmek için 5000xg'de 5 dakika +4°C santrifüj edildi. Süpernatantlardan toplam protein konsantrasyonu ticari BCA kiti ile belirlendi ve her bir plate kuyucuğuna örneğin toplam protein konsantrasyonu 0.3 mg'ı geçmeyecek şekilde pipetlendi. Norepinefrin için Şekil 3.9'da belirtildiği gibi 5 aşamalı seyreltilme işlemi yapılarak belirli konsantrasyonlarda standart örnekleri hazırlandı. Numune konsantrasyonun belirlenmesinde kullanılan standart grafiğinin doğruluğunu arttırmak için standart örnekleri dublike olarak çalışıldı. Kit içerisinde çıkan protokol kataloğundaki basamaklar takip edilerek çalışıldı. Sonuçlar daha sonra pankreas doku süpernatantlarında ölçülen mg doku/ml oranına göre düzenlendi ve sonuçlar µmol/mg olarak değerlendirildi.



Şekil 3.9. Norepinefrin ELISA kiti referans standartlarının seri dilüsyonu

3.9. Western Blot Protein Analizi

Western Blot (WB) spesifik bir proteinin analiz edilmesinde daha çok tercih edilen moleküler biyolojik bir yöntemidir. WB yöntemi analiz edilen proteinin varlığı, büyüklüğü, konsantrasyonu protein bandının renk yoğunluğuna ve ölçüsüne göre değerlendirilen yarı kantatif bir ölçüm metodudur.

3.9.1. Protein İzolasyonu

Sıçanlar dekapite edilerek çıkarılan beyinler hemen kuru buz üzerinde donduruldu ve -80°C'de saklandı. Koronal beyin bölümleri cryostat microtome kullanılarak çıkarıldı. Hipotalamik III. ventrikül çevresi (Paxinos & Watson'ın stereotaksik koordinatları atlasına göre Bregma'dan 2,3–4,5 mm) 18G kesilmiş bir iğne kullanılarak beyinden bilateral olarak alınan yaklaşık 100 mg doku parçacıkları POMC ve AgRP western analizlerinde kullanıldı.



Şekil 3.10. Western analizleri için beyin dokusundan alınan AgRP ve POMC nöron gruplarının bulunduğu 3. Ventrikül çevresindeki beyin bölgesinin gösterimi

Çalışmamızda değerlendirilen glukagon ve insülin protein düzeylerinin analizi için de yine aynı şekilde kuru buz üzerinde pankreas dokusundan alınan yaklaşık 100 mg doku parçacıkları kullanıldı.

Western Blot analizleri için beyin ve pankreas doku lizatları hazırlandı. 100 mg doku için 1 ml olacak şekilde 10X RIPA (Abcam; ab156034) tamponu 1X konsantrasyona dilüe edildi ve proteaz inhibitör 1:20 oranda (Abcam; ab201111) eklenerek hazırlanan çözelti içerisinde homojenize edildi. Homojenizatör (Next Advance BBY24M, Inc. Innovative Lab Products for the Life Sciences, USA) kullanılarak 8000 rpm de 5 dk (1dkx5) homojenizasyon işlemi yapıldı. Homojenizasyon işlemi boyunca her 1 dk sonrasında köpük içerisindeki kara gömülerek homejenatların ısınması engellenerek protein degregasyonu minimize edilmeye çalışıldı. Daha sonra doku homejenatları 10.000 rpm de 15 dk +4°C santrifüj edilerek süpernatantlara ayrıldı. Alınan süpernatant ependorf tüplerine alınarak protein yıkımının olmaması için uygun koşullarda saklandı.



Şekil 3.11. Western Blot ve ELISA için doku homojenizasyonunda kullandığımız soğutmalı doku homojeniztör cihazı ve soğutmalı santrifüj

3.9.2. Protein Konsantrasyonu Ölçümü

Doku süpernatantlarında toplam protein konsantrasyonu, bikononik asit (BCA) protein miktarı ölçüm yöntemi ile belirlendi. Bu işlem ile her bir Western jel kuyucuğuna eşit miktarda protein yüklenilmesi sağlandı.

Diğer protein tayin yöntemlerine göre daha yeni ve Lowry yönteminin farklı bir uygulaması olan bu teknikte reaktif olarak BCA kullanılır. Bu yöntem alkali çözeltideki proteinlerin Biüret reaktifi ile Cu^{2+} 'den Cu^+ 'ya indirgenmesi ve daha sonra Cu^+ 'nın BCA ile verdiği renkli kompleksin 562 nm'deki spektrofotometrik ölçümüne dayanır. Renk yeşilden koyu mora dönüşür. Yöntemin duyarlılığı Lowry metoduna yakındır (20–100 μg protein/mL). Mikro ölçüm işlemi ile duyarlılığın daha da artırılması mümkündür. BCA yöntemi proteinin amino asit kompozisyonundan az etkilenir ve girişim etkisi gösteren çok fazla bileşik yoktur. BCA metodu ile amino asitler, deterjanlar, lipitler, şekerler ve nükleik asitler diğer metotlara göre daha iyi tolere edilebilir olduğundan tercih edildi.

Alınan ticari kit (Abcam; BCA Protein Quantification Kit ab102536) protokolüne uygun olarak çalışıldı. Kit içeriğindeki protein stok solüsyonu ile farklı konsantrasyonlarda (0-0.5-1-2-4-8-16 ve 32 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$) standart çözeltiler hazırlandı. Analizin doğruluk ve duyarlılığını arttırmak için numuneler de 1/10 oranında dilüe edildi. Daha sonra 96'lık pleytin her bir kuyucuğuna 50 μl standart ve numune pipetlendi ve üzerine kit içerisindeki çalışma solüsyonundan (BCA, sodyum karbonat, sodyum tartarat, sodyum bikarbonat, 0.1 M NaOH, pH 11.25) 100 μl eklenerek 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Laboratuvar alt yapımızda mevcut BioTek Synergy-HTX plate reader ile 562 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü ve numune konsantrasyonları $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ olarak hesaplandı.



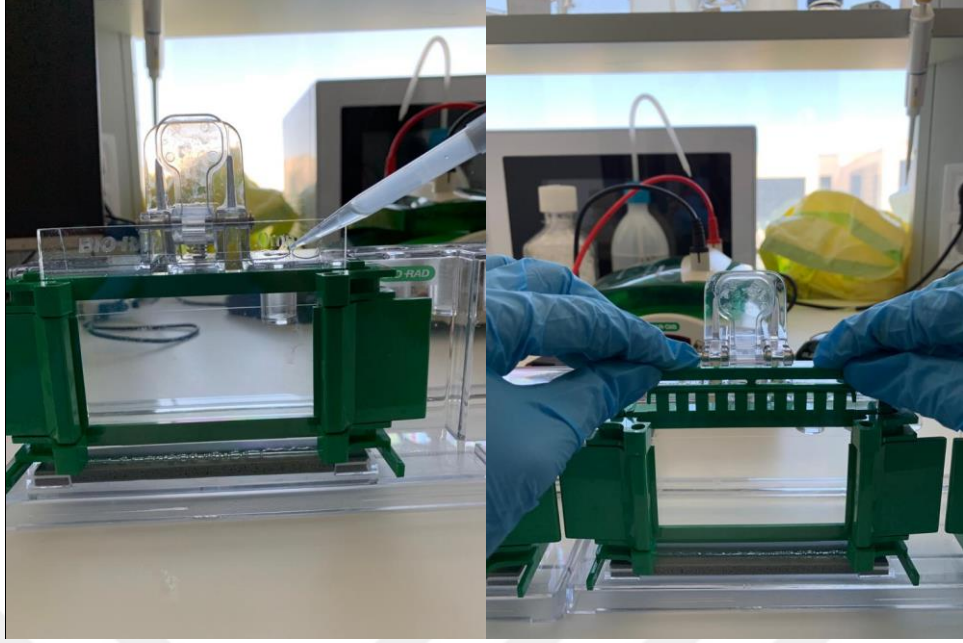
Şekil 3.12. ELISA analizlerinde kullandığımız ELISA plate reader

3.9.3. Jel elektroforezi

Bu deney için çalışmamızda incelediğimiz proteinlerin büyüklüğüne uygun olduğunu düşündüğümüz %10'luk SDS jel kullanıldı. Bunun için tabloda her bir jel için verilen miktarlarda hazırlanan running jel hazırlandı ve 1mm kalınlığında olacak şekilde cam levhaların arasına tarak mesafesine kadar döküldü. %10'luk jel döküldükten sonra üzerine izopropanol alkol eklenerek alttaki jelin hava alması önlenildi ve jelin donması için oda ısısında 30 dakika bekletildi. Alt tabakadaki jel katılaştıktan sonra üzerindeki izopropanol alkol döküldü ve üzerine %5'lik jel eklendi. Cam yüzeyler arası jel çözeltisiyle doldurulduktan sonra hava kabarcıklarının olmamasına özen gösterilerek 10 kuyucuk içeren tarak yerleştirildi.

Tablo 3.1. SDS-poliakrilamid jelin içerdiği kimyasal maddeler ve jelin yoğunluğuna göre değişen madde miktarları.

	Running jel %10 SDS- poliakrilamid jel	Stacking jel %5 SDS- poliakrilamid jel
%40 Akrilamid/bisakrilamid(37.5:1)	1670 µl	-
%30 Akrilamid/bisakrilamid(37.5:1)	-	506 µl
%10 Amonyum persülfat	25 µl	15 µl
1,5 M Tris (pH 8.8)	1250 µl	-
0,5 M Tris (pH 6.8)	-	375 µl
%20 SDS	25 µl	15 µl
Distile su	2000 µl	2088 µl
Temed	2.5 µl	1.5 µl



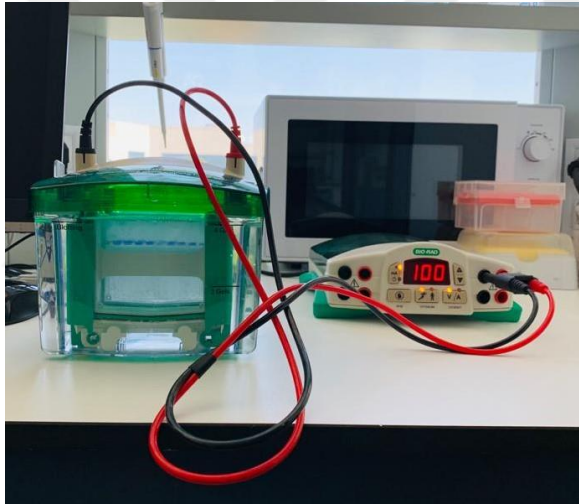
Şekil 3.13. SDS jellerin hazırlanması

Ependorf tüplerine alınan doku homejanatlarına 1/5 oranında SDS loading dye solüsyonu (%0.05 Bromphenol blue, %30 gliserol, %10 SDS, 0.25 M Tris-HCl, %5 β -merkaptotanol) eklendi ısıtıcı blokta (88870002, ThermoFisher Scientific, USA) 95°C’de 10 dakika inkübe edildikten sonra oda sıcaklığında soğutularak jele yüklemeye hazır hale getirildi.



Şekil 3.10. Western Blot analizlerinde numunelerin jele yüklenmeden önce β -merkaptotanol ile yüksek sıcaklıkta protein yapıların lineer forma dönüşmesi için kullanılan ısıtıcı plak

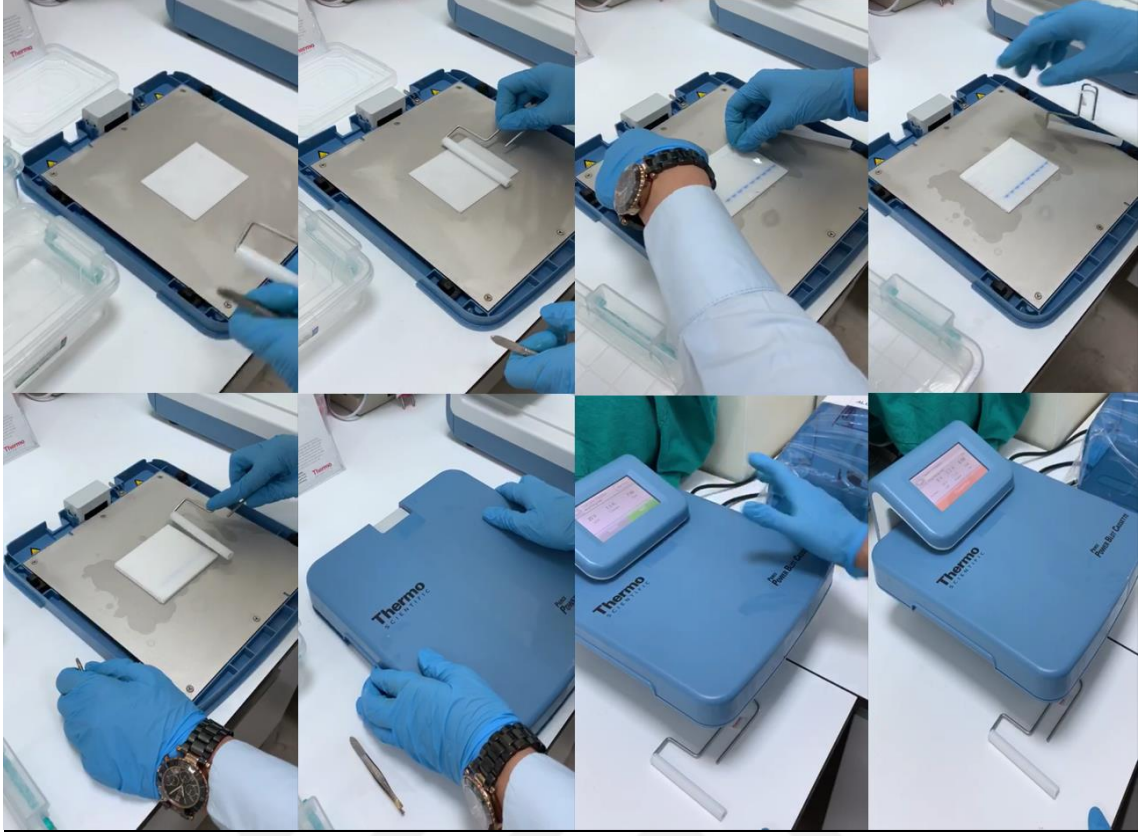
Bir gün öncesinden hazırlanıp +4°C’de running buffer içerisinde bekletilen hazır jeller 4’lü dikey jel elektroforez tankı (1658004, Biorad Life Sciences Research, Kaliforniya, Amerika) içerisine yerleştirildi ve dikey elektroforez için gerekli olan tampon çözeltisi (25 mM Tris, 192 mM glisin, %0.1 sodyum dodesil sülfat (SDS), pH 8.3) eklendi. Moleküler ağırlıklarına göre protein örneklerini ve dikey elektroforezin süresini belirlemek için kullanılan protein işaretçisi (ab116029) ilk jel kuyucuğuna yüklendi. Numunelerden hazırlanan doku örnekleri ise her bir kuyucuğa 40 µg protein olacak şekilde diğer kuyucuklara yüklendi. Güç kaynağı (1645070, Biorad Life Sciences Research, Kaliforniya, Amerika) kullanılarak proteinler ağırlıklarına göre ayrıldı. Güç kaynağı 100 volta ayarlandı ve yaklaşık 130 dk markerın açılması takip edilerek blotlama işlemi yapıldı. Tankın sıcaklığı kontrol edildi ve gerektiğinde buz bloklar kullanılarak direncin artması engellendi.



Şekil 3.14. Çalışmamızda kullanılan 4 jelli dikey elektroforez tankı ve güç kaynağı

3.9.4. Jelden Membrana Protein Transferi

Elektroforez sonunda proteinler jelden Poli-viniliden florür (PVDF) 0.2 µm kalınlığındaki membrana transfer edebilmek için transfer tampon solusyonu (25 mM Tris, 192 mM glisin, %20 metanol) hazırlandı. PVDF membran ve whatman filtre kâğıtları (84783, Thermo Scientific, USA) hazırlanan transfer tampon solusyonu içerisinde ıslatıldıktan sonra trans-blot turbo transfer sistemi (Thermo Scientific, USA) kullanılarak moleküler ağırlıklarına göre ayrılmış olan proteinler jelden PVDF (1620177, Biorad Life Sciences Research, USA) membrana aktarıldı.



Şekil 3.15. Blotlama işleminden sonra proteinlerin jelden PVDF membrana transfer basamakları

PVDF membran 50 mM Tris-Buffered Saline (PBS-T) (%0.1 Tween içeren tamponlanmış PBS) ile hazırlanan %5 yağsız süt tozu (EC-No 271-045-3, PanReac Applichem) ile oda ısısında en az 2 saat bloklandı.



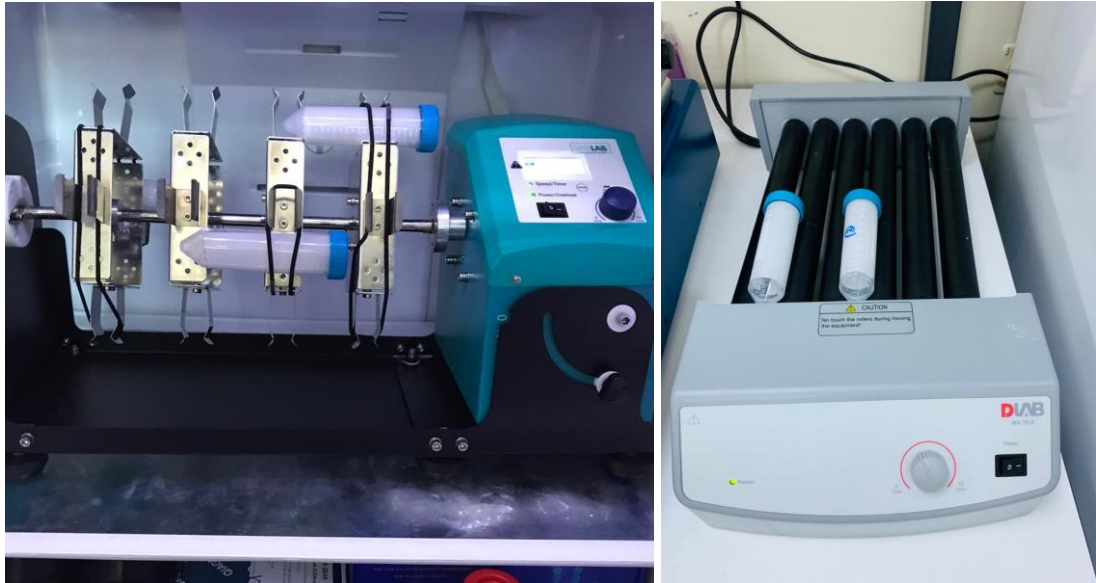
Şekil 3.16. PVDF membrana transfer edilen proteinlerin süt tozu çözeltisinde bloklama işlemi

3.9.5. Antikorlar ile İnkübasyon

Membranlar PBS-T tamponu ile hazırlanan %5'lik süt tozu içerisinde 2 saat oda ısısında bloklandıktan sonra PBS-T ile yıkandı. Yıkanan membranlar bir gece tabloda verilen oranlarda %5'lik BSA içerisinde hazırlanan spesifik primer antikorları ile 4°C'de gece boyunca inkübe edildi. Membranlar TBS-T ile 3x15 dk yıkandıktan sonra, primer antikora uyumlu HRP konjuge edilmiş sekonder antikor ile bir saat oda ısısında inkübe edildi.

Tablo 3.2. Western Blot analizlerinde kullanılan primer ve sekonder antikorların katalog numaraları ile dilüsyon oranları

Doku	Protein	Primer Ab	Dilüsyon	Sekonder Ab	Dilüsyon
Pankreas	İnsülin	ab7842	1/500	ab6771	1/2000
Pankreas	Glukagon	ab92517	1/500	ab205718	1/2000
Beyin	AgRP	ab228495	1/500	ab6771	1/2000
Beyin	POMC	ab254257	1/500	ab205718	1/2000
	β -Actin	ab8226	1/1000	ab6728	1/2000



Şekil 3.17. PVDF membranın +4°C'de primer antikor ile inkübasyonu ve yıkama aşamaları

3.9.6. Görüntüleme ve Değerlendirme

Membranlar sekonder antikor inkübasyonunun sonunda PBS-T ile 3x15 dk yıkandıktan sonra 5 dakika ECL Western görüntüleme solüsyonu (32106, Thermo Scientific Pierce ECL Western Blotting Substrate, USA) ile inkübe edildi. Membranlar Syngene GBox Chemi-XRQ Gel Documentation System görüntüleme sistemi kullanılarak görüntüledi.



Şekil 3.18. Çalışmamızda kullandığımız Western Blot görüntüleme sistemi

Western Blot yöntemi ile elde edilen membrandaki bant görüntüleri bilgisayar programı (Manuel Band Quantification, GeneTools software, version 4.03.05, Syngene, Cambridge, UK), yardımıyla analiz edildi. Bant yoğunlukları hesaplandı ve pozitif kontrol olarak β -aktin yoğunluklarına kıyaslanarak değerlendirildi.

3.10. İmmüno Floresan Analizi

3.10.1. Cryostat Cihazı ile Kesit Alımı

Beyin dokusunda POMC, AgRP ve pankreas dokusundan da glukagon ve insülin protein düzeylerinin histolojik değerlendirmesi immüno floresan analiz yöntemi kullanılarak yapıldı. Çıkarılan beyin ve pankreas dokusu -16°C , -18°C de dondurularak bölümümüz altyapısında mevcut cryostat microtome ile $8\ \mu\text{m}$ kalınlığında kesitler alındı.



Şekil 3.19. İmmünofloresan analizleri için kroyostat ile beyin ve pankreas kesitlerinin hazırlanması

3.10.2. İmmünofloresan Boyama

Beyin ve pankreas doku örneklerinden elde edilen kesitler immünofloresan metot ile boyandı. Kesitler -20°C 'de bekletilen soğuk aseton ile oda sıcaklığında 15 dakika fikse edildi. Fiksasyonun ardından lamalar 3xPBS ile yıkandı ve özgül olmayan antikor bağlanmalarını bloke etmek için hücrelere bloklama solüsyonu (%1 BSA, %0,1 Triton X-100, %0,1 sodyum azid, %1 keçi serumu) eklenerek 45 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bloklamanın ardından tabloda belirtilen oranlarda sulandırılan primer antikorlar (abcam RabMab antibodies, USA) eklendi. Kesitlerin kurumasını engellenecek şekilde $+4^{\circ}\text{C}$ 'de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından 3xPBS ile yıkandı ve primer antikor ile uyumlu sekonder antikor (abcam RabMab antibodies, USA) eklenerek 1 saat oda sıcaklığında karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı. Sekonder antikor inkübasyonunun ardından 3xPBS ile yıkandı Çekirdek boyaması için yapıştırıcı özellikli DAPI solüsyonu eklendi ve kesitler lamel ile kapanarak ışık almayacak şekilde muhafaza edildi.

Tablo 3.3. İmmünofloresan analizlerinde kullanılan primer ve sekonder antikorların katalog numaraları ile dilüsyon oranları

Doku	Protein	Primer Ab	Dilüsyon	Sekonder Ab	Dilüsyon
Pankreas	İnsülin	ab7842	1/50	ab150185	1/1000
Pankreas	Glukagon	ab92517	1/50	ab150079	1/1000
Beyin	AgRP	ab228495	1/500	ab150185	1/1000
Beyin	POMC	ab254257	1/500	ab150079	1/1000

3.10.3. Görüntüleme ve Değerlendirme

Boyanan kesitlerin tamamı Nikon Eclipse Ni-U ışık mikroskobu, DS-Fi3 camera (Nikon Instruments Inc., Melville, NY) ve NIS-Elements Documentation 5.02 Görüntü Analiz Sistemi (Nikon Corp., Tokyo, Japan) ile incelenerek analizler yapıp fotoğraflar alındı.

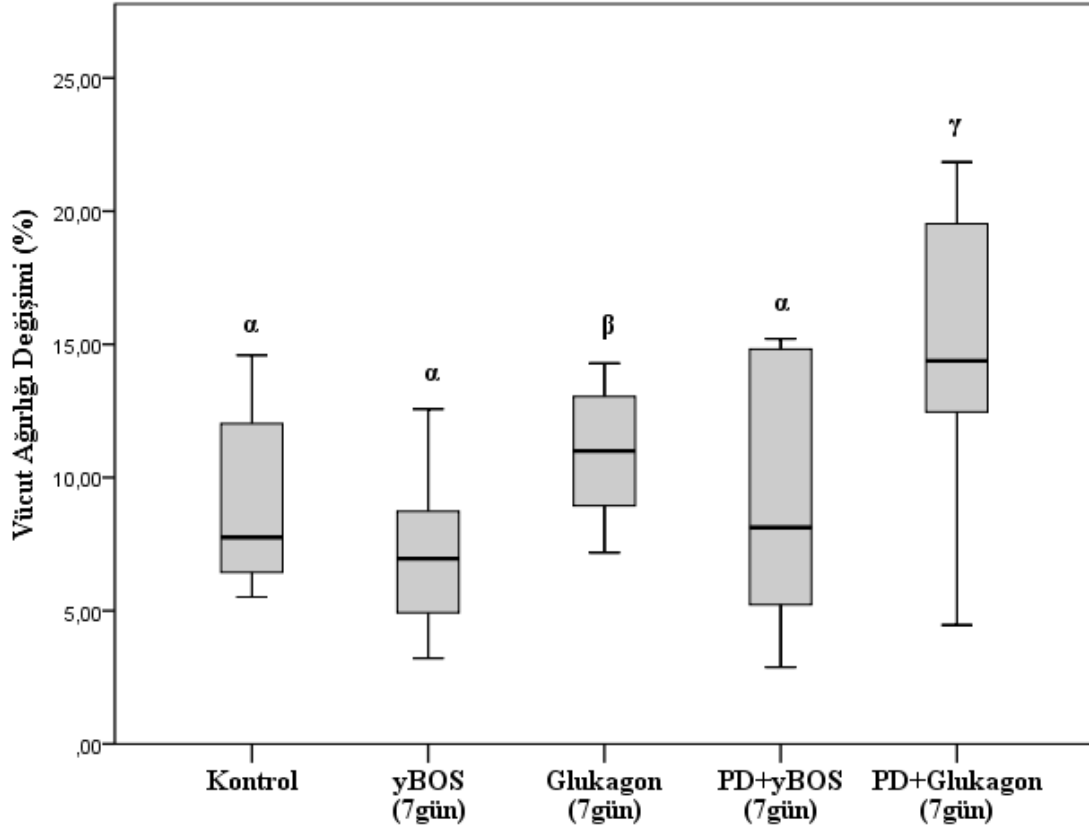
3.11. İstatistiksel Analizler

Çalışmadan elde edilen veriler İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi Anabilim Dalı öğretim elemanları tarafından geliştirilen ve bioistatapps.inonu.edu.tr adresinden açık erişim olarak kullanıma sunulan program kullanılarak yapıldı (100). Veri analizinde öncelikle eksik ve hatalı veriler ile aşırı değişken/uç değer sorunlarının önlenmesine yönelik denetimler ve gerekli ise düzeltme işlemleri yapıldı. Nicel veriler ortalama±standart sapma, nitel veriler ise sayı (yüzde) ile özetlendi. İncelenen değişkenlerin gruplar arası karşılaştırılmalarının tek yönlü varyans analizi ile yapılabilmesi için, normal dağılıma uygunluk ve varyansların homojenlik (Levene testi) kontrolü yapıldı. Bu varsayımlar sağlandığında, ilgili değişkenler için grup ortalamaları arası farklılık, tek yönlü varyans analizi ve çoklu karşılaştırmalar ise varyansların homojen olduğu durumlarda Tukey HSD, olmadığı durumlarda ise Tamhane T2 testi ile yapıldı. Normallik varsayımlarının sağlanmadığı durumlarda ise Kruskal Wallis H testi ve çoklu karşılaştırmalarda ise Conover testi kullanıldı. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Yem Tüketimi ve Vücut Ağırlığı Değişim Bulguları

Çalışmamızda glukagonun merkezi olarak uzun süre uygulandığı gruplarda glukagon uygulamasından itibaren bir hafta boyunca yem tüketimi ve vücut ağırlık değişimleri takip edilmiştir. Vücut ağırlık değişimleri cerrahi operasyonlara kaynaklanan kilo kayıplarına bağlı farklılıkları optimize edebilmek için her bir gruptaki sıçanların başlangıç ağırlıklarına göre orantılanarak % değişim olarak Tablo 4.1’de verilmiştir. Bulgularımıza göre (Şekil 4.1’de) gruplar arası ağırlık değişim yüzdesi glukagon uygulaması yapılan gruplarda artmış ve uygulanmayan gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Ayrıca PD+Glukagon (7 gün) grubundaki ağırlık artışı sadece Glukagon (7 gün) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$). Glukagonun merkezi olarak 7 gün süre uygulandığı gruplarda ortalama yem tüketimi bulguları Tablo 4.2’de verilmiştir. Bulgularımıza göre (Şekil 4.2’de) Glukagon (7 gün) grubundaki yem tüketimi artışı yBOS (7gün) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıdır. PD+Glukagon (7 gün) grubunun haftalık ortalama yem tüketimi yem tüketimi Glukagon (7 gün) ve PD+yBOS (7 gün) gruplarından da istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$). Bu veriler MSS’nin kilo artışı ve yem tüketimindeki etkileri üzerinde glukagonun da rolü olabileceğini göstermektedir.

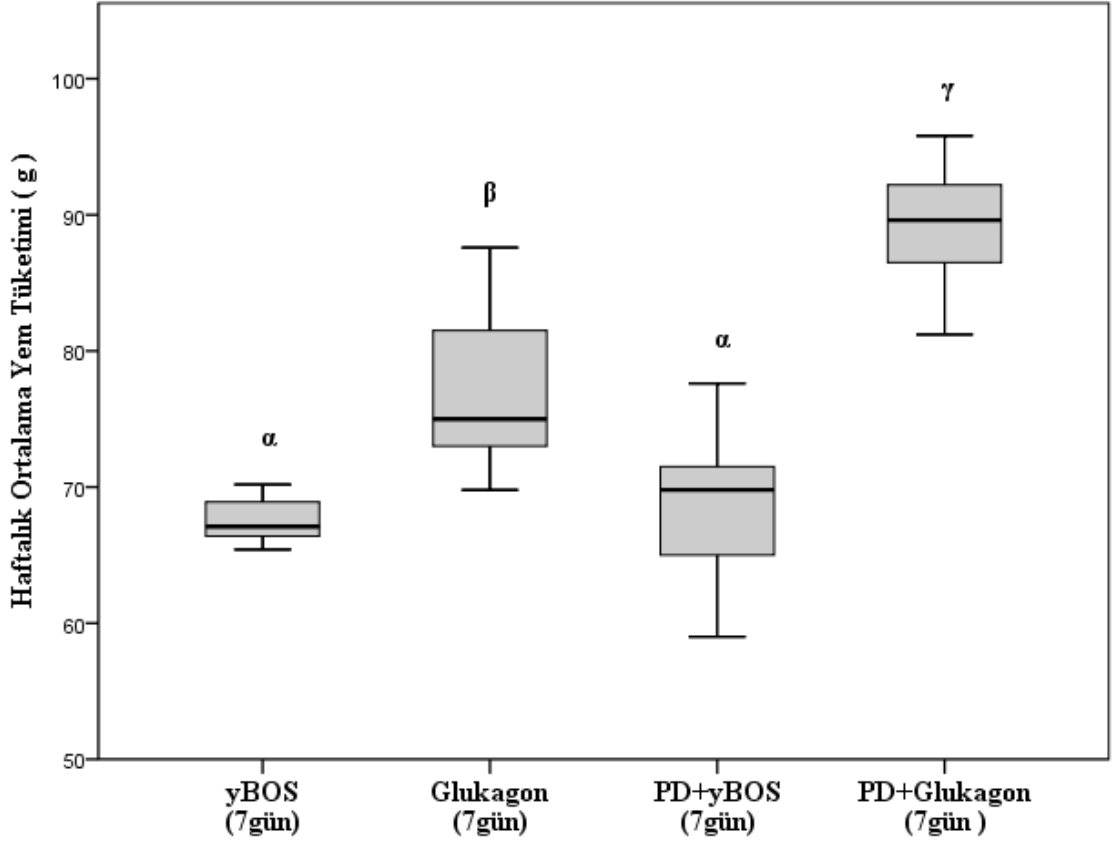


Şekil 4.1. 7 gün süreyle merkezi olarak glukagon uygulanmasının sıçanların vücut ağırlığı % değişimi üzerine etkileri (7 gün uygulama yapılan gruplarda; α , β , γ birbirinden farklı $p < 0.05$; $n = 10$).

Tablo 4.1. 7 gün süreyle merkezi olarak glukagon uygulanmasının sıçanların vücut ağırlığı % değişimleri üzerindeki etkileri

Gruplar	Ağırlık % Değişim (g) Ortanca (Min- Max)	p-değeri
Kontrol	7.757 (5.515-14.588) α	
yBOS (7gün)	6.956 (3.216-12.566) α	
Glukagon (7gün)	10.997 (7.180-14.285) β	$p < 0.05$
PD+yBOS (7gün)	8.124 (2.879-15.201) α	
PD+Glukagon (7gün)	14.376 (4.458-21.839) γ	$p < 0.05$

Veriler Ortanca (min-max) olarak verilmiştir. Gruplar arası karşılaştırma Kruskal Wallis testi ile yapıldı (Gruplar arası karşılaştırmada; α , β , γ birbirinden farklı $p < 0.05$; $n = 10$).



Şekil 4.2. 7 gün süreyle merkezi glukagon uygulanmasının sıçanların haftalık yem tüketimi üzerine etkileri (Gruplar arası karşılaştırmada; α , β , γ birbirinden farklı $p < 0.05$; $n = 10$).

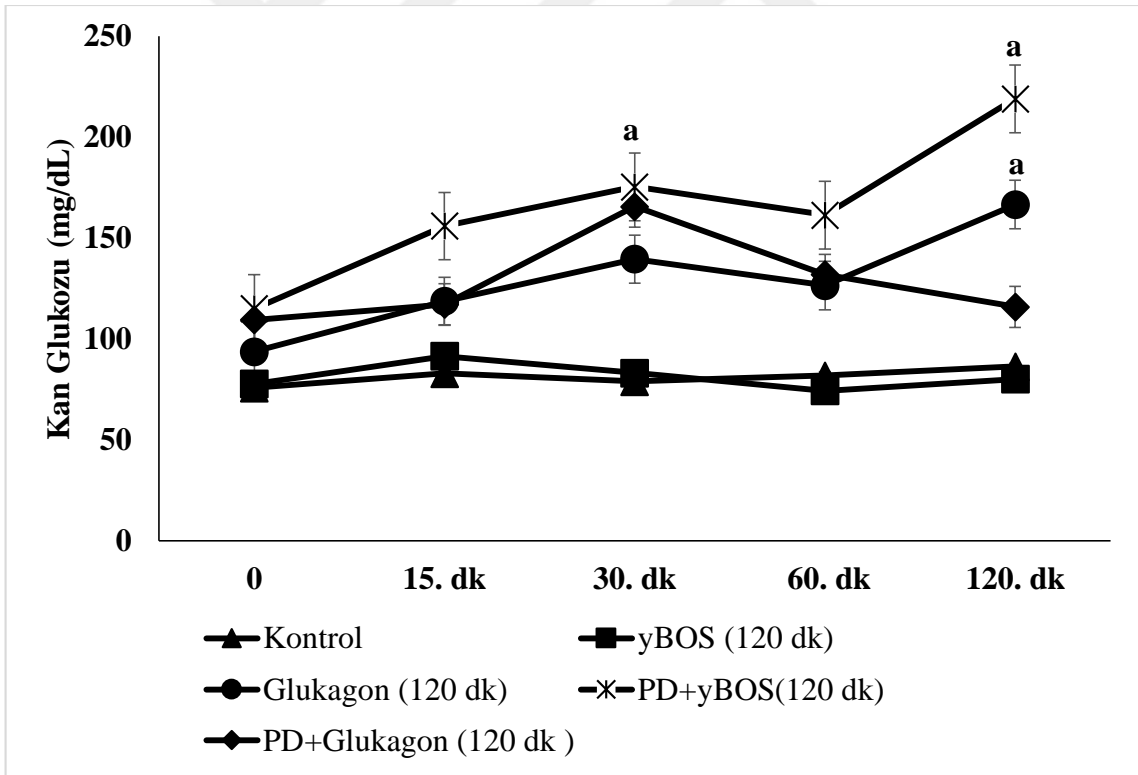
Tablo 4.2. 7 gün süreyle merkezi olarak glukagon uygulanmasının sıçanların haftalık yem tüketimi üzerine etkileri

Gruplar	Yem tüketimi (g) Ortanca (Min- Max)	p-değeri
yBOS (7gün)	67.1 (65.4-70.2) α	
Glukagon (7gün)	75.2 (69.8-87.6) β	$p < 0.05$
PD+yBOS (7gün)	69.8 (59.1-77.6) α	
PD+Glukagon (7gün)	89.6 (81.2-95.8) γ	$p < 0.05$

Veriler Ortanca (min-max) olarak olarak verilmiştir. Gruplar arası karşılaştırma Kruskal Wallis testi ile yapıldı (Gruplar arası karşılaştırmada; α , β , γ birbirinden farklı $p < 0.05$; $n = 10$).

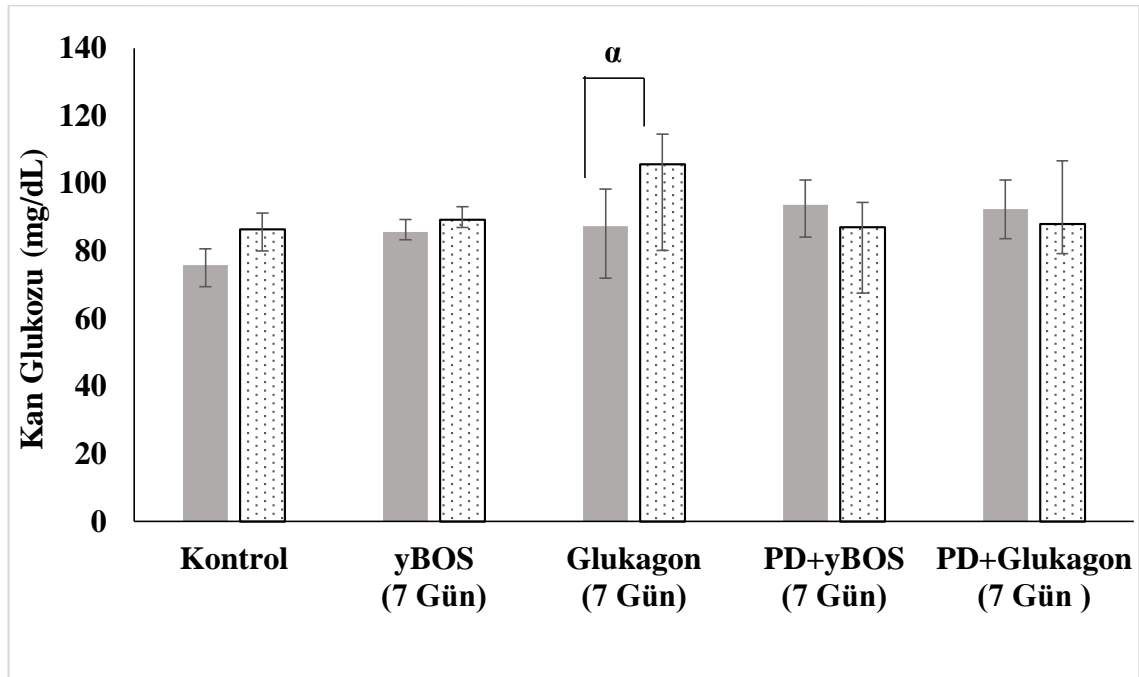
4.2. Sıçanların Kan Glukoz Düzeyleri

Çalışmamızda glukagonun merkezi olarak tek doz uygulandığı gruplarda glukagon uygulamasından itibaren 0.,15.,30.,60.,120. dakikalarda kuyruk kanından alınan örnekler ile kan glukoz değişimleri takip edildi. Bulgularımıza göre (Şekil 4.3’de) PD+yBOS (120 dk) grupta 30. ve 120. dakikalarda başlangıç kan glukozuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi ($p<0.05$). İcv glukagon uygulanan grupta 30. dakikadan itibaren kan glukoz düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi. PD+Glukagon (120 dk) grupta ise 30. Dakikada kan glukoz düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Bu bulgulara göre denerve olan gruplarda kan glukoz düzeyindeki artış pankreasın endokrin salgılarında merkezi kontrolün rol oynadığını göstermektedir. Ayrıca icv glukagon uygulaması yapılan gruptaki kan glukoz miktarındaki dalgalanmalar glukagon hormonunun periferik etkilerinin yanında MSS üzerinde de etki göstererek kan glukozu değişiminde rol oynar.



Şekil 4.3. Merkezi olarak glukagon uygulanmasının sıçanların kan glukozu değişimi üzerine etkileri (0. Dakikadaki değere göre kıyaslandığında; a ilk ölçümden farklı $p<0.05$; n=10).

Çalışmamızda glukagonun merkezi olarak bir hafta boyunca uygulandığı gruplarda günlük kuyruk kanından alınan örnekler ile kan glukoz değişimleri takip edildi. Bulgularımıza göre (Şekil 4.4’de) icv glukagon uygulanan grupta kan glukoz düzeyinde uygulama öncesine göre istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi ($p<0.05$). Glukagon uygulanan gruptaki kan glukozu artışı immünofloresan boyama ile incelediğimiz pankreas dokusunda insülin miktarı azalışı ve glukagon miktarındaki artışla ilişkili olabilir. Azalan insülin miktarına bağlı olarak portal dolaşımdaki glukozun hücre içine alımı azalmaya bağlı olarak kan glukoz konsantrasyonu artmaktadır. Metabolik bir bozukluk olmadığı müddetçe glukagonun merkezde oluşturduğu etki karaciğer, pankreas, kas ve yağ dokunun koordineli olarak etkileşimi ile düzelenabilmektedir.



Şekil 4.4. Merkezi olarak glukagon uygulanmasının sıçanların kan glukozu değişimi üzerine etkileri (7 gün icv glukagon uygulamasında; α ilk ölçümden farklı $p<0.05$; $n=10$).

Tablo 4.3. Gruplara göre sıçanların haftalık ortalama kan glukoz düzeyleri (mg/dl) üzerindeki etkileri

Gruplar	Uygulama öncesi (mg/dl)	7 Günlük uygulama ortalaması (mg/dl)	p-değeri
Kontrol	75.90 ± 4.81	86.41 ± 6.42	
yBOS (7gün)	85.57 ± 3.79	89.28 ± 2.27	
Glukagon (7gün)	87.44 ± 10.86	105.66 ^a ± 15.47	p<0.001
PD+yBOS (7gün)	93.66 ± 7.34	87.06 ± 9.47	
PD+Glukagon (7gün)	92.40 ± 8.64	88.19 ± 8.75	

Merkezi olarak glukagon uygulanmasının sıçanlarda bir haftalık ortalama kan glukoz düzeyi üzerine etkileri. Veriler ortalama ± SD olarak verildi ve gruplar arası karşılaştırma Kruskal Wallis testi ile yapıldı (7 gün uygulama yapılan gruplarda; α , uygulama öncesinden farklı p<0.05; n=10).

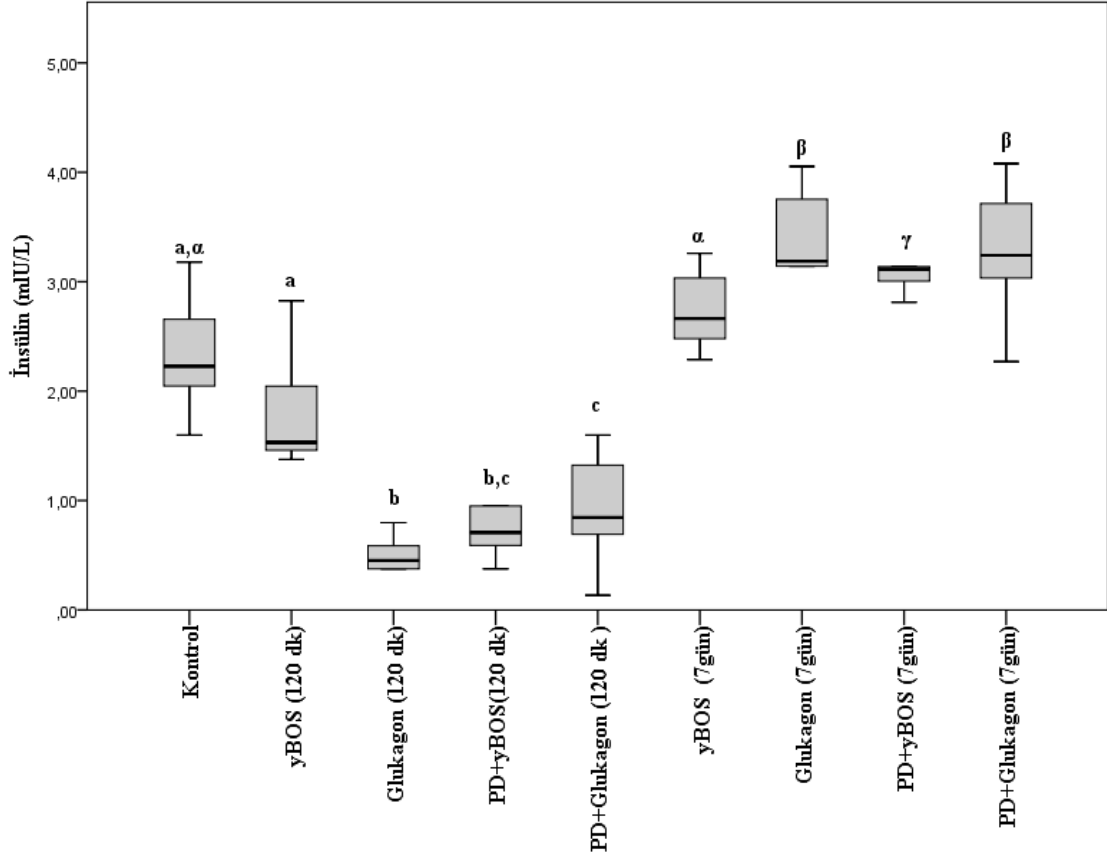
4.3. Sıçanların Kan İnsülin Düzeyleri

Çalışmamızda glukagonun merkezi olarak 120 dk ve 7 gün süre ile uygulandığı gruplarda serum insülin düzeyleri ELISA yöntemi ile ölçüldü ve sonuçlar Tablo 4.4’de verildi. Bulgularımıza göre (Şekil 4.5’de) 120 dk uygulama ile akut etkilerin incelendiği çalışma modelinde Glukagon (120 dk), PD+yBOS (120 dk) ve PD+Glukagon (120 dk) gruplarında serum insülin düzeyindeki azalma Kontrol ve yBOS (120 dk) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0.05). PD+Glukagon (120 dk) grubu ile Glukagon (120 dk) grubu kıyaslandığında insülin seviyesindeki azalış istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0.05).

Merkezi Glukagon uygulamasının uzun süreli etkilerin incelendiği çalışma protokolünde, Glukagon (7 gün), PD+yBOS (7 gün), ve PD+Glukagon (7 gün), gruplarında serum insülin düzeyi atışı Kontrol ve yBOS (7 gün), grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıdır. PD+Glukagon (7 gün) grubu ile Glukagon (7 gün) grubu kıyaslandığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Kısa ve uzun süreli merkezi glukagon uygulamasının serum insülin düzeyi üzerine etkileri incelendiğinde, kısa süreli etkinin insülin düzeyini azaltıcı yönde etkili olduğu

görüldü. Uzun süreli merkezi glukagon uygulamasının ise insülin miktarını artırıcı yönde etki gösterdiği belirlendi. MSS ile pankreasın insülin sekresyonu kontrol edilmekte ve glukagon hormonu akut etkisini azaltıcı; kronik etkisini ise arttırıcı yönde göstermektedir.



Şekil 4.5. Merkezi olarak glukagon uygulanmasının sıçanlarda serum insülin düzeyi üzerine etkileri (120 dk uygulama yapılan gruplarda; a, b, c birbirinden farklı, 7 gün uygulama yapılan gruplarda; α , β , γ birbirinden farklı p<0.05; n=10).

Tablo 4.4. Merkezi olarak glukagon uygulanmasının sıçanlarda serum insülin düzeyleri.

Gruplar	İnsülin (mIU/L) Ortanca (Min- Max)	p-değeri
Kontrol	2.228 (1.055-7.084) ^{a,α}	
yBOS (120 dk)	1.532 (1.375-2.826) ^a	
Glukagon (120 dk)	0.451 (0.375-0.797) ^b	p<0.001
PD+yBOS (120 dk)	0.707 (0.375-2.014) ^{b,c}	p<0.001
PD+Glukagon (120 dk)	0.845 (0.135-1.598) ^c	p<0.001
yBOS (7gün)	2.662 (1.467-3.261) ^α	
Glukagon (7gün)	3.186 (1.244-4.054) ^β	p<0.001
PD+yBOS (7gün)	3.116 (2.813-3.627) ^γ	p<0.001
PD+Glukagon (7gün)	3.241 (2.271-4.082) ^β	p<0.001

Veriler Ortanca (min-max) olarak verildi ve gruplar arası karşılaştırma Kruskal Wallis testi ile yapıldı (120 dk uygulama yapılan gruplarda; a, b, c birbirinden farklı, 7 gün uygulama yapılan gruplarda; α, β, γ birbirinden farklı p<0.05; n=10).

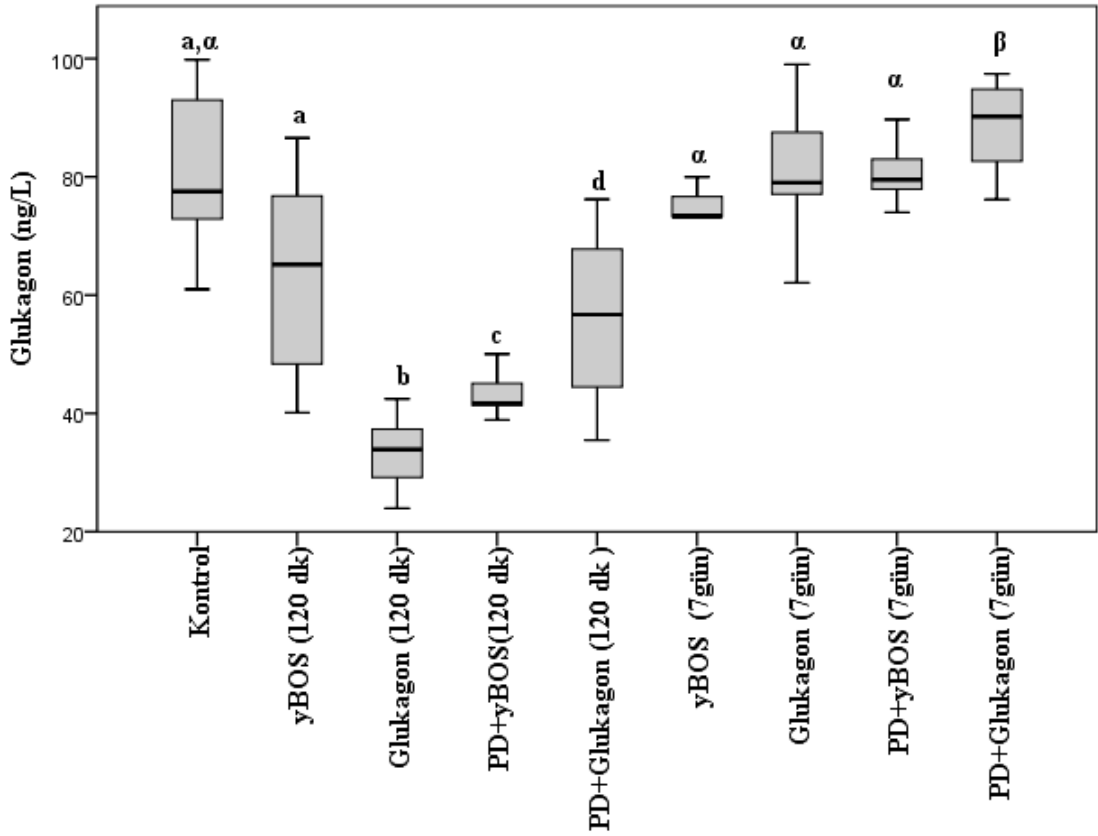
4.4. Sıçanların Kan Glukagon Düzeyleri

Çalışmamızda glukagonun merkezi olarak 120 dk ve 7 gün uygulandığı gruplarda serum glukagon düzeyleri ELISA yöntemi ile ölçüldü ve sonuçlar Tablo 4.5’de verildi. Bulgularımıza göre (Şekil 4.6’da) 120 dk uygulama ile akut etkilerin incelendiği çalışma modelinde Glukagon (120 dk), PD+yBOS (120 dk) ve PD+Glukagon (120 dk) gruplarında serum glukagon düzeyindeki azalma, Kontrol ve yBOS (120 dk) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0.05). PD+Glukagon (120 dk) grubu ile Glukagon (120 dk) grubu ve PD+yBOS (120 dk) kıyaslandığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0.05).

Merkezi glukagon uygulamasının uzun süreli etkilerinin incelendiği çalışma modelinde, yBOS (7 gün), Glukagon (7 gün) ve PD+yBOS (7 gün) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. PD+Glukagon (7 gün) grubundaki serum

glukagon düzeyi artışı Kontrol ve yBOS (7 gün) ve Glukagon (7 gün) ve PD+yBOS (7 gün) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).

Kısa (120 dk) ve uzun (7 gün) süreli merkezi glukagon uygulamasının serum glukagon düzeyi üzerine etkilerinin incelendiği gruplar kendi arasında kıyaslandığında, yBOS (120 dk) ve yBOS (7 gün) grupları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. Glukagon (120 dk) ile Glukagon (7 gün), PD+yBOS (120 dk) ile PD+yBOS (7 gün) ve PD+Glukagon (120 dk) ile PD+Glukagon (7 gün) grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).



Şekil 4.6. Merkezi olarak glukagon uygulanmasının sıçanlarda serum glukagon düzeyi üzerine etkileri (120 dk uygulama yapılan gruplarda; a, b, c, d birbirinden farklı, 7 gün uygulama yapılan gruplarda; α ve β birbirinden farklı $p<0.05$; $n=10$).

Tablo 4.5. Merkezi olarak glukagon uygulanmasının sıçanlarda serum glukagon düzeyleri üzerine etkileri.

Gruplar	Glukagon (ng/L)		p-değeri
	Ortanca (Min- Max)		
Kontrol	77.527	(60.984-100.982) ^{a,α}	
yBOS (120 dk)	63.870	(40.366-87.942) ^a	<0.001
Glukagon (120 dk)	33.887	(23.966-42.452) ^b	<0.001
PD+yBOS(120 dk)	42.709	(38.895-62.060) ^c	<0.001
PD+Glukagon (120 dk)	56.707	(35.479-76.193) ^d	<0.001
yBOS (7gün)	73.348	(62.715-79.984) ^α	<0.001
Glukagon (7gün)	77.096	(49.004-128.795) ^α	<0.001
PD+yBOS (7gün)	79.516	(73.994-89.718) ^α	<0.005
PD+Glukagon (7gün)	90.209	(76.147-145.353) ^β	<0.001

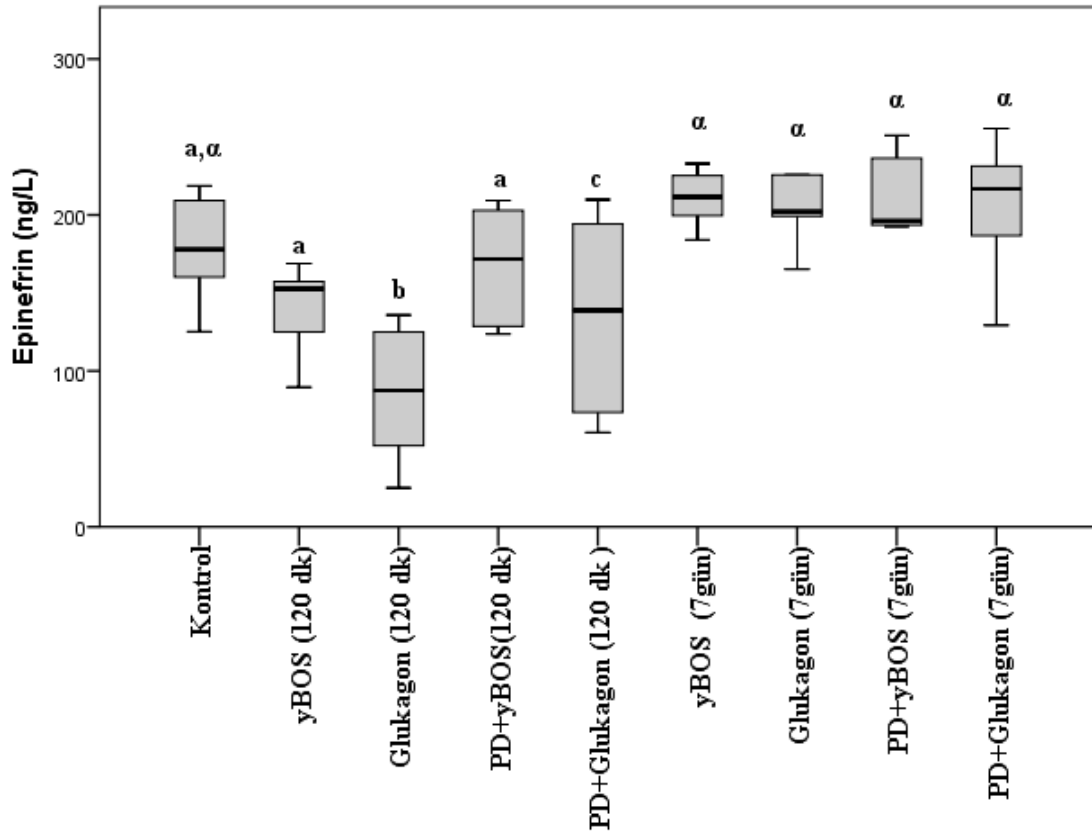
Merkezi olarak glukagon uygulanmasının sıçanlarda serum glukagon düzeyi üzerine etkileri. Veriler Ortanca (min-max) olarak verildi ve gruplar arası karşılaştırma Kruskal Wallis testi ile yapıldı (120 dk uygulama yapılan gruplarda; a, b, c, d birbirinden farklı, 7 gün uygulama yapılan gruplarda; α, β birbirinden farklı p<0.05; n=10).

4.5. Sıçanların Kan Epinefrin Düzeyleri

Çalışmamızda glukagonun merkezi olarak 120 dk ve 7 gün uygulandığı gruplarda serum epinefrin düzeyleri ELISA yöntemi ile ölçüldü ve Tablo 4.6'de verildi. Bulgularımıza göre (Şekil 4.7'de) 120 dk uygulama ile akut etkilerin incelendiği çalışma modelinde Glukagon (120 dk), PD+Glukagon (120 dk) gruplarında serum epinefrin düzeyindeki azalma Kontrol, yBOS (120 dk) ve PD+yBOS (120 dk) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0.05).

Merkezi glukagon uygulamasının uzun süreli etkilerinin incelendiği çalışma modelinde, gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Merkezi glukagon uygulaması 120 dk sonra kan epinefrin düzeyini azaltırken uzun süreli uygulamanın bir etkisi görülmemektedir.



Şekil 4.7. Merkezi olarak glukagon uygulanmasının sıçanlarda serum epinefrin düzeyi üzerine etkileri (120 dk uygulama yapılan gruplarda; a, b, c birbirinden farklı $p < 0.05$; $n = 10$).

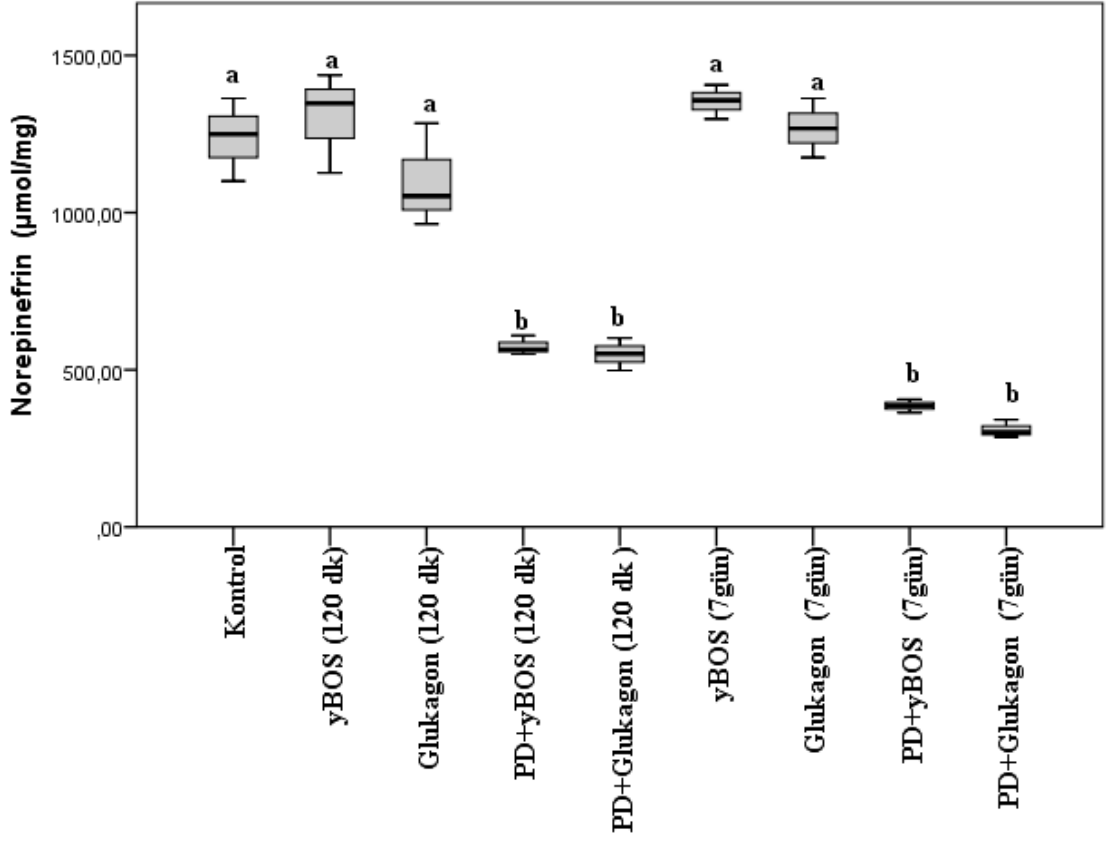
Tablo 4.6. Merkezi olarak glukagon uygulanmasının sıçanlarda serum epinefrin düzeyleri üzerine etkileri.

Gruplar	Epinefrin (ng/L) Ortanca (Min-Max)	p-degeri
Kontrol	188.415 (125.16-485.45) ^{a,α}	
BOS (120 dk)	141.837 (51.23-168.81) ^a	
Glukagon (120 dk)	50.918 (25.00-171.91) ^b	<0.005
PD+yBOS (120 dk)	171.765 (27.86-557.39) ^a	
PD+Glukagon (120 dk)	138.786 (60.42-209.83) ^c	<0.001
yBOS (7gün)	211.513 (183.91-232.83) ^α	
Glukagon (7gün)	202.192 (124.07-270.30) ^α	
PD+yBOS (7gün)	196.281 (192.64-250.93) ^α	
PD+Glukagon (7gün)	195.917 (96.34-255.48) ^α	

Veriler Ortanca (min-max) olarak verildi ve gruplar arası karşılaştırma Kruskal Wallis testi ile yapıldı. Veriler Ortanca (min-max) olarak verildi ve gruplar arası karşılaştırma Kruskal Wallis testi ile yapıldı (120 dk uygulama yapılan gruplarda; a, b, c birbirinden farklı, p<0.05; n=10).

4.6. PD Gruplarında Sıçanların Pankreas Dokusu NE Düzeyleri

Çalışımızda pankreatik denervasyon yapılan gruplarda cerrahi modelin doğruluğunu değerlendirmek için pankreas dokusu norepinefrin düzeyleri ELISA yöntemi ile ölçüldü ve Tablo 4.7’de verildi. Bulgularımıza göre (Şekil 4.8’de) PD+Glukagon (120 dk), PD+yBOS (120 dk), PD+Glukagon (7 gün), PD+yBOS (7 gün) gruplarında norepinefrin düzeyindeki azalma denervasyon yapılmayan gruplara göre istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0.05).



Şekil 4.8. Pankreatik denervasyon cerrahi uygulanmasının sıçanlarda pankreas dokusu norepinefrin düzeyi üzerine etkileri (Gruplar arası kıyaslamada; a, b birbirinden farklı $p < 0.05$; $n = 3$).

Tablo 4.7. Pankreatik denervasyon cerrahi uygulanmasının sıçanlarda pankreas dokusu norepinefrin düzeyi üzerine etkileri.

Gruplar	Norepinefrin (mol/mg) Ortanca (Min-Max)	p-değeri
Kontrol	1175 (1100-1250) ^a	
yBOS (120 dk)	1348 (1126-1437) ^a	
Glukagon (120 dk)	1053 (964-1284) ^a	
PD+yBOS (120 dk)	565 (550-609) ^b	<0.001
PD+Glukagon (120 dk)	551 (498-601) ^b	<0.001
yBOS (7gün)	1357 (1298-1406) ^a	
Glukagon (7gün)	1268 (1175-1364) ^a	
PD+yBOS (7gün)	386 (364-406) ^b	<0.001
PD+Glukagon (7gün)	301 (287-341) ^b	<0.001

Veriler Ortanca (min-max) olarak verildi ve gruplar arası karşılaştırma Kruskal Wallis testi ile yapıldı (gruplar arası kıyaslamada; a, b birbirinden farklı p<0.05; n=3).

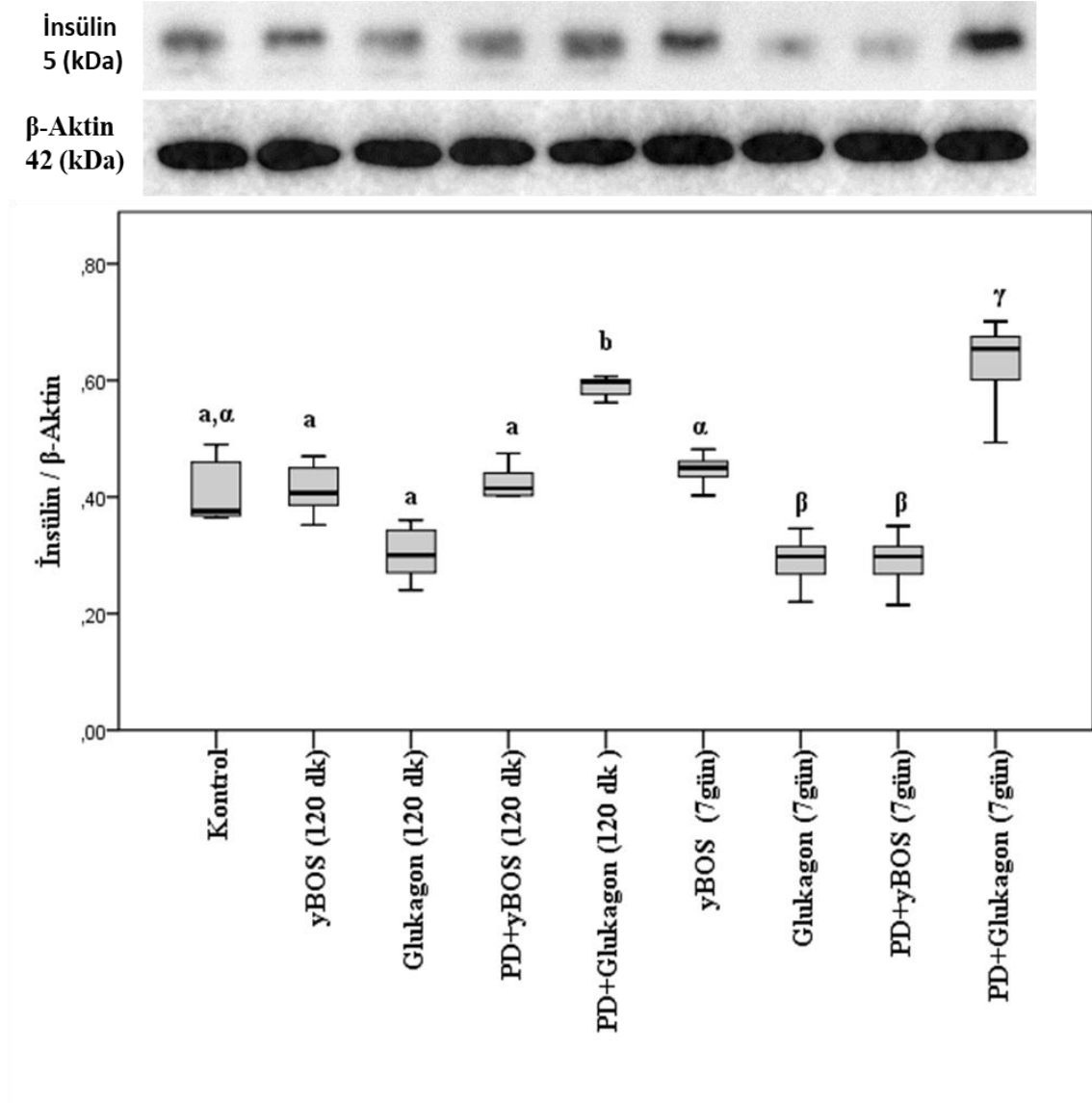
4.7. Sıçanların Pankreas Dokusu Western Blot Bulguları

4.7.1. Sıçanların Pankreas Dokusu İnsülin Western Blot Bulguları

Çalışmamızda glukagonun merkezi olarak 120 dk ve 7 gün süre ile uygulandığı gruplarda pankreas dokusu insülin protein seviyeleri Tablo 4.8’de verildi. Pankreas dokusunda ölçülen insülin protein seviyeleri β -aktin seviyesine göre oranlanarak hesaplanmıştır. Bulgularımıza göre (Şekil 4.9’da) 120 dk uygulama ile akut etkilerin incelendiği çalışma modelinde PD+Glukagon (120 dk) grubunda insülin seviyesindeki artış ile diğer gruplar arası farklılıklar istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0.05).

Merkezi glukagon uygulamasının uzun süreli etkilerin incelendiği çalışma modelinde, PD+yBOS (7 gün) ve Glukagon (7 gün) gruplarında insülin seviyesindeki azalma Kontrol ve yBOS (7 gün) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0.05). Glukagon (7 gün) grubu ve PD+yBOS (7 gün) grupları ile kıyaslandığında PD+Glukagon (7 gün) grubundaki insülin seviyesi artışı istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0.05). PD+yBOS (7 gün) grubu ile Glukagon (7 gün) grubu kıyaslandığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Kısa (120 dk) ve uzun (7 gün) süreli merkezi glukagon uygulamasının pankreas insülin düzeyi üzerine etkilerinin incelendiği gruplar kendi arasında kıyaslandığında yBOS (120 dk) ve yBOS (7 gün) grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. Glukagon (120 dk) ile Glukagon (7 gün), PD+yBOS (120 dk) ile PD+yBOS (7 gün) ve PD+Glukagon (120 dk) ile PD+Glukagon (7 gün) grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).



Şekil 4.9. Merkezi olarak glukagon uygulanmasının sıçanlarda İnsülin/β-Aktin oranına etkisi (120 dk uygulama yapılan gruplarda; a, b birbirinden farklı, 7 gün uygulama yapılan gruplarda; α, β, γ birbirinden farklı $p<0.05$; $n=5$).

Tablo 4.8. Merkezi olarak glukagon uygulanmasının sıçanlarda İnsülin/ β -Aktin seviyesine etkisi.

Gruplar	İnsülin/ β -Aktin Ortanca (Min-Max)	p-degeri
Kontrol	0.38 (0.36-0.49) ^{a,α}	<0.001
yBOS (120 dk)	0.41 (0.35-0.47) ^a	<0.001
Glukagon (120 dk)	0.3 (0.24-0.36) ^b	<0.001
PD+yBOS (120 dk)	0.42 (0.4-0.48) ^c	<0.001
PD+Glukagon (120 dk)	0.6 (0.56-0.61) ^d	<0.001
yBOS (7gün)	0.45 (0.4-0.48) ^a	<0.001
Glukagon (7gün)	0.3 (0.22-0.35) ^{β}	<0.001
PD+yBOS (7gün)	0.3 (0.21-0.35) ^{β}	<0.001
PD+Glukagon (7gün)	0.65 (0.49-0.7) ^{γ}	<0.001

Veriler ortanca (min-max) olarak verildi ve gruplar arası karşılaştırma Kruskal Wallis testi ile yapıldı. 120 dk uygulama yapılan gruplarda a, b, c, d birbirinden farklı; 7 gün uygulama yapılan gruplarda α , β , γ birbirinden farklı. ($p<0.05$; $n=5$)

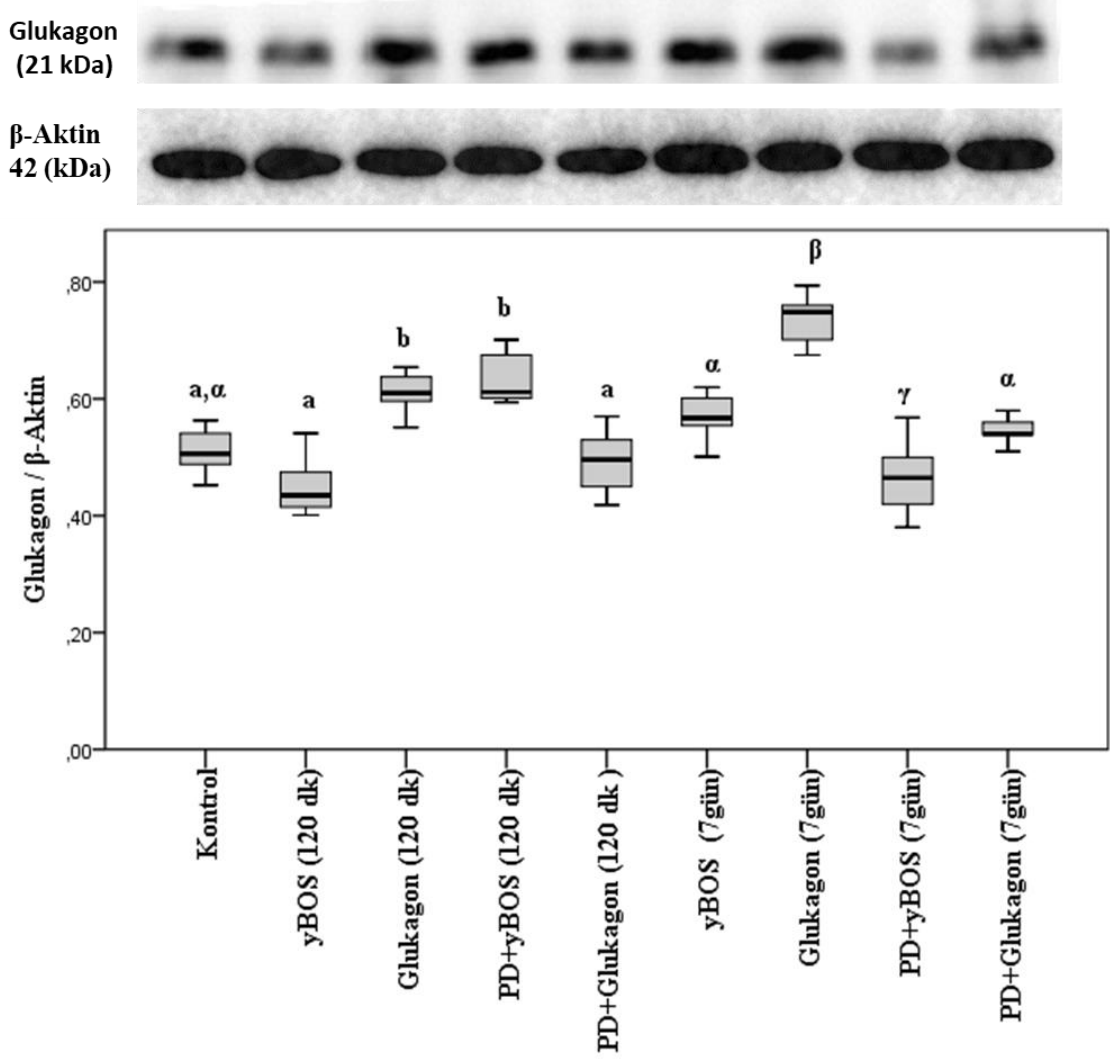
4.7.2 Sıçanların Pankreas Dokusu Glukagon Western Blot Bulguları

Çalışmamızda glukagonun merkezi olarak 120 dk ve 7 gün süre ile uygulandığı gruplarda pankreas dokusu glukagon protein düzeyleri Tablo 4.9’da verildi. Pankreas dokusunda ölçülen glukagon protein seviyeleri β -aktin seviyesine göre oranlanarak hesaplanmıştır. Bulgularımıza göre (Şekil 4.10’da) 120 dk uygulama ile akut etkilerin incelendiği çalışma modelinde Glukagon (120 dk) ve PD+yBOS (120 dk) gruplarında glukagon seviyesindeki artış diğer gruplar ile kıyaslandığında farklılıklar istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).

Merkezi glukagon uygulamasının uzun süreli etkilerin incelendiği çalışma protokolünde; Glukagon (7 gün) grubundaki glukagon seviyesi artışı ve PD+yBOS (7 gün) grubundaki glukagon seviyesi azalış Kontrol, yBOS (7 gün) ve PD+Glukagon (7 gün) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).

Kısa (120 dk) ve uzun (7 gün) süreli merkezi glukagon uygulamasının pankreas insülin düzeyi üzerine etkilerinin incelendiği gruplar kendi arasında kıyaslandığında yBOS (120 dk) ve yBOS (7 gün) grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı

değildir. Glukagon (120 dk) ile Glukagon (7 gün), PD+yBOS (120 dk) ile PD+yBOS (7 gün) ve PD+Glukagon (120 dk) ile PD+Glukagon (7 gün) grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$).



Şekil 4.10. Merkezi olarak glukagon uygulanmasının sıçanlarda Glukagon/β-Aktin oranına etkisi (120 dk uygulama yapılan gruplarda; a, b birbirinden farklı, 7 gün uygulama yapılan gruplarda; α, β, γ birbirinden farklı $p < 0.05$; $n=5$).

Tablo 4.9. Merkezi olarak glukagon uygulanmasının sıçanlarda Glukagon/ β -Aktin oranına etkisi

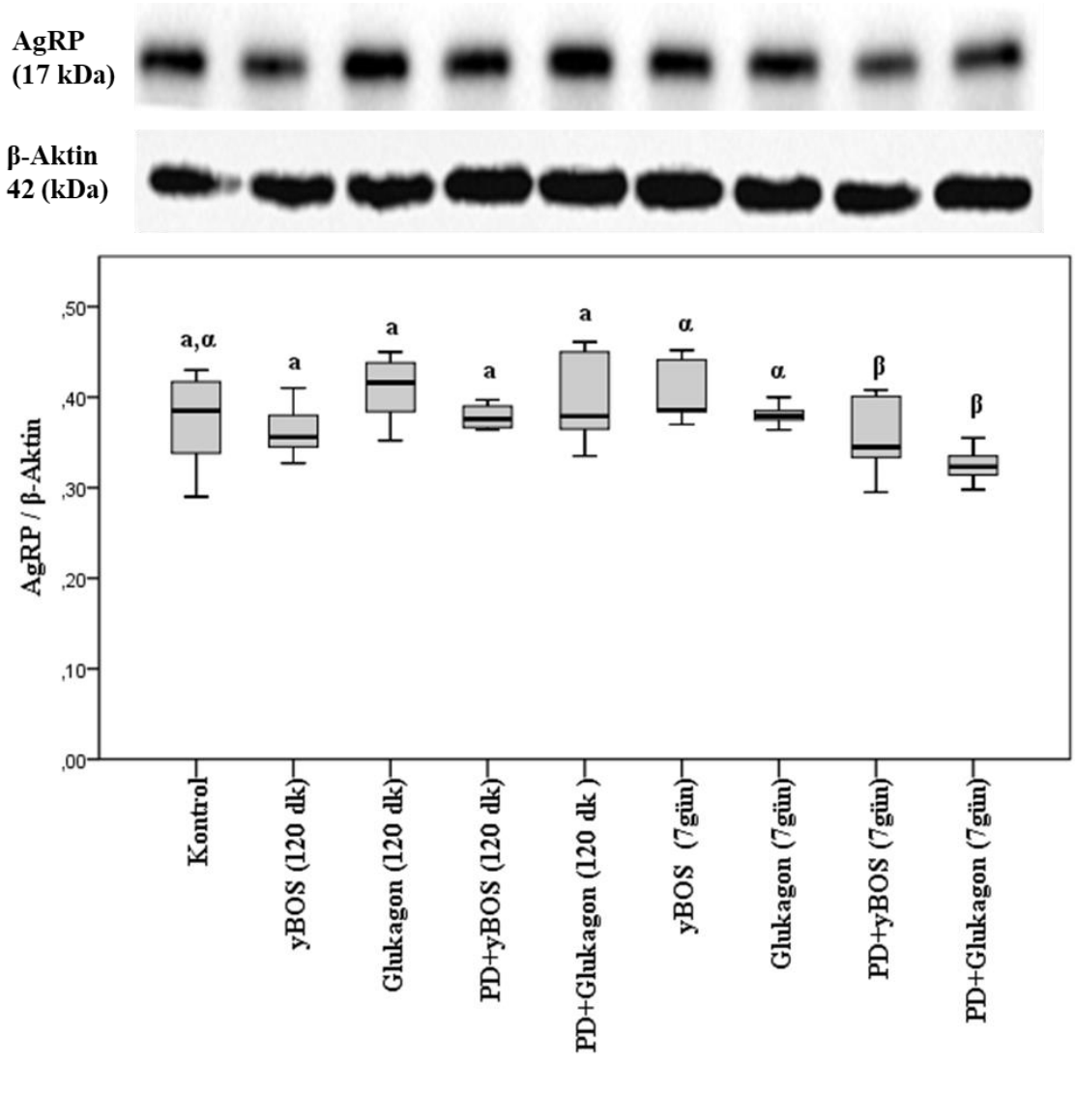
Gruplar	Glukagon/ β -Aktin Ortanca (Min-Mak)	p-degeri
Kontrol	0.51 (0.45-0.56) ^{a, α}	
yBOS (120 dk)	0.44 (0.40-0.54) ^a	<0.001
Glukagon (120 dk)	0.61 (0.55-0.65) ^b	<0.001
PD+yBOS (120 dk)	0.61 (0.59-0.70) ^c	<0.001
PD+Glukagon (120 dk)	0.5 (0.42-0.57) ^a	<0.001
yBOS (7gün)	0.57 (0.5-0.62) ^{α}	<0.001
Glukagon (7gün)	0.75 (0.68-0.79) ^{β}	<0.001
PD+yBOS (7gün)	0.47 (0.38-0.57) ^{γ}	<0.001
PD+Glukagon (7gün)	0.54 (0.51-0.58) ^{α}	<0.001

Veriler ortanca (min-max) olarak verildi ve gruplar arası karşılaştırma Kruskal Wallis testi ile yapıldı. 120 dk uygulama yapılan gruplarda a, b, c birbirinden farklı;7 gün uygulama yapılan gruplarda α , β , γ birbirinden farklı. (p<0.05; n=5)

4.8. Sıçanların Beyin Dokusu Western Blot Bulguları

4.8.1. Sıçanların Beyin Dokusu AgRP Western Blot Bulguları

Çalışmamızda glukagonun merkezi olarak 120 dk ve 7 gün süre ile uygulandığı gruplarda pankreas dokusu AgRP protein düzeyleri Tablo 4.10'da verildi. Pankreas dokusunda ölçülen glukagon protein seviyeleri β -aktin seviyesine göre oranlanarak hesaplanmıştır. Bulgularımıza göre (Şekil 4.11'de) 120 dk uygulama ile akut etkilerin incelendiği çalışma modelinde ve uzun süreli etkilerin incelendiği çalışma modelinde gruplar arası farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 4.11. Merkezi olarak glukagon uygulanmasının sıçanlarda AgRP/β-Aktin oranına etkisi. 120 dk uygulama yapılan gruplarda gruplar arası fark istatistiksel olarak anlamlı değildir; 7 gün uygulama yapılan gruplarda α, β birbirinden farklı. ($p < 0.05$; $n = 5$)

Tablo 4.10. Merkezi olarak glukagon uygulanmasının sıçanlarda AgRP/ β -Aktin oranına etkisi

Gruplar	AgRP/β-Aktin
	Ortanca (Min-Max)
Kontrol	0.39 (0.29-0.43)
yBOS (120 dk)	0.36 (0.33-0.41)
Glukagon (120 dk)	0.42 (0.35-0.45)
PD+yBOS (120 dk)	0.38 (0.36-0.4)
PD+Glukagon (120 dk)	0.38 (0.34-0.46)
yBOS (7gün)	0.39 (0.37-0.45)
Glukagon (7gün)	0.38 (0.36-0.4)
PD+yBOS (7gün)	0.35 (0.3-0.41)
PD+Glukagon (7gün)	0.32 (0.3-0.36)

Veriler ortanca (min-max) olarak verildi ve gruplar arası karşılaştırma Kruskal Wallis testi ile yapıldı ($p < 0.05$; $n=5$).

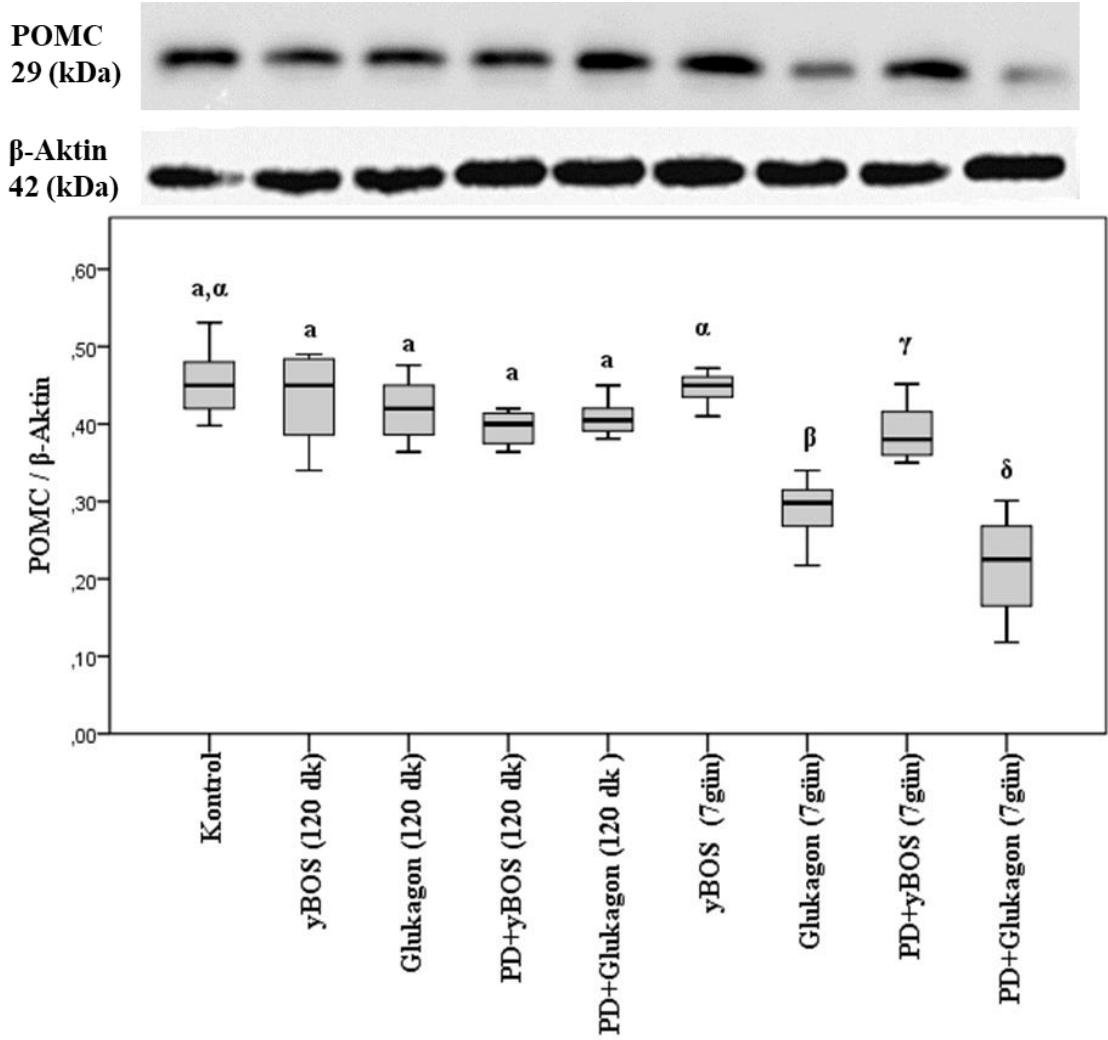
4.8.2 Sıçanların Beyin Dokusu POMC Western Blot Bulguları

Çalışmamızda glukagonun merkezi olarak 120 dk ve 7 gün süre ile uygulandığı gruplarda pankreas dokusu POMC protein düzeyleri Tablo 4.11’de verildi. Pankreas dokusunda ölçülen glukagon protein seviyeleri β -aktin seviyesine göre oranlanarak hesaplanmıştır. Bulgularımıza göre (Şekil 4.12’de) 120 dk uygulama ile akut etkilerin incelendiği çalışma modelinde gruplar arası farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Merkezi glukagon uygulamasının uzun süreli etkilerin incelendiği çalışma modelinde, Glukagon (7 gün) grubu POMC değerlerindeki azalış Kontrol ve yBOS (7 gün), grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıdır. Glukagon (7 gün) grubu ile PD+yBOS (7 gün) grubu ve PD+Glukagon (7 gün) grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır. PD+yBOS (7 gün) grubu ile PD+Glukagon (7 gün) grubu kıyaslandığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$).

Kısa (120 dk) ve uzun (7 gün) süreli Merkezi Glukagon uygulamasının pankreas insülin düzeyi üzerine etkilerinin incelendiği gruplar kendi arasında kıyaslandığında

yBOS (120 dk) ve yBOS (7 gün) grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. Glukagon (120 dk) ile Glukagon (7 gün), PD+yBOS (120 dk) ile PD+yBOS (7 gün) ve PD+Glukagon (120 dk) ile PD+Glukagon (7 gün) grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).



Şekil 4.12. Merkezi olarak glukagon uygulanmasının sıçanlarda POMC/β-Aktin oranına etkisi (120 dk uygulama yapılan gruplarda a gruplar arası farklılık istatistiksel olarak anlamlı değil); (7 gün uygulama yapılan gruplarda α, β, γ, δ birbirinden farklı $p<0.05$; n=5).

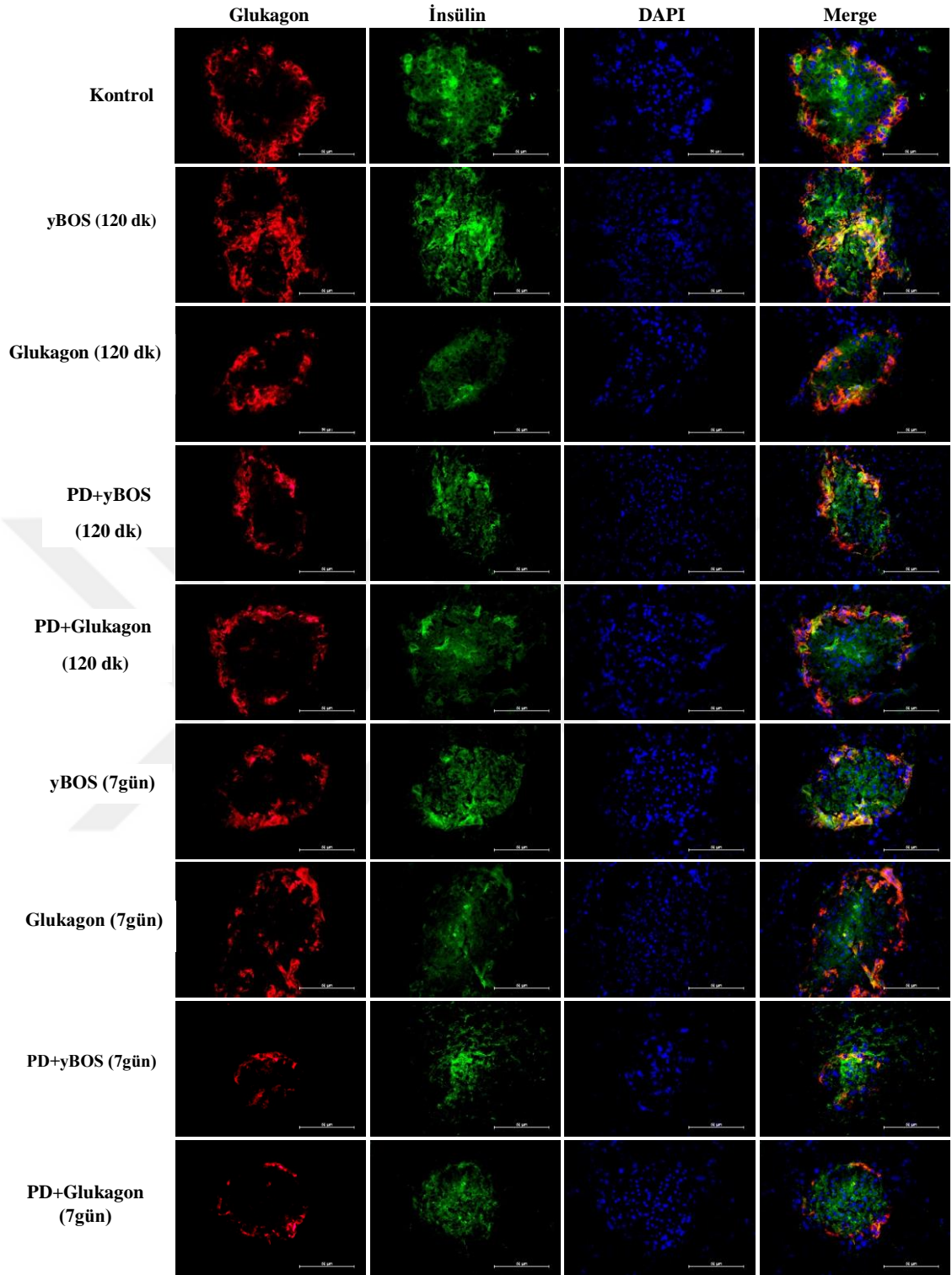
Tablo 4.11. Merkezi olarak glukagon uygulanmasının POMC/ β -Aktin oranına etkisi

Gruplar	POMC/ β -Aktin Ortanca (Min-Max)	p-değeri
Kontrol	0.45 ^{a,α} (0.4-0.53)	
yBOS (120 dk)	0.45 ^a (0.34-0.49)	
Glukagon (120 dk)	0.42 ^a (0.36-0.48)	
PD+yBOS (120 dk)	0.4 ^a (0.36-0.42)	
PD+Glukagon (120 dk)	0.41 ^a (0.38-0.45)	
yBOS (7gün)	0.45 ^α (0.41-0.47)	
Glukagon (7gün)	0.3 ^β (0.22-0.34)	<0.001
PD+yBOS (7gün)	0.38 ^γ (0.35-0.45)	<0.001
PD+Glukagon (7gün)	0.23 ^δ (0.12-0.3)	<0.001

Veriler ortanca (min-max) olarak verildi ve gruplar arası karşılaştırma Kruskal Wallis testi ile yapıldı. 7 gün uygulama yapılan gruplarda α , β , γ , δ birbirinden farklı ($p < 0.05$; $n=5$)

4.9. Sıçanların Pankreas Dokusu İmmüno Floresan Bulguları

Çalışmamızda üçlü immüno floresan boyama tekniği ile Pankreas dokusu adacık hücreleri incelenerek β hücrelerinde üretilen insülin ile α adacık hücrelerinde üretilen glukagon protein yoğunlukları kıyaslanmıştır. Bulgularımıza göre pankreatik denervasyon yapılan gruplarda kısa süreli etkilerin incelendiği modelde pankreatik denervasyonun ve glukagon uygulamasının insülin ve glukagon sekresyonunda etkin olduğu gözlemlendi. PD+yBOS (120 dk) grubunda insülin ve glukagon miktarının Kontrol grubuna kıyasla azalmış olduğu ve PD+Glukagon (120 dk) grubunda ise insülin miktarını artırdığı görüldü. Pankreatik denervasyonun uygulamasının bir haftalık etkisinin insülin ve glukagon miktarını azaldığı belirlendi. Glukagon uygulaması insülin miktarını azaltırken glukagon miktarını artırdı. Yine uzun süreli glukagon uygulanan PD+Glukagon (7gün) grupta insülin ve glukagon miktarı kontrol grubu bulgularına benzerdi.

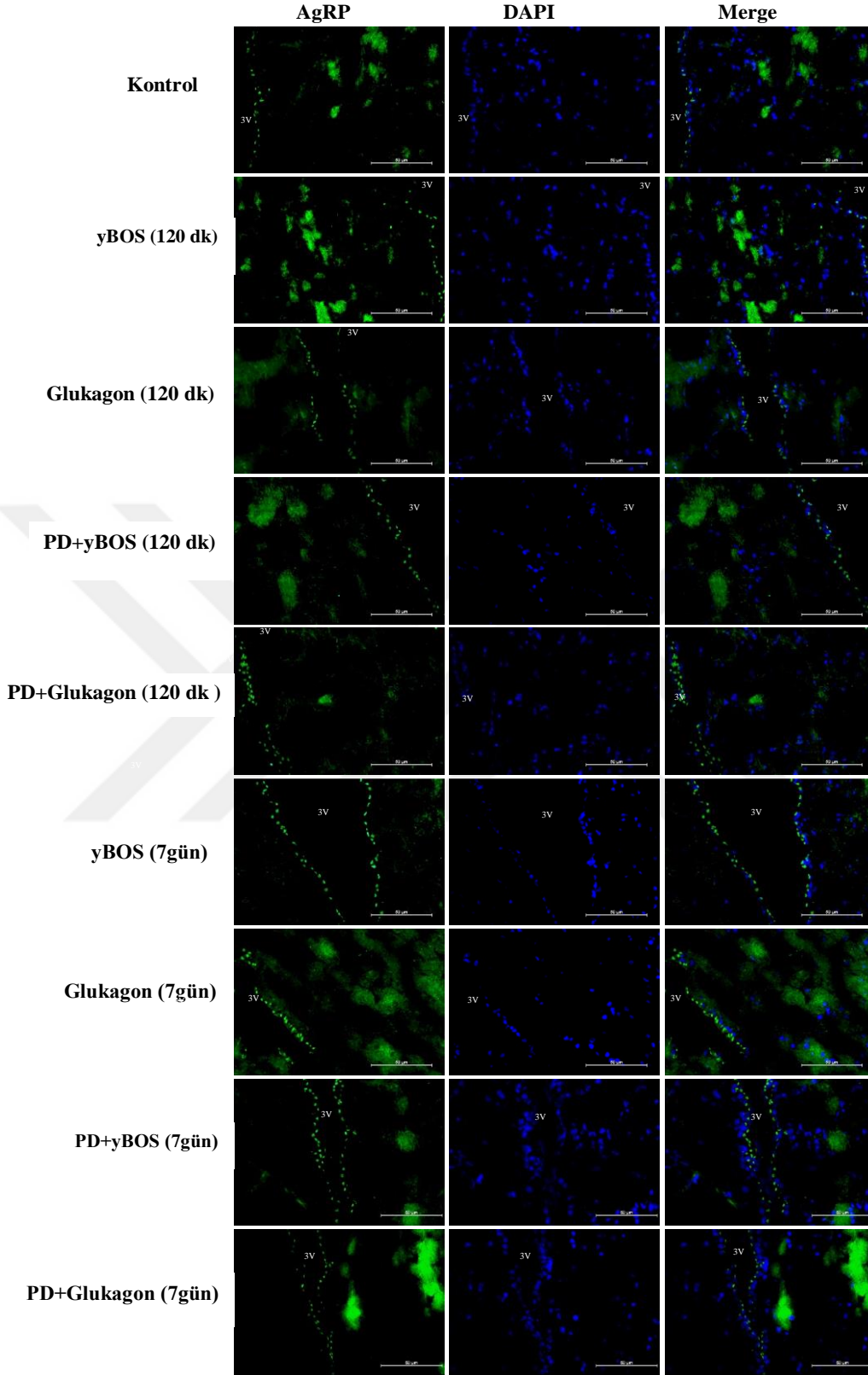


Şekil 4.13. Sıçanların pankreas dokusu üçlü immüno Floresan boyama. Sıçan pankreas adacık hücrelerini gösterimi. Glukagon (kırmızı, Alexa 647), insülin (yeşil, Alexa488), hücre nükleusları (DAPI) ile gösterilmiştir. Bar 50 µm

4.10. Sıçanların Beyin Dokusu IF Bulguları

4.10.1. Sıçanların Beyin Dokusu AgRP IF Bulguları

Çalışmamızda ikili immünofloresan boyama tekniği ile beyin dokusu incelenerek çalışma gruplarında AgRP protein yoğunlukları kıyaslanmıştır. Bulgularımıza göre kısa süreli pankreatik denervasyon ve glukagon uygulamasının AgRP protein seviyesinde farklılık gözlemlenmemiştir. Uzun süreli deney protokolünde ise ve icv glukagon uygulanan Glukagon (7 gün) ve PD+Glukagon (7 gün) gruplarında glukagon uygulaması yapılmayan gruplara göre AgRP protein seviyesinde artış görüldü. Kısa ve uzun süreli merkezi glukagon uygulamasının AgRP protein seviyesi üzerinde etkileri kıyaslandığında; Glukagon (7 gün) grubunun Glukagon (120 dk) grubundan daha fazla AgRP protein seviyesinde artışa neden olduğu görüldü. PD+Glukagon (7 gün) grubu ile PD+Glukagon (120 dk) grubu kıyaslandığında AgRP seviyesinde artış görüldü.

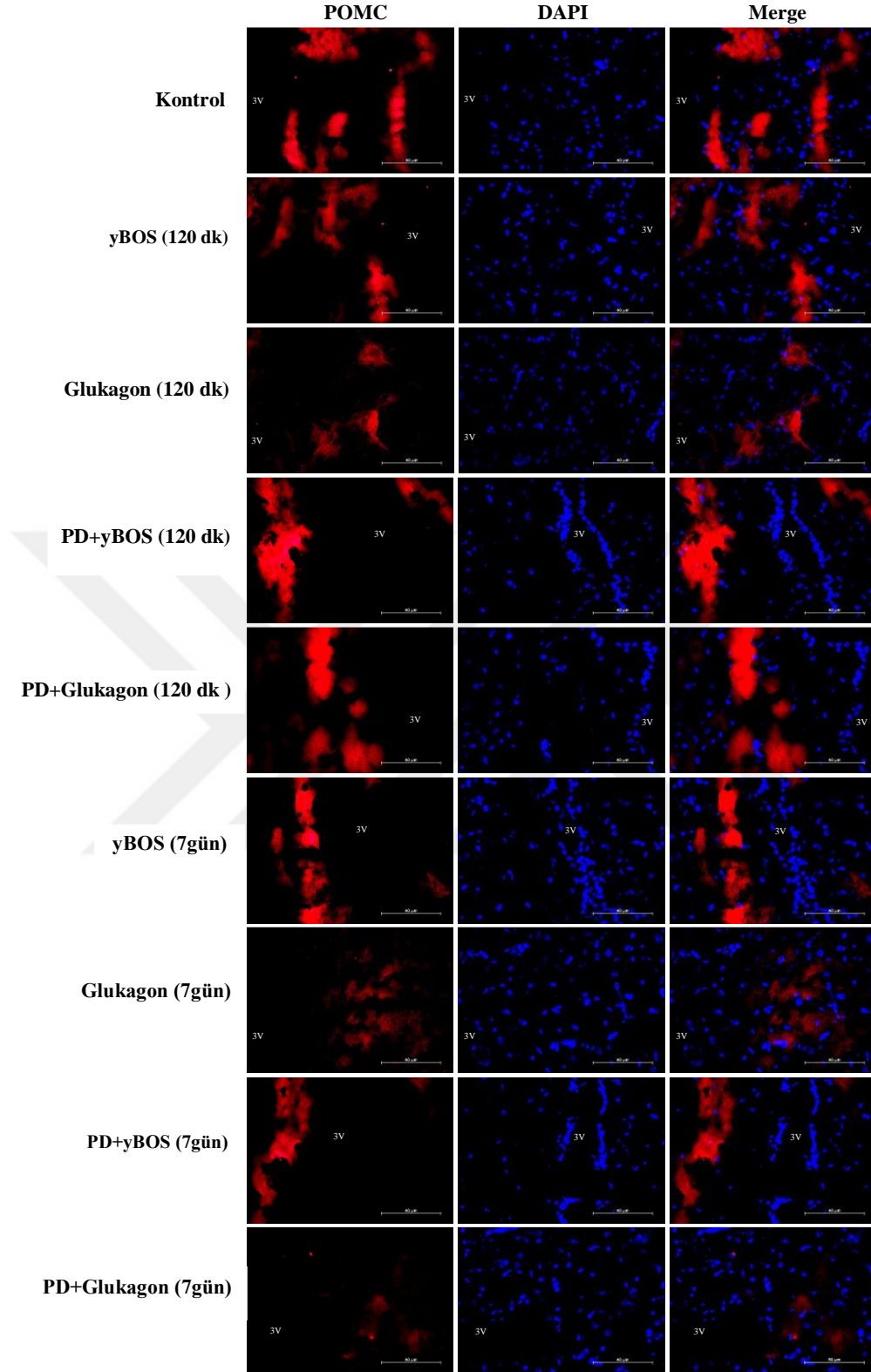


Şekil 4.14. Sıçanların beyin dokusu ikili immünofloresan boyama. Sıçan beyin dokusunda 3.ventrikül çevresinin gösterimi. AgRP (yeşil, Alexa 488), hücre nükleusları (DAPI) ile gösterilmiştir. Bar 50 μ m

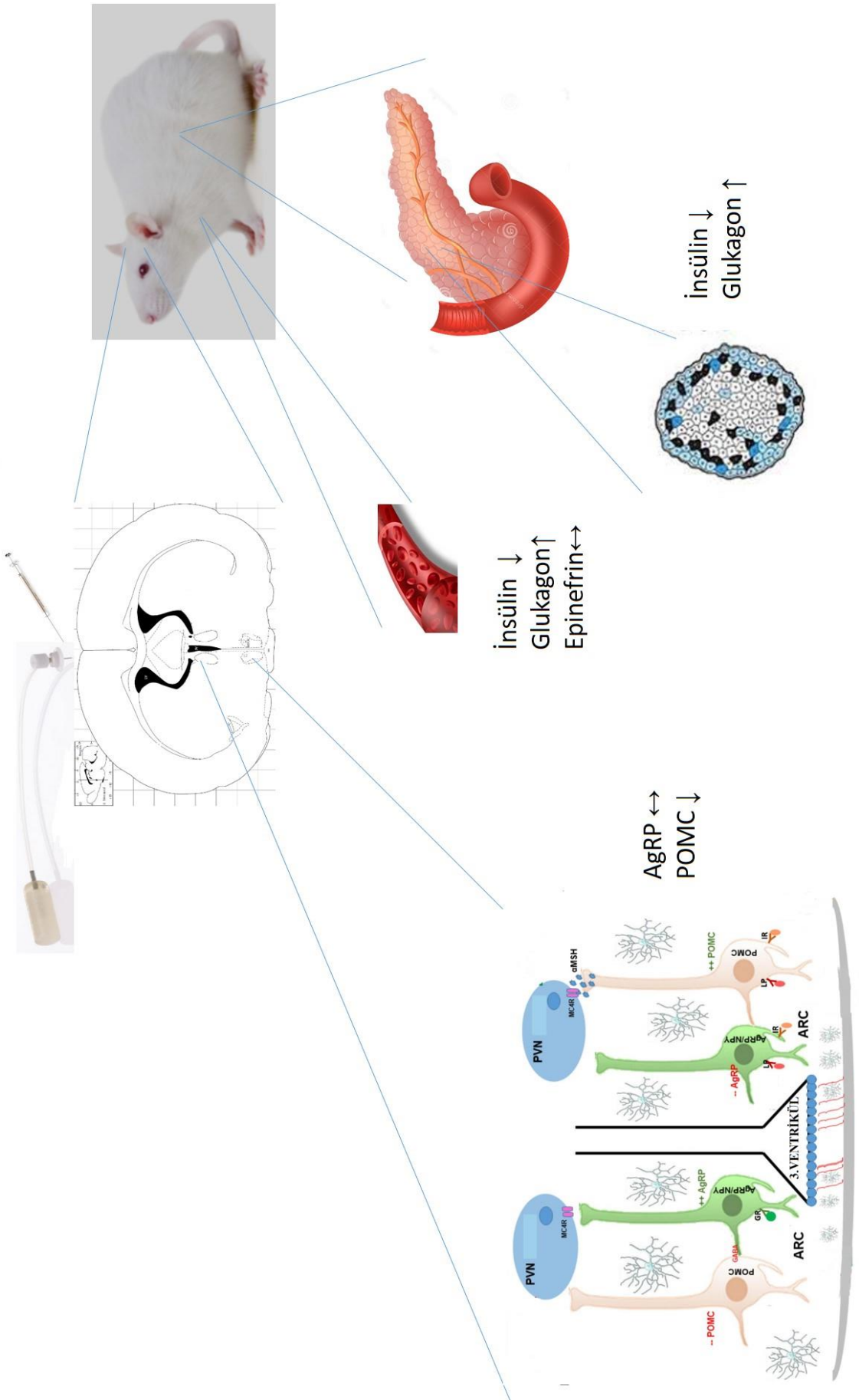
4.10.2 Sıçanların Beyin Dokusu POMC IF Bulguları

Çalışmamızda ikili immünofloresan boyama tekniği ile beyin dokusu incelenerek çalışma gruplarında POMC protein yoğunlukları kıyaslanmıştır. Bulgularımıza göre pankreatik denervasyon yapılan gruplarda kısa süreli etkilerin incelendiği modelde pankreatik denervasyonun ve glukagon uygulamasının POMC protein miktarı üzerinde etkili olmadığı görüldü. Şekil 4.15’ de görüldüğü gibi görsel sonuçlarımız kontrol grubu bulgularına benzerdir. Uzun süreli etkilerin incelendiği çalışma modelinde ise glukagon uygulanan gruplarda POMC protein miktarında azalma görüldü. PD+Glukagon grubunda POMC miktarındaki azalma Glukagon (7 gün) grubundan daha az olduğu görüldü.





Şekil 4.15. Sıçanların beyin dokusu ikili immüno Floresan boyama. Sıçan beyin dokusunda 3.ventrikül çevresinin gösterimi. POMC (kırmızı, Alexa 647), hücre nükleusları (DAPI) ile gösterilmiştir. Bar 50 µm



5. TARTIŞMA

Sağlıklı bir erişkindeki günlük enerji harcamalarının yaklaşık 1.500 kcal'lık büyük kısmı (%60-%75) bazal metabolizma için harcanır. MSS tamamını glukozdan karşıladığı 100-160 kcal/gün enerji kullanır (101). Beyin gibi sinir dokusu, eritrosit, lökosit ve renal medulla hücreleri de gereksinim duydukları enerjiyi yalnızca glukozdan karşılayabilirler. Bu nedenle, dolaşımdaki glukozun belli aralıklarda dengede tutulması önemlidir (102).

Glukagon pankreatik α hücrelerinden sentezlenip kana salınan hepatik glukoz üretim yoluyla kan glukoz düzeyini arttıran bir hormondur (103). En basit düzeyde, dolaşımdaki kan şekeri düzeylerinin artmasıyla glukagon sekresyonu azalarak, kan glukoz düzeyi azalınca da glukagon sekresyonu artarak kan glukoz seviyesinin korunmasına yardımcı olur. Glukagonun kontrolünü inceleyen çoğu çalışma özellikle hipoglisemide glukozdaki değişikliklere glukagon salgısının nasıl tepki verdiğini incelemiştir. Beynin, çeşitli stresörler (hipoglisemi, leptin vb) aracılığıyla glukagon seviyesindeki değişimlerde rol oynayabileceği düşünülmese rağmen mekanizmayla ilgili yeterli veri bulunmamaktadır (104). Glukagonun periferdeki insüline zıt etkisinin, merkezde insülinin etkin olduğu bölgelerde nasıl olduğu da tam olarak bilinmemektedir.

Bu tez çalışması ile glukagonun merkezdeki muhtemel etkilerinin ve etki mekanizmasının nasıl olduğuna dair kanıtlar elde etmeye çalışılmıştır. Merkezi olarak glukagon uygulandığında beyin beslenme davranışlarını düzenleyen yollar ve periferdeki yansımalarının kan glukoz homeostazında kilit rol alan insülin ve glukagon üzerine etkilerini inceleyerek kan glukoz homeostazındaki düzenleyici mekanizmalarının tam olarak bilinmeyen bir parçasının (glukagon yönüyle) açıklanmasına katkı sağlanmaya çalışılmıştır.

Çalışmamızda PD yapılan deney gruplarında icv uygulanan glukagonun MSS etkileşimini incelerken pankreas dokusu üzerindeki etkilerin nöronal mi yoksa hormonal bir etkileşim ile mi düzenledikleri araştırılmıştır. Ayrıca icv uygulanan glukagonun MSS muhtemel etkinliğinin, sempatik sinir sistemi aktivitesini değiştirip, ekstra pankreatik dokuları etkileyerek mi yoksa pankreastan bu hormonların salınımını değiştirerek mi gösterdiği de aydınlatılmaya çalışılmıştır.

5.1. Glukoz Homeostazında Glukagonun Merkezi Sinir Sistemindeki Rolü

AgRP ve POMC beslenme davranışlarına bağlı kilo değişimlerinin sinirsel kontrolünde etkindirler. POMC artışı iştahı baskılamak, AgRP artışı iştahla birlikte besin tüketimini artırmaktadır. Yapılan çalışmalar birçok endokrin sinyalin bu yolları koordineli bir şekilde etkileyerek beslenme davranışlarını düzenlediğini göstermiştir. Ayrıca POMC ve AgRP kendi arasında da etkileşim göstererek uyumlu olduğu ve bu uyum bozulduğunda obezite gibi bir metabolik sendromun geliştiği ileri sürülmektedir (105). POMC'nin AgRP nöronlarının ateşlenmesinde etkin olduğu bilinmektedir (106, 107). Beslenme davranışları ve bazal metabolizma arasındaki ilişkinin değerlendirildiği çalışmalardan birinde egzersizin POMC üzerinde artışa neden olduğunu ve POMC artışının leptin reseptörlerini arttırdığı ileri sürülmüştür. Leptin hormonunun AgRP ve NPY üzerindeki baskılayıcı etkisinin artmasıyla iştahın baskılandığı bu metabolik yolda POMC'nin iştahın düzenlenmesi üzerinde daha etkin bir rolünün olabileceğinin bir işareti olarak vurgulanmıştır (108).

Glukagonun merkezi uygulandığı doz bağımlı (5, 10, 25, 50 ve 100 ng/kg) bir çalışmada en düşük dozun sadece ilk üç saatte; en yüksek dozun 24 saate kadar kan glukoz düzeyi üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir. Yine bu çalışma bulgularına göre 25 ng/kg glukagonun icv uygulamasının sıçanların 24 saatlik beslenme davranışlarında değişikliklere sebep olduğu rapor edilmiştir. Ancak araştırmacılar çalışmalarında uygulanan farklı dozların farklı etki göstermesi ve dozlar ile etkinin paralellik göstermemesini elde ettikleri bulguların güvenilirliğini kısıtladığını bildirmişlerdir (5).

Quinones ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada da glukagonun icv olarak (120 ng, 240 ng, 480 ng ve 1 µg) uygulandığı sıçanların beyin dokusunda bir saat sonra AgRP, NPY, CART ve POMC mRNA düzeylerinde azalmalar olduğu ancak bu azalmanın sadece AgRP mRNA düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olduğu değerlendirilmiştir (109). Aynı çalışmada bazı gruplara icv glukagon uygulamasından 20 dk önce glukagon reseptör antagonisti verilmiş ve bu gruplarda glukagon reseptör protein düzeyi azalırken AgRP düzeyinin 2 kat artmış olduğu belirlenmiştir. Buna rağmen gruptaki hayvanların yem tüketiminde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmemiştir. Bu çalışmada da farklı doz ve sürelerde yapılan besin tüketimi ölçümlerinde doğrusal bir linearite değerlendirilememiştir (109).

Çalışmamızda 7 günlük uygulama yapılan gruplardan glukagon, PD ve PD+Glukagon gruplarında POMC seviyelerinin anlamlı olarak azaldığı belirlendi. AgRP

protein düzeyinde ise sadece PD ve PD+Glukagon uygulanan gruplarda azalmaların olduğu tespit edildi. Bu azalmalar sadece 7 gün uygulama yapılan gruplarda istatistiksel olarak anlamlıydı. Ancak kısa süreli (120 dk) uygulama yapılan gruplar arasında bu parametreler bakımından anlamlı herhangi bir fark tespit edemedik. Aynı zamanda yem tüketimi ve vücut ağırlığı değişimi bakımından yapılan değerlendirmede de 7 gün Glukagon ve PD+Glukagon uygulanan gruplarda hem yem tüketiminin hem de vücut ağırlığının anlamlı olarak arttığını belirledik. Bu artışın PD yapılan gruplarda daha yüksek olduğunu da gördük.

POMC'nin AgRP nöronlarının ateşlenmesinde etkin olduğunu ileri süren çalışmalardaki (106, 107) bilgiler ile çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde; glukagonun POMC seviyesinde meydana getirdiği azalma POMC'nin, AgRP üzerindeki ateşleme etkisini ortadan kaldıracak ve böylelikle AgRP seviyelerinde de azalmaya sebep olabileceğine ilişkin kanıt teşkil etmektedir. Merkezi olarak glukagon uygulanmasının POMC'yi baskılamış olması ve hayvanların yem tüketimini arttırmış olması, bilinen iştahın düzenlenme mekanizması ile uyumlu olmasına karşın AgRP'nin azalması ile tezatlık arz etmektedir. Bu sonuca göre AgRP'nin azalmasının iştahın baskılanmasına sebep olmaması, iştahın düzenlenmesi üzerinde POMC'nin AgRP'den daha etkin bir rolünün olabileceğine dair bir kanıt olarak kabul edilebilir. Nitekim He ve ark. daha önce yaptıkları bir çalışmada bu duruma dikkat çekmişlerdi (108). Aynı gruplardaki hayvanların vücut ağırlıklarında tespit ettiğimiz artışlar, bu gruplardaki hayvanların yem tüketimindeki artışlara paralel olarak meydana geldiği görülmektedir. Yine çalışmamızdan elde ettiğimiz bir diğer önemli sonuç da hayvanların POMC, AgRP, yem tüketimi ve vücut ağırlığındaki değişimlerin PD yapılan gruplarda yapılmayan gruplara göre istatistiksel olarak daha anlamlı olmasıydı. Bu bulgumuz sinirsel uyarının bu mekanizma üzerinde önemli bir faktör olduğunu da ortaya koydu.

5.2. İcv Glukagon Uygulamasının Pankreas Dokusu ve Endokrin Sekresyonu Üzerine Etkileri

Pankreasın, çok sayıda hormon, peptid ve nörotransmitter tarafından kontrol edildiği bilinmektedir (110). Pankreasla ilgili yapılan ilk çalışmalar genellikle endokrin veya ekzokrin fonksiyonlarını aydınlatmaya yönelik iken zaman içerisinde daha çok pankreasın diğer metabolik fonksiyonlarına odaklanılmıştır (111).

MSS ortamdaki glukoz seviyelerinin önemli bir sensörüdür. Hipoglisemi durumunda glukagon salgılanmasını artırıcı sinir sinyallerini yönlendirir. CNS içindeki hipotalamus ve medullanın solitar traktus bölgesindeki GLUT2 içeren birden çok bölgedeki nöronlar hipoglisemi sırasında parasempatik uyarıları arttırarak glukagon sekresyonunun stimülasyonuna katkıda bulunduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (112).

Kan glukoz seviyesindeki değişimler, insülin sekresyonunun ana düzenleyicisidir. Nöral uyarıların, pankreas endokrin salgılarının sekresyonu üzerinde başlatıcı bir işleve sahip olmaktan çok modüle edici bir işlevinin olduğu ileri sürülmüştür (111). Nörohormonal etkileşimlerin langerhans adacıklarındaki her hücre türü için spesifik ve farklı etkilerinin olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (113).

Birden fazla uyarı, α hücrelerinden glukagon salınımının kontrol edilmesine yardımcı olur. Adacık hücreleri ortamdaki glukoz değişikliklerini hızla algılar ve yanıt verir. Ancak α hücrelerinin glukoz değişimine direkt duyarlılığı net değildir. Yapılan birçok çalışmada glukagon sekresyonu β ve δ hücrelerinden gelen parakrin sinyaller ile modüle edildiği gösterilmiştir. Gastrointestinal sistemden gelen glukoz; GLP-1 ve insülin üzerinde arttırıcı etkiye sebep olurken, glukagon baskılanmasını da güçlendirir. Bununla birlikte, bu lokal faktörlere ek olarak, glukagon salınımı doğrudan sempatik ve parasempatik innervasyona ek olarak dolaşımdaki katekolaminlerdeki değişiklikler yoluyla da kontrol edilir. Esas olarak glukagon salınımını uyaran dolaşımdaki epinefrindir. Beyinde preganglionik sempatik nöronlardan kaynaklanan otonomik faktörler adrenal medulladaki kromaffin hücrelerine etki ederek kolinerjik nikotinik stimülasyon yoluyla katekolamin salınımını artırır (26). Dolaşımda artan katekolaminler glukagon salınımını arttırarak hipoglisemiye engeller.

Pankreasın endokrin salgısının düzenlenmesinde etkin uyaran yollarının incelendiği bir çalışmada, köpeklerde pankreatik denervasyonun açlık ve uyarılmış

insülin salgılanmasının miktarı ve etkinliği üzerinde ölçülebilir bir rolünün olmadığı ileri sürülmüştür (114).

Transplantasyon sonrası glukoz ve insülin anormalliklerinin denervasyona atfedilememesini idda eden bir çalışmada da, uyarılmış kan glukoz ve insülin seviyelerinin innerve ve denerve gruplar arasında farklılık olmadığı gösterilmiştir. Enteral veya parenteral glukoz yüklemesine, fizyolojik ve farmakolojik hiperglisemiye yanıt olarak döngüsel insülin salınımı için pankreasın sinir iletisinin gerekli olmadığı ileri sürülmüştür (115).

Bir başka çalışmada ise denervasyon sonrası 30 dakika süreyle iv glukoz yüklemesi yapılmış ve denerve olan gruplarda glukoz artışına cevap olarak insülin seviyesinde bir yükselme gözlemlenmişken glukagon seviyesinin etkilenmediği görülmüştür (116). Endojen insülin salınımını inhibe etmek ve böylece insülin duyarlılığını değerlendirmek için sürekli glukoz, insülin, epinefrin ve propranolol infüzyonu uygulandığında ise insülin duyarlılığında önemli bir değişiklik tespit edilememiştir. Denervasyonun, muhtemelen β -hücresindeki katekolaminerjik negatif uyarıyı kesintiye uğratarak, artan glukozun insülin tepkisine (glukagona değil) yol açtığını ileri sürmüşlerdir (116).

Anestezi altındaki köpeklerde yapılan bir başka çalışmada icv glukagon (0.01 μ g) uygulaması 30 dk sonra kanda, hipolipidemiye, hipokolesterolemiye neden olurken, serbest yağ asidi ve trigliserit düzeyini azaltıp HDL konsantrasyonunu arttırmıştır. Glukagonun merkezi uygulaması üzerindeki bu etkiler, pankreatektomi uygulanan ve omurilik transektomili hayvanlarda gözlenmemiştir. Bu nedenle, glukagonun merkezi uygulaması ile artan lipolizin, sempatik lifler yoluyla pankreastan salgılanan endojen glukagondan kaynaklandığı ileri sürülmektedir (117).

Kemirgenlerde tek doz icv glukagon infüzyonunun kahverengi adipoz doku termogenezinin uyarılmasına bağlı enerji tüketimini artırdığı ileri sürülmektedir (118, 119). Kronik icv uygulamalarının değerlendirildiği çalışmalarda glukagonun enerji harcamasındaki rolü, tam olarak açıklanamamıştır. İlginç bir şekilde, merkezi glukagon sinyallerinin karaciğer glukoz üretiminin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı görülmektedir (120-122). Glukagonun merkezi etkilerinin enerji metabolizması ve gliseminin düzenlenmesindeki rolü tam olarak aydınlatılmamıştır.

Kemirgenlerde yapılan bir başka çalışmada ise pankreatik klemp koşulları altında mediobazal hipotalamusa glukagon infüzyonunun, normoglisemiye neden olduğu

savunulmaktadır. Merkezi glukoz reseptör sinyallerinin hepatik glukoz üretimini protein kinaz A ve bozulmamış hepatik vagal innervasyon mekanizmaları ile kontrol edildiği ileri sürülmektedir (121). Bu nedenle, mediobazal hipotalamustaki glukagon sinyallerinin, sürekli hepatik glukagon sinyallemesine bağlı olarak hipoglisemi gelişimini önlemeye neden olduğu öngörülmektedir.

Eric D. ve ark. yapmış oldukları bir çalışmada da leptinin besin alımındaki azalmaya bağlı enerji dengesini düzenlemek için POMC nöronları üzerinde etki göstererek hipoglukagonemiye engelleyerek kan glukoz seviyesini dengede tuttuğu bildirilmiştir (123).

Kısa süreli (120 dk) deney protokolünde pankreas dokusunda insülin ve glukagon seviyeleri değerlendirildiğinde, icv glukagon uygulanmasının glukagon protein seviyesini artırdığı (PD+Glukagon grubu hariç) belirlendi. İnsülin seviyesinde ise Glukagon grubunda azalma PD+Glukagon grubunda ise artış oluşturduğu tespit edildi. Kan glukagon ve insülin seviyelerinde tüm gruplarda azalma gözlenirken kan glukoz düzeylerinde bir artış meydana geldi. Çalışma sonuçlarımız ve literatür bilgileri (124) birlikte değerlendirildiğinde, muhtemel etkinin merkezden gelen glukagon sinyalinin pankreasta glukagon seviyesinin artmasına bu artışın da insülin sentezinin baskılanmasına yol açtığını göstermektedir. Pankreasta insülin sentezindeki bu baskılanmanın kan insülin seviyelerinde de bir azalmaya sebep olduğu, buna bağlı olarak da kan glukoz seviyesinde artış meydana geldiği; kan glukoz seviyesindeki bu artışında kan glukagon seviyesinde azalmalara sebep olduğunu düşünmekteyiz. PD+Glukagon grubunda, glukagon seviyesinde bir artış gözlenmedi. Buna bağlı olarak da glukagonun pankreasdaki insülin sentezi üzerine yaptığı baskılayıcı etkinin denervasyon nedeniyle azalması olduğunu düşünmekteyiz. Sonuç olarak pankreas insülin seviyesinde artış meydana gelmiştir. Ancak pankreasta insülin sentezindeki bu artışın yükselen kan glukoz seviyesine rağmen kandaki miktarı yeterince yükselememesi yapılan PD etkisiyle sekresyona yol açan sinirsel sinyalin oluşamamasıyla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Yapısal olarak sağlam bir pankreasta asıl kontrolün kan glukozu değişimi olduğu belirtilmektedir (114). Bulgularımız pankreasın endokrin salgılarının (insülin ve glukagon) kısa süreli kontrolünde sinirsel bir etkinin olabileceğini göstermektedir. Ancak bu sinirsel kontrolden insülin-glukagon-kan glukozu üçgeninde hangisinin rolünün daha baskın olduğunu net olarak söylemek oldukça güçtür.

Uzun süreli (7 gün) deney protokolünde pankreas dokusunda insülin ve glukagon seviyeleri değerlendirildiğinde; icv glukagon uygulaması glukagon seviyesinde artışa, insülin seviyesinde ise azalmaya neden olmuştur. Artan kan glukozuna cevap olarak insülin sekresyonu artmış ve kan insülin seviyesinde yBOS grubuna göre anlamlı bir artış görülmüştür. PD uygulamasından bir hafta sonra pankreas dokusunda insülin ve glukagon seviyelerindeki azalma, literatürde bahsedilen pankreas adacık hücrelerinin sentez ve otonöregülasyonunda sinirsel kontrolün (111) bir göstergesi olarak değerlendirilebilir. Kan glukoz seviyesindeki dengenin insülin sekresyonundaki artışla sağlanmış olabileceğini düşünmekteyiz. PD+Glukagon (7 gün) grubunda pankreas insülin ve glukagon seviyelerinde artışa bağlı olarak kan seviyelerinde de bir artışa sebep olmuştur. Kan glukozunda PD grubundaki gibi bir dengenin sağlanması, pankreasta glukagona nazaran daha fazla insülin artışıyla sağlanmış olabileceğini göstermiştir.

Çalışma sonuçlarımız sıçanların III. ventrikül bölgesine icv olarak uyguladığımız glukagonun beslenme ve pankreas dokusu üzerine etkiler ortaya koyduğunu gösterdi. Endokrin bir hormon olarak bilinen glukagonun beyinde bir nörohormon gibi etki göstererek glukoz homeostazı üzerinde etkin bir rol oynadığına dair kanıtlar da yine bu çalışmamızdan elde edilen verilerle ortaya konulmuştur. Bu etkilerini pankreas dokusu üzerinde sinirsel bir uyarı yolağı ile göstermekle birlikte çalışmamızda incelemediğimiz ancak glukoz homeostazı üzerinde etkin oldukları bilinen karaciğer, adrenal bez, böbrek gibi diğer organlar ve metabolik yollar üzerindeki muhtemel etkileri ile göstermesi de olasıdır. Çalışma bulgularımız 7 günlük glukagon uygulamasının hayvanların vücut ağırlığında artışa neden olduğunu, bu artışın da özellikle PD yapılan gruplarda daha fazla olduğunu gösterdi. Bu bilgiler ışığında beyin pankreas salgısı üzerinde etkin olduğunu ve PD'un pankreas salgıları üzerindeki kontrolü kalktığında insülin ve glukagon salgısını değiştirip, farklı metabolik yolların aktivitesini etkileyerek göstermesinin muhtemel olabileceği söylenebilir. Glukagonun iştah ve dolayısıyla gıda alınımını arttırıcı etkisi, beyinde iştahın uyarılmasında rolleri olan aktörler üzerindeki baskılanmayı azaltarak göstermesi muhtemel görünmektedir. Çalışmamızda icv glukagon uygulamasının POMC seviyeleri üzerinde anlamlı bir azalma meydana getirmesi glukagonun merkezi olarak iştahın düzenlenmesinde bir aktör olabileceğine delil teşkil etmektedir. Ancak AgRP ve POMC'nin glukoz homeostazındaki rolünü tam olarak açıklayabilmek için karaciğer üzerindeki etki yollarının incelenmesi gerektiğini de düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sıçanlarda PD yapılarak beyin pankreas arasındaki nöronal iletim bloklandığında, pankreas dokusundan insülin ve glukagon sentezinin azaldığı western Blot ve İF yöntemleriyle gösterildi. Literatürdeki bilgilere ve çalışma sonuçlarımıza dayanarak pankreasın glukoz homeostazı üzerinde kan glukozu ve otokrin etkilerin yanısıra beyin tarafından sinirsel kontrolün de oldukça etkin bir rol oynadığını söyleyebiliriz.

Beslenme davranışlarının düzenlenmesinde etkili olan hipotalamik faktörlerden AgRP (iştahı artırıcı) ve POMC (iştahı baskılayıcı) protein düzeylerini icv glukagon uygulamasının tek doz ve kısa süreli (120 dk) uygulamadan ziyade sürekli ve uzun süreli (7 günlük) uygulama sonrasında değerlendirmenin literatüre daha yararlı sonuçlar katacağına inanmaktayız. Tek uygulama ile glukagonun terapötik doza ulaşmasında bir süreklilik sağlanamayacağı gibi etki gösterme sürecinde de kesinti meydana gelecektir. Ancak sürekli infüzyon yöntemi ile terapötik doza ulaşma ve etkinliğin sürekliliği de sağlanmış olacaktır. Çalışmamızda beyinde beslenme davranışlarının düzenlendiği ARC ve PVN bölgelerine yakın olan III. ventriküle icv uygulanan glukagonun, POMC seviyesinin azalmasına neden olduğu ortaya konulmuştur. POMC'deki bu azalışın AgRP üzerinde bir baskılamaya sebep olduğu ancak AgRP'deki bu baskılanmanın gıda alımında bir azalma yerine artış meydana getirdiği belirlenmiştir. Bu durum literatürde yer alan ve iştahın düzenlenmesinde POMC'nin AgRP'den daha baskın bir role sahip olduğunu savunan sonuçlara destek sağlar niteliktedir. Ancak POMC'nin AgRP üzerinde bu etkisinin daha net bir biçimde ortaya konulabilmesi için MCR-3 ve NPY düzeyindeki değişimlerin de belirlenmesi yerinde olacaktır. Çalışmamızda bu parametreyi değerlendirmemiş olmamız etki mekanizmasının aydınlatılması adına bir kısıtlılık oluştursa da mevcut verilerle muhtemel yolak hakkında bilgi sağlanmış olması oldukça önemlidir.

İnsülinin AgRP nöronları üzerinde baskılayıcı etkisinin olduğu bilinmektedir. İcv glukagon uygulamasının POMC seviyelerinin azalmasına neden olması, periferde insüline zıt etki gösteren glukagonun MSS'de beslenme davranışlarının düzenlendiği bölgelerde de benzer bir etki gösterdiğini düşündürmektedir.

Sonuçlarımız glukagonun kan glukoz homeostazındaki rolünün sadece kan glukoz seviyesi düştüğünde pankreastan salınıp karaciğer üzerinde etki göstererek kan glukozunu arttırmakla sınırlı olmadığını ortaya koydu. Aynı zamanda nöroendokrin etki göstererek özellikle pankreastan insülin ve glukagon sentez ve sekresyonu üzerinde de etkili

olabileceğini gösterdi. Aynı zamanda bu etkilere cevap olarak gelişen birçok fizyolojik yolağı etkilemesinin muhtemel olabileceğini de ortaya koydu. Merkezi glukagon sinyali, pankreasta glukagon seviyesinin artmasına bu artışın da insülin sentezinin baskılanmasına yol açtığını göstermektedir. Pankreasta insülin sentezindeki bu baskılanmanın kan insülin seviyelerinde bir azalmaya sebep olduğu, buna bağlı olarak da kan glukoz seviyesinde artış meydana geldiği; kan glukoz seviyesindeki bu artışın da kan glukagon seviyesinde azalmalara sebep olduğu muhtemel bir mekanizmayı düşünmekteyiz. PD uygulaması pankreasta insülin ve glukagonun hem seviyelerinin hemde kana salınımında azalışa yol açarken PD+Glukagon uygulaması kan glukozunun yükselmesine ve cevap olarak insülin sekresyonunun artmasına glukagon sekresyonunun ise azalmasına neden olmaktadır. Pankreas sekresyonu üzerindeki uyarıcı ana faktör her ne kadar kan glukozu olsada; çalışma sonuçlarımız sinirsel uyarıların da değişen fizyolojik koşullarda endokrin salgıların karşılıklı denge içerisinde sentez ve sekresyonunun kısa ve uzun süreli regülasyonunda etkin olabileceğine kanıt teşkil etmektedir. Ancak bu sinirsel kontrolün glukoz homeostazındaki rolünün, kan glukozundaki dengenin sağlanması için hangi değişken/değişkenler üzerinden olduğu, hangisinin ana kontrol basamağı olarak dengede tutulmaya çalışıldığı veya hangisindeki değişime duyarlılık gösterip cevap oluşturduğu ve bu cevabın nasıl kontrol edildiğini net olarak söylemek oldukça güçtür. Beslenme ile ilgili fizyolojik zaman dilimlerinde (açlık, tokluk, yemek öncesi ve sonrası gibi) ve farklı dozların uygulanması ile yapılacak olan çalışmalardan elde edilecek verilerin, glukagonun başta diyabet olmak üzere bozulmuş glukoz metabolizma hastalıklarında daha fazla dikkate alınması ve bunun da tedavi süreçlerine olumlu yansımaları olması muhtemeldir.

Çalışma bulgularımız glukagonun glukoz homeostazı üzerinde bilinen mevcut etkilerinden çok daha fazla rolü olabileceğini ve bu etkinliğini hem periferal hem de merkezi olarak sergileyebileceğine ilişkin önemli bilgiler sağlamıştır. Aynı zamanda merkezi olarak iştahın düzenlenmesinde de rolünün olabileceğine dair kanıtlar sağlamıştır.

Sonuçlarımıza göre glukagon, özellikle diyabet olmak üzere obezite gibi glukoz homeostazındaki dengenin bozulduğu metabolik hastalıklarda, glukagonun tedavi sürecinde (merkezdeki etkisi de dikkate alınarak) daha fazla dikkate alınmasının uygulanacak tedavi protokollerinin etkinliğini arttırmada faydalı olabileceğini önermekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Tucker RM, Tan SY. Do non-nutritive sweeteners influence acute glucose homeostasis in humans? A systematic review. *Physiol Behav* 2017, 18217-26.
2. Tups A, Benzler J, Sergi D, Ladyman SR, Williams LM. Central Regulation of Glucose Homeostasis. *Compr Physiol* 2017, 7(2): 741-64.
3. Dodd GT, Michael NJ, Lee-Young RS, Mangiafico SP, Pryor JT, Munder AC, Simonds SE, Bruning JC, Zhang ZY, Cowley MA, Andrikopoulos S, Horvath TL, Spanswick D, Tiganis T. Insulin regulates POMC neuronal plasticity to control glucose metabolism. *Elife* 2018, 7.
4. Hoosein NM, Gurd RS. Identification of glucagon receptors in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984, 81(14): 4368-72.
5. Inokuchi A, Oomura Y, Nishimura H. Effect of intracerebroventricularly infused glucagon on feeding behavior. *Physiol Behav* 1984, 33(3): 397-400.
6. Quinones M, Al-Massadi O, Gallego R, Ferno J, Dieguez C, Lopez M, Nogueiras R. Hypothalamic CaMKKbeta mediates glucagon anorectic effect and its diet-induced resistance. *Mol Metab* 2015, 4(12): 961-70.
7. Amir S. Central glucagon-induced hyperglycemia is mediated by combined activation of the adrenal medulla and sympathetic nerve endings. *Physiol Behav* 1986, 37(4): 563-6.
8. Ramnanan CJ, Edgerton DS, Cherrington AD. Evidence against a physiologic role for acute changes in CNS insulin action in the rapid regulation of hepatic glucose production. *Cell Metab* 2012, 15(5): 656-64.
9. Dunning BE, Taborsky GJ, Jr. Neural control of islet function by norepinephrine and sympathetic neuropeptides. *Adv Exp Med Biol* 1991, 291107-27.
10. Lindsey CA, Faloon GR, Unger RH. Plasma glucagon levels during rapid exsanguination with and without adrenergic blockade. *Diabetes* 1975, 24(4): 313-6.
11. Tai TY, Pek S. Direct stimulation by growth hormone of glucagon and insulin release from isolated rat pancreas. *Endocrinology* 1976, 99(3): 669-77.
12. Javed K, Fairweather SJ. Amino acid transporters in the regulation of insulin secretion and signalling. *Biochem Soc Trans* 2019, 47(2): 571-90.
13. Agius L. Hormonal and Metabolite Regulation of Hepatic Glucokinase. *Annu Rev Nutr* 2016, 36389-415.

14. Taborsky GJ, Jr. The physiology of glucagon. *J Diabetes Sci Technol* 2010, 4(6): 1338-44.
15. Jensen MD, Caruso M, Heiling V, Miles JM. Insulin regulation of lipolysis in nondiabetic and IDDM subjects. *Diabetes* 1989, 38(12): 1595-601.
16. Kettelhut IC, Wing SS, Goldberg AL. Endocrine regulation of protein breakdown in skeletal muscle. *Diabetes Metab Rev* 1988, 4(8): 751-72.
17. Sandoval DA, Obici S, Seeley RJ. Targeting the CNS to treat type 2 diabetes. *Nat Rev Drug Discov* 2009, 8(5): 386-98.
18. Unger RH. The milieu interieur and the islets of Langerhans. *Diabetologia* 1981, 20(1): 1-11.
19. Rodwell V, Bender D, Botham KM, Kennelly PJ, Weil PA. Harpers illustrated biochemistry 30th edition. McGraw Hill Professional Google Scholar; 2015.
20. Ganong WF. *Review of medical physiology*, Mcgraw-hill 1995.
21. Granner DKJP, Endocrinology Po, Metabolism. Hormonal action. 1995, 20-5.
22. Winter TAJCOiCN, Care M. The effects of undernutrition and refeeding on metabolism and digestive function. 2006, 9(5): 596-602.
23. Büyükdevrim S, Garibağaoğlu MJBvDD. Kan Şekerinin Ayarlanmasında Karaciğerin Rolu-Substrat (Besin Oğesi), Enzim ve Hormonların Karşılıklı Etkileşimi: Claude Bernard'dan Günümüze Molekuler Düzeyde Elde Edilen Yenilikler. 1995, 24(1): 99-122.
24. Rodriguez-Diaz R, Abdulreda MH, Formoso AL, Gans I, Ricordi C, Berggren PO, Caicedo A. Innervation patterns of autonomic axons in the human endocrine pancreas. *Cell Metab* 2011, 14(1): 45-54.
25. Rodriguez-Diaz R, Dando R, Jacques-Silva MC, Fachado A, Molina J, Abdulreda MH, Ricordi C, Roper SD, Berggren PO, Caicedo A. Alpha cells secrete acetylcholine as a non-neuronal paracrine signal priming beta cell function in humans. *Nat Med* 2011, 17(7): 888-92.
26. Taborsky GJ, Jr., Munding TO. Minireview: The role of the autonomic nervous system in mediating the glucagon response to hypoglycemia. *Endocrinology* 2012, 153(3): 1055-62.
27. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. *Robbins temel patoloji*, Nobel Tıp Kitabevleri 2014.
28. Savaş HB, Gültekin FJSTFD. İnsülin direnci ve klinik önemi. 2017, 24(3): 116-25.

29. Vila G, Riedl MJfKEuS-AJoCE, *Metabolism*. Ein Hormon stellt sich vor. 2010, 3(4): 36-7.
30. Tura A, Pacini G, Yamada Y, Seino Y, Ahren B. Glucagon and insulin secretion, insulin clearance and fasting glucose in GIP receptor and GLP-1 receptor knockout mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2018.
31. Holst JJ, Holland W, Gromada J, Lee Y, Unger RH, Yan H, Sloop KW, Kieffer TJ, Damond N, Herrera PLJE. Insulin and glucagon: partners for life. 2017, 158(4): 696-701.
32. Kim J, Okamoto H, Huang Z, Anguiano G, Chen S, Liu Q, Cavino K, Xin Y, Na E, Hamid RJCM. Amino acid transporter Slc38a5 controls glucagon receptor inhibition-induced pancreatic α cell hyperplasia in mice. 2017, 25(6): 1348-61. e8.
33. Dean ED, Li M, Prasad N, Wisniewski SN, Von Deylen A, Spaeth J, Maddison L, Botros A, Sedgeman LR, Bozadjieva NJCM. Interrupted glucagon signaling reveals hepatic α cell axis and role for L-glutamine in α cell proliferation. 2017, 25(6): 1362-73. e5.
34. Authier F, Desbuquois B. Glucagon receptors. *Cell Mol Life Sci* 2008, 65(12): 1880-99.
35. Rodbell M, Krans HM, Pohl SL, Birnbaumer L. The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. IV. Effects of guanylnucleotides on binding of 125I-glucagon. *J Biol Chem* 1971, 246(6): 1872-6.
36. Rodbell M, Birnbaumer L, Pohl SL, Krans HM. The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. V. An obligatory role of guanylnucleotides in glucagon action. *J Biol Chem* 1971, 246(6): 1877-82.
37. Tengholm A, Gylfe E. cAMP signalling in insulin and glucagon secretion. *Diabetes Obes Metab* 2017, 19 Suppl 142-53.
38. Christophe J. Glucagon receptors: from genetic structure and expression to effector coupling and biological responses. *Biochim Biophys Acta* 1995, 1241(1): 45-57.
39. Burcelin R, Katz EB, Charron MJ. Molecular and cellular aspects of the glucagon receptor: role in diabetes and metabolism. *Diabetes Metab* 1996, 22(6): 373-96.
40. Brubaker PL, Drucker DJ. Structure-function of the glucagon receptor family of G protein-coupled receptors: the glucagon, GIP, GLP-1, and GLP-2 receptors. *Receptors Channels* 2002, 8(3-4): 179-88.

41. Campos RV, Lee YC, Drucker DJ. Divergent tissue-specific and developmental expression of receptors for glucagon and glucagon-like peptide-1 in the mouse. *Endocrinology* 1994, 134(5): 2156-64.
42. Jin SL, Han VK, Simmons JG, Towle AC, Lauder JM, Lund PK. Distribution of glucagonlike peptide I (GLP-I), glucagon, and glicentin in the rat brain: an immunocytochemical study. *J Comp Neurol* 1988, 271(4): 519-32.
43. Drucker DJ, Asa S. Glucagon gene expression in vertebrate brain. *J Biol Chem* 1988, 263(27): 13475-8.
44. Unson CG. Molecular determinants of glucagon receptor signaling. *Biopolymers* 2002, 66(4): 218-35.
45. Mayo KE, Miller LJ, Bataille D, Dalle S, Goke B, Thorens B, Drucker DJ. International Union of Pharmacology. XXXV. The glucagon receptor family. *Pharmacol Rev* 2003, 55(1): 167-94.
46. Bernard C. *Introduction à l'étude de la médecine expérimentale*, JB Baillière et fils 1865.
47. Al Massadi O, Lopez M, Tschop M, Dieguez C, Nogueiras R. Current Understanding of the Hypothalamic Ghrelin Pathways Inducing Appetite and Adiposity. *Trends Neurosci* 2017, 40(3): 167-80.
48. Gao Q, Horvath T. Hypothalamus. In: Binder MD, Hirokawa N, Windhorst U, editors. *Encyclopedia of Neuroscience*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2009. p. 1895-900.
49. Austin J, Marks D. Hormonal regulators of appetite. *Int J Pediatr Endocrinol* 2009, 2009141753.
50. Vicent MA, Mook CL, Carter ME. POMC neurons in heat: A link between warm temperatures and appetite suppression. *PLoS Biol* 2018, 16(5): e2006188.
51. Hall JE. *Guyton and Hall textbook of medical physiology e-Book*, Elsevier Health Sciences 2010.
52. Miyagi K, Harada S, Tokuyama S. Pancreatic Changes in Nerve Growth Factor/TrkA Associated with Insulin Secretion in Cerebral Ischemia. *Biol Pharm Bull* 2015, 38(11): 1747-51.
53. Gotoh K, Masaki T, Chiba S, Ando H, Fujiwara K, Shimasaki T, Mitsutomi K, Katsuragi I, Kakuma T, Sakata T, Yoshimatsu H. Hypothalamic brain-derived

- neurotrophic factor regulates glucagon secretion mediated by pancreatic efferent nerves. *J Neuroendocrinol* 2013, 25(3): 302-11.
54. Sisley S, Sandoval D. Hypothalamic control of energy and glucose metabolism. *Rev Endocr Metab Disord* 2011, 12(3): 219-33.
 55. Grayson BE, Seeley RJ, Sandoval DA. Wired on sugar: the role of the CNS in the regulation of glucose homeostasis. *Nat Rev Neurosci* 2013, 14(1): 24-37.
 56. Qu D, Ludwig DS, Gammeltoft S, Piper M, Pelleymounter MA, Cullen MJ, Mathes WF, Przypek R, Kanarek R, Maratos-Flier E. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* 1996, 380(6571): 243-7.
 57. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 1998, 92(4): 573-85.
 58. Lu S, Guan JL, Wang QP, Uehara K, Yamada S, Goto N, Date Y, Nakazato M, Kojima M, Kangawa K, Shioda S. Immunocytochemical observation of ghrelin-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Neurosci Lett* 2002, 321(3): 157-60.
 59. Han Y, Xia G, Wu Q. Functional Interrogation of the AgRP Neural Circuits in Control of Appetite, Body Weight, and Behaviors. *Adv Exp Med Biol* 2018, 10901-16.
 60. Girardet C, Marks DL, Butler AA. Melanocortin-3 Receptors Expressed on Agouti-Related Peptide Neurons Inhibit Feeding Behavior in Female Mice. *Obesity (Silver Spring)* 2018, 26(12): 1849-55.
 61. Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RD, Smith FJ, Campfield LA, Burn P, Lee F. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 1997, 88(1): 131-41.
 62. Albarado DC, McClaine J, Stephens JM, Mynatt RL, Ye J, Bannon AW, Richards WG, Butler AA. Impaired coordination of nutrient intake and substrate oxidation in melanocortin-4 receptor knockout mice. *Endocrinology* 2004, 145(1): 243-52.

63. Dhillon H, Zigman JM, Ye C, Lee CE, McGovern RA, Tang V, Kenny CD, Christiansen LM, White RD, Edelstein EA, Coppari R, Balthasar N, Cowley MA, Chua S, Jr., Elmquist JK, Lowell BB. Leptin directly activates SF1 neurons in the VMH, and this action by leptin is required for normal body-weight homeostasis. *Neuron* 2006, 49(2): 191-203.
64. Baldini G, Phelan KD. The melanocortin pathway and control of appetite-progress and therapeutic implications. *J Endocrinol* 2019, 241(1): R1-R33.
65. Chen AS, Metzger JM, Trumbauer ME, Guan XM, Yu H, Frazier EG, Marsh DJ, Forrest MJ, Gopal-Truter S, Fisher J, Camacho RE, Strack AM, Mellin TN, MacIntyre DE, Chen HY, Van der Ploeg LH. Role of the melanocortin-4 receptor in metabolic rate and food intake in mice. *Transgenic Res* 2000, 9(2): 145-54.
66. Sohn JW. Network of hypothalamic neurons that control appetite. *BMB Rep* 2015, 48(4): 229-33.
67. Obici S, Feng Z, Morgan K, Stein D, Karkanias G, Rossetti L. Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. *Diabetes* 2002, 51(2): 271-5.
68. Redmann Jr SM, Argyropoulos GJB, communications br. AgRP-deficiency could lead to increased lifespan. 2006, 351(4): 860-4.
69. Konner AC, Janoschek R, Plum L, Jordan SD, Rother E, Ma X, Xu C, Enriori P, Hampel B, Barsh GS, Kahn CR, Cowley MA, Ashcroft FM, Bruning JC. Insulin action in AgRP-expressing neurons is required for suppression of hepatic glucose production. *Cell Metab* 2007, 5(6): 438-49.
70. Gulec MY, Ozalmete OA, Ozturk M, Gulec H, Sayar K, Kose SJKPB-BoCP. Plasma neuropeptide Y levels in medication naive adolescents with major depressive disorder. 2010, 20(2): 132-8.
71. Wyss P, Stricker-Krongrad A, Brunner L, Miller J, Crossthwaite A, Whitebread S, Criscione L. The pharmacology of neuropeptide Y (NPY) receptor-mediated feeding in rats characterizes better Y5 than Y1, but not Y2 or Y4 subtypes. *Regul Pept* 1998, 75-76363-71.
72. Gehlert DR. Role of hypothalamic neuropeptide Y in feeding and obesity. *Neuropeptides* 1999, 33(5): 329-38.

73. Rasmusson AM, Southwick SM, Hauger RL, Charney DS. Plasma neuropeptide Y (NPY) increases in humans in response to the alpha 2 antagonist yohimbine. *Neuropsychopharmacology* 1998, 19(1): 95-8.
74. Imai Y, Patel HR, Hawkins EJ, Doliba NM, Matschinsky FM, Ahima RS. Insulin secretion is increased in pancreatic islets of neuropeptide Y-deficient mice. *Endocrinology* 2007, 148(12): 5716-23.
75. Kuo LE, Kitlinska JB, Tilan JU, Li L, Baker SB, Johnson MD, Lee EW, Burnett MS, Fricke ST, Kvetnansky R, Herzog H, Zukowska Z. Neuropeptide Y acts directly in the periphery on fat tissue and mediates stress-induced obesity and metabolic syndrome. *Nat Med* 2007, 13(7): 803-11.
76. Kuo LE, Czarnecka M, Kitlinska JB, Tilan JU, Kvetnansky R, Zukowska Z. Chronic stress, combined with a high-fat/high-sugar diet, shifts sympathetic signaling toward neuropeptide Y and leads to obesity and the metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 2008, 1148232-7.
77. Kaye WH, Berrettini W, Gwirtsman H, George DT. Altered cerebrospinal fluid neuropeptide Y and peptide YY immunoreactivity in anorexia and bulimia nervosa. *Arch Gen Psychiatry* 1990, 47(6): 548-56.
78. Menyhert J, Wittmann G, Lechan RM, Keller E, Liposits Z, Fekete C. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) is colocalized with the orexigenic neuropeptide Y and agouti-related protein and absent from the anorexigenic alpha-melanocyte-stimulating hormone neurons in the infundibular nucleus of the human hypothalamus. *Endocrinology* 2007, 148(9): 4276-81.
79. Koylu EO, Couceyro PR, Lambert PD, Kuhar MJ. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide immunohistochemical localization in the rat brain. *J Comp Neurol* 1998, 391(1): 115-32.
80. Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Christjansen KN, Wulff BS, Clausen JT, Jensen PB, Madsen OD, Vrang N, Larsen PJ, Hastrup S. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 1998, 393(6680): 72-6.
81. Lambert PD, Couceyro PR, McGirr KM, Dall Vechia SE, Smith Y, Kuhar MJ. CART peptides in the central control of feeding and interactions with neuropeptide Y. *Synapse* 1998, 29(4): 293-8.

82. Varela L, Horvath TL. Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. *EMBO Rep* 2012, 13(12): 1079-86.
83. Nussey SS, Whitehead SA. *Endocrinology: an integrated approach*, CRC Press 2001.
84. Sindelar DK, Chu CA, Venson P, Donahue EP, Neal DW, Cherrington AD. Basal hepatic glucose production is regulated by the portal vein insulin concentration. *Diabetes* 1998, 47(4): 523-9.
85. Sindelar DK, Chu CA, Neal DW, Cherrington AD. Interaction of equal increments in arterial and portal vein insulin on hepatic glucose production in the dog. *Am J Physiol* 1997, 273(5 Pt 1): E972-80.
86. Lewis GF, Vranic M, Harley P, Giacca A. Fatty acids mediate the acute extrahepatic effects of insulin on hepatic glucose production in humans. *Diabetes* 1997, 46(7): 1111-9.
87. Boden G, Chen X, Capulong E, Mozzoli M. Effects of free fatty acids on gluconeogenesis and autoregulation of glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes* 2001, 50(4): 810-6.
88. Obici S, Zhang BB, Karkanias G, Rossetti L. Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nat Med* 2002, 8(12): 1376-82.
89. Pocai A, Lam TK, Gutierrez-Juarez R, Obici S, Schwartz GJ, Bryan J, Aguilar-Bryan L, Rossetti L. Hypothalamic K(ATP) channels control hepatic glucose production. *Nature* 2005, 434(7036): 1026-31.
90. Schwartz MW, Sipols AJ, Marks JL, Sanacora G, White JD, Scheurink A, Kahn SE, Baskin DG, Woods SC, Figlewicz DP, et al. Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. *Endocrinology* 1992, 130(6): 3608-16.
91. Air EL, Strowski MZ, Benoit SC, Conarello SL, Salituro GM, Guan XM, Liu K, Woods SC, Zhang BB. Small molecule insulin mimetics reduce food intake and body weight and prevent development of obesity. *Nat Med* 2002, 8(2): 179-83.
92. Spanswick D, Smith MA, Mirshamsi S, Routh VH, Ashford ML. Insulin activates ATP-sensitive K⁺ channels in hypothalamic neurons of lean, but not obese rats. *Nat Neurosci* 2000, 3(8): 757-8.
93. Rosario W, Singh I, Wautlet A, Patterson C, Flak J, Becker TC, Ali A, Tamarina N, Philipson LH, Enquist LW, Myers MG, Jr., Rhodes CJ. The Brain-to-Pancreatic

- Islet Neuronal Map Reveals Differential Glucose Regulation From Distinct Hypothalamic Regions. *Diabetes* 2016, 65(9): 2711-23.
94. Paxinos G, Watson CR, Emson PCJJonm. AChE-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates. 1980, 3(2): 129-49.
 95. Dirnena-Fusini I, Am MK, Fougner AL, Carlsen SM, Christiansen SC. Intraperitoneal, subcutaneous and intravenous glucagon delivery and subsequent glucose response in rats: a randomized controlled crossover trial. *BMJ Open Diabetes Res Care* 2018, 6(1): e000560.
 96. Morawska D, Sieklucka-Dziuba M, Kleinrok Z. Central action of glucagon. *Pol J Pharmacol* 1998, 50(2): 125-33.
 97. Yoshimatsu H, Niijima A, Oomura Y, Yamabe K, Katafuchi T. Effects of hypothalamic lesion on pancreatic autonomic nerve activity in the rat. *Brain Res* 1984, 303(1): 147-52.
 98. Zoucas E, Nilsson C, Alm P, Ihse I. Selective microsurgical sympathetic denervation of the rat pancreas. *Eur Surg Res* 1996, 28(5): 367-73.
 99. Patel V, Joharapurkar A, Kshirsagar S, Patel HM, Pandey D, Patel D, Shah K, Bahekar R, Shah GB, Jain MR. Central and Peripheral Glucagon Reduces Hyperlipidemia in Rats and Hamsters. *Drug Res (Stuttg)* 2017, 67(6): 318-26.
 100. Arslan AK, SY, Cemil Colak, Saim Yologlu. WSSPAS: Web-Based Sample Size & Power Analysis Software. *Turkiye Klinikleri Journal of Biostatistics* 2018, 31-34.
 101. Adalet Bakanlığı, Uzun süreli açlıkların adli tıptaki yeri ve önemi.
 102. Altın Z JİTEvAHD. Açlığın fizyolojisi. 2017, 27(3): 179-85.
 103. Campbell JE, Drucker DJNre. Islet α cells and glucagon—critical regulators of energy homeostasis. 2015, 11(6): 329.
 104. Jones BJ, Tan T, Bloom SR. Minireview: Glucagon in stress and energy homeostasis. *Endocrinology* 2012, 153(3): 1049-54.
 105. Farooqi IS, Keogh JM, Yeo GS, Lank EJ, Cheetham T, O'Rahilly S. Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *N Engl J Med* 2003, 348(12): 1085-95.
 106. Uner AG, Kecik O, Quaresma PGF, De Araujo TM, Lee H, Li W, Kim HJ, Chung M, Bjorbaek C, Kim YB. Role of POMC and AgRP neuronal activities on glycaemia in mice. *Sci Rep* 2019, 9(1): 13068.

107. Zhan C. POMC Neurons: Feeding, Energy Metabolism, and Beyond. *Adv Exp Med Biol* 2018, 109017-29.
108. He Z, Gao Y, Alhadeff AL, Castorena CM, Huang Y, Lieu L, Afrin S, Sun J, Betley JN, Guo H, Williams KW. Cellular and synaptic reorganization of arcuate NPY/AgRP and POMC neurons after exercise. *Mol Metab* 2018, 18107-19.
109. Quiñones M, Al-Massadi O, Gallego R, Fernø J, Diéguez C, López M, Nogueiras R. Hypothalamic CaMKK β mediates glucagon anorectic effect and its diet-induced resistance. *Mol Metab* 2015, 4(12): 961-70.
110. Rodriguez-Diaz R, Caicedo A. Neural control of the endocrine pancreas. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2014, 28(5): 745-56.
111. Matthews DR, Clark A. Neural control of the endocrine pancreas. *Proc Nutr Soc* 1987, 46(1): 89-95.
112. Lamy CM, Sanno H, Labouèbe G, Picard A, Magnan C, Chatton J-Y, Thorens BJCm. Hypoglycemia-activated GLUT2 neurons of the nucleus tractus solitarius stimulate vagal activity and glucagon secretion. 2014, 19(3): 527-38.
113. Brunicardi FC, Druck P, Seymour NE, Sun YS, Elahi D, Andersen DK. Selective neurohormonal interactions in islet cell secretion in the isolated perfused human pancreas. *J Surg Res* 1990, 48(4): 273-8.
114. Baumgartner D, Illig R, Sutherland DE. Effect of venous drainage to the vena cava and denervation on endocrine function of pancreatic segments in dogs. *Transplant Proc* 1984, 16(3): 769-72.
115. Berry SM, Friend LA, McFadden DW, Brodish RJ, Krusch DA, Fink AS. Pancreatic denervation does not influence glucose-induced insulin response. *Surgery* 1994, 116(1): 67-75.
116. Nilsson C, Zoucas E, Lundquist I, Ihse I. Effect of selective denervation of the rat pancreas on pancreatic endocrine function. *Eur Surg Res* 2001, 33(2): 86-91.
117. Agarwala GC, Mishra R, Jaiswal G, Bapat V. Effect of centrally administered glucagon on blood lipids in anesthetised dogs. *Indian J Physiol Pharmacol* 1986, 30(4): 280-8.
118. Atrens DM, Menendez JA. Glucagon and the paraventricular hypothalamus: modulation of energy balance. *Brain Res* 1993, 630(1-2): 245-51.
119. Lockie SH, Heppner KM, Chaudhary N, Chabenne JR, Morgan DA, Veyrat-Durebex C, Ananthakrishnan G, Rohner-Jeanrenaud F, Drucker DJ, DiMarchi R,

- Rahmouni K, Oldfield BJ, Tschop MH, Perez-Tilve D. Direct control of brown adipose tissue thermogenesis by central nervous system glucagon-like peptide-1 receptor signaling. *Diabetes* 2012, 61(11): 2753-62.
- 120.** Abraham MA, Yue JT, LaPierre MP, Rutter GA, Light PE, Filippi BM, Lam TK. Hypothalamic glucagon signals through the KATP channels to regulate glucose production. *Mol Metab* 2014, 3(2): 202-8.
- 121.** Mighiu PI, Yue JT, Filippi BM, Abraham MA, Chari M, Lam CK, Yang CS, Christian NR, Charron MJ, Lam TK. Hypothalamic glucagon signaling inhibits hepatic glucose production. *Nat Med* 2013, 19(6): 766-72.
- 122.** LaPierre MP, Abraham MA, Yue JT, Filippi BM, Lam TK. Glucagon signalling in the dorsal vagal complex is sufficient and necessary for high-protein feeding to regulate glucose homeostasis in vivo. *EMBO Rep* 2015, 16(10): 1299-307.
- 123.** Berglund ED, Vianna CR, Donato J, Jr., Kim MH, Chuang JC, Lee CE, Lauzon DA, Lin P, Brule LJ, Scott MM, Coppari R, Elmquist JK. Direct leptin action on POMC neurons regulates glucose homeostasis and hepatic insulin sensitivity in mice. *J Clin Invest* 2012, 122(3): 1000-9.
- 124.** Sørensen H, Winzell MS, Brand CL, Fosgerau K, Gelling RW, Nishimura E, Ahren B. Glucagon receptor knockout mice display increased insulin sensitivity and impaired beta-cell function. *Diabetes* 2006, 55(12): 3463-9.

EKLER

Ek 1: Özgeçmiş

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : KEVSER TANBEK

E-mail : kevsr.tanbek@inonu.edu.tr – ktanbek@hotmail.com.tr

Eğitim Durumu:

Lisans :Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü(2004-2008)

Y. Lisans : İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya A.D. (2009-2011)

Doktora : İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya A.D. (2011-2016)

Y. Lisans : İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji A.D. (2013-2015)

Doktora : İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji A.D. (2015-2020)

Akademik Görevler

Araştırma Görevlisi (2013-) İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri
Fizyoloji Anabilim Dalı

Öğretim Görevlisi (2012-2013) Adıyaman Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek
Yüksekokulu, Sağlık Programları Bölümü

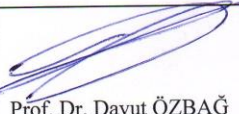
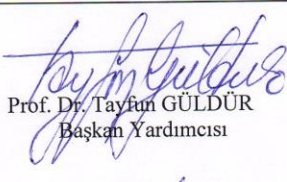
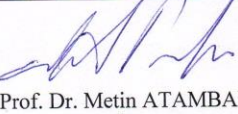
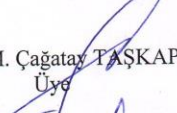
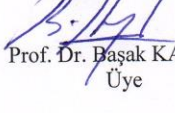
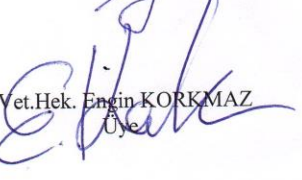
Ek 2: Etik Kurul Belgesi

İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 20.09.2019
Toplantı Yeri : Tıp. Fak. Toplantı Salonu
Araştırma Protokol no.su : 2019/A-42
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Türü : Rat
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Soyu : Wistar albino/Sprague dawley
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti : E D Farketmez
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 90 adet
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı : 250-300 g

Prof. Dr. Süleyman SANDAL'ın sorumlu araştırmacı olduğu; **“Sıçanlarda Glukoz Homeostazının Düzenlenmesinde Glukagonun Merkezi Sinir Sistemindeki Etkilerinin Araştırılması”** isimli 2019/A-42 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmesi şartıyla çalışmanın yapılmasının uygun olduğuna; **oy birliği ile karar verildi.**

 Prof. Dr. Davut ÖZBAĞ Başkan	 Prof. Dr. Tayfun GÜLDÜR Başkan Yardımcısı	 Prof. Dr. Metin ATAMBAY Üye
 Prof. Dr. M. Çağatay TAŞKAPAN Üye	 Prof. Dr. Başak KAYHAN Üye	Doç. Dr. Şengül YÜKSEL KATILMADI
 Vet.Hek. Engin KORKMAZ Üye	Akın ÖZ Sivil Üye KATILMADI	Av. M. Umut YALÇIN Sivil Üye KATILMADI