T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

STREPTOZOTOSİN DİYABETİK HAYVANLARDA L-KARNİTİNİN DOĞAL ÖLDÜRÜCÜ HÜCRELER ÜZERİNE ETKİSİ

PERİHAN ŞEMİN

DANIŞMAN
PROF. DR. GÜNNUR DENİZ

İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI
İMMÜNOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2014

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İmmünoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programında Perihan ŞEMİN tarafından hazırlanan " Streptozotosin Diyabetik Hayvanlarda L-karnitinin Doğal Öldürücü Hücreler Üzerine Etkisi" başlıklı Yülsek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

01 / 12 / 2014

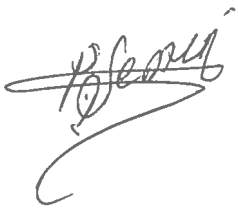
Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)			İmzası
1.Prof. Dr. Günnur DENİZ	Deneysel Tıp Araş. Enst.	İmmünoloji A. D.	
2.Prof. Dr. İlhan SATMAN	İstanbul Tıp Fakültesi	İç Hastalıkları A. D.	
3.Prof. Dr. Selim BADUR	İstanbul Tıp Fakültesi	Mikrobiyoloji A. D.	
4.Doç. Dr. Ali Osman GÜROL	Deneysel Tıp Araş. Enst.	İmmünoloji A. D.	
5.Doç. Dr. Esin A.ÇETİN	Deneysel Tıp Araş. Enst.	İmmünoloji A. D.	

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Perihan ŞEMİN



İTHAF

Öncelikle, her durumda yanımda olup, beni destekleyen sevgili aileme ve sevgisini esirgemeyen tüm arkadaşlarıma…

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans dönemim boyunca tezimde ve çalışmalarımda her türlü destek ve yardımı sağlayan, çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Günnur Deniz'e,

Tezim boyunca kapısını bana hep açık tutan ve her türlü desteği sağlayan değerli hocam Doç. Dr. Ali Osman GÜROL'a,

Cihaz kullanımında ve laboratuvar çalışmalarım sürecinde karşılaştığım problemleri çözmem konusunda her türlü yardımı sağlayan Abdullah Yılmaz'a,

Bütün deney aşamaları boyunca kendi tezi titizliği ve hassasiyeti ile yanımda olan Uzman Biyolog Çağdaş Uğur ADAŞ'a,

Her türlü konuda soru sorabildiğim, yardımlarını esirgemeyen ve laboratuvarda çalışma becerisi kazanmamda büyük katkısı olan Araş. Gör. İlhan TAHRALI'ya,

Gerek istatistik çalışmalarımda büyük yardımıyla gerekse tez dönemimin her aşamasında beni motive eden Sibel P. YENTÜR'e

Desteklerini benden esirgemeyen ve yaşadığım zorluklarda yaptıkları yönlendirmelerle bana yol gösteren Vüsale ABBASOVA, Pınar KASAPOĞLU, Mahdi Alahgholi HAJİBEHZAD ve Dr. Umut Can KÜÇÜKSEZER'e,

Tüm zamanlarımda ve zorlu tez aşamamın her döneminde beni hiç yalnız bırakmayan sıkıntılarımı paylaştığım zor dönemlerin üstesinden gelmemde katkısı büyük olan sevgili kız kardeşim Hatice ŞEMİN MALK'a ve pek değerli arkadaşım İslam MAMAN'a,

Meslek hayatımın en başından beri maddi ve manevi olarak destekleyen, heyecanımı benimle birlikte yaşayan varlıklarıyla benim için moral ve motivasyon kaynağı olan çok değerli aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 30232

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİİ
TABLOLAR LİSTESİ X
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... Xİİ
ÖZET ..... XVİ
ABSTRACT ..... XVİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. Diabetes Mellitus Tanımı ve Tarihçesi 4
2.1.1. Diabetes Mellitus'un Tanımı 4
2.1.2. Diabetes Mellitus'un Tarihçesi 4
2.2. Diabetes Mellitus Epidemiyolojisi 5
2.3. Diabetes Mellitus'un Tanı Kriterleri 5
2.4. Diabetes Mellitus'un Etiyolojik Sınıflaması 6
2.4.1. İnsüline Bağımlı (Tip 1) Diabetes Mellitus 8
2.4.2. İnsüline Bağımlı Olmayan (Tip 2) Diabetes Mellitus 8
2.5. Deneysel Diyabet 9
2.6. STZ ve Alloksan Etki Mekanizmaları 10
2.6.1. Streptozotosin (STZ) 10
2.6.2. Alloksan (ALX) 11
2.7. L-Karnitin 14
2.8. Doğal Öldürücü Hücreler 16
2.8.1. NK Hücrelerinin Genel Özellikleri 16
2.8.2. NK Hücrelerinin Diabetes Mellitus ile İlişkisi 18
2.9. L-Karnitinin Diabetes Mellitus ile İlişkisi 19
2.10. Sitokinler 21
2.10.1. Genel Özellikleri 21

2.10.1.1. İnterferon-gamma (IFN-γ) 22
2.10.1.2. Interlökin 10 (IL-10) 22
3. GEREÇ VE YÖNTEM 24
3.1. Araç ve Gereçler 24
3.1.1. Kimyasal Maddeler 24
3.1.2. Aletler 25
3.2. Araştırmada Kulanılan Deney Hayvanları 25
3.2.1. Kullanılan hayvanlar 25
3.2.1.1. Sağlıklı Hayvanlar 26
3.2.1.2. STZ ile diyabetik yapılan hayvanlar 26
3.2.1.3. STZ ve L-Karnitin birlikte verilen hayvanlar 27
3.2.1.4. L-Karnitin verildikten sonra STZ yapılan hayvanlar 27
3.2.1.5. STZ yapıldıktan sonra L-Karnitin verilen hayvanlar 27
3.2.1.6. Sadece L-Karnitin verilen hayvanlar 27
3.3. Yöntem 28
3.3.1. Kan Glikozu Ölçümü 28
3.3.2. Kloral Hidrat Anestezisi 28
3.3.3. PBS (Fosfat Tampon Tuz Çözeltisi) 28
3.3.4. RPMI-1640 28
3.3.5. Fiksasyon ve Permeabilizasyon Solüsyonu 28
3.3.6. Perm/ Wash Buffer Yıkama Solüsyonu 29
3.3.7. Periferik Kan Mononükleer Hücre (PKMH) İzolasyonu 29
3.3.8. Hücre Kültürü 29
3.3.9. Hücre Yüzey Boyaması 30
3.3.10. Hücre İçi Boyama 31
3.3.11. Kültür Medyumunun Zenginleştirilmesi 31
3.3.12. İstatistiksel Analiz 31
4. BULGULAR 32
4.1. NK Hücreleri 32
4.1.1. $CD3^-$ Hücre Populasyon Oranları 33
4.1.2. $CD3^+$ T Hücre Populasyon Oranları 35
4.1.3. $CD3^-$ $CD161^+$ Hücre Populasyon Oranları 37
4.1.4. Doğal Öldürücü T Hücre ($CD3^+$ $CD161^+$) Oranları 39

4.1.5. NK Hücrelerinde Hücre İçi Sitokin Profili 41
4.1.5.1. $CD3^-$ $CD161^+$ NK hücre içi IFN-γ seviyeleri.....41
4.1.5.2. $CD3^-$ $CD161^+$ NK hücre içi IL-10 seviyeleri 43
4.1.6. $CD3^+$ T Hücre Populasyonunda Hücre İçi Sitokin Profili 45
4.1.6.1. $CD3^+$ T hücre içi IFN-γ seviyeleri.....45
4.1.6.2. $CD3^+$ T hücre içi IL-10 seviyeleri 47
5. TARTIŞMA 50
KAYNAKLAR 57
ETİK KURUL KARARI 66
ÖZGEÇMİŞ 67

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Diabetes mellitus ve glikoz metabolizmasının diğer bozukluklarında tanı kriterleri 6
Tablo 2-2: Diabetes mellitus' etiyolojik sınıflaması 7
Tablo 3-1: Deney Hayvan Grupları 27
Tablo 3-2: Hücre kültüründe kullanılan uyaranlar ve kimyasallar 30
Tablo 3-3: Hücre yüzey boyamada kullanılan monoklonal antikorlar 30
Tablo 4-1: Uyarım yapılmayan ve PMA uyarımlı koşullarda $CD3^-$ hücre oranları 35
Tablo 4-2: Uyarım yapılmayan ve PMA uyarımlı koşullarda $CD3^+$ hücre oranları 37
Tablo 4-3: Uyarım yapılmayan ve PMA uyarımlı koşullarda $CD161^+$ hücre oranları 39
Tablo 4-4: Uyarım yapılmayan ve PMA uyarımlı koşullarda doğal öldürücü T hücre ($CD3^+$ $CD161^+$) oranları 41
Tablo 4-5: $CD3^-$ $CD161^+$ NK hücre IFN-γ içeriği 43
Tablo 4-6: $CD3^-$ $CD161^+$ NK hücre IL-10 içeriği 45
Tablo 4-7: $CD3^+$ T hücre içi IFN-γ İçeriği 47
Tablo 4-8: $CD3^+$ T hücre içi IL-10 içeriği 49

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Streptozotosinin kimyasal formülü (35) 10
Şekil 2-2: Alloksanın kimyasal formülü (35) 12
Şekil 2-3: NK hücrelerinin yüzey molekül ekspresyonları ve salgıladıkları sitokinler 18
Şekil 3-1: Deneylerde kullanılan Wistar albino sıçanlar 26
Şekil 4-1: $CD3^-$ hücre grubunda NK hücre kapılama stratejisi ve sitokin profili 32
Şekil 4-2: Uyarım yapılmayan ve PMA uyarımlı koşullarda $CD3^-$ hücre oranları 34
Şekil 4-3: Uyarım yapılmayan ve PMA uyarımlı koşullarda $CD3^+$ T hücre oranları 36
Şekil 4-4: Uyarım yapılmayan ve PMA uyarımlı koşullarda $CD161^+$ hücre oranları 38
Şekil 4-5: Uyarım yapılmayan ve PMA uyarımlı koşullarda doğal öldürücü T hücre ($CD3^+$ $CD161^+$) oranları 40
Şekil 4-6: $CD3^-$ $CD161^+$ NK hücre IFN-γ içeriği 42
Şekil 4-7: $CD3^-$ $CD161^+$ NK hücre IL-10 içeriği 44
Şekil 4-8: $CD3^+$ T hücre içi IFN-γ İçeriği 46
Şekil 4-9: $CD3^+$ T hücre içi IL-10 içeriği 48

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

APC	Allofikosiyanin
ASH	Antijen sunucu hücre (Antigen presenting cell)
ALC	Asetil L-karnitin (Acetyl L-carnitine)
ALX	Alloksan
ADP	Adenozin iki fosfat
ATP	Adenozin üç fosfat
ABCC8	ATP binding cassette C8
APG	Açlık plazma glikoz
ADA	Amerikan Diyabet Birliği (American Diabetes Sociation)
BB	Bio breeding
BLK	Beta lenfosit-spesifik kinaz
CD	Farklılaşma kümesi (Cluster of differetiation)
CTL	Sitotoksik T lenfositleri (Cytotoxic T Lymphocytes)
CSIF	Sitokin sentez inhibitör faktörü (Cytokine synthesis inbibitory factor)
CAT	Karnitine açil karnitin translokaz (Carnitine acyl translokaz)
CPT-I	Karnitine palmitoil açil transferaz-I (Carnitine palmitoyl transferase)
CEL	Karboksil ester lipaz (Carboxyl ester lipase)
CO_2	Karbondioksit
DNA	Deoksi-ribonükleik asit

DIDMOAD sendr	Diabetes insipidus, diabetes mellitus, optik atrofi ve sağırlık (deafness) ile seyreden sendrom (Wolfram sendromu)
DH	Dendritik hücre
DM	Diabetes mellitus
FACS	Floresan aktive hücre ayırma sistemi (Fluorescence activated cell sorting)
FBS	Fetal sığır serumu (Fetal bovine serum)
FITC	Fluoresein izosiyanat
FADH	İndirgenmiş flavinamid dinükleotid
FGF-4	Fibroblast büyüme faktörü-4 (Fibroblast growth factor 4)
GM-CSF	Granülosit-monosit koloni uyarıcı faktör (Granulocyte-monocyte colony stimulating factor)
GLUT2	Glikoz transporter 2
HbA1c	Glikozillenmiş hemoglobin A1c
HNF	Hepatosit nükleer faktör
HT	Hipertansiyon
IFN-γ	İnterferon-gamma
Ig	İmmünoglobülin
IL	İnterlökin
IFG	Bozulmuş açlık glikozu (Impaired fasting glucose)
IGT	Bozulmuş glikoz toleransı (Impaired glucose tolerance)
IDDM	İnsülin bağımlı diyabet mellitus (İnsülin-dependent diabetes mellitus)

IDF	Uluslararası Diyabet Federasyonu (International Diabetes Federation)
IPF	İnsülin promotör faktör
INS	İnsülin
İ.P.	İntraperitonal
İ.V.	İntravenöz
iNK	Olgunlaşmamış NK hücresi
KOA	Koenzim A
KLF	Kruppel benzeri factor (Kruppel like factor)
kD	Kilo dalton
KCNJ11	Potasyum içsel-rektifiye kanal (Potassium inwardly-rectifying channel J11)
KIR	Öldürücü İnhibitör Faktör (Killer inbition reseptor)
MODY	Gençlikte ortaya çıkan erişkin tip diyabet (Maturity onset diabetes of the young)
MHC	Major histocompatibility complex
M.Ö	Milattan önce
µl	Mikrolitre
NO	Nitrik oksit (Nitrogen monoxide)
NK	Doğal öldürücü hücre (Natural killer)
NKT	Natural killer T (Doğal öldürücü T hücresi)
NKR-P1A	Doğal Öldürücü Hücre Reseptör P1A (Natural killer Reseptör- P1A)
NOD	Obez olmayan diyabetik (non-obese diabetic)
NAD	Nikotinamid dinükleotid
NADH	İndirgenmiş nikotinamid dinükleotid

OGTT	Oral glikoz tolerans testi
PKMH	Periferik kan mononükleer hücreler
PBS	Fosfat tuz tamponu (Phosphate buffered saline)
PE	Phycoerythrin
PG	Plazma glikoz
PAX4	Paired box4
pH	Hidrojen gücü (Power of hidrogene)
PQQ	Pirolokünolin kinon (Pyrroloquınoline quınone)
ROS	Reaktif oksijen ürünleri (reactive oxygen species)
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute medium-1640
STZ	Streptozotosin
TNF	Tümör nekrozis faktör
Th	Yardımcı T hücresi (T helper cell)
TURDEP	Türkiye Diyabet Epidemiyolojisi Projesi
TGF-β	Transforme edici büyüme faktörü-beta (Transforming growht faktör-beta)
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)

ÖZET

Şemin P. STZ Diyabetik Hayvanlarda L- Karnitinin Doğal Öldürücü Hücreler Üzerine Etkisi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İmmünoloji AD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2014.

Diabetes mellitus (DM); insülin hormonunun yokluğu, yetersizliği ya da aşırı üretiminden dolayı glikozun hücreler tarafından kullanılamadığı multisistem bir hastalıktır. İmmün mekanizmalar, genetik yatkınlık, enfeksiyonlar ve çevresel faktörlerin tip 1 diyabet patogenezinde ilişiği olduğu gösterilmiştir.

Hayvan modellerinde ve aynı zamanda insanlarda tip 1 diabetes mellitus (T1DM) patogenezinde immün sistemin rolünü açıklamaya yönelik çok sayıda çalışmada Langerhans pankreatik adacıklarında insülin üreten β hücrelerinin otoimmün harabiyeti görülmektedir. Diyabetin immünopatogenezinde NK hücreleri ile ilgili bulgular çelişkilidir.

Karaciğerde lizin ve metiyonin aminoasitlerinden yapılan L-karnitin, yağ dokusunda enerji üretimi için gerekli bir aminoasit türevidir. İnsülin duyarlılığını ve glikozun periferik dokular tarafından kullanımını arttıran L-karnitinin eksikliğinde glikoz kullanımı iyice bozulmakta ve diyabetin kontrolü zorlaşmaktadır. L-karnitin metabolizması üzerine yapılan çalışmalarda plazma düzeyleri normal veya düşük saptanmıştır.

Çalışmamızda, STZ diyabetik sıçanlarda L-karnitinin NK hücreleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla 1) sağlıklı kontroller, 2) sadece STZ uygulanan, 3) yalnız L-karnitin, 4) STZ + L-karnitin, 5) STZ uygulandıktan sonra L-karnitin verilen ve 6) L-karnitin verildikten sonra STZ uygulanan sıçanların kalplerinden alınan periferik kan örnekleri flow sitometrik yöntemle incelenmiştir. Hücre yüzey molekül ekspresyonları (CD3, NKR-P1A-CD161), PMA uyarımlı ve uyarım olmayan koşullarda hücre içi IFN-γ ve IL-10 seviyeleri flow sitometri ile tespit edilmiştir.

Uyarım olmayan durumda gruplar birbirleri ile karşılaştırıldığında $CD3^{-}CD161^{+}$ NK hücrelerinin, STZ sonrası L-karnitin verilen hayvanlarda, sadece STZ ve L-karnitin sonrası STZ uygulanan gruplara göre anlamlı derecede artış gösterdiği saptanmıştır. Sitokin salınımı açısından değerlendirildiğinde genel olarak L-karnitin uygulamasının IFN-γ içeriğini arttırdığı buna karşılık IL-10 içeriğini azalttığı görülmştür. Bulgularımız L-karnitininin IFN-γ salgılayan NK1 tipi hücreleri arttırarak diyabet patogenezinde rol oynayabileceğini desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: Doğal Öldürücü Hücreler, Diyabet, L-karnitin, Sıçan, STZ

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 30232

ABSTRACT

Şemin P. The effect of L-carnitine on natural killer cells in STZ diabetic animals. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Immunology. Graduate Thesis. Istanbul. 2014.

Diabetes Mellitus (DM) is a multi-systemic disease that the cells have fail to uptake of glucose because of deficiency, absence or overproduction of insulin. Genetic predisposition, immune mechanisms, infections and environmental factors are shown to be involved in pathogenesis of type-1 diabetes.

In animal models as well as in humans, studies investigating immune system contribution in tip 1 diabetes mellitus (T1DM) revealed autoimmune destruction of Langerhans islet insulin-producing beta-cells. NK-cell contribution to DM pathogenesis is controversial.

L-carnitine is an amino acid derivate produced in liver from lyzin and metionin and is required for energy production in fat tissue, and increases insülin sensitivity and utilization of glucose by peripheral tissues. L-carnitine deficiency destroys utilization of glucose and complicates diabetes control. A number of studies in diabetics showed normal or decreased plasma levels of L-carnitine.

In our study, effects of L-carnitine on NK cells were investigated in STZ-diabetic rats. With this aim, formed groups were; 1) healthy controls, 2) STZ only, 3) L-carnitine only, 4) STZ together with L-carnitine, 5) L-carnitine after STZ and 6) STZ after L-carnitine. Peripheral blood was collected from the hearts of rats. Cell-surface molecule expression levels of CD3, NKR-P1A-CD161a, as well as intracellular IFN-γ and IL-10 levels were investigated by flow cytometry.

$CD3^{-}CD161^{+}$ NK cell levels were significantly increased in animals who received L-carnitine after STZ in comparison with only STZ and STZ after L-carnitine groups. L-carnitine administration is shown to increase IFN-γ content while IL-10 was decreased. Our findings suggest increase of NK1 cells with increased IFN-γ production in response L-carnitine, which may have a role in pathogenesis of diabetes.

Key Words: Natural killer cells, Diabetes, L-carnitine, rats, STZ

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 30232

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tip 1 diabetes mellitus (DM) çocukluk yaş grubunda sık görülen, T hücrelerinin aracılık ettiği, insülin üretiminde görev alan pankreas β hücrelerinin otoimmün veya otoimmün dışı nedenlerle haraplanması sonucu gelişen, insülopeni ve hiperglisemi ile karakterize kronik metabolik bir hastalıktır (1).

İmmün mekanizmaların, genetik yatkınlık ve çevresel faktörlerin tip 1 diyabet patogenezi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (2). İmmün sistemin, deneysel hayvan modellerinde olduğu gibi insanlarda da tip 1 diabetes mellitus (IDDM) patogenezinde rol oynadığını kanıtlar yeni bulgular vardır (2, 3) ve Langerhans pankreatik adacıklarında insülin üreten β hücrelerinin otoimmün harabiyeti görülmektedir. Hastalığın başlangıç mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte deneysel hayvan modelleri ve insan çalışmalarından elde edilen bulgular, adacık hücre harabiyetinin CD4 ve CD8 T hücreleri, B lenfositleri, makrofajlar ve dentritik hücreler gibi immün sistem hücrelerinin pankreasa infiltrasyonu sonucu geliştiğini göstermektedir (2). Otoreaktif T hücreleri otoimmün diyabette en önemli efektör hücrelerdir ve β hücrelerinde apoptozisi indüklemektedirler (4, 5). Doğal immünitenin elemanı olan doğal öldürücü (natural killer-NK) hücreler, kemik iliği kökenli, büyük granüllü lenfositlerdir. Patojenler ve tümörlere karşı spontan litik aktivite gösteren NK hücreleri periferik kan lenfositlerinin % 5-15'ini oluşturur ve karaciğer, peritoneal kavite, plasenta gibi periferik dokularda bulunurlar (6). Aktive NK hücreleri litik aktivitelerini perforin ve granzimin ekzositozu ile hedef hücrelerin apoptozunu uyararak gerçekleştirirler. Bu esnada interferon-gamma (IFN-γ), tümör nekroz faktör (TNF), granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF), interlökin 10 (IL-10) gibi proenflamatuvar sitokinleri sekrete ederler (7).

In vitro şartlarda belirli tümör hücrelerini öldürme yeteneğine sahip olan NK hücrelerinin *in vivo* deplesyonu, bazı fare modellerinde tümör oluşumunda artışa neden olmaktadır. Th1 (yardımcı T hücresi 1) ve Th2 hücrelerine benzer şekilde insan NK hücre alt gruplarının da NK1 ve NK2 olarak iki gruba ayrıldığı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda gösterilmiştir. Çalışmalar dolaşımdaki NK hücrelerinin farklı sitokin profillerine sahip efektör NK hücre alt gruplarına dönüşebileceğini ve farklı enflamatuvar özellikler kazanabileceğini desteklemektedir (6). Sıçan NK hücreleri yüksek seviyede NKR-P1A (CD161) ve CD8a eksprese etmelerine karşın CD3 eksprese etmemeleri ile ayırt edilirler (8). NK hücre aktivitesinin başlangıç tip 1 diyabetli hastalar ile sağlıklı kontroller karşılaştırıldığında azaldığı, ancak tip 2 diyabetli hastalar

ile benzer olduğu gösterilmiştir. Diyabette NK hücre aktivitesinde saptanan bu azalmanın tip 1 diyabetteki IFN-γ üretimindeki yetersizlikten (eksiklik) veya IFN-γ karşı NK hücre duyarlılığının azalmasından kaynaklanabileceği yönündedir (82). Başka bir çalışmada tip 1 diyabetli hastaların NK hücre sayılarının azalma eğiliminde olduğu (83) benzer şekilde tip 1 diyabetli hastalarda NK hücre sitotoksik aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir (84). DM oluşturulan sıçanlarda NK hücre sitotoksik aktivitesinin, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında belirgin şekilde azaldığı gösterilmiştir. Diyabetik sıçanlarda TNF-α, IL-1, IL-2, IL-6, IL-10 sitokinlerinin serum seviyelerinin sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında çok az değiştiği, IFN-γ seviyesinin ise belirgin olarak arttığı saptanmıştır (2).

L-karnitin, yağ dokusunda enerji üretimi için gerekli bir aminoasit türevidir. Karaciğerde lizin ve metiyonin aminoasitlerinden yapılmaktadır. L-karnitin, gereksinim duyulduğunda vücutta kolaylıkla üretilebildiğinden dolayı, eksikliği oldukça nadir görülmektedir. Bununla birlikte, L-karnitin eksikliği primer olarak genetik defektler sonucu gelişebileceği gibi sekonder olarak diyabet, siroz ve kronik böbrek yetersizliği gibi bazı kronik hastalıkların zemininde de ortaya çıkabilmektedir (10). Diyabetik hastalarda L-karnitin eksikliği, diyabetik komplikasyonları (retinopati, noropati gibi) olanlarda daha sık görülmekte ve bu durum, L-karnitin eksikliğinin bu komplikasyonların gelişmesinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Çünkü L-karnitin insülin duyarlılığını ve glikozun periferik dokular tarafından kullanımını arttırmaktadır. L-karnitin uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondri içine transportunda ve bunların oksidasyonunda görev almanın yanı sıra, yağ asidi oksidasyonunu arttırmaktadır. İnsanlarda kas dokusunda azalmış yağ asidi oksidasyonu, obezlerdeki insülin direnci ile ilişkili bulunmuştur (11).

Diyabetiklerde L-karnitin metabolizması üzerine yapılan birçok çalışmada plazma düzeyleri normal veya düşük bulunmuştur (10, 11). Özellikle tip 2 diabetes mellitusta (T2DM) saptanan düşük plazma L-karnitin seviyeleri, L-karnitin bir tedavi aracı olabileceğini düşündürmektedir (85, 86). L-karnitin eksikliğinin kan şekeri regulasyonunu bozan bir faktör olduğu düşünülmektedir. DM yeterli biçimde kontrol edilemediği takdirde artmış yağ asidi oksidasyonuna ve protein yıkımına bağlı olarak asetil, propiyonil gibi açil koenzim A (KoA) bileşiklerinin üretiminde artış meydana gelmektedir. Bunların ortamdan uzaklaştırılması için L-karnitine gereksinim vardır. Bu bileşiklerin hücrelerde birikmesi deterjan benzeri bir etkiyle sitotoksik hasar

oluşturabilmekte ve solunum zinciri fonksiyonlarını inhibe etmektedir. Bu bileşiklerin klirensi için L-karnitine gereksinim duyulması nedeniyle L-karnitin depoları tüketilir ve sonuçta düzeyi azalır. L-karnitin eksikliğinde glikoz kullanımı iyice bozulmakta ve diyabetin kontrolü de zorlaşmaktadır. Bu durum diyabetik komplikasyonların gelişmesini kolaylaştırmaktadır (11).

Diyabetik hastalarda saptanan L-karnitin eksikliğinin yerine konması ile insülin duyarlılığının ve glikozun periferik dokular tarafından kullanımının arttığı, endotel bağımlı relaksasyon kaybının düzeldiği ve insülin direncinin azaldığı klinik çalışmalarda gösterilmiştir.

Çalışmamızda Streptozotosin (STZ) ile diyabetik yapılan, STZ + L-karnitin verilen, L-karnitin verildikten sonra STZ verilen, STZ verildikten sonra L-karnitin verilen, sadece L-karnitin verilen sıçanlar ve sağlıklı kontrollerin kalperinden elde edilen periferik kan örneklerinde NK hücre oranları saptanarak diyabetik, sağlıklı ve L-karnitin verilen hayvanlarda NK hücrelerinin IFN-γ ve IL-10 içerikleri saptanarak L-karnitinin, diyabetik sıçanların tedavisi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu çerçevede diyabette rol oynadığı düşünülen NK hücrelerinin farklı denek gruplarındaki hücre içi sitokin seviyeleri karşılaştırılarak diyabet patogenezindeki rolü araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diabetes Mellitus Tanımı ve Tarihçesi

2.1.1. Diabetes Mellitus'un Tanımı

Diabetes mellitus, mutlak/kısmi insülin eksikliği ve/veya insülin direnci ile karakterize edilen, karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasında bozukluklara yol açan kronik hiperglisemik kompleks bir metabolizma hastalığıdır. Klinik olarak polidipsi, poliüri, polifaji, pruritus, ağırlık kaybı gibi klasik belirtiler ile başlar, süreç içinde hastalığa spesifik retinopati, nöropati ve nefropati gibi mikrovasküler komplikasyonlar ile birlikte ortaya çıkar. Özellikle insüline bağımlı olmayan T2DM klasik klinik belirtileri göstermeyebilir. Böyle durumlarda tanı kan testine göre konulmaktadır. İnsüline bağımlı olan T1DM klasik belirtiler ile kolaylıkla tanı koyulabilmektedir (12).

2.1.2. Diabetes Mellitus'un Tarihçesi

Diabetes mellitus poliüri, polifaji, polidipsi gibi kardinal belirtileri, zayıflama, çevre organlarda trofik bozukluklar ve enfeksiyonlar ile karakterize bir hastalık olduğundan önemi büyüktür (13, 14). Diabetes eski Yunanca'da "sifon" anlamına gelmekte ve aşırı idrar yapmayı ifade etmektedir. Mellitus ise Yunanca'da "bal" anlamına gelen "mel" kelimesinden türetilmiştir (15). Tarihte, DM ile ilgili ilk tanımlamalara günümüzden yaklaşık 3000 yıl önceki kaynaklarda rastlanmaktadır (13, 14). M.Ö. 1500'de Mısır Ebers Papirusları'ında fazla idrar yapılan, idrar yoluyla şeker kaybedilen bir hastalık olarak tanımlanmıştır. M.Ö. 6. ve 4. yüzyıllarda eski Hint hekimleri bu hastalığa sahip kişilerin idrarlarının karıncaları ve sinekleri çektiğini fark etmiş ve inceledikleri idrarın tatlı olduğunu saptamışlardır. "Tatlı idrar hastalığı" olarak tarif ettikleri bu rahatsızlığı bir üriner sistem hastalığı olarak değerlendirmişlerdir. Milattan 200 yıl sonra Kapadokyalı Areateus hastalığa "diabetes" ismini vermiştir (16). John Rollo 18. yüzyılda hastalık için, Yunanca ve Latince "*bal ve tatlı*" anlamına gelen "*mellitus*" kelimesini ilk kullanan kişi olmuştur. Chevreul 1815'de idrardaki bu şekerin "glikoz" olduğunu saptamış, Langerhans 1860'da, pankreastaki adacık hücrelerini tanımlamıştır. Mering ve Minkowski 1889'da pankreatektomiyle diyabet oluşumunu ortaya koyarak şeker hastalığında sorumlu organın pankreas olduğunu göstermişlerdir. Banting ve Best 1921 yılında insülini keşfetmiş, 1955 yılında oral antidiyabetik ilaçlar (Tolbutamid) kullanıma girmiş, 1973'de saflaştırılmış ve antikor üretimine sebep

olmayan insülin tipleri geliştirilmiştir. Günümüzde ise "rekombinant" teknoloji ile tamamıyla sentez ürünü insan insülinleri ve analogları kullanılmaktadır.

DM, 2000 yıl öncesinde Areateus'dan beri tanısı, tanımı, etiyolojisi ve tedavisinde devamlı değişimler ve gelişimler gösteren komplike bir hastalık olarak karşımıza çıkmaktadır (17).

2.2. Diabetes Mellitus Epidemiyolojisi

DM, bütün toplumlarda ve ırklarda görülen bir hastalık olmakla birlikte dünyanın bazı bölgelerinde görülme sıklığı daha azdır. Grönland ve Alaska Eskimolarında prevalansı çok düşük olup, saptanan olguların çoğu insüline bağımlı olmayan DM'dir. Buna karşılık %55'den fazla prevalansla Amerika'da yaşayan Pima Kızılderilileri'nde birinci sırada bulunmaktadır (18). Batı toplumlarında diyabetin prevelansı hızla yükselmektedir. DM prevalansının dramatik olarak artması; genetik faktörlerin yanısıra yaşam süresinin uzaması, obezite ve fiziksel inaktivitenin önemli bir sonucudur (19, 20, 21). Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF) verilerine göre dünyada 371 milyonun üzerinde diyabet hastası bulunmakta ve bu sayı 2005-2030 yılları arasında ulaşılması beklenen rakama şimdiden ulaşıldığını göstermektedir (22).

Ülkemizde 1999 yılında tamamlanan ve Dünya Sağlık Organizasyonu (WHO) destekli Türkiye Diyabet Epidemiyolojisi Proje'sinde (TURDEP-I) % 7,2 oranında diyabet saptanmıştır. TURDEP-II'de bu sıklık, % 90 artarak 2010'da % 13,7'e ulaşmıştır (23). Tüm diyabetlilerin % 90'dan fazlası tip 2 diyabet olan ülkemizde tip 1 diyabetin prevalansı % 2,5-6 civarındadır (24).

2.3. Diabetes Mellitus'un Tanı Kriterleri

Hastalığın tip 1 diyabet tanısı için çoğu kez Oral Glikoz Tolerans Testi (OGTT) yapılmasına gerek duyulmamaktadır. Tanı kriterleri venöz plazmada glikoz oksidaz yöntemi ile yapılan ölçümleri temel almaktadır.

Amerikan Diyabet Birliği'nin (ADA) 2013 kılavuzuna göre, açlık plazma glikoz (APG) düzeyinin 126 mg/dl'nin veya OGTT ile şeker yüklemesi sonrası 2. saat plazma glikoz (2st PG) düzeyinin 200 mg/dl'nin üzerinde olmasının yanı sıra; polidipsi, poliüri, polifaji, zayıflama gibi diyabetik semptomlarının olması koşulu ile herhangi bir zamanda ölçülen kan glikoz düzeyinin ≥200 mg/dl bulunması ile de tanı konulabilmektedir (25). Herhangi birinin varlığında kişide DM ile ilgili semptomlar yok

ise, kesin DM tanısı koyabilmek için, 3 kriterden herhangi biri ile bir başka gün sonucun desteklenmesi gerekmektedir (26).

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre sağlıklı bireylerin açlıktaki kapiller tam kan glikoz düzeyi venöz plazmadaki düzeye eşittir; ancak toklukta plazmadakinden yaklaşık olarak % 11 daha düşük kabul edilmektedir. Diyabet ve glikoz metabolizmasının diğer bozuklukları için revizyonları kapsayan yeni tanı kriterleri Tablo 2-1'de görülmektedir (12). Glikozillenmiş hemoglobin (HbA_{1c}; A1C) 2008 yılından beri diyabet tanı kriteri olarak kabul edilmekte ve HbA_{1c} seviyesi ≥ % 6,5 olması diyabet tanısı için yeterli görülmektedir.

Tablo 2-1: Diabetes mellitus ve glikoz metabolizmasının diğer bozukluklarında tanı kriterleri

	Aşikar DM	**İzole IFG**	**İzole IGT**	**IFG+IGT**	**DM Riski Yüksek**
APG (≥8 st açlıkta)	≥126 mg/dl	100-125 mg/dl	<100 mg/dl	100-125 mg/dl	-
OGTT 2. st PG (75 g glikoz)	≥200 mg/dl	<140 mg/dl	140-199 mg/dl	140-199 mg/dl	-
Rastgele PG	≥200mg/dl+Diyabet Septomları	-	-	-	-
HbA_{1C}	≥% 6.5 (≥48mmol/mol)	-	-	-	% 5.7-6.4 (39- 46 mmol/mol)

DM: Diabetes mellitus, APG: Açlık plazma glikozu, 2. st PG: 2. saat plazma glikozu, OGTT: Oral glikoz tolerans testi, HbA_{1c}: Glikozillenmiş hemoglobin A1c, IFG: Bozulmuş açlık glikozu (impaired fasting glucose), IGT: Bozulmuş glikoz toleransı (impaired glucose tolerance).

2.4. Diabetes Mellitus'un Etiyolojik Sınıflaması

Özetlenen diyabet sınıflamasında dört klinik tip yer almaktadır (Tablo 2-2). Bunlardan üçü (tip 1, tip 2 ve gestasyonel diyabet) primer, diğerleri (spesifik diyabet formları) ise sekonder diyabet formları olarak bilinmektedir (12).

Tablo 2-2: Diabetes mellitus' etiyolojik sınıflaması

I. Tip 1 diyabet (Genellikle mutlak insülin noksanlığına sebep olan β-hücre yıkımı vardır)

A. İmmün aracılı

B. İdiyopatik

II. Tip 2 diyabet (İnsülin direnci zemininde ilerleyiciinsülin sekresyon defekti ile karakterizedir.

III. Gestasyonel diabetes mellitus (GDM)
Gebelikle sırasında ortaya çıkan ve genellikle doğumla birlikte düzelen diyabet.

IV. Diğer spesifik diyabet tipleri

A. β-hücre fonksiyonlarının genetik defekti (monogenik diyabet formları)
- 20. Kromozom, HNF-4a (MODY1)
- 7. Koromozom, Glukokinaz (MODY2)
- 12. Kromozom, HNF-1a (MODY3)
- 13. Kromozom, IPF-1 (MODY4)
- 17. Kromozom, HNF-1B (MODY5)
- 2. Kromozom, NeuroD1 (MODY6)
- 2. Kromozom, KLF11 (MODY7)
- 9. Kromozom, CEL (MODY8)
- 7. Kromozom, PAX4 (MODY9)
- 11. Kromozom, INS (MODY10)
- 8. Kromozom, BLK (MODY11)
- Mitokondriyal DNA
- 11. Kromozom, Neonatal DM (Kir 6.2, ABCC8, KCNJ11 mutasyonu)
- Diğerleri

B. İnsülin etkisindeki genetik defektler
- Leprechaunism
- Lipoatrofik diyabet
- Rabson- Mendenhall sendromu
- Tip A insülin direnci
- Diğerleri

C. Pankreasın ekzokrin doku hastalıkları
- Fibrokalkulöz pankreatopati
- Hemokromatoz
- Kistik fibroz
- Neoplazi
- Pankreatit
- Travma/pankreatektomi
- Diğerleri

D. Endokrinopatiler
- Akromegali
- Aldosteronoma
- Cushing sendromu
- Feokromositoma
- Glukagonoma
- Hipertiroidi
- Somatostatinoma
- Diğerleri

E. İlaç veya Kimyasal Ajanlar
- Atipik anti-psikotipler
- Anti-viral ilaçlar
- B adrenerjik agonistler
- Diazoksid
- Fenitoin
- Glukokortikodiotler
- a- interferon
- Nikotinik asit
- Pentamidin
- Proteaz İnhibitörleri
- Tiyazid grubu diüretikler
- Tiroid hormonu
- Vacor
- Diğerleri (post transplant diyabet)

F. Immun aracılıklı nadir diyabet formları
- Anti-insülin reseptör antikorları
- "Stiff-man" sendromu
- Diğerleri

G. Diyabetle ilişkiligenetik sendromlar
- Alström sendromu
- Down sendromu
- Friedreich tipi ataksi
- Hantington korea
- Klinefelter sendromu
- Laurence-Moon-Biel Sendromu
- Miotonik distrofi
- Porfiria
- Prader-Willi sendromu
- Turner sendromu
- Wolfram (DIDMOAD) sendromu
- Diğerleri

H. İnfeksiyonlar
- Konjenital rubella
- Sitomegalovirus
- Koksaki B
- Diğerleri (adenovirus, kabakulak)

HNF-1α: Hepatosit nükleer faktör-1α, MODY1-10: Gençlerde görülen erişkin tipi diyabet formları 1-10 (maturity onset diabetes of the young 1-10), HNF-4α: Hepatosit nükleer faktör-4α, IPF-1: İnsülin promotör faktör-1, HNF-1β: Hepatosit nükleer faktör 1β, NeuroD1: Nörojenik diferansiyasyon 1, BLK: Beta lenfosit-spesifik kinaz, DNA: Deoksi-ribonükleik asit, DIDMOAD sendromu: Diabetes insipidus, diabetes mellitus, optik atrofi ve sağırlık (deafness) ile seyreden sendrom (Wolfram sendromu), KLF11: Kruppel like factor 11, CEL: Carboxyl ester lipase (bile salt-dependent lipase), PAX4: Paired box4, ABCC8: ATP binding cassette C8, KCNJ11: Potassium inwardly-rectifying channel J11, INS: İnsülin.

2.4.1. İnsüline Bağımlı (Tip 1) Diabetes Mellitus

İnsüline bağımlı diabetes mellitus, pankreas β hücre harabiyeti ya da fonksiyon bozukluğu nedeniyle mutlak insülin yetersizliği sonucu ortaya çıkan, başta karbonhidrat metabolizması bozukluklarına bağlı belirtilerle başlayan, tedavi edilmediği takdirde ketoasidoz ve ölümle sonuçlanan bir tablodur (27).

Pankreastan salgılanan endojen insülin eksikliğine veya yokluğuna bağlı olarak geliştiğinden, tedavide insülin mutlaka gereklidir (28, 29). Ayrıca diyabete yatkınlık oluşturan 14 gen saptanmıştır. DQB1 grubunda 57. pozisyonda aspartik asit bulunduğunda diyabet nadiren gelişmekte, 57. pozisyonda aspartik asit yerine başka bir amino asit (Valin) bulunduğunda ise diyabet gelişme olasılığı artmaktadır. Tip 1 diyabet tedavisi için kesin bir çözüm bulunamamış, ancak yaşam kalitesini düzenlemek adına insülin enjeksiyonları, tıbbi beslenme tedavisi, egzersiz, eğitim, evde kan glikoz ve keton takibi gibi multifaktöriyel uygulamalar yapılmaktadır (29). Her yaşta ortaya çıkabilmesine rağmen en sık çocukluk çağı ve ergenlikte görülmektedir (27).

2.4.2. İnsüline Bağımlı Olmayan (Tip 2) Diabetes Mellitus

Toplumda en sık görülen diabetes melllitus tipidir. Tip 2 diabet polidipsi, poliüri, polifaji, pruritus, ağırlık kaybı gibi klasik belirtiler ile ortaya çıkarsa da çoğu kez uzun sürebilen asemptomatik bir dönemle seyredebilmektedir (30).

Heterojen bir hastalık olan insüline bağımlı olmayan tip 2 DM'in patogenezinden β hücre fonksiyon bozukluğu, insülin direnci ve hepatik glikoz üretimi artışı gibi üç ana metabolik bozukluk sorumludur. Hepatik glikoz üretimi artışının primer defekt olduğunu gösteren bulgular az sayıdadır. İnsülin eksikliği ve/veya insülin direnci ise asıl nedeni oluşturmakta, ancak tip 2 DM'nin ortaya çıkışında insülin eksikliği ile seyreden β hücre fonksiyon bozukluğundan veya insülin direncinden hangisinin primer olarak sorumlu olduğu tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte β hücre fonksiyon bozukluğu ve insülin direnci arasında karşılıklı bir etkileşimin olduğu ve her ikisinin de patogenezde birlikte rol aldığı da ileri sürülmektedir. Tip 2 DM'deki primer patolojinin β hücre fonksiyon bozukluğu veya insülin direnci olmasında yaşın, etnik farklılıkların, şişmanlığın ve diyabetin heterojenitesinin kısmen de olsa belirleyici olduğu ileri sürülmektedir (27).

2.5. Deneysel Diyabet

Tip 1 diyabet pankreasda insülin üreten β hücrelerinin zarar gördüğü ve yıkıma uğradığı immün aracılı bir hastalıktır. Hayvan modelleri ile çalışmak bu hastalığın patogenezini anlamada ve yeni tedavi yöntemleri geliştirmede önemli bir yer tutar. Mantıklı ve hedef tedaviye yönelik girişimlerde bulunmak özellikle patogenezi tam olarak bilinmeyen tip 1 diyabette oldukça zordur (31).

Çeşitli hastalıkların patogenezinin anlaşılması, hastalıktan korunmanın ve tedavi olanaklarının incelenebilmesi için deneysel hayvan modellerinin kullanımı yaygın hale gelmiştir. Çevresel faktörlerin etkilerini belirlemek için kontrollerin kullanılabilmesi, araştırılan patolojiye uygun hayvan türlerinin genetik olarak seçilebilmesi, anlamlı istatistiksel değerlendirme yapmaya izin verecek sayıda örnekte çalışılabilmesi, hayvan modelleri ile çalışmayı rasyonel hale getiren temel faktörlerdir. İlaç araştırmalarında *in vivo* deneylerin bir bölümü, koşullar elverdiğince, insandaki hastalığı temsil eden hayvan modelleri üzerinde yapılır. Bu modellerden bazıları (spontan hipertansif sıçan modeli gibi) insandaki hastalığa patolojik özellikleri bakımından benzese de o hastalığı tam olarak temsil etmemektedir. Bazı modeller hayvanın diyetini değiştirmek veya toksik maddelerle belirli hedef organlarda lezyon oluşturmak suretiyle yapılmaktadır (kolesterol yüklenmesine bağlı ateroskleroz modelleri, kimyasal pankreas lezyonuna bağlı diyabet modelleri gibi) (32).

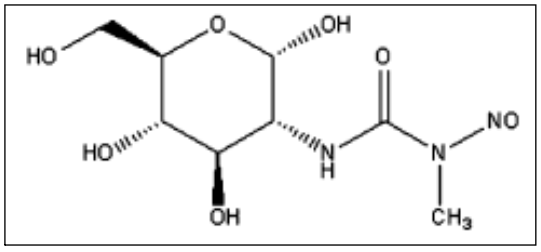
Fare, sıçan, tavşan, kobay, hamster, maymun, domuz, köpek ve kedi gibi deney hayvanları deneysel diyabet oluşturmak amacıyla kullanılabilmektedir. Deney hayvanlarında deneysel diyabet oluşturulması kimyasal ajanlarla, spontan olarak veya virüs aracılığıyla yapılabilmektedir. Bu kimyasalların en yaygın kullanılanları STZ ve alloksandır (32). Bu ajanların pankreasın beta hücrelerinde meydana getirdiği etki mekanizması yoğun olarak çalışılmıştır. Her iki ajanın da sitotoksik etkisi reaktif oksijen ürünleri (ROS) ile ilgili olmakla birlikte, oluşturdukları mekanizmanın kaynağı farklıdır.

Sıçanlarda deneysel diyabeti indüklemede kullanılan kimyasallar, seçici bir şekilde pankreatik beta hücrelerini yıkıma uğrattıkları için oldukça kullanışlı ve kullanımı kolaydır (33).

2.6. STZ ve Alloksan Etki Mekanizmaları

2.6.1. Streptozotosin (STZ)

Deneysel hayvan çalışmalarında insanlardakine benzer diyabet oluşturmak için kullanılan N-nitroso türevi D-glikozamin yapısındaki (Şekil 2-1) STZ'nin, oksidan maddeler meydana getirerek Langerhans adacıklarını seçici olarak tahrip etme yoluyla diyabeti başlattığı düşünülmektedir (34). STZ, toprakta bulunan *streptomyces achromogenes* isimli bir mikroorganizmanın metabolitidir. STZ sentetik olarak da üretilmektedir. Sentetik STZ'nin fermantasyon ürünün ürettiği ile aynı biyolojik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (35). 1960'da izole edilen ve başlangıçta antibiyotik, antitümöral ve karsinolojik özellikleriyle bilinen ajan, 1963'te köpek, kedi ve sıçanlarda diyabetojenik etkili bir madde olarak tanımlanmıştır. İlaç 2-deoksi-D-glikozun C-2 pozisyonuna bağlı bir metilnitrozoüre yan zinciri içermektedir (36).



Şekil 2-1: Streptozotosinin kimyasal formülü (35)

STZ, enjeksiyon sonrası seçici olarak beta hücrelerini yıkıma uğratırken ekzokrin kısım değişime uğramadan kalır. STZ uygulaması sonrası paknreasın beta hücrelerinde meydana gelen değişimin yanı sıra bütün organizma üzerindeki etkisinin anlaşılması ile deney hayvalarında diyabetojenik ajan olarak bu bileşiğin kullanılması oldukça yaygınlaşmıştır (37). Katı halde stabil değildir ve yapısındaki glikoz molekülünün konumuna göre α ve β izomerlerinin karışımı şeklindedir. Dondurulmuş olarak saklanmalı ve ışıktan korunmalıdır. Optimum stabilitesi için pH 4 - 4,5 olmalıdır. STZ pankreas β hücrelerine direkt olarak toksik etki göstermektedir. Yapısında bulunan bir glikoz molekülü sayesinde plazma membranındaki glikoz taşıyıcılarına bağlanır, molekül nitrozoüre bölümünden ayrılır ve hücre içine girerek toksisite gösterir. Glikozla uyarılan insülin salınımını bloke eder. Ancak pankreas β hücrelerine etkisi, daha çok intrasellülerdir. STZ'nin hücre içindeki temel etki yeri nükleer DNA'dır. Hücre içinde

STZ dekompozisyona uğrar. Bu sırada oldukça reaktif karbonyum iyonları oluşur ve bu iyonlar DNA bazlarının alkilasyonuna neden olduğu için, olayı DNA tamir dönemi izler. Bu sırada çekirdek enzimi olan poli (ADPriboz) sentetaz aşırı miktarda aktive olur. Bu enzimin hücresel aktivitesi sırasında NAD fazla kullanıldığından, hücredeki NAD depoları boşalır, NAD tükenmesi hücre ölümüne neden olur (36).

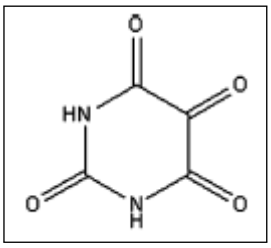
STZ hayvanlara tek doz verilebildiği gibi çoklu dozlarda da verilebilir. Bu uygulama çoğunlukla farelerde olmakta ve immün mekanizmaların aktivasyonu yoluyla tip 1 diyabeti indükleme amacıyla kullanılmaktadır (35). STZ, pankreas β hücrelerini hasarlayarak hem insüline bağımlı, hem de insülinden bağımsız diyabete neden olmaktadır. Yetişkin sıçanlarda tek doz (40-60 mg/kg) damar içi (i.v.) yolla STZ uygulamasının, insüline bağımlı diyabete; yeni doğmuş sıçanlara tek doz periton içi (i.p.) veya i.v. yolla 100 mg/kg STZ uygulamasının ise insülinden bağımsız diyabete neden olduğu bildirilmiştir (38). STZ, pankreas dokusu dışında böbrek ve karaciğere de hasar vermektedir (39).

Beta hücrelerindeki STZ etkisi, kandaki insülin ve glikoz konsantrasyonlarındaki belirgin değişiklerle kendini göstermektedir. Enjeksiyondan 2 saat sonra kan insülin düzeyinin düşmesine eşlik eden hiperglisemi gözlenmektedir. Yaklaşık 6 saat sonra kan insülin düzeyinin yükselmesi ile birlikte hipoglisemi meydana gelmektedir. Son olarak da hiperglisemi gelişmekte ve kan insülin düzeyi düşmektedir (35). Kan glikoz ve insülin düzeyindeki bu değişiklikler beta hücre fonksiyonlarında bozukluğa neden olarak kendini göstermektedir. STZ glikoz oksidasyonunu bozmakta, insülin biyosentezini ve sekresyonunu düşürmektedir (40). Öncelikle STZ β hücrelerinin glikoza olan cevabını ortadan kaldırmakta, sonrasında ise bu cevapsızlığın geçici durumu kaybolmakta ve durumu glikoza verilen yanıtın kalıcı olarak kaybı ve hücrelerin zarar görmesi izlemektedir (33, 35).Sıçanlarda yapılan çalışmalarda STZ uygulanan diyabetik gruplarla sağlıklı grupların pankreas biyopsileri hematoksilen & eozin ile boyandığında diyabetik gruplarda pankreatik langerhans dokusu ile beta hücrelerinin geri dönüşümsüz şekilde yıkıma uğradığı gözlenmiştir (41).

2.6.2. Alloksan (ALX)

2,4,5,6- tetraoksiprimidin; 5,6-dioksiurasil yapısında olan ALX (Şekil 2-2) ilk kez 1818 yılında Brugnatelli tarafından tanımlanmıştır. Wöhler ve Liebig ise bu maddeye "alloksan" adını vermiştir ve sentezinin ürik asit oksidasyonu ile olduğunu tanımlamışlardır. 1943 yılında Dunn, Sheehan ve Mclethie, bu ilacın diyabetojenik

etkisini tavşanlarda çalışmış ve pankreatik adacıklarda meydana gelen spesifik nekrozu rapor etmişlerdir. O zamandan beri hayvanlarda tip 1 diyabet oluşturmak için ALX' den yararlanılmaktadır (35). Ürik asit türevi, antineoplastik bir ajandır. Genellikle monohidrat tuzu şeklinde bulunur. Toz hali 2-8ºC'de saklanmalıdır. Suda kolaylıkla erir, solüsyonu +4ºC'nin altında korunmalıdır. Toksik etkisi özellikle pankreas β hücrelerine özgüdür. Glikozla uyarılan insülin salınımını inhibe eder; yüksek dozları ise β hücre nekrozu yapar (39).



Şekil 2-2: Alloksanın kimyasal formülü (35)

ALX'in iki farklı patolojik etkisi vardır: birincisi ALX glikoza bağlı insülin sekresyonunu glukokinazın spesifik inhibisyonu ile seçici olarak durdurmaktadır. Diğeri β hücresinin glikoz sensörü, ROS'un üretimini indükleyerek β hücrelerinde seçici nekroza neden olmaktadır (35). Ayrıca serbest radikal hasarı oluşumuna bağlı olarak mitokondriyal transport sistemlerini inhibe ederek hücre içi pH'ın yükselmesine ve hücre ölümüne (39), sonuç olarak tip 1 diyabet oluşumuna yol açmaktadır. Bu iki etki ALX'in spesifik kimyasal özelliği olarak belirlenmiştir. ALX ve glikoz hidrofilik bir yapıya sahiptir ve plazma membranının lipid kısmına giriş yapmamaktadır (35).

ALX molekülü glikoza yapısal olarak oldukça benzediği için β hücresi plazma membranındaki glikoz transporter 2 (GLUT2) glikoz taşıyıcısı bu glikoz benzeri yapıyı kabul etmekte ve onu sitozole taşımaktadır (42). ALX taşıyıcının fonksiyonunu inhibe etmediğinden, seçerek ve serbest olarak β hücresi içine girmektedir, bu yüzden insülin üreten hücreler için toksik değildir (43). ALX'ın yarı ömrü kısadır, dakikalar içerisinde çözeltide hemen çözülmekte ve non-diyabetojenik alloksanik asit haline gelmektedir. Bu nedenle β hücreleri tarafından hızlı bir şekilde hücre içinde biriktirilmelidir. Eğer ALX enjeksiyonundan sonraki dakikalarda pankreastaki kan akışında herhangi bir kesinti olursa ALX etkisiz hale gelmektedir (35). Sistemik yayılımdan sonra ALX'in lipofilik türevleri nefrotoksisiteye neden olan başlıca etkendir.Oldukça şiddetli olup hayvanlarda diyabet oluşmadan önce ölümcül nefrotoksisite oluşmaktadır. Lipofilik

ALX türevlerinin toksik etkisine karşı böbrekte olan bu duyarlılık, bu türevlerin böbrekteki tubuler hücrelerdeki birikiminin, β hücreleri gibi GLUT2 eksprese etmesinden kaynaklanmaktadır. Glikoz ile indüklenebilen insülin sekresyonunun seçici olarak inhibisyonu, ALX'in tiyol grubu rekativitesinin major patofizyolojik etkisi ile olmaktadır (35, 42). ALX'in tiyol grupları ile reaksiyona giren merkezi 5-karbonil grubu vardır. Glukokinaz β hücresi içinde bulunan çok duyarlı bir tiyol enzimidir. Yüksek konsantrasyonlarda ALX çok sayıda fonksiyonel olarak önemli enzimi ve buna ek olarak diğer protein ve fonksiyonları inhibe etmektedir (44, 45). Deneysel diyabet oluşturmada kullanılan başka bir yönteme göre; distile su veya serum fizyolojik içerisinde çözülmüş alloksan, sıçanlara i.p. yolla 120 mg/kg dozunda 3 gün üstüste uygulanır. Son alloksan uygulamasından 3 gün sonra sıçanlar 1 gece önce aç bırakılarak sabah açlık kan şekerleri ölçülür. Kan şekeri düzeyi 250 mg/dL'nin üzerinde olanlar diyabetli kabul edilir. Ayrıca serum fizyolojik solüsyonunda çözülmüş alloksan, 150 mg/kg dozunda i.p. yolla 1 kez uygulanır. Alloksan uygulamasına bağlı olarak pankreastan yoğun insülin salgılanmaktadır. Bundan dolayı fatal (öldürücü) hipoglisemi gelişme olasılığı vardır. Bunu önlemek için sıçanlara 4-6 saat sonra 15-20 mL kadar % 20'lik glikoz solüsyonu i.p. yolla uygulanır. Bundan sonra sıçanlara hipoglisemiyi önlemek amacıyla 24 saat süreyle % 5 glikoz solüsyonu (içme suyuna katılarak) verilir. 2 hafta sonra açlık kan şekeri ölçümü yapılır ve kan şekeri düzeyi 200-260 mg/dL olanlar çalışmaya alınır (38). Alloksanın *in vivo* dezavantajları; fizyolojik pH'da stabil olmayışı, diyetteki şekerlerin alloksanın etkisine karşı koruyucu olabilmesi, yaş ve türe göre geniş bir doz varyasyonu bulunması ve yüksek dozlarda pankreas dışı diğer organlarda da toksik etkili oluşudur. Alloksanın diyabetojenik dozu i.v. 40-45 mg/kg'dır (39).

Alloksan ile STZ arasındaki farklar

1. STZ' ye kıyasla alloksan ile daha yüksek kan şekeri düzeyleri saptanır.

2. STZ'nin trifazik yanıtı alloksana oranla genellikle 1 saat daha geç ortaya çıkar.

3. Alloksan ile ketozis daha sıktır.

4. Diyabetik ajan uygulamasından birkaç ay sonra β hücrelerinin rejenerasyonu veya adacık hücre adenomu gelişmesi sonucu kan şekeri düşmeye başlayabilir. STZ diyabetinde bu onkojenik etki (adenoma riski) alloksana kıyasla daha fazladır (STZ ile adenom riski % 5-99 arasında değişir). Bu nedenle uzun süreli diyabet

oluşturulması ve kronik komplikasyonların izlenmesi gerektiğinde alloksan diyabeti daha avantajlıdır.

5. STZ diyabetinde nöropati daha şiddetlidir.

Kimyasal diyabette biyokimyasal değişiklikler

Diyabetojenik ajan uygulanımı sonrası kan glikozunda üç fazlı bir yanıt oluşmaktadır:

1. **Geçici hiperglisemi fazı:** İlk 2 saatte oluşur; karaciğerde glikojenin ani yıkımına bağlı olarak kan şekeri yükselir. Bu durum uygulamadan önce hayvan 12-18 saat aç bırakılırsa azaltılabilir. Bu dönemde plazma insülin düzeyleri düşüktür (39).
2. **Şiddetli hipoglisemi fazı:** Uygulamadan yaklaşık 6 saat sonra başlar. Diyabetojenik ilaç uygulamasını izleyen ilk 24 saat içindeki ölümlerden bu hipoglisemi sorumludur. Bu nedenle diyabet indüksiyonundan sonraki ilk 24 saatlik dönemde hayvana şekerli sıvı (örneğin % 10 glikoz solüsyonu) verilmesi tavsiye edilir. Hipoglisemi, β hücrelerinin ölümüyle birlikte aşırı miktarda insülinin kana salınımına bağlıdır ve plazma insülin düzeyleri çok yüksektir. Aç bırakılan hayvanlarda bu etki daha da belirgindir. Bundan dolayı şiddetli hipoglisemiye bağlı ölümlere engel olabilmek için diyabetojenik ajanın tok karnına uygulanması da önerilmektedir (39).
3. **Kalıcı hiperglisemi fazı:** Diyabetojenik ajan uygulanımından 10-12 saat sonra başlar. Bu fazda plazma insülin düzeyleri düşer ve aylarca düşük düzeylerde seyreder (39).

Kimyasal diyabette genel olarak glukagon fazlalığı söz konusudur ve ilk 24 saatte plazma glikoz ve insülin düzeylerine paralel değişiklikler oluşur. Glukagonla ilgili değişikliklerin doğrudan α hücre hasarıyla mı, yoksa insülin eksikliği nedeniyle mi geliştiği tam bilinmemektedir. Somatostatin salgılayan delta hücreleri ise diyabetojenik ajandan etkilenmez, ancak uygulamadan yaklaşık 2 hafta sonra insülinin düşüşü ve glukagonun yükselişine yanıt olarak somatostatin düzeylerinde artış oluşmaktadır (39).

2.7. L-Karnitin

Karnitin, β-hidroksi γ-trimetil aminobütirik asit formülünde olup kimyasal yapı olarak asetilkoline benzer. Bir asimetrik karbon atomuna sahip olması nedeniyle D ve L formlarına sahiptir. Dokularda sadece L formu sentez edilir ve sadece bu formu

metabolik olarak aktiftir. Vücut total karnitin stoğunun % 98'i iskelet ve kalp kasında, % 1,6'sı karaciğer ve böbreklerde, % 0,6'sı ise ekstrasellüler sıvıda bulunmaktadır.

Primer olarak karaciğer ve böbreklerde proteine bağlı lizin kalıntılarından ve S-adenozil metiyoninden sentezlenir. Karnitin sentezinde 4-N-trimetil-lizin ve γ-bütirobetain olmak üzere iki primer ara ürünü vardır. Bu iki ara ürünün kandaki miktarının arttığı durumlarda karnitin üretimini arttırdığı görülmüştür (46).

Askorbik asit karnitin sentezi için esansiyeldir ve sentezde hidroksilasyon reaksiyonlarında kofaktör rolü oynar. Deneysel vitamin C eksikliği çalışması karnitinin üriner atılımının artışıyla sonuçlanmıştır (47). Karnitin düzeyindeki azalış diyetsel kaynaklardan absorbsiyonun azalması veya böbreklerden atılımın artması sebebiyle olabilir. Plazma karnitin konsantrasyonu normal olan insanlarda böbrek glomerülünden süzülen karnitinin % 90'dan fazlası geri emilir. İnsanlarda karnitin ihtiyacı genellikle diyet ve endojen biyosentezi ile sağlanır. Diyetsel karnitin kaynakları et, kümes hayvanları, balık ve süt ve süt ürünleridir. Bitkisel kaynaklardan sağlanan miktar oldukça azdır. Bağırsak lümeninden hızla emilen karnitin basit ve aktif transport mekanizmalarıyla mukozal membrandan geçer. Portal sirkülasyondan karaciğere gelen karnitin, devamında sistemik dolaşıma salınır (47, 48).

Gereksinim duyulduğunda vücutta kolaylıkla üretilebilmesinden dolayı L-karnitin eksikliği oldukça nadir görülür. L-karnitin eksikliği primer olarak genetik defektler sonucu gelişebileceği gibi sekonder olarak diyabet, siroz ve kronik böbrek yetersizliği gibi bazı kronik hastalıkların zemininde de ortaya çıkabilmektedir (10,11).

L-karnitin lipid metabolizması için oldukça önemlidir. Yağ asidi β-oksidasyonu için düzenleyici kofaktör gibi rol oynar. Uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondriyal membrandan açil karnitin esterleri olarak geçişine yardımcı olarak bir mekik görevi görmektedir. Mitokondri içine yağ asidi taşınmasında bir azalma olduğunda sitozolik trigliserid birikimi olur.

Yağ asitlerinin katobolizması üç ana basamakta gerçekleşir: Aktivasyon, mitokondriye taşınma ve β-oksidasyon.

Aktivasyon aşamasında uzun zincirli yağ asidi açil-KoA sentetaz tarafından uzun zincir açil-KoA'ya dönüştürülerek aktive edilir. İkinci aşamada mitokondriyal dış membranda bulunan karnitin palmitoilaçil transferaz-I (CPT-I) enzimi tarafından aktive yağ asidi karnitine aktarılarak uzun zincir açil-KoA açil karnitine dönüştürülür. Üçüncü aşamada açil karnitin mitokondriyal karnitin açil karnitin translokaz (CAT) aracılığı ile mitokondriyal iç membrandan geçer. CAT bir kotransporterdir; açil-karnitin ve serbest

karnitini aynı anda zıt yönlere taşır. Açil karnitini sitozolden mitokondri matriksine taşırken serbest karnitini mitokondri matriksinden sitozole taşır. İç mitokondri membranının iç yüzeyinde bulunan karnitin palmitoilaçil transferaz-II (CPT-II) açil karnitindeki uzun zincirli yağ asidini koenzim A'ya aktarır ve açil-KoA oluşur.

Açil-KoA β-oksidasyona uğrar, oluşan ürün sitrik asit döngüsüne dahil olur. β-oksidasyonda asetil-KoA'ların sitrik asit döngüsünde kullanılması ile reaksiyonlarında açığa çıkan indirgenmiş nikotinamid dinükleotid (NADH) ve indirgenmiş flavinamid dinükleotid (FADH2)'ler elektron transport zinciri ve oksidatif fosforilasyonda kullanılarak ATP oluşur.

L-karnitinin lipid metabolizması dışında etkileri de olduğu saptanmıştır:

1. Mitokondri içinde oluşan kısa zincir açil kalıntılarının benzoik ve pirüvik asit gibi fizyolojik olmayan bazı bileşiklerin ortamdan kaldırılmasında,
2. Pirüvatın asetil-KoA'ya dönüşümünü sağlayan pirüvat dehidrogenaz aktivitesinin düzenlenmesinde,
3. Mitokondri içinde ATP/ADP oranını kontrol eden adenin nükleotid translokaz aktivitesinin düzenlenmesinde,
4. Karbonhidrat metabolizmasının yönlendirilmesi ve yakıt hassasiyetinde rol oynamaktadır (47, 48).

2.8. Doğal Öldürücü Hücreler

2.8.1. NK Hücrelerinin Genel Özellikleri

Doğal immünitenin elemanı olan doğal öldürücü (natural killer, NK) hücreler, kemik iliği kökenli, gelişim için timusa gereksinim göstermeyen büyük granüllü lenfositlerdir. Patojenler ve tümörlere karşı spontan litik aktivite gösteren NK hücreleri periferik kan lenfositlerinin % 5-15'ini oluştururlar (49). Karaciğer, peritonal kavite, plesenta gibi periferik dokularda bulunurlar. *In vitro* şartlarda belirli tümör hücrelerini öldürme yeteneğine sahip NK hücrelerinin *in vivo* deplesyonu bazı fare modellerinde tümör oluşumunda artışa neden olmaktadır. Th1 (yardımcı T hücresi 1) ve Th2 hücrelerine benzer şekilde insan NK hücre alt gruplarının da NK1 ve NK2 olarak iki gruba ayrıldığı *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda gösterilmiştir. Çalışmalar dolaşımdaki NK hücrelerinin farklı sitokin profillerine sahip efektör NK hücre alt gruplarına dönüşebileceğini ve farklı enflamatuvar özellikler kazanabileceğini desteklemektedir (6). Sıçan NK hücreleri hem yüksek seviyede NKR-P1A (CD161) hem de çoğu NK

hücresinin CD8a eksprese etmesi ve CD3 eksprese etmemesi ile ayırt edilirler (8). Kemik iliğinden kökenlenen ve gelişim için timusa gereksinim duymayan NK hücreleri, T hücre reseptörü veya CD3 molekülünü eksprese etmemelerine karşılık, hücre yüzeylerinde CD16 ve CD56 ekspresyonu ile karakterizedir. CD56 ekspresyonunun yoğunluğuna bağlı olarak "$CD56^{parlak}$ ve $CD56^{soluk}$" olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Yüksek oranda Fc-γ reseptör CD16 ve perforin eksprese eden $CD56^{soluk}$ NK hücre popülasyonu periferik kan NK hücrelerinin yaklaşık % 90'ını oluşturmaktadır. Efektif olarak litik etkili bu hücre grubunun aksine, düşük seviyede perforin ve CD16 eksprese eden $CD56^{parlak}$ NK hücrelerinin yüksek seviyede sitokin sekresyonundan dolayı enflamatuvar veya regülatör etkili hücreler olduğu ileri sürülmektedir (6).

Bu hücreler uyarıma bağlı olarak değişen miktarlarda IFN-γ sekrete edebilen ve hedef hücreleri etkili şekilde öldüren hücrelerdir (50). Enflamasyonlu periferal bölgeler için "homing marker"ları (yerleşme belirteci) taşırlar ve sitotoksisitede etkili perforin içerirler (51, 52).

$CD56^{soluk}$ hücreler, CD94/NKG2, KIR, NC ve perforini eksprese etmeleriyle bilinirken, $CD56^{parlak}$ hücreler CD94/NKG2 eksprese etmelerine karşın KIR, NC ve perforin ekspresyonları düşük ya da yoktur (53, 54). Bu iki alt grup hem farklı adezyon moleküllerine hem de kemokin reseptörlerine sahptir (55, 56, 57, 58).

NK hücreleri patojenlere karşı erken konak savunmasını sağlayan tümör ve virüsle enfekte hücreleri tanıyarak öldürme ve immünoregülatör sitokinlerin üretimi olmak üzere 2 ana fonksiyona aracılık ederler (58, 59, 60).

NK hücreleri fonksiyonlarını, yüzeylerinde eksprese ettikleri çeşitli aktivatör ve inhibitör reseptörler arasındaki etkileşimler aracılığıyla gerçekleştirir ve IFN-γ, IL-2, IL-12 gibi sitokinler tarafından aktive olurlar (59, 61). İnhibitör reseptörler bir inhibisyon sinyali oluştururken, aktivatör reseptörler NK hücre aktivasyonunu ve hedef hücre lizisini başlatırlar. Bu reseptörler arasında NKG2A inhibitör, NKG2D ve NKp44 ise aktivatör reseptördür (61). NK hücreleri aktivasyonu takiben uygun hedef hücrelere karşı sitotoksik fonksiyonlar sergilemenin yanında doğal ve edinsel immün yanıtları düzenleyen çeşitli sitokinler ve kemokinler (IFN-γ, GM-CSF ve TNF-α) salgılarlar (62).

NK hücrelerinin genel olarak fonksiyonları:

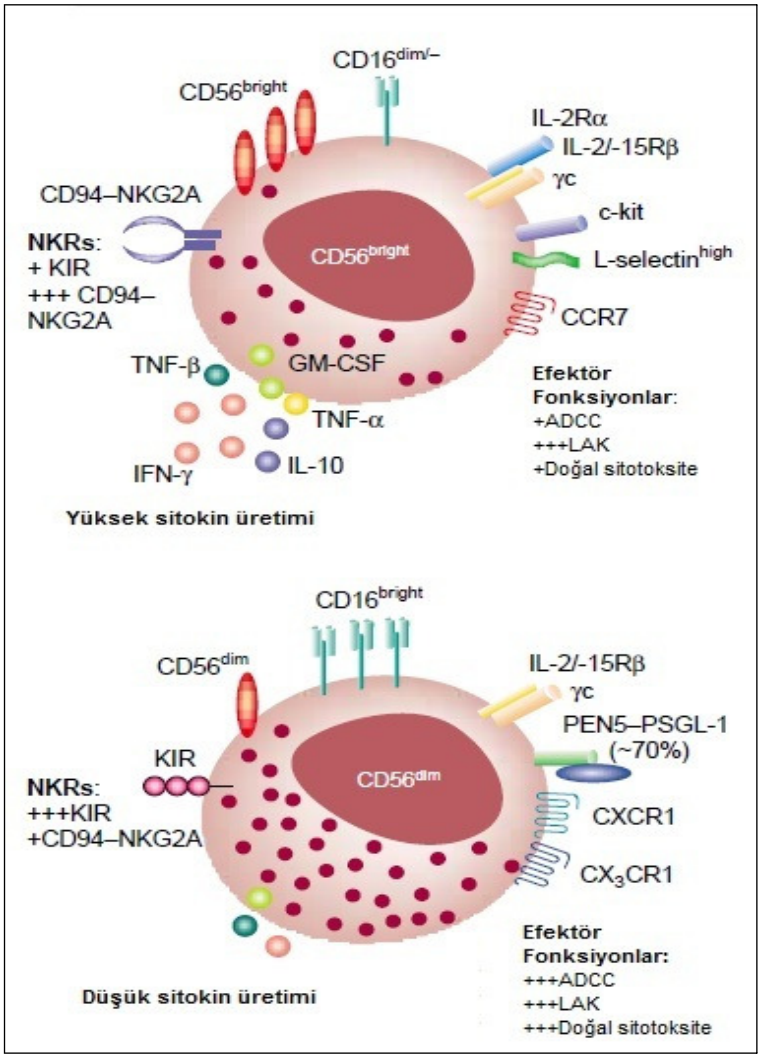
1. Salgıladıkları bazı sitokinlerle edinsel immün yanıtı düzenleme (58)

2. Dendritik hücre etkileşimiyle doğal immün sistemi şekillendirme (63)

3. Viral enfeksiyonlara karşı savunma (64)

4. Tümör hücrelerinin lizisi ve yıkımı (65)

$CD56^{bright}$ ve $CD56^{dim}$ olarak iki gruba ayrılan NK hücrelerinin yüzeylerinde ekspre ettikleri moleküller ve salgıladıkları sitokinler şekilde görülmektedir (Şekil 2-3).



Şekil 2-3: NK hücrelerinin yüzey molekül ekspresyonları ve salgıladıkları sitokinler

2.8.2. NK Hücrelerinin Diabetes Mellitus ile İlişkisi

NK hücrelerinin diyabet patogenezindeki rolü tam olarak bilinmemekle birlikte, DM'ta T ve NK hücrelerinin rolünü gösteren çok sayıda çalışma bulunmakla birlikte NK hücreleri ile ilgili çalışma sonuçları çelişkilidir (66). NK hayvan çalışmalarının çoğu NOD (non obese diabetic) fareler üzerinedir. Mevcut çalışmalar, sağlıklı kontrollerle kıyaslandığında hastaların periferik kan NK hücrelerinde eksiklik olduğu

veya NK hücre sayısının hasta ve kontrollerde aynı olmasına karşılık sitotoksik aktivitelerinde düşüklük olduğu yönündedir (2, 9). DM'ta sıçanlarla yapılan çalışmada ise NK sitotoksik aktivitesinin, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında belirgin şekilde azaldığı gösterilmiştir. Diyabetik sıçanlarda TNF-α, IL-1, IL-2, IL-6, IL-10 sitokinlerinin serum seviyelerinin sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında çok az değiştiği, IFN-γ seviyesinin ise belirgin olarak arttığı saptanmıştır (2). Yeni tanı konmuş hastalarda NK hücre sıklığında sağlıklılara oranla azalma gözlenmiştir. Pankreas adacıklarının hücre yüzeylerinde, bir NK hücre aktivasyon reseptörü olan NKp46'nın ligand ekspresyonunda artış olduğu gösterilmiş ve aktivasyon reseptörlerinin pankreas adacıkları üzerindeki ligandlarına bağlanma yoluyla tip 1 DM gelişiminde önemli rol oynayabileceği öne sürülmüştür (66). Ayrıca NKG2D ekspresyonunun sağlıklılara kıyasla hem yeni tanı konmuş hem de ileri dönemdeki hastalarda daha düşük olduğu saptanmıştır (67, 68). Başka bir çalışmada yeni tanı almış tip 2 diyabet hastalarında aktive NK ve NKT hücre sıklığının sağlıklılara oranla yüksek olduğu bilgisi, NK ve NKT hücrelerinin tip 2 diyabet patogenezinde rol alan obezite ile ilişkili kronik enflamasyona da katıldıklarını düşündürmektedir (69).

2.9. L-Karnitinin Diabetes Mellitus ile İlişkisi

L karnitin yağ dokusunda enerji üretimi için gerekli bir aminoasit türevidir. Karaciğerde lizin ve metiyonin aminoasitlerinden yapılmaktadır (10). L karnitin lipid metabolizması dışında karbonhidrat metabolizmasının yönlendirilmesi ve yakıt hassasiyetinde rol oynamaktadır (47, 48). L-karnitin eksikliğinin kan şekeri regülasyonunu bozan bir faktör olduğu düşünülmektedir. Diyabetik hastalarda L-karnitin eksikliği, diyabetik komplikasyonları (retinopati, noropati gibi) olanlarda daha sıktır. Bu durum L-karnitin eksikliğinin bu komplikasyonların gelişmesinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Çünkü L-karnitin insülin duyarlılığını ve glikozun periferik dokular tarafından kullanımını arttırır. L-karnitin uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondri içine transportunda ve bunların oksidasyonunda görev alır, yağ asidi oksidasyonunu arttırır. İnsanlarda kas dokusunda azalmış yağ asidi oksidasyonu, obezlerdeki insülin direnci ile ilişkili bulunmuştur (11). Diyabetiklerde L-karnitin metabolizması üzerine yapılan birçok çalışmada plazma düzeyleri normal veya düşük bulunmuştur (10, 11).

L-karnitin eksikliğinde endotel disfonksiyonu gelişebilmektedir. Hipertansif ve normotansif sıçanlarda L-karnitinin endotel bağımlı relaksasyonu, nitrik oksit üretimini

arttırarak indüklediği gösterilmiştir (11, 70). L-karnitin tedavisiyle sistolik ve ortalama kan basıncında belirgin bir düşüş, diyastolik kan basıncında ılımlı bir düşüş olduğu saptanmıştır (11, 71). İnsanlarda L-karnitin eksikliği miyopati ve bozulmuş yağ asidi oksidasyonu ile ilişkilidir. Sonuçta enerji metabolizmasında bir defekt oluşur ve enerji üretimi azalır. Plazma L-karnitin düzeyinin hücresel enerji metabolizmasını yansıtan bir gösterge olduğuna inanılmaktadır. Diyabetin yetersiz kontrolü bir anlamda ortamdaki enerji açığını ifade etmektedir. Bu nedenle kötü kontrollü diyabetiklerde L-karnitin düzeylerinin düşük bulunması şaşırtıcı olmamalıdır (10). Bu veriler göz önüne alındığında diyabetik hastalarda L-karnitin eksikliğine bağlı olarak; bozulmuş yağ asidi oksidasyonu nedeniyle serbest yağ asitleri düzeyinin artacağı, glikozun aerobik yıkımının azalacağı ve hipergliseminin ağırlaşacağı, glikoz ile yağ asidi arasındaki dengenin bozulacağı, bunun da insülin direncine neden olacağı, reaktif oksijen ürünlerinin artacağı, nitrik oksit üretiminin azalacağı ve sonucunda endotel disfonksiyonuna bağlı olarak damarlarda relaksasyon kaybı gelişeceği, tüm bu olumsuz etkilerin hipertansiyon gelişimine katkıda bulunabileceği veya mevcut nokturnal hipertansiyonun (HT) ağırlaşabileceği ve nokturnal kan basıncı değişikliklerine neden olabileceği düşünülmektedir (11).

DM yeterli biçimde kontrol edilemediği takdirde artmış yağ asidi oksidasyonuna ve protein yıkımına bağlı olarak asetil, propiyonil gibi açil koenzim A (KoA) bileşiklerinin üretimi artar. Bunların ortamdan uzaklaştırılması icin L-karnitine gereksinim vardır. Bu bileşiklerin hücrelerde birikmesi deterjan benzeri etkiyle sitotoksik hasar yapabilmekte ve solunum zinciri fonksiyonlarını inhibe etmektedir. Bu bileşiklerin klirensi için L-karnitine gereksinim duyulması nedeniyle L-karnitin depoları tüketilir ve sonuçta düzeyi azalır. L-karnitin eksikliğinde glikoz kullanımı iyice bozulmakta ve diyabetin kontrolü de zorlaşmaktadır. Bu durum diyabetik komplikasyonların gelişmesini kolaylaştırmaktadır (11). Asetil-karnitin artışı ile beraber pirüvat seviyesinin azaldığını ve glikozun nonoksidatif kullanımının % 50 oranında arttığını bildirmişlerdir (72).

Tip 2 diyabetli hastalarda karnitin uygulamasının glikoz kullanımında artışa yol açtığı saptanmıştır (73). Diyabetik hastalarda saptanan L-karnitin eksikliğinin yerine konması ile insülin duyarlılığının ve glikozun periferik dokular tarafından kullanımının arttığı, endotel bağımlı relaksasyon kaybının düzeldiği ve insülin direncinin azaldığı klinik çalışmalarda gösterilmiştir (11).

2.10. Sitokinler

2.10.1. Genel Özellikleri

Sitokinler, immün ve enflamatuvar reaksiyonların mediatörleri olarak fonksiyon gösteren salgısal sinyal proteinlerdir. İmmün sistem hücreleri arasında etkileşimi sağlayan ve bu hücreler tarafından salgılanan, düşük molekül ağırlıklı, protein ya da glikoprotein yapısındaki maddelerdir. Hedef hücrelerin yüzeyindeki, ya da çözünmüş haldeki kendilerine özgü reseptörlere bağlanır, ileti aktarımı yollarını harekete geçirir ve hedef hücredeki gen ekspresyonunda değişikliklere yol açarak etkinlik gösterirler. Birçok sitokin, sentezlendikleri hücre üzerine etki yaparken (otokrin), bazıları yakın hücrelere etki ederler (parakrin). Endokrin etki göstererek uzaktaki hücrelere etki eden sitokinler de mevcuttur. Sitokinler ayrıca yara iyileşmesi, hematopoezis ve çeşitli diğer biyolojik işlevleri de düzenlerler. Doğal immün yanıtlarda makrofaj ve NK hücreleri tarafından salınırken, edinsel immün yanıtlarda genellikle T lenfositleri tarafından salgılanmaktadırlar.Vücuda dışarıdan girerek enfeksiyona sebep olabilecek patojenlere karşı etkin ve kuvvetli bir yanıt oluşmasında sitokinlerin rolü büyüktür. Diğer taraftan sitokinlerin aşırı miktarda salgılanması da vücutta pek çok otoimmün bozukluğa neden olabilmektedir. Bu nedenle, sitokin üretim ve salgılanmasında denge sağlamak amacıyla, dışarıdan yapılan sitokin desteği veya inhibisyonu ile farklı tedavi stratejileri geliştirmeye yönelik çalışmalar yapılmaktadır (74).

Doğal immünitenin aracıları ve düzenleyicileri olan sitokinler, dendritik hücreler, makrofajlar ve mast hücreleri gibi doğal immün hücreler tarafından üretilirler ve enflamasyon sürecini başlatırlar veya viral enfeksiyonlara karşı savunmaya katkıda bulunurlar. Diğer sitokinler, özellikle yardımcı T hücre alt grupları tarafından üretilenler, edinsel immün sistemin aracılık ettiği konak savunmasına katkı sağlarlar ve immün yanıtları düzenlerler. Ayrıca T ve B hücrelerinin aktivasyon ve farklılaşmasından da sorumludurlar. Bazı sitokinler hematopoez için büyüme faktörü olup, kemik iliğindeki öncüllerden farklı tip immün hücrelerin oluşumunu düzenlemektedirler (75).

Sitokinlerin genel fonksiyonları:

1. Lenfoid hücrelerin çoğalma ve farklılaşmasını sağlamak,

2. İmmün cevabı arttırmak veya baskılamak suretiyle regüle etmek,

3. Enflamatuvar olaylara katılan hücreleri aktive etmek, reaksiyon bölgesine toplamak ve çeşitli biyolojik etkiler göstermek,

4. Kemik iliğine etki ederek hematopoietik regülasyona katılmak,

5. Bazı hipofiz hormonlarının ve diğer biyolojik maddelerin, sentez ve salınımını sağlamak (76).

2.10.1.1. İnterferon-gamma (IFN-γ)

IFN-γ (tip-2 interferon), tümör kontrolünde ve hücre içi bakteriyel ve viral enfeksiyonlara karşı doğal ve edinsel immünitede kritik rol oynar. IFN-γ, makrofajlar için önemli bir aktivatördür. IFN-γ ekspresyonundaki aşırı yükselme, otoimmün ve oto-enflamatuvar hastalıklarla ilişkilidir. İmmün sistemde IFN-γ'nın önemi, viral replikasyonu doğrudan inhibe etmesi ve en önemlisi immün-uyarıcı ve immün-düzenleyici etkilerinin olmasıdır.

Anti-viral, immünregülatör ve anti-tümör özelliklere sahip olan IFN-γ baskın olarak NK ve NKT hücreleri ve antijen-spesifik immün yanıtın parçası olan $CD4^+$ Th1 ve $CD8^+$ sitotoksik T lenfositleri (STL) tarafından üretilmektedir (77, 78).

IFN-γ'nın önmeli etkileri;

1. NK hücre aktivitesini uyarmak,

2. Aktive plazma B hücrelerinden IgG2a ve IgG3 üretimini indüklemek,

3. Lökosit göçü için gerekli adezyonu ve bağlanmayı uyarmak.

2.10.1.2. Interlökin 10 (IL-10)

IL-10, insan sitokin sentez inhibitör faktörü (CSIF) olarak da bilinen bir anti-enflamatuvar sitokin olup, primer olarak monositler tarafından üretilmekte ve daha az olarak Th2, mastositler, $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ düzenleyici (regülatör) T hücreleri ve aktive T ve B hücrelerinin belirli bir alt grubunda üretilmektedir (79). Ayrıca aktif makrofajlardan salınmakta olup aynı zamanda aktif makrofajların ve dendritik hücrelerin inhibitörüdür (negatif feed-back mekanizması). Doğuştan edinilmiş bağışıklık reaksiyonlarını ve hücre aracılığı ile olan bağışıklığı kontrol eder (80).

Viral enfeksiyona karşı immün yanıt süresince NK hücre aktivitesini inhibe etmek için sitotoksik T hücreleri tarafından salınan IL-10, immünregülasyon ve enflamasyonda görev almaktadır. Th1 sitokinlerinin, MHC sınıf-2 antijenlerinin ve

makrofajlar üzerindeki ko-stimülatör moleküllerin ekspresyonunu azaltmakta ve aynı zamanda B hücre sağkalımını, çoğalmasını ve antikor üretimini arttırmaktadır. IL-10 NF-κB aktivitesini bloke edebilir.IL-10, makrofajlar ve regülatör T hücreleri gibi hücreler tarafından üretilen IFN-γ, IL-2, IL-3, TNF-α ve GM-CSF gibi pro-enflamatuvar sitokinlerin sentezini inhibe etme kapasitesine sahiptir. Aynı zamanda antijen sunucu hücrelerin (ASH) antijen sunma kapasitelerini baskılayabilmektedir. Ayrıca IL-10, Th2 hücreleri ve mast hücrelerine karşı uyarıcı etkiye sahiptir (81).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araç ve Gereçler

3.1.1. Kimyasal Maddeler

APC - Mouse- anti rat CD3 Antikoru (BD Pharmingen, San Jose, CA)

FITC - Mouse-anti Rat-CD161a Antikoru (BD Pharmingen, San Jose, CA)

PE - Mouse-anti Rat-IL-10 antikoru (BD Pharmingen, San Jose, CA)

PE Mouse-anti Rat-IFN-γ antikoru (BD Pharmingen, San Jose, CA)

Phorbol 12 Myristate 13 Acetate - PMA (Santa Cruz, Bolivia)

Ionomycin (Santa Cruz, Bolivia)

RPMI-1640 kültür medyumu (Gibco, UK)

Biocoll (Biochrom AG, Berlin, Germany)

L-glutamin (Gibco, UK)

Penisilin & streptomisin (Gibco, UK)

Isıyla inaktive fetal sığır serumu (FBS) (Gibco, UK)

Fiksasyon & Permeabilizasyon Solusyonu (BD Cytofix/cytoperm, San Jose, CA)

Perm/wash buffer (BD Perm/wash, San Jose, CA)

Brefeldin A (eBioscience Inc., San Diego)

Steril PBS

Steril distile su

Etil alkol (% 70)

Streptozotosin (STZ) (Santa Cruz, Bolivia)

Kloral Hidrat (Merck, Gemany)

Yem (Standart pellet yemi)

Musluk suyu

Serum fizyolojik

3.1.2. Aletler

Cerrahi penset-makas, portekü vb.

Hassas terazi (Radwag, Poland)

Petri kutuları

Glukometre - ölçüm çubuğu

Akan hücre ölçer (FACSAria II, Becton Dickinson, USA)

Laminar akım kabini (Nüve, TR)

% 5 CO_2'li Etüv (Thermo Scientific, US)

Soğutmalı santrifüj (Nüve,TR)

Kan sayım cihazı (Rayto, China)

+4ºC ve -20ºC derin dondurucu (Arçelik, TR)

24 kuyucuklu kültür plakları

Mikropipetler

Steril pipet uçları

Enjektörler

50 ml ve 15 ml'lik Falcon tüpleri

5 ml'lik Flow tüpleri

Heparinize 10 ml'lik kan tüpleri

3.2. Araştırmada Kulanılan Deney Hayvanları

3.2.1. Kullanılan hayvanlar

İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan alınan onay sonrası hayvanlar, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Deney Hayvanları Biyolojisi ve Biyomedikal Uygulama Teknikleri Anabilim Dalı'ndan tedarik edilip deney süresince post-op odasında gerekli ortam koşulları altında muhafaza edilmiştir.

Çalışmanın deneysel kısımları İstanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE), İmmünoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Kalpten alınan kandan periferik kan mononükleer hücre (PKMH) izolasyonunu takiben hücre yüzey molekül ekspresyonu ve hücre içi sitokin içeriği akan hücre ölçer ile tayin edilmiştir.

Çalışmamızda 3-4 aylık 200-300 gram ağırlığında 36 erkek Wistar albino sıçanlar kullanılmıştır (Şekil 3-1).



Şekil 3-1: Deneylerde kullanılan Wistar albino sıçanlar

3.2.1.1. Sağlıklı Hayvanlar

Deneyde 200-300 gram 6 tane sağlıklı Wistar albino erkek sıçan kullanıldı. Sağlıklı sıçanların herbiri hasta sıçan grupları ile birlikte deneye alındı. Sağlıklılara 5 gün boyunca serum fizyolojik verildi. Beşinci günde takipleri yapıldıktan sonra kalplerinden kan alınarak sakrifiye edildi.

3.2.1.2. STZ ile diyabetik yapılan hayvanlar

Deneyde 6 tane erkek Wistar albino sıçan kullanıldı. Diyabet oluşturmak için hayvanlara intraperitonal (i.p) 55 U/ kg STZ yapıldı. 48 saat sonra kuyruklarından kan alınıp glukometre ile şeker seviyelerine bakıldı. Şeker düzeyleri >250 mg/dl olan sıçanlar diyabetik kabul edildi. 10 gün süre ile takibi yapıldıkan sonra kalplerinden kan alındı. Her bir denekten ortalama 6 ml kan elde edildi.

3.2.1.3. STZ ve L-Karnitin birlikte verilen hayvanlar

Bu grup için de 6 adet sıçan kulanıldı. Sıçanlara aynı anda STZ yapılıp, L-karnitin verildi. Her bir hayvana 5 gün süre ile 150 mg/ kg L-karnitin verildikten sonra 5 gün takip edildi ve 11. günde kalpten kan alındı.

3.2.1.4. L-Karnitin verildikten sonra STZ yapılan hayvanlar

Altı adet sıçana 5 gün boyunca L-karnitin verildikten sonra 6. gün STZ yapıldı. Onuncu güne kadar takipleri yapılan sıçanların 11. gün kalplerinden kan alındı.

3.2.1.5. STZ yapıldıktan sonra L-Karnitin verilen hayvanlar

Hayvanlara (n=6) i.p STZ yapıldıktan 48 saat sonra şeker ölçümleri yapıldı. STZ uygulamasından 72 saat sonra (1. gün) L-karnitin verildi. Beş gün süre ile L-karnitin verilmeye devam edildi ve 11. gün deney için hayvanların kalplerinden kan alınarak sakrifiye edildi.

3.2.1.6. Sadece L-Karnitin verilen hayvanlar

Grup için 6 tane Wistar albino erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlara 5 gün boyunca L-karnitin verildikten sonra deney için apeksten girilerek kalplerinden kanlar alındı.

Deney hayvanları, her grupta 6 sıçan olacak şekilde 6 grup halinde oluşturulmuştur (Tablo 3-1).

Tablo 3-1: Deney Hayvan Grupları

Deney Hayvan Grupları	**Hayvan Adedi**
Sağlıklı	(n=6)
STZ diyabetik	(n=6)
STZ + L-karnitin verilenler	(n=6)
L-karnitin verildikten sonra STZ uygulanan	(n=6)
STZ uygulandıktan sonra L-karnitin verilenler	(n=6)
Sadece L-karnitin verilenler	(n=6)

3.3. Yöntem

3.3.1. Kan Glikozu Ölçümü

Kan glikoz düzeyleri glukometrenin stripine kuyruk ven kanı damlatılarak ölçüldü. Her test stribinin üzerinde hassas kimyasallar içeren bir ölçüm alanı bulunmaktadır. Ölçüm alanı üzerine kan uygulandığında kimyasal bir reaksiyon oluşur [glikoz renklendirici oksidoredüktaz mediatör reaksiyonu (PQQ-bağımlı glikoz dehidrogenaz mediatör reaksiyonu)]. Böylelikle ölçüm alanının rengi değişmekte ve ölçüm cihazı bu renk değişikliğini kaydederek elde edilen sinyal bir kan şekeri değerine dönüştürülmektedir. Veriler mg/dl üzerinden değerlendirildi. Glikoz düzeyleri 250 mg/dl üzerinde olan sıçanlar diyabetik olarak kabul edildi.

3.3.2. Kloral Hidrat Anestezisi

360 mg/kg kloral hidrat 0.8 ml serum fizyolojikte hazırlanarak operasyon öncesi sıçanlara intraperitonal uygulanmıştır. Anestezi derinliği takip edilmiş ve gerek duyulduğunda ek uygulamalar yapılmıştır.

3.3.3. PBS (Fosfat Tampon Tuz Çözeltisi)

PBS (Sigma-Aldrich, USA), kan ile izotonik bir çözelti (pH=7,4) olma özelliğinden dolayı, hücre süspansiyonu hazırlama ve santrifüj ile hücre yıkama gibi işlemlerde kullanılmaktadır.

3.3.4. RPMI-1640

Kültür için besi yeri malzemesi olarak kullanılan RPMI-1640 (Gibco, Life Technologies, UK) antibiyotik, antimikotik ve zenginleştirme maddelerinin eklenmesiyle *in vitro* deneyler için hazır hale getirilmektedir. Zenginleştirmede kullanılan malzemeler:

- % 10 FBS (Fetal sığır serumu - Gibco, UK)
- % 1 L-glutamin (Gibco, UK)
- % 1 Streptomisin ve penisilin (Gibco, UK)

3.3.5. Fiksasyon ve Permeabilizasyon Solüsyonu

Fiksasyon ve permeabilizasyon solüsyonu (BD Cytofix/cytoperm, San Jose, CA) ve Perm/Wash Buffer (BD Perm/Wash, San Jose, CA) hücreleri flow sitometrik analizden önce hücre içi boyama işlemine hazırlamada kullanılmaktadır. Fiksasyon

çözeltisi ise % 4 formaldehit içermekte olup, hücre yüzeyini sabitlemek amacıyla kullanılmaktadır. Dilüe edilmeden $+4^0$C'de saklanır.

3.3.6. Perm/ Wash Buffer Yıkama Solüsyonu

Yıkama solüsyonu 10X konsantrasyonda olup, kullanılmadan önce 1:10 oranında distile suyla dilüe edilmesi gerekmektedir. 1X perm wash % 0.1 oranında saponin ve fetal sığır serumu içermektedir. Hücre memebran yüzeyini delerek boyamada kullanılacak monoklonal antikorun hücre içine girmesini sağlamaktadır.

3.3.7. Periferik Kan Mononükleer Hücre (PKMH) İzolasyonu

Sıçan kalplerinden alınan 5-10 ml heparinize kan örnekleri, 1:1 oranında PBS ile sulandırıldıktan sonra, 50 ml'lik konik tabanlı falcon tüpü içerisinde, oda sıcaklığındaki steril Biocoll (Biochrom AG, Berlin, Germany - yoğunluk:1,077 gr/ml) üzerine 1:1 oranında pastör pipeti ile eklenmiş, bu işlem sırasında ficoll ve sulandırılmış kan örneğinin birbirine karışmamasına ve ficoll ile kan örneğinin ayrı katmanlar halinde kalmasına dikkat edilmiştir.

Falcon tüpleri içindeki örneklerin 2000 devirde, 20 dakika ve $+20^0$C'de santrifüj edilmesini takiben, ayrı katmanlara ayrılmış olan kan-PBS karışımının en üstte kalan plazma kısmı pastör pipeti ile uzaklaştırıldıktan sonra PKMH'lerin bulunduğu, ficoll ile plazma arasında ince bir tabaka halinde gözlenen beyaz bulutsu katman pastör pipeti ile toplanarak 15 ml'lik konik tabanlı steril falcon tüpüne alınmıştır. Üzerine 15 ml'ye tamamlanacak şekilde steril PBS çözeltisi eklendikten sonra tüpler, 2000 devirde 10 dakika ve $+8^0$C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst sıvının uzaklaştırılması ile elde edilen PKMH'lerin üzerine tekrar 15 ml steril PBS eklenerek 5 dakika 1250 devirde ve $+4^0$C'de ikinci kez yıkama işlemi yapılmıştır.

Yıkama sonrası üst sıvıları uzaklaştırılan PKMH'lerin üzerine $+4^0$C'deki 1 ml zenginleştirilmiş RPMI-1640 medyumu eklenerek hücre sayımı aşamasına geçilmiştir. Bu amaçla 0.5 ml'lik tüplere 50 µl PKMH hücre süspansiyonundan eklenerek hücreler kan sayım cihazında okutulurak 1 ml'de bulunan canlı PKMH sayısı hesaplanmıştır.

3.3.8. Hücre Kültürü

PKMH ler $1x10^6$ hücre/ içeren miktarda, 24 kuyucuklu kültür plaklarına ekilmiş ve üzerine 1 ml'ye tamamlanacak miktarda hazırlanmış RPMI-1640 medyum eklenmiştir. PMA (5ng/ml) uyarılı ve uyarısız olmak üzere farklı şartlarda kültüre

alınan PKMH'ler 37^0C'de % 5 CO_2'li etüvde 4 saat kültüre edilmiştir. Kültürün 2. saatinin sonunda kuyucuklara bir transport inhibitör proteini olan Brefeldin A (eBioscience, San Diego, CA) eklenerek salgılanan sitokinin hücre içersinde kalması sağlanmıştır. Pipetaj yapılarak karışması sağlandıktan sonra kültür plakları tekrar etüve kaldırılmış ve 4 saatlik kültür sonunda hücre yüzey molekül ekspresyonu ve hücre içi sitokin tayini yapılmıştır.

Hücre kültüründe kullanılan uyaran ve kimyasalların kullanım dozları tabloda gösterilmektedir (Tablo 3-2).

Tablo 3-2: Hücre kültüründe kullanılan uyaranlar ve kimyasallar

Uyaran	Kullanım Dozu	Marka
PMA	5 ng/ml	Santa Cruz
Brefeldin A	3 ng/ml	eBioscience

3.3.9. Hücre Yüzey Boyaması

1. Kültürden toplanan PKMH'ler 5 dakika 1800 rpm'de ve 20^oC'de santrifüj edildikten sonra üst sıvılar uzaklaştırılmış ve üzerine 300 µl PBS eklenerek PKMH süspansiyonu elde edilmiştir.

2. PMA uyarımı yapılan ve uyarım yapılmayan her iki koşul için ayrı ayrı olmak üzere tüplere 1,5 µl anti-rat CD3-APC, 2 µl anti-rat CD161a-FITC monoklonal antikorları eklenmiş (Tablo 3-3) ve $5x10^5$ hücre içeren PKMH süspansiyonu eklenerek 20 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edilmiştir.

3. İnkübasyon sonrası tüplere 2 ml PBS eklenerek 1800 rpm'de 5 dakika 20^oC'de santrifüj edilip üst sıvılar uzaklaştırılmıştır.

Tablo 3-3: Hücre yüzey boyamada kullanılan monoklonal antikorlar

Monoklonal Antikor	Florokrom	Miktar	Firma
CD3	APC	1,5µl	BD/Simultest, San Jose, CA
CD161	FITC	2 µl	BD/Simultest, San Jose, CA

3.3.10. Hücre İçi Boyama

1. Hücre yüzey boyamasından sonra üst sıvıları uzaklaştırılan tüplere 100 µl 1X fiksasyon sıvısı eklenip vorteks ile karıştırıldıktan sonra 20 dakika karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

2. Fiksasyon işlemini takiben tüplere 1 ml wash buffer eklenerek 5 dakika 1500 rpm'de 20^{o}C'de santrifüj edilip üst sıvılar uzaklaştırılmıştır.

3. Hücrelerin üzerine 50 µl perm wash solüsyonu eklenip ardından 2,5 µl PE mouse anti-rat-IL-10 ve 7 µl PE mouse anti-rat IFN-γ monoklonal antikorları eklenerek 30 dakika karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

4. İnkübasyonu takiben tüplere 1 ml 1X permeabilizasyon sıvısı eklenerek 1500 devirde 5 dk santrifüj edilmiştir.

5. Üst sıvılar uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin üzerine 300 µl FACS Flow Sheat sıvısı eklenerek akan hücre ölçerde değerlendirilmek üzere +4^{o}C'de muhafaza edilmiştir.

3.3.11. Kültür Medyumunun Zenginleştirilmesi

500 ml'lik medyum, steril şartlarda % 1 oranında penisilin-streptomisin (5 ml), % 1 oranında L-glutamin (5 ml) ve % 10 oranında fetal sığır serumu (50 ml) ile zenginleştirilmiştir.

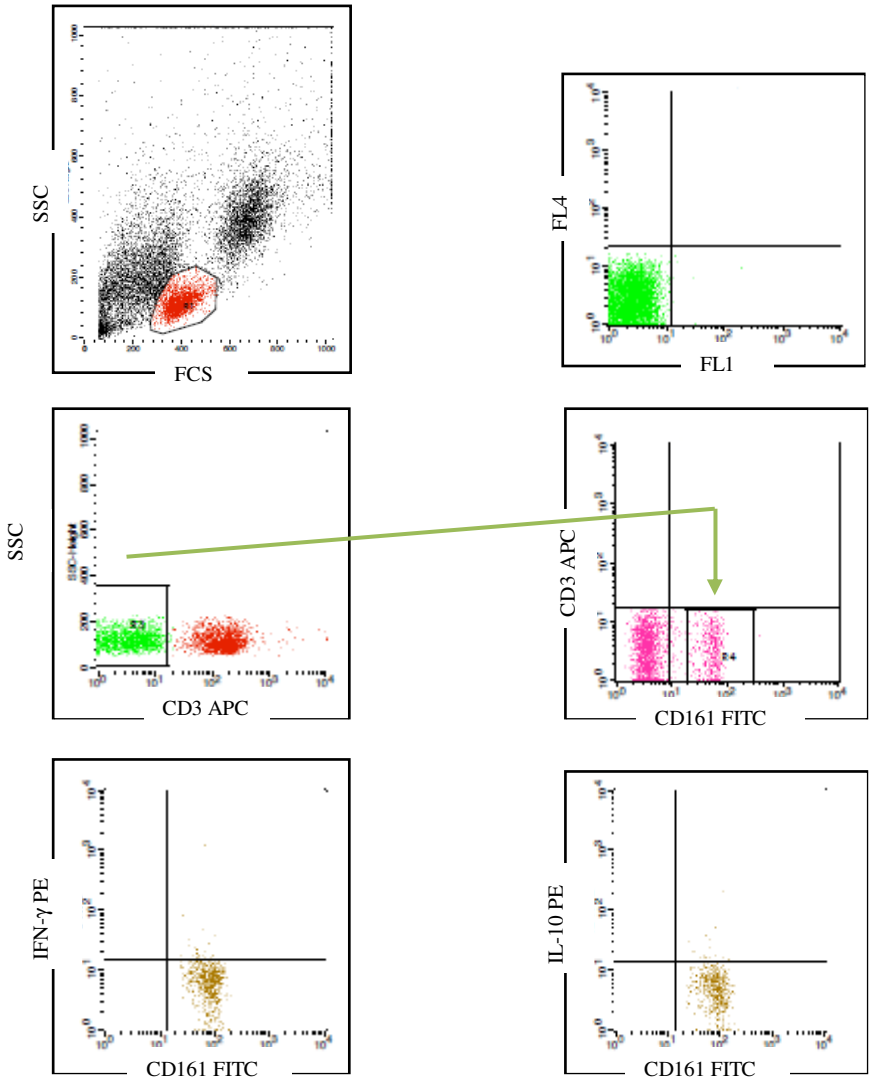
3.3.12. İstatistiksel Analiz

Çalışmada gerçekleştirilen tüm deneylerin sayım ve analizleri BD CellQuest yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Verilerin istatistiksel analizleri SPSS 21 programı ile yapılmış ve gruplar arası farkların değerlendirilmesinde non-parametrik Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. $p \leq 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. NK Hücreleri

Kalpten alınan kan örneklerinde NK hücreleri $CD3^{-}CD161^{+}$ populasyon işaretlenerek saptandı. Bu amaçla, FSC/SSC grafiğinde lenfosit populasyonu kapılandı, lenfosit kapısından CD3/SSC histogramı çizilerek $CD3^{-}$ NK hücreleri belirlendi. $CD3^{-}$ NK hücre populasyonunda $CD161^{+}$ hücreler işaretlendi ve bu populasyondaki IFN-γ ve IL-10 içeriği saptandı (Şekil 4-1).



Şekil 4-1: $CD3^{-}$ hücre grubunda NK hücre kapılama stratejisi ve sitokin profili

4.1.1. $CD3^-$ Hücre Populasyon Oranları

$CD3^-$ hücre ekspresyonu, hasta grupları arasında ve sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında belli gruplarda anlamlı farklılıklar saptanmıştır.

Uyarım yapılmayan koşullarda STZ uygulanan diyabetik sıçanlar;

L-karnitin verilen, STZ + L-karnitin verilen, L-karnitin verildikten sonra STZ uygulanan gruplar ve sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında $CD3^-$ hücre ekspresyonunun anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır (p=0.002, p=0.038, p=0.002, p=0.001, sırasıyla) (Şekil 4-2), (Tablo 4-1).

Sadece L-karnitin verilen sıçanlar, sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında $CD3^-$ hücre oranlarının anlamlı derecede arttığı gözlenmiştir (p=0.029).

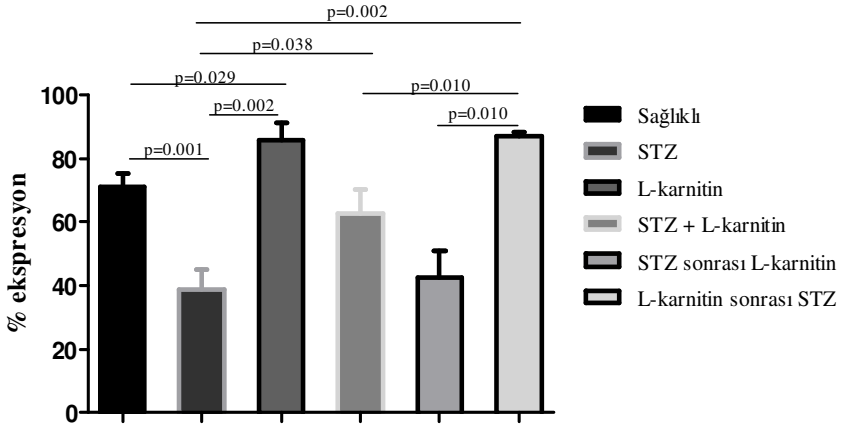
L-karnitin verildikten sonra STZ uygulanan gruptaki $CD3^-$ hücre oranları, STZ + L-karnitin verilen ve STZ uygulandıktan sonra L-karnitin verilen diyabetik sıçanlarla karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0.010, p=0.010, sırasıyla).

PMA uyarımlı koşullarda STZ diyabetik hayvanlar;

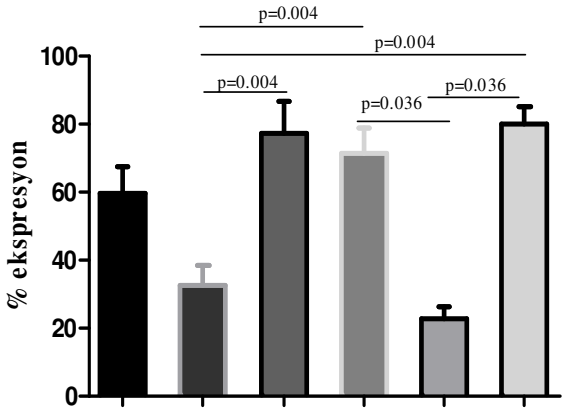
L-karnitin verilen, STZ + L-karnitin verilen ve L-karnitin verildikten sonra STZ uygulanan gruplarla karşılaştırıldığında $CD3^-$ hücre oranı anlamlı derecede düşük saptanmıştır (p=0.004, p=0.004, p=0.004, sırasıyla). STZ sonrası L-karnitin verilen grupta ise STZ + L-karnitin ve L-karnitin sonrası STZ uygulanan gruba göre anlamlı derecede azalma olduğu görülmüştür (p=0.036, p=0.036, sırasıyla) (Şekil 4-2), (Tablo 4-1).

CD3⁻

Uyarımsız



PMA Uyarımlı



Şekil 4-2: Uyarım yapılmayan ve PMA uyarımlı koşullarda CD3⁻ hücre oranları

Tablo 4-1: Uyarım yapılmayan ve PMA uyarımlı koşullarda $CD3^-$ hücre oranları

UYARIM YAPILMAYAN KOŞULLARDA $CD3^-$ HÜCRE ORANI

	Sağlıklı	STZ	L-karnitin	STZ + L-karnitin	STZ sonrası L- karnitin	L- karnitin sonrası STZ
Sağlıklı						
STZ	↓		↓	↓		↓
L-karnitin	↑					
STZ + L-karnitin						
STZ sonrası L- karnitin						
L- karnitin sonrası STZ				↑	↑	

PMA UYARIMLI KOŞULLARDA $CD3^-$ HÜCRE ORANI

	Sağlıklı	STZ	L-karnitin	STZ + L-karnitin	STZ sonrası L-karnitin	L- karnitin sonrası STZ
Sağlıklı						
STZ			↓	↓		↓
L-karnitin						
STZ + L-karnitin						
STZ sonrası L-karnitin				↓		↓
L- karnitin sonrası STZ						

4.1.2. $CD3^+$ T Hücre Populasyon Oranları

Uyarım yapılmayan koşullarda STZ uygulanan gruptaki $CD3^+$ hücre oranı;

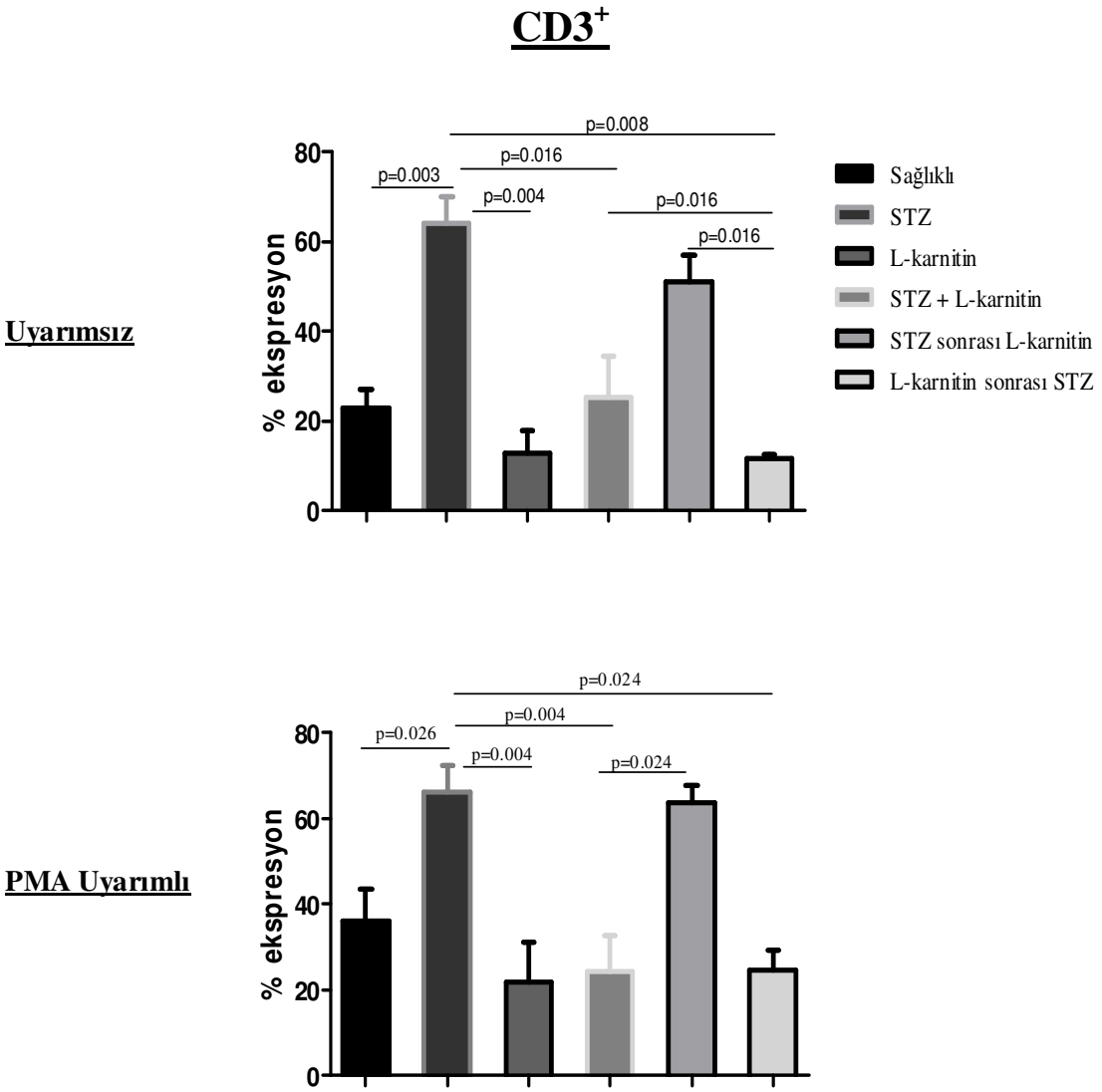
L-karnitin verilen, STZ + L-karnitin verilen, L-karnitin sonrası STZ uygulanan gruplara ve sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede yüksek saptanmıştır (p=0.004, p=0.016, p=0.008, p=0.003; sırasıyla).

L-karnitin sonrası STZ uygulanan sıçanlarda ise STZ + L-karnitin verilen ve STZ sonrası L-karnitin verilen gruplara oranla anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p=0.016, p=0.016, sırasıyla) (Şekil 4-3), (Tablo 4-2).

PMA uyarımına yanıt olarak, STZ diyabetik grupta;

L-karnitin, STZ + L-karnitin verilen, L-karnitin sonrası STZ uygulanan gruplara ve sağlıklı kontrollere göre anlamlı bir artış saptanmıştır (p=0.004, p=0.004, p=0.024,

p=0.026, sırasıyla). STZ + L-karnitin verilen hasta grubunda, STZ sonrası L-karnitin verilen gruba göre anlamlı bir düşüş saptanmıştır (p=0.024) (Şekil 4-3), (Tablo 4-2).



Şekil 4-3: Uyarım yapılmayan ve PMA uyarımlı koşullarda $CD3^+$ T hücre oranları

Tablo 4-2: Uyarım yapılmayan ve PMA uyarımlı koşullarda $CD3^+$ hücre oranları

UYARIM YAPILMAYAN KOŞULLARDA $CD3^+$ HÜCRE ORANI

	Sağlıklı	STZ	L-karnitin	STZ + L-karnitin	STZ sonrası L- karnitin	L- karnitin sonrası STZ
Sağlıklı						
STZ	↑		↑	↑		↑
L-karnitin						
STZ + L-karnitin						
STZ sonrası L- karnitin						
L- karnitin sonrası STZ				↓	↓	

PMA UYARIMLI KOŞULLARDA $CD3^+$ HÜCRE ORANI

	Sağlıklı	STZ	L-karnitin	STZ + L-karnitin	STZ sonrası L-karnitin	L- karnitin sonrası STZ
Sağlıklı						
STZ	↑		↑	↑		↑
L - karnitin						
STZ + L-karnitin					↓	
STZ sonrası L- karnitin						
L- karnitin sonrası STZ						

4.1.3. $CD3^-$ $CD161^+$ Hücre Populasyon Oranları

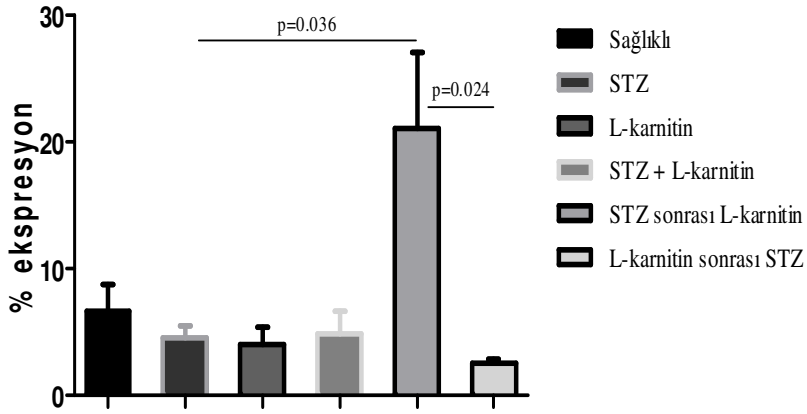
Uyarım olmayan durumda gruplar birbirleri ile kıyaslandığında;

STZ sonrası L-karnitin verilen hayvanlarda, sadece STZ ve L-karnitin sonrası STZ uygulananlara göre anlamlı derecede artış saptanmıştır ($p=0.024$) (Şekil 4-4), (Tablo 4-3).

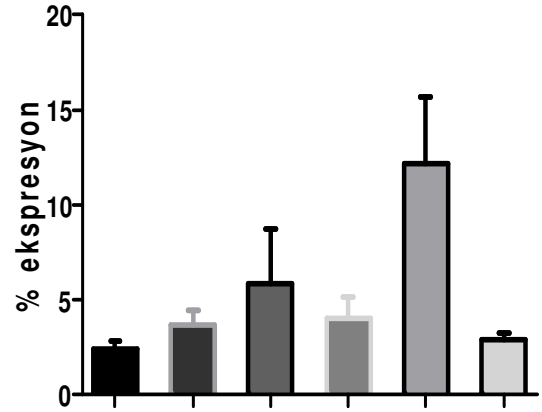
PMA uyarımı yapılan koşullarda $CD3^-$ $CD161^+$ hücre oranlarında herhangi bir anlamlılık saptanmamıştır (Şekil 4-4).

CD3^{-}CD161^{+}

Uyarımsız



PMA Uyarımlı



Şekil 4-4: Uyarım yapılmayan ve PMA uyarımlı koşullarda CD161^{+} hücre oranları

Tablo 4-3: Uyarım yapılmayan ve PMA uyarımlı koşullarda $CD3^-$ $CD161^+$ hücre oranları

UYARIM YAPILMAYAN KOŞULLARDA $CD3^-$ $CD161^+$ HÜCRE ORANI

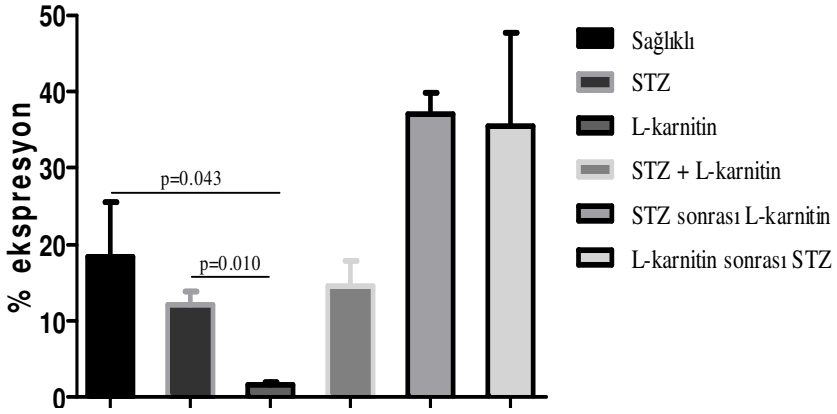
	Sağlıklı	STZ	L-karnitin	STZ + L-karnitin	STZ sonrası L-karnitin	L-karnitin sonrası STZ
Sağlıklı						
STZ						
L-karnitin						
STZ + L-karnitin						
STZ sonrası L-karnitin		↑				↑
L- karnitin sonrası STZ						

4.1.4. Doğal Öldürücü T Hücre ($CD3^+$ $CD161^+$) Oranları

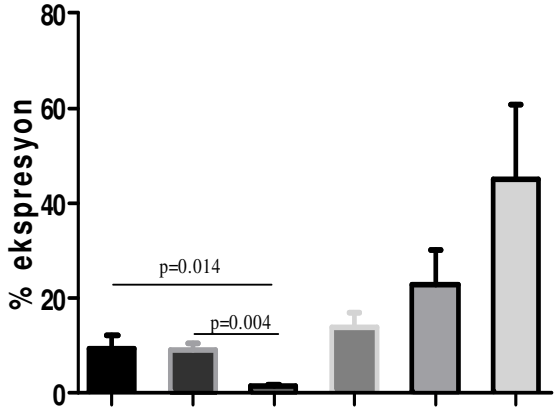
Hem PMA uyarımlı hem de uyarım yapılmayan koşullarda L-karnitin verilen grupta STZ uygulanan gruba ve sağlıklı kontrollere göre anlamlı bir azalma gözlenmiştir (Uyarımsız koşulda; p=0.010, p=0.043, sırasıyla) (PMA uyarımlı koşulda; p=0.004, p=0.014, sırasıyla) (Şekil 4-5), (Tablo 4-4).

CD3$^+$ CD161$^+$

Uyarımsız



PMA Uyarımlı



Şekil 4-5: Uyarım yapılmayan ve PMA uyarımlı koşullarda doğal öldürücü T hücre (CD3$^+$ CD161$^+$) oranları

Tablo 4-4: Uyarım yapılmayan ve PMA uyarımlı koşullarda doğal öldürücü T hücre ($CD3^+$ $CD161^+$) oranları

UYARIM YAPILMAYAN KOŞULLARDA $CD3^+$ $CD161^+$ HÜCRE ORANI

	Sağlıklı	STZ	L-karnitin	STZ + L-karnitin	STZ sonrası L- karnitin	L- karnitin sonrası STZ
Sağlıklı						
STZ						
L-karnitin	↓	↓				
STZ + L-karnitin						
STZ sonrası L- karnitin						
L- karnitin sonrası STZ						

PMA UYARIMLI KOŞULLARDA $CD3^+$ $CD161^+$ HÜCRE ORANI

	Sağlıklı	STZ	L-karnitin	STZ + L-karnitin	STZ sonrası L-karnitin	L- karnitin sonrası STZ
Sağlıklı						
STZ						
L-karnitin	↓	↓				
STZ + L-karnitin						
STZ sonrası L-karnitin						
L- karnitin sonrası STZ						

4.1.5. NK Hücrelerinde Hücre İçi Sitokin Profili

4.1.5.1. $CD3^-$ $CD161^+$ NK hücre içi IFN-γ seviyeleri

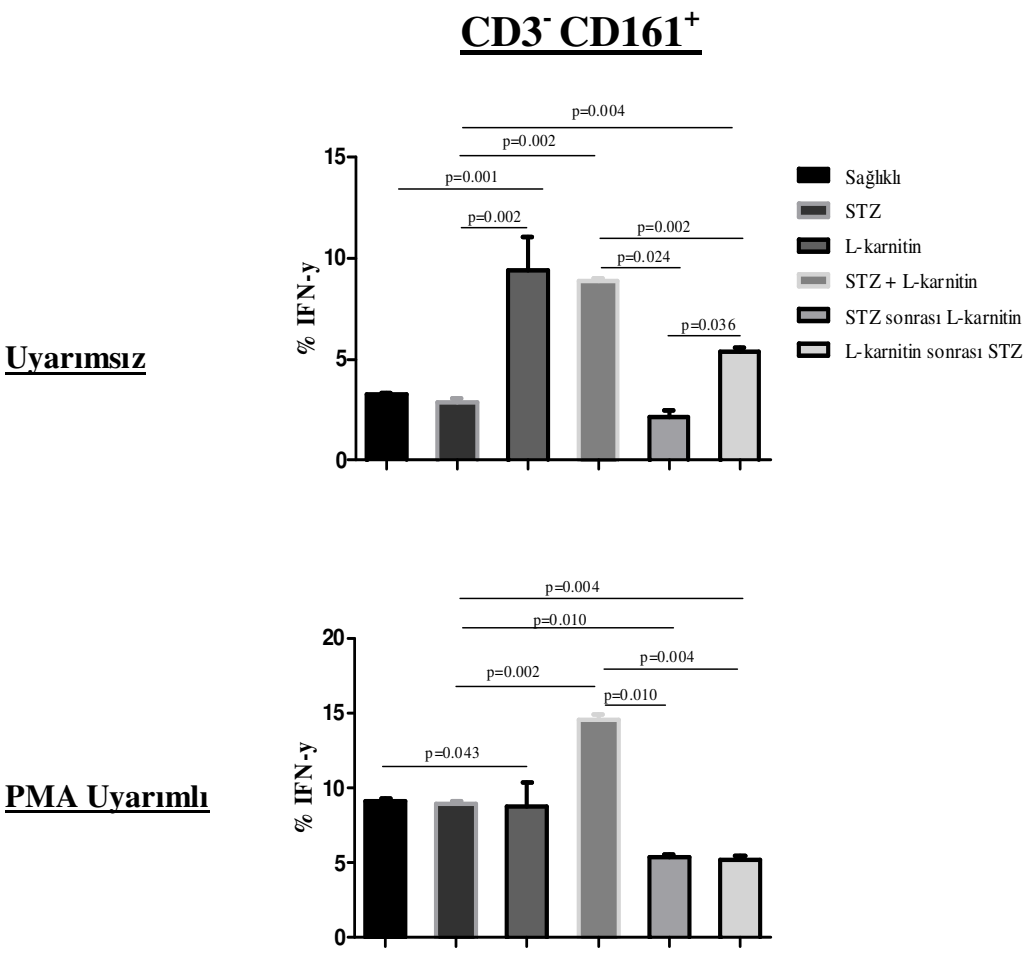
DM patogenezinde NK hücrelerinin immünoregülatör rolünü saptamak amacıyla, PKMH'ler uyarımsız ve PMA uyarımlı koşullarda 4 saat süreyle *in vitro* şartlarda kültüre alınmıştır. Kültür sonrası $CD3^-$ $CD161^+$ NK hücre grubunda IFN-γ ve IL-10 seviyeleri saptanmıştır.

Uyarım olmayan koşullarda L-karnitin verilen grupta IFN-γ seviyesi, STZ uygulanan gruba ve sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede yüksek saptanmıştır ($p=0.002$, $p=0.001$, sırasıyla).

STZ + L-karnitin verilen hayvanlarda IFN-γ içeriği, sadece STZ uygulanan, STZ öncesi ve STZ sonrası L-karnitin verilen gruplara göre anlamlı derecede yüksek

saptanmıştır (p=0.002, p=0.002, p=0.024, sırasıyla). L-karnitin sonrası STZ uygulanan diyabetik hayvanlarda ise sadece STZ ve STZ sonrası L-karnitin verilen gruba kıyasla IFN-γ seviyesinin anlamlı derecede artmış olduğu görülmüştür (p=0.004, p=0.036, sırasıyla) (Şekil 4-6), (Tablo 4-5).

PMA uyarımı yapılan koşulda ise, L-karnitin verilen grupta sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında IFN-γ içeriğinin anlamlı derecede azaldığı gözlenmiştir (p=0.043). STZ + L-karnitin verilen hayvanlardaki IFN-γ seviyesinin sadece STZ uygulanan, STZ öncesi ve STZ sonrası L-karnitin verilen gruplara göre anlamlı derecede arttığı saptanmıştır (p=0.002, p=0.004, p=0.010, sırasıyla). Sadece STZ uygulanan grupta ise, STZ öncesi ve STZ sonrası L-karnitin verilenlere göre anlamlı bir artış görülmüştür (p=0.004, p=0.010, sırasıyla) (Şekil 4-6), (Tablo 4-5).



Şekil 4-6: CD3⁻ CD161⁺ NK hücre IFN-γ içeriği

Tablo 4-5: $CD3^-$ $CD161^+$ NK hücre IFN-γ içeriği

UYARIM YAPILMAYAN KOŞULLARDA $CD3^-$ $CD161^+$ IFN-γ HÜCRE ORANI

	Sağlıklı	STZ	L-karnitin	STZ + L-karnitin	STZ sonrası L- karnitin	L- karnitin sonrası STZ
Sağlıklı						
STZ						
L-karnitin	↑	↑				
STZ + L-karnitin		↑			↑	↑
STZ sonrası L-karnitin						
L- karnitin sonrası STZ		↑			↑	

PMA UYARIMLI KOŞULLARDA $CD3^-$ $CD161^+$ IFN-γ HÜCRE ORANI

	Sağlıklı	STZ	L-karnitin	STZ + L-karnitin	STZ sonrası L- karnitin	L- karnitin sonrası STZ
Sağlıklı						
STZ					↑	↑
L-karnitin	↓					
STZ + L-karnitin		↑			↑	↑
STZ sonrası L-karnitin						
L- karnitin sonrası STZ						

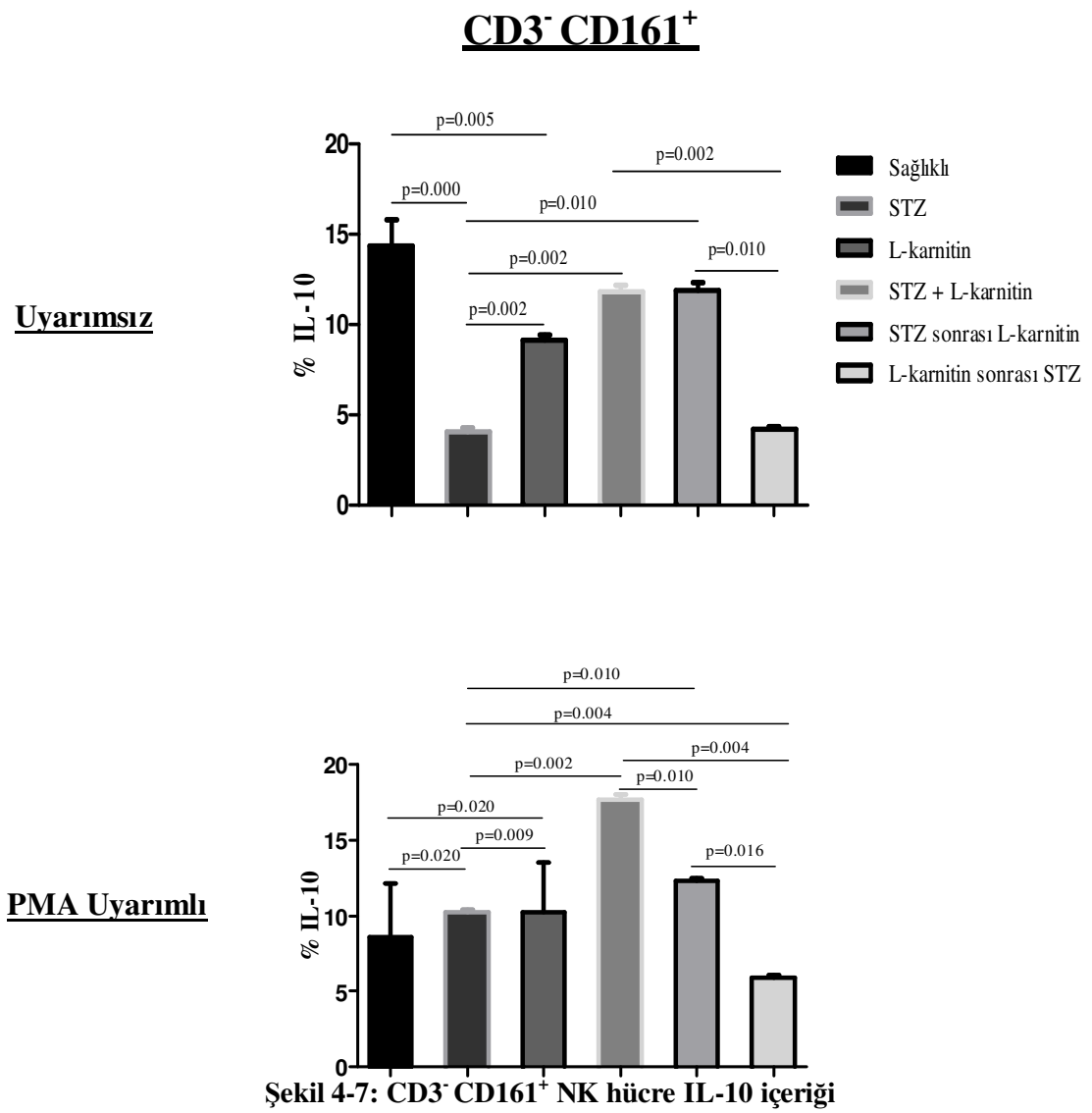
4.1.5.2. $CD3^-$ $CD161^+$ NK hücre içi IL-10 seviyeleri

Uyarım yapılmayan şartlarda STZ uygulanan gruptaki $CD3^-$ $CD161^+$ NK hücre IL-10 seviyesi; sadece L-karnitin, STZ + L-karnitin, STZ sonrası L-karnitin verilen gruplar ve sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında anlamlı derecede düşüş göstermiştir (p=0.002, p=0.002, 0.010, p=0.000, sırasıyla). Sadece L-karnitin verilen grupta sağlıklı kontrollere göre (p=0.005), L-karnitin sonrası STZ uygulanan hayvalarda ise; STZ + L-karnitin ve STZ sonrası L-karnitin verilen hayvanlara göre IL-10 düzeylerinde anlamlı derecede bir azalma gözlenmiştir (p=0.002, p=0.010, sırasıyla) (Şekil 4-7), (Tablo 4-6).

PMA uyarımlı koşullarda STZ uygulanan hayvanlardaki IL-10 içeriği; L-karnitin sonrası STZ uygulanan gruba ve sağlıklı kontrollere kıyasla anlamlı derecede artış gösterirken (p=0.004, p=0.020, sırasıyla); L-karnitin, STZ + L-karnitin ve STZ

sonrası L-karnitin verilen gruplarda anlamlı derecede bir azalma göstermiştir (p=0.009, p=0.002, p=0.010, sırasıyla).

Yalnız L-karnitin verilen hayvanlarda IL-10 içeriği sağlıklılara oranla anlamlı dercede artış göstermiştir (p=0.020). STZ + L-karnitin verilen hayvanlardaki IL-10 seviyesinin, STZ öncesi ve STZ sonrası L-karnitin verilenlere göre anlamlı derecede artmış olduğu gözlenmiştir (p=0.004, p=0.010, sırasıyla). STZ öncesi ve STZ sonrası L-karnitin verilenler karşılaştırıldığında ise anlamlı derecede bir azalma saptanmıştır (p=0.016) (Şekil 4-7), (Tablo 4-6).



Şekil 4-7: $CD3^-$ $CD161^+$ NK hücre IL-10 içeriği

Tablo 4-6: $CD3^-$ $CD161^+$ NK hücre IL-10 içeriği

UYARIM YAPILMAYAN KOŞULLARDA $CD3^-$ $CD161^+$ IL-10 HÜCRE ORANI

	Sağlıklı	STZ	L-karnitin	STZ + L-karnitin	STZ sonrası L-karnitin	L- karnitin sonrası STZ
Sağlıklı						
STZ	↓		↓	↓	↓	
L-karnitin	↓					
STZ + L-karnitin						
STZ sonrası karnitin						
L- karnitin sonrası STZ				↓	↓	

PMA UYARIMLI KOŞULLARDA $CD3^-$ $CD161^+$ IL-10 HÜCRE ORANI

	Sağlıklı	STZ	L-karnitin	STZ + L-karnitin	STZ sonrası L- karnitin	L- karnitin sonrası STZ
Sağlıklı						
STZ	↑		↓	↓	↓	↑
L-karnitin	↑					
STZ + L-karnitin					↑	↑
STZ sonrası L-karnitin						
L- karnitin sonrası STZ					↓	

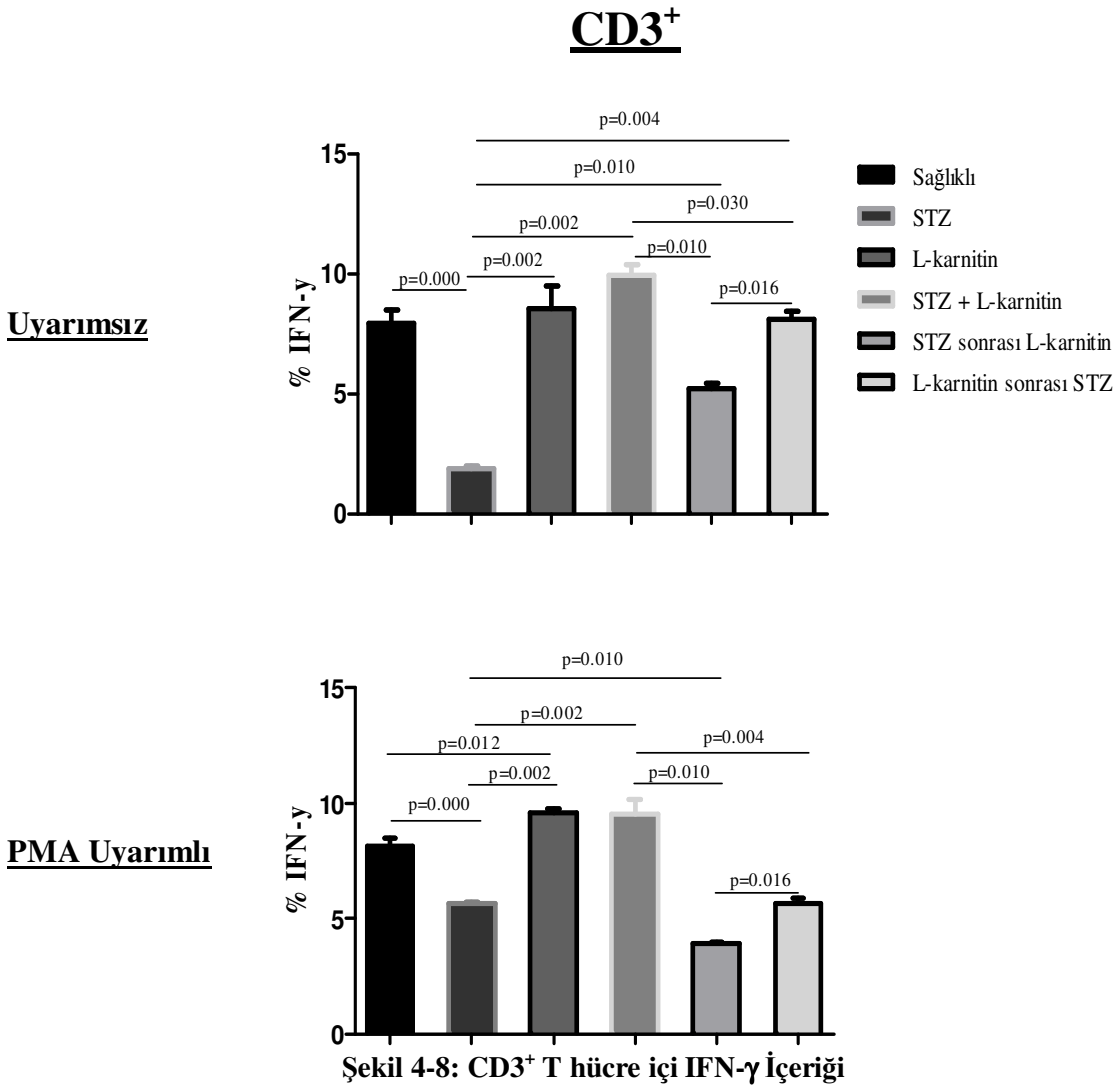
4.1.6. $CD3^+$ T Hücre Populasyonunda Hücre İçi Sitokin Profili

4.1.6.1. $CD3^+$ T hücre içi IFN-γ seviyeleri

Uyarım yapılmayan koşullarda $CD3^+$ hücre IFN-γ içeriği, sadece STZ uygulanan grupta; yalnız L-karnitin, STZ + L-karnitin, STZ öncesi ve STZ sonrası L-karnitin verilen gruplara ve sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede düşüş göstermiştir (p=0.002, p=0.002, p=0.004, p=0.010, p=0.000, sırasıyla). STZ + L-karnitin verilen grupta, STZ öncesi ve STZ sonrası L-karnitin verilen hayvanlara göre anlamlı derecede artış gözlenirken (p=0.030, p=0. 010, sırasıyla), STZ sonrası L-karnitin verilenlerde STZ öncesine göre anlamlı derecede bir azalma saptanmıştır (p=0.016) (Şekil 4-8), (Tablo 4-7).

PMA uyarımı yapılan koşullarda, sadece STZ uygulanan gruptaki IFN-γ içeriği; sadece L-karnitin ve STZ + L-karnitin verilen gruplara ve sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede azalırken (p=0.002, p=0.002, p=0.000, sırasıyla), STZ sonrası L-karnitin verilenlere göre anlamlı derecede artış göstermiştir (p=0.010).

Yalnız L-karnitin verilen grupta sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede artış görülmüştür (p=0.012). STZ + L-karnitin verilenlerde IFN-γ düzeyinin, STZ öncesi ve STZ sonrası L-karnitin verilenlere göre anlamlı derecede artmış olduğu gözlemlenmiştir (p=0.004, p=0.010, sırasıyla). STZ öncesi ve STZ sonrası L-karnitin verilenler kıyaslandığında ise anlamlı bir artış saptanmıştır (p=0.016) (Şekil 4-8), (Tablo 4-7).



Şekil 4-8: CD3+ T hücre içi IFN-γ İçeriği

Tablo 4-7: $CD3^+$ T hücre içi IFN-γ İçeriği

UYARIM YAPILMAYAN KOŞULLARDA $CD3^+$ IFN-γ HÜCRE ORANI

	Sağlıklı	STZ	L-karnitin	STZ + L-karnitin	STZ sonrası L- karnitin	L- karnitin sonrası STZ
Sağlıklı						
STZ	↓		↓	↓	↓	↓
L-karnitin						
STZ + L-karnitin					↑	↑
STZ sonrası Lkarnitin						
L- karnitin sonrası STZ					↑	

PMA UYARIMLI KOŞULLARDA $CD3^+$ IFN-γ HÜCRE ORANI

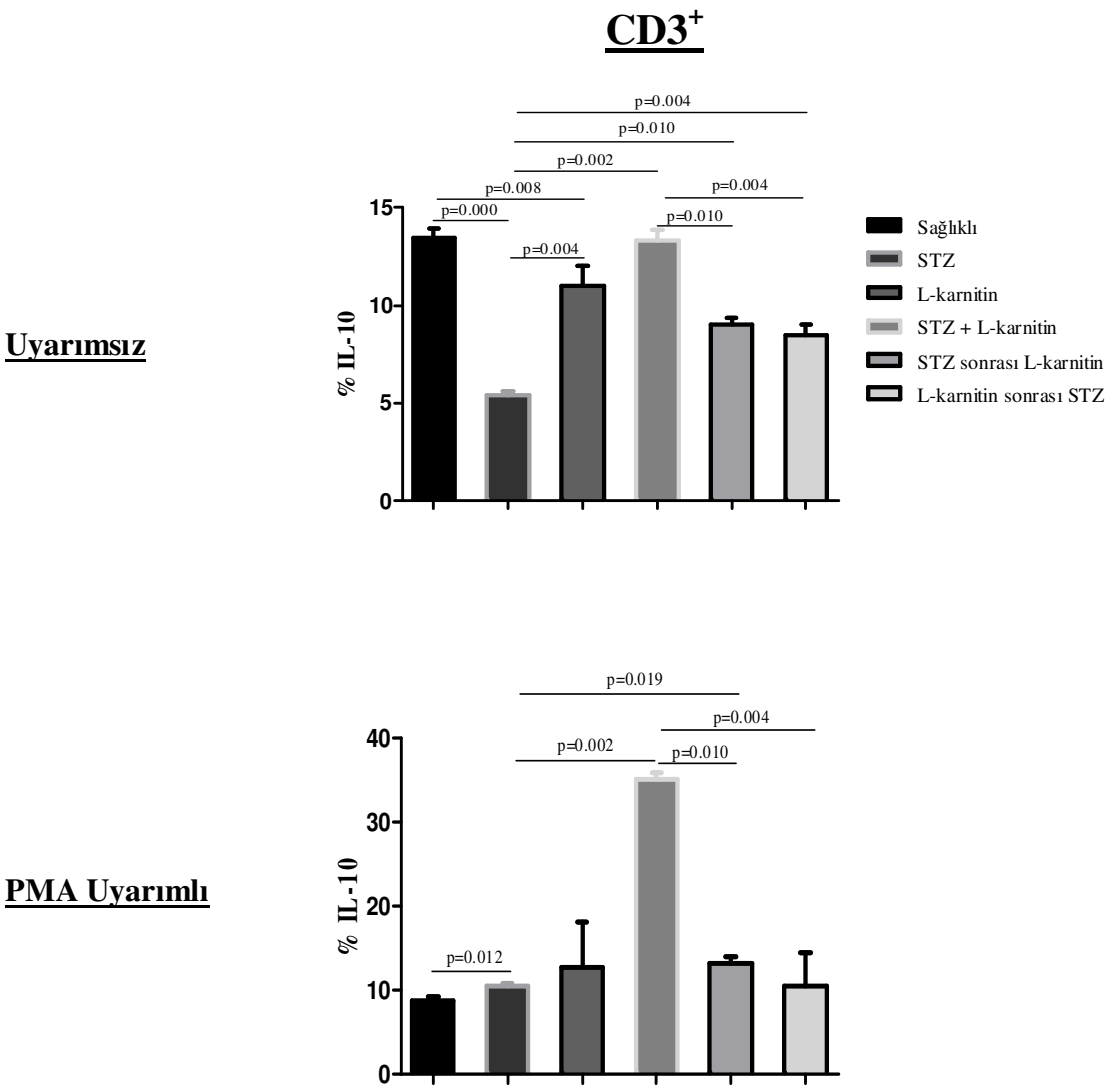
	Sağlıklı	STZ	L-karnitin	STZ + L-karnitin	STZ sonrası L- karnitin	L- karnitin sonrası STZ
Sağlıklı						
STZ	↓		↓	↓	↑	
L-karnitin	↑					
STZ + L-karnitin					↑	↑
STZ sonrası L-karnitin						
L-karnitin sonrası STZ					↑	

4.1.6.2. $CD3^+$ T hücre içi IL-10 seviyeleri

Uyarım yapılmayan koşullarda STZ uygulanan hayvanlarda, sadece L-karnitin, STZ + L-karnitin, STZ öncesi ve STZ sonrası L-karnitin verilenlere ve sağlıklı kontrollere göre IL-10 içeriğinde anlamlı derecede düşüş saptanmıştır (p=0.004, p=0.002, p=0.004, p=0.010, p=0.000, sırasıyla). L-karnitin verilen grupta sağlıklı kontrollere kıyasla anlamlı bir azalma gözlenirken (p=0.008), STZ + L-karnitin verilen grupta STZ öncesi ve STZ sonrası L- karnitin verilenlere göre anlamlı bir artış görülmüştür (p=0.004, p=0.010, sırasıyla) (Şekil 4-9), (Tablo 4-8).

PMA ile uyarım uygulanan koşulda, STZ diyabetik hayvanlarda IL-10 seviyesi sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede artış gösterirken (p=0.012), STZ + L-karnitin ve STZ sonrası L-karnitin verilenlere göre anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır (p=0.002, p=0.019, sırasıyla). STZ + L-karnitin verilen grupta ise, hem STZ öncesi hem

de STZ sonrası L-karnitin verilen gruplara göre anlamlı derecede artış gözlenmiştir (p=0.004, p=0.010, sırasıyla) (Şekil 4-9), (Tablo 4-8).



Şekil 4-9: CD3+ T hücre içi IL-10 içeriği

Tablo 4-8: $CD3^+$ T hücre içi IL-10 içeriği

UYARIM YAPILMAYAN KOŞULLARDA $CD3^+$ IL-10 HÜCRE ORANI

	Sağlıklı	STZ	L-karnitin	STZ + L-karnitin	STZ sonrası L- karnitin	L- karnitin sonrası STZ
Sağlıklı						
STZ	↓		↓	↓	↓	↓
L-karnitin	↓					
STZ + L-karnitin					↑	↑
STZ sonrası L- karnitin						
L- karnitin sonrası STZ						

PMA UYARIMLI KOŞULLARDA $CD3^+$ IL-10 HÜCRE ORANI

	Sağlıklı	STZ	L-karnitin	STZ + L-karnitin	STZ sonrası L- karnitin	L- karnitin sonrası STZ
Sağlıklı						
STZ	↑			↓	↓	
L-karnitin						
STZ + L-karnitin					↑	↑
STZ sonrası L- karnitin						
L- karnitin sonrası STZ						

5. TARTIŞMA

STZ deneysel hayvan modellerinde diyabetin indüklenmesinde en çok kullanılan ajanlardan biridir. Yüksek dozda enjeksiyonu, pankreatik β hücreleri üzerine doğrudan toksisiteye neden olmaktadır (39). STZ seçici olarak pankreas β hücresini harap ederek insülin sentez ve salınımını inhibe etmekte ve sonuçta insüline bağımlı diyabet ile sonuçlanmaktadır. STZ, tek ya da çoklu dozlar halinde veya çok daha küçük ve tekrarlanan dozlarda intraperitonal veya intravenöz olarak uygulanmaktadır. Hayvanlarda tek doz STZ uygulamaası, diyabet oluşumu için yeterli görülmektedir. Kimyasal uyarımlı pankreatik hasar, hiperglisemi kaynaklı komplikasyonların değerlendirilmesi açısından faydalı olmaktadır (87). Bu bilgiler ışığında çalışmamızda 4 - 6 aylık sıçanlara 55 mg/kg STZ i.p. enjekte edilerek geri dönüşümsüz β hücre harabiyeti oluşturulması amaçlanmıştır.

Karnitin, L-β-hidroksi-γ-N-trimetilammonyobutanoat yapısında olan uzun zincirli yağ asitlerinin, mitokondri membranından transportunda görev alan temel bir taşıyıcıdır. Eksikliğinde, mitokondri içine yağ asitlerinin transportunun azalması nedeni ile sitozolik trigliserid birikimine yol açmakta, trigliserid birikimi ise glikoz kullanımını iyice bozarak diyabetin kontrolünü zorlaştırmaktadır. Bu durum, L-karnitinin insülin direnci patogenezinde yer aldığının bir göstergesidir (48). Tip 1 ve tip 2 diyabetli hastalarla yapılan çalışmalarda serum L-karnitin düzeyinin azaldığı bildirilmektedir (88, 10).

Karnitinin primer biyokimyasal fonksiyonu, hücrelerin enerji üretimine olan katılımıdır (89). Ayrıca ester oluşumu ile, mitokondride normal ve anormal metabolizmanın bir sonucu olarak biriken kısa ve orta zincirli yağ asitlerinin taşınmasını da kolaylaştırmaktadır (90 - 94). Buna ek olarak, farklı acil grupların muhtemelen farklı metabolik kökenlere sahip olmasıyla, karnitin, yağ asitleri ve karbonhidrat metabolizması arasındaki bir bağlantıyı göstermektedir (95). DM'ta karnitin metabolizması yaygın olarak incelenmiş ve farklı sonuçlar bildirilmiştir (96 - 99). Deney hayvanlarındaki mekanistik çalışmalar, insülin direncinin gelişiminde karnitin eksikliğinin rolü olduğunu göstermektedir. (100, 101). Karnitin, periferik dokular tarafından glikoz kullanımını ve hücrelerin insüline karşı duyarlılığını arttırdığından, karbonhidrat metabolizmasında önemlidir (102, 103).

Diyabet ile NK hücreleri arasındaki ilişkiyi gösteren ilk çalışmalar 1980 ve 90'lı yıllara aittir. Bu çalışmalar, diyabetik ve diyabetik eğilimli sıçan NK hücre sitotoksik aktivitesinin, aynı kökenden gelen diyabete karşı dirençli sıçanlarınki ile karşılaştırıldığında daha yüksek olduğunu göstermektedir (104 - 106). Kesin rollerinin tam olarak açıklanamamış olmasına karşılık, T1DM'yi kapsayan otoimmün hastalıkların patogenezinde NK hücrelerinin rol oynadığı kabul edilmektedir (107, 108, 109). Kimyasal olarak indüklenen diyabetik fare modellerinde NK hücrelerinin ortamdan uzaklaştırılması sonucu hastalığın önlenebildiğini gösteren çalışmalar NK hücrelerinin T1DM patojenik rolünü desteklemektedir (110, 111), ancak bu veriler, BB (BioBreeding) sıçanlarla ilgili başka çalışmalarda doğrulanmamıştır (112 - 114). Bulgular hücrelerinin *in vitro* pankreas β-hücrelerini yıkıma uğratabileceğine dair bir kanıttır (104, 106). BB sıçanlarda, dalak NK hücrelerinin adacıklara zarar verdiği ancak daha önceki çalışmalarda, NK hücrelerinin hastalık gelişiminde çok önemli olmadığı yönündedir. Bununla birlikte, transgenik farelerde yapılan deneyler, β hücre yıkımının modülasyonunda NK hücrelerinin rolü olduğunu düşündürmektedir (115).

NK hücrelerinin, dendritik hücreler ile etkileşimi, T hücre cevaplarını polarize etmesi ve regülatör T hücreleri ile konuşmadaki rolü nedeniyle (116 - 118), T1DM patogenezinde ilgi çekici aday olarak kabul edilmektedir (119, 120).

DM'un karnitin metabolizması için farklı sonuçlar bildirilmiştir (96 - 99). T2DM ile ilgili çok sayıda veriye karşılık (121 - 123), T1DM için sınırlı sayıda veri bulunmaktadır (10, 124, 125 - 127). İki çalışma (126, 156) haricinde, kabul edilen diğer tüm çalışmalar diyabetik deneklerde, plazmadaki serbest karnitin konsantrasyonunun azaldığını göstermiştir (10, 97, 121, 122, 125, 128).

Diyabet immünopatogenezini aydınlatmak amacıyla hastalık sürecinde önemli rol oynadığı bilinen sıçan $CD3^{-}CD161^{+}$ NK hücrelerinin oranlarının belirlenmesi ile birlikte bu hücrelerin IFN-γ ve IL-10 sitokin seviyeleri saptanarak L-karnitinin sağlıklı ve hasta gruplarındaki NK hücreleri üzerine olan etkisinin incelendiği çalışmamızda, uyarım olmayan durumda gruplar birbirleri ile kıyaslandığında $CD3^{-}CD161+$ NK hücre oranının, STZ sonrası L-karnitin verilen hayvanlarda, sadece STZ ve L-karnitin sonrası STZ uygulananlara göre anlamlı derecede artış gösterdiği saptanmış, PMA uyarımı yapılan koşullarda ise $CD3^{-}CD161^{+}$ hücre oranlarında herhangi bir anlamlı fark saptanmamıştır.

İnsan çalışmaları T1DM'li hastaların NK hücre sayısında azalma ve NK hücre fonksiyonlarında bozukluk olduğunu göstermektedir (129, 130). T1DM'de saptanan NK

hücre fenotip değişikliğinin sebebi bilinmemektedir (131). Rodacki ve arkadaşları T1DM'li hastalarda farklı evrelerde periferik kan NK hücre sıklığı ve aktivasyon durumunu incelemişler ve tanıda, NK hücrelerinin kesin sayısının azaldığını ancak IFN-γ üretiminin saptanması sonucu aktivasyonlarının arttığı gösterilmiştir. Yeni T1DM tanısı konulmuş hastaların periferik kan NK hücre sıklığında azalma görülmekle birlikte uzun dönem hastalığa sahip bireylerde herhangi bir fark saptanmamıştır. NK hücre alt grup oranlarında da ($CD56^{bright}CD16^{-}$ ve $CD56^{dim}CD16^{+}$) fark gözlenmemiştir (129).

NK hayvan çalışmalarının çoğu NOD fareler üzerinedir. Mevcut çalışmalar, NOD farelerin periferik kan NK hücrelerinde eksiklik olduğu veya NK hücre sayısının hasta ve kontrollerde aynı olmasına karşılık hastaların sitotoksik aktivitelerinde düşüklük olduğu yönündedir (2, 9).

Çalışmamızda, uyarım yapılmayan koşullarda STZ sonrası L-karnitin verilen gruptaki NK hücre oranlarında, sadece STZ ve L-karnitin sonrası STZ uygulanan gruplara göre anlamlı derecede artışın olması ve PMA uyarımı yapılan koşullarda ise denek grupları arasında hiçbir fark saptanmaması mevcut çalışmalarla (2, 9, 129) ile uyumluluk göstermektedir. STZ sonrası L-karnitin uygulamasının NK hücre sayısında artışa neden olması, L-karnitinin hastalık sonrasındaki süreçte etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Fare ve insan çalışmalarında T1DM'de NK hücre aktivatör reseptörü olan NKp46'nın etkisi incelenmiş ve pankreatik β hücreleri üzerinde eksprese edilen bilinmeyen bir ligand ile bağlanması sonucu NKp46 aktivatör reseptörün aktive olarak β hücre hasarına neden olduğu gösterilmiştir (108). NOD farelerde NKp46 reseptörünün β hücrelerine bağlanmasının bloke edilmesi sonucu diyabet gelişiminin engellenebileceği gösterilmiştir (108, 132). Bu çalışma, NK hücrelerinin T1DM gelişiminin engellenmesi ve tedavisinde yeni ve ilave bir terapötik yaklaşım olarak hedeflenebileciğini göstermektedir. Genetik ile işbirliğinin etkilerini saptamak için, erken başlangıçlı T1DM'de NK hücreleri ile ilgili daha çok fonksiyonel çalışmanın gerekli olduğu görülmektedir.

Çalışmamızda, uyarım olmayan koşullarda L-karnitin verilen gruptaki IFN-γ seviyesi STZ uygulanan gruba ve sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede artış göstermiştir. STZ ve L-karnitin birlikte verilen hayvanlarda; sadece STZ uygulanan, STZ öncesi ve STZ sonrası L-karnitin verilen gruplara göre anlamlı derecede artış saptanmıştır. L-karnitin sonrası STZ uygulanan diyabetik hayvanların ise; sadece STZ

ve STZ sonrası L-karnitin verilen gruba kıyasla IFN-γ seviyesinin anlamlı derecede arttığı görülmüştür.

PMA uyarımı yapılan koşulda ise, L-karnitin verilen gruptaki IFN-γ seviyelerinin sağlıklı kontrollere oranla anlamlı derecede azaldığı gözlenmiştir. STZ + L-karnitin verilen hayvanlardaki IFN-γ seviyesinin sadece STZ uygulanan, STZ öncesi ve STZ sonrası L-karnitin verilen gruplara göre anlamlı derecede artmış olduğu saptanmıştır. Sadece STZ uygulanan grupta ise, STZ öncesi ve STZ sonrası L-karnitin verilenlere göre anlamlı bir artış görülmüştür.

Hem PMA uyarımlı hem de uyarım yapılmayan koşullarda hasta grupları arasında L-karnitin verilen sıçanlarda IFN-γ seviyesindeki artış, L-karnitinin NK hücre sitokin profili üzerine etkili olduğunu göstermektedir. Ayrıca IFN-γ'nın artışının, sadece STZ uygulanan gruba kıyasla ile yalnız L-karnitin verilen veya STZ uygulaması ile L-karnitin verilen gruplarda görülmesi L-karnitinin hastalıkla ilişkili olabileceğini düşündürtmektedir. IFN-γ çeşitli mekanizmalar aracılığı ile adacık harabiyeti ve diyabet patogenezinde rol oynamaktadır. Birincisi, kemirgen hayvan modellerinde patojenik T hücreleri (Th1) IFN-γ salgılama yetenekleri ile karakterize edilmektedir (133) ve aynı zamanda insanda diyabet-otoantijen reaktif T hücreleri de IFN-γ sekrete etmektedir (134). İkincisi, IFN-γ diğer immün mediatörler ile birlikte direkt olarak β hücrelerine zarar vermektedir (135). Üçüncüsü ise, NOD farede IFN-γ'nın serum konsatrasyonunun artması hastalık durumu ile ilişkilidir (136).

Kronik enflamasyon; insülin direnci ve T2DM gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (137 - 142). NK ve NKT hücreleri gibi doğal bağışıklık hücrelerindeki sapmalar, koroner arter ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi enflamatuvar hastalıkların gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Bununla birlikte, insülin direnci ve T2DM gelişiminde NK ve NKT hücrelerinin rolü hala belirsizdir (143, 144, 145). Daha önceki çalışmalar, NK hücrelerinin T1DM patogenezi ile birlikte periferik tolerans ve enflamatuvar cevapları da regüle ettiğini göstermiştir. Ancak, son çalışmalar ile birlikte, T2DM hastalarında aktive NK ve NKT hücrelerinde artış görülürken, inhibitör NK ve NKT hücrelerinin ise daha düşük frekansa sahip olduğu gösterilmiştir (129, 146 - 150).

Diyabet oluşumunu engellemek için rekombinant IFN-γ enjeksiyonun uygulandığı bir çalışmada (151), pankreas adacıklarına infiltre eden hücrelerden salgılanan IFN-γ nın β hücre yıkımına neden olduğu gösterilmiştir (152 - 155).

Sitokinlerin (IL-1, IFN-γ, IL-15, IL-12, IL-18 ve TNF vb.) NOD fare pankreatik adacıklarında enflamasyon ile ilişkili NK hücre aktivatörleri olarak etkili olduğu bilinmektedir (156). Sitolitik aktiviteye sahip NK hücreleri sitokin ve kemokinler salgılarlar. Başta IFN-γ ayrıca TNF-α ve GM-CSF, immünoregülatör sitokinlerden IL-5, IL-10, IL-13 ve kemokinlerden MIP-1α, MIP-1β, RANTES sentezlemektedirler (157). Sağlıklı kontrollere karşılaştırıldığında, T2DM'li hastaların NK hücrelerinden spontan ve uyarı sonucu salgılanan IFN-γ seviyelerinde anlamlı bir fark saptanmamış, NK hücrelerinin, IFN-γ dışında IL-15 ve IL-12 gibi proenflamatuvar sitokinleri salgılayarak T2DM'nin patojenik sürecine dahil olabilecği ileri sürülmüştür (158, 159).

İnsandaki insülitik infiltrat, hayvan modellerinden daha az yoğundur ve her ne kadar B hücreleri, makrofajlar ve NK hücreleri ile ilişkili ise de temel olarak T hücrelerinin fonksiyonu olduğu bilinmektedir. Ayrıca, proenflamatuvar sitokin ve kemokinlerin ekspresyonu (örneğin, IL-1β, TNFa, IFN-γ, CXCL-10, vb) bildirilmiştir. Enflamatuvar mediatörler, fonksiyonel baskılama ve β hücrelerinin ölümü ile adacık hücre yenilenmesinin düzenlenmesi ve bunun sonucunda apoptoza katkıda bulunabilmektedir (160).

T hücre transgenik fare modeli kullanılarak oluşturulan T1DM modelinde diyabetojenik NK hücrelerinin fonksiyonu ve gelişiminde regülatör T hücrelerinin etkili olduğu gösterilmiştir. Bu durum hızlı diyabet gelişiminden sorumlu $Foxp3^+$ regülatör T hücrelerinin ortamdan uzaklaştırılması ve panreatik β hücrelerine NK hücre infiltrasyonu ile tanımlanmaktadır (161). Regülatör T hücre tedavisi, yeni başlangıç T1DM hastaların tedavisi için klinik çalışma evresindedir (162). Regülatör T hücre sayı ve fonksiyonunu arttırmada diyabetojenik NK hücrelerinin üzerinde etkili olabilir. Tedavi sonucunda NK hücre değişikliklerinin izlenmesi farklı bir tedavi yaklaşımı oluşturabilir.

NK hücrelerinin diyabet gelişiminde koruyucu bir rolü olabileceğini düşündüren çalışmalar bulunmaktadır. Freund bileşiğiyle immünize edilen NOD farelerde, IFN-γ sekresyonu ile NK hücre aracılı reaktif sitotoksik T hücrelerinin azaltılması sonucu hastalık gelişiminin önlendiği gösterilmiştir (163, 164).

Uyarım yapılmayan şartlarda STZ uygulanan gruptaki $CD3^-CD161^+$ NK hücre IL-10 seviyesi; sadece L-karnitin, STZ + L-karnitin, STZ sonrası L-karnitin verilen gruplara ve sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede azalma göstermiştir. Sadece L-karnitin verilen grupta sağlıklı kontrollere göre anlamlı bir azalma saptanmıştır. L-

karnitin sonrası STZ uygulanan hayvalarda ise; STZ + L-karnitin ve STZ sonrası L-karnitin verilen hayvanlara göre anlamlı bir azalma gözlenmiştir.

PMA uyarımlı koşullarda STZ uygulanan hayvanlardaki IL-10 seviyesi; L-karnitin sonrası STZ uygulanan gruba ve sağlıklı kontrollere kıyasla anlamlı derecede artış gösterirken, L-karnitin, STZ + L-karnitin ve STZ sonrası L-karnitin verilenlerde anlamlı bir azalma gözlenmektedir. Yalnız L-karnitin verilenlerde sağlıklılara oranla anlamlı bir artış saptanmıştır. STZ + L-karnitin verilen hayvanlardaki IL-10 seviyesinin, STZ öncesi ve STZ sonrası L-karnitin verilenlere göre anlamlı derecede artmış olduğu gözlenmiştir. STZ öncesi ve STZ sonrası L-karnitin verilenler karşılaştırıldığında ise anlamlı bir azalma olduğu saptanmıştır.

Uyarım yapılmayan koşullarda gruplar birbirleri ile kıyaslandığında tüm gruplarda IFN-γ seviyesinin artmasına karşılık IL-10 seviyesinin azalması bu iki sitokinin antagonist etkisini düşündürmektedir. L-karnitin uygulaması hem NK hücre sitokin içeriği hem de hastalık sürecinde önemli olabileceğini düşümdürmektedir.

IL-10, insan sitokin sentez inhibitör faktörü (CSIF) olarak da bilinen bir anti-enflamatuvar sitokin olup, primer olarak monositler tarafından ve daha az olarak Th2, mastositler, $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ regülatör T hücreleri ve aktive T ve B hücrelerinin belirli bir alt grubunda üretilmektedir. IL-10 ekspresyonu, uyarılmamış dokularda minimal düzeydedir ve kommensal veya patojenik flora tarafından tetiklenmesi gerektiği bilinmektedir (79).

DM gelişimi, mitokondriyal ve immün fonksiyon azalması ile karakterize edilmektedir. L-karnitin ve onun türevleri, yağ asitleri ve lipid metabolitlerinde (uzun zincirli açil-CoA, diaçilgliserol, triaçilgliserol ve/veya seramid vb) önemli rol oynamaktadır. Bu metabolitlerin birikmesi, muhtemelen proenflamatuvar yolakların aktivasyonu sonucunda, insülin direncinin oluşmasıyla insülin hareket yolağının değiştiğini göstermektedir (165).

IL-10, makrofajlardan IFN-γ salınımını inhibe ederek anti-enflamatuvar özellik göstermektedir. Çalışmalar otoimmün diyabet gelişiminin erken safhalarında IL-10 uygulanmasının hastalığı geciktirebileceği ve/veya önleyebileceğini ileri sürmektedir. Adacık transplantasyonu yapılan hayvanlara IL-10 uygulamasının, transplante edilen adacıkların sağkalımını uzattığı yönündedir (166).

İmmün aracılı diyabet gelişiminde IL-10'un multifaktöriyel rolü tartışmalıdır. IL-10'un koruyucu ya da patojenik olarak gösterildiği çalışmalar mevcuttur (167 - 170). IL-10'un enflamasyonu önleyerek otoimmün sürecin düzenlenmesinde etkili olabildiği görülmektedir. Periferik toleransta IL-10 eksikliğinin T1DM başta olmak üzere otoimmün hastalıkların sürecinde önemli olduğu saptanmıştır (171). IL-10'un Th1 hücre sitokinleri üzerindeki indirgeyici etkisi ve MHC sınıf I molekülü üzerindeki inhibitör etkisinden dolayı T1DM gelişiminde koruyucu rolü olduğu düşünülmektedir (169, 172, 173).

Bozulmuş karnitin durumu ve diyabet gelişimi arasındaki ilişki incelendiğinde elde edilen bulgular, bozulmuş karnitin ve glikoz intoleransı arasında ilişki olduğunu desteklemektedir.

Genel olarak hayvan modellerindeki çalışmalar T1DM patogenezinde NK hücrelerinin rolünü tam olarak açıklayamamaktadır. Farklı deneysel şartlarda, NK hücreleri patojenik ya da koruyucu etkili olabilmektedir. Mevcut bulgular T1DM patogenezine hem doğal hem de edinsel immünitenin birlikte katıldığını göstermektedir. Sadece T ve B lenfosilerinin değil, NK , dentritik hücre ve ASH gibi edinsel ve doğal immünite elemanları rol oynamaktadır. Bu nedenle, T1DM oluşumunun ve β-hücre harabiyetinin önlenmesinde doğal bağışıklık elemanlarının potansiyel etkili olabileceği düşünülebilir.

Çalışmamızda NK hücre oranının sadece STZ sonrası L-karnitin verilen grupta artış göstermesi ve sitokin seviyelerindeki değişimin, L-karnitinin tek başına ya da STZ ile birlikte/önce/sonra verilen gruplarda daha belirgin görülmesi L-karnitinin hastalık sürecinde NK hücre aracılığıyla etkili olabileceğini göstermektedir. NK hücre oranında genel olarak bir değişiklik görülmemesine karşılık, IFN-γ/IL-10 içeriklerinde saptanan değişim, NK hücrelerinin hem doğal hem de edinsel immün yanıt elemanlarını etkileyerek hastalık patogenezinde etkili olduğunu düşündürmektedir. Elde edilen veriler doğrultusunda diyabetik hayvan modellerinde ve insanlarda yapılacak çalışmalar NK hücrelerinin diyabet patogenizindeki rolünü aydınlatacaktır.

KAYNAKLAR

1. Abacı A. Tip 1 diyabet. Güncel Pediatri 2007. 5: 1–10.
2. Fidan I. Evaluation of the natural killer cytotoxicity and the levels of cytokines in rats with type I diabetes mellitus. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005. 100(8): 883–887.
3. MacKay P. Spontaneous diabetes mellitus in the bio-breeding/worcester rat. J. Clin. Invest.1986. 77: 916–924.
4. Suk K. IFN-g/TNF-a Synergism as the final effector in autoimmune diabetes: A key role for STAT1/IFN regulatory factor-1 pathway in pancreatic β cell death. J Immunol 2001. 166: 4481–4489.
5. Kurrer MO. Beta cell apoptosis in T cell-mediated autoimmune diabetes. 1997. 94: 213.
6. Deniz G. NK ve NKT Hücreler. Türkiye Klinikleri J Int Med Sci 2007; 3(43): 18–25.
7. Rodacki M. NK cells and type 1 diabetes. Clinical & Developmental Immunol. 2006. 13(2–4): 101–107.
8. www.bdbiosciences.com. Rat İmmunology. 00-6081-69A1.
9. Johansson SE. Broadly impaired NK cell function in non-obese diabetic mice is partially restored by NK cell activation in vivo and by IL-12/IL-8 in vitro. Intern Immunol 2004. 16: 1–11.
10. Winter SC. Relative carnitine insufficiency in children with type 1 diabetes mellitus. Am J Dis Child. 1989. 143: 1337-1339.
11. Korkmaz S. Low L-carnitine levels: can it be a cause of nocturnal blood pressure changes in patients withtype 2 diabetes mellitus?. Anadolu Kardiyol Derg. 2011. 1: 57–63.
12. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği. Diabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Kılavuzu 2013, Satman İ (Editör) ve ark. 6. Baskı.
13. International Diabetes Federation, Clinical Guidelines Task Force .Global guideline for type 2 diabetes .Retrieved September 14. 2005.
14. Yilmaz M.T: Editörden Galenos Aylık Sağlık Meslek Dergisi 1997. 1:3 8.
15. Somedan WA. Pathologic physiology mechanisms of disease. Çevirenler: V. Cesur, N. Kemal. 1. Baskı, Hekimler Birliği Vakfı, Türkiye Klinikleri Yayınevi. 1992 Ankara. Cilt 2.
16. Hatemi H. Diabetes Mellitus'un Tarihçesi. Aktüel Tıp Dergisi 1996. 7: 497–499
17. Bagrıacık N. Diabetes mellitus: Tanımı, tarihçesi, sınıflaması ve sıklığı. İlkova H (editör), İÜ CTF Sürekli Tıp Eğitimi Komisyonu Yayın No:4, İstanbul. 1997. 9-18.
18. Benett PH. Diabetes mellitus in American (Pima) Indians. Lancet 1971. 298: 125–128.
19. Erdoğan G. Diabetes Mellitusun tedavisi 1.Baskı, Bilimsel Tıp Yayınevi Ankara,1997.

20. Kahn CR. Joslin's diabetes mellitus. 14th ed. Boston: Lippincott Williams & Wilkins, M 2005. 341–354.

21. Mogensen CE. Diabetic nephropathy in type 2 diabetes. London: Science Press, 2002. 21–30.

22. International Diabetes Federation (IDF). Diabetes Atlas 5th edition, 2012. Erişim 01/06/2013, http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/Update2012.

23. Satman I. Twelve-year trends in the prevalence and risk factors of diabetes and prediabetes in Turkish adults. European Journal of Epidemiology 2013. 28: 169–180.

24. Günöz H. Türkiye diyabet önleme ve kontrol programı-eylem Planı: 2011/2014 Satman İ (editör), Sağlık Bakanlığı Yayın No: 816, Ankara 2011.

25. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes care 2013. 36: 67–74.

26. American Diabetes Association: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 2007. 30: 42-47.

27. Sperling MA. Diabetes mellitus in children. Jenson HB. Nelson textbook of pediatrics. 17th Ed, Philadelphia. WB Saunders Company, 2004. 1947–1972.

28. Madsbad S. Practical clinical value of the C-peptide response to glucagon stimulation in the choice of treatment in diabetes mellitus. Acta Med Scand 1981. 210: 153–156.

29. Altuntaş Y. Devrim AS.Patterns of change in beta-cell reserve within the first two years of Type I diabetes mellitus. Diabetologia 1993. 36 (Suppl 1): A 203.

30. Golay A. Metabolic basis of obesity and non-insulin dependent diabetes mellitus. Diab Metab Rev 1988. 4: 727–747.

31. Von Herrath M. Gerald T Nepom. Animal Models of human type 1 diabetes. Nature Immunol 2009. 10(2): 129–132.

32. Kayaalp O. Klinik farmakolojinin esasları ve temel düzenlemeler. 2. baskı. Ankara: Hacettepe TAŞ. 2001.

33. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. Physiol Res 2001. 50: 537–546.

34. Atlan N. Diabetes mellitus ve oksidatif stres. Türk Biyokimya Dergisi 2006. 31(2): 51-56.

35. Lenzen S. The mechanisms of alloxan and streptozotocin-induced diabetes. Diabetologia 2008. 51(2): 216–226.

36. Bell RH Jr. Animal models of diabetes mellitus: physiology and pathology. J Surg Res 1983. 35(5): 433–460.

37. Mythili MD. Effect of stretozotocin on the ultrastructure of rat pancreatic islets. Microsc Res Tech 2004. 63(5): 274–281.

38. Öntürk H. Carried out of experimental diabetes and the measurement of glycemic activity. Genel Tıp Derg 2007. 17(4): 231–236.

39. İrer SV. Experimental models of diabetes mellitus. Türk Klinik Biyokimya Derg 2004. 2(3): 127–136.

40. Bedoya FJ. N-monomethyl-arginine and nicotinamide prevent streptozotocin-induced double strand DNA break formatin in pancreatic rat islets. Experientia 1996. 43(12): 1528–1533.

41. Akbarzadeh ND. Induction diabetes by streptozotosin in rats. İndians Journal of Clinical Biochemistry 2007. 22(2): 60–64.

42. Elsner M. Importance of the GLUT2 glucose transporter of pancreatic beta cell toxicity of alloxan. Diabetologia 2002. 45(1): 542–1549.

43. Bloch KO. Stretozotocin and alloxan based selection improves toxin resistance of insulin-producing RINm cells. Int J EXp Diabetes Res 2000. 1: 211–219.

44. Konrad RJ. The role of O-linked protein glycosylatin in beta-cell dsyfunction.Int J Mol Med 2002. 10: p. 535–539.

45. Tiedge M. Importance of cysteine residues for the stability and catalytic activity of human pancreatic beta cell glucokinase. Arch Biochem Biophys 2000. 375: 251–260.

46. Deniz G. Karnitin: Sentez, metabolizma, fonksiyon ve iskemik kalpte terapötik önemi T Klin Tıp Bilimleri 1999. 19: 55–62.

47. Naidu KA. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. Nutr J 2003; 2:7.

48. Mingrone G. Carnitine in type 2 diabetes. Ann N Y Acad Sci 2004. 1033: 99–107.

49. Peritt D. Differentiation of human NK cells into NK1 and NK2 subsets. The J Immunol 1998. 161: 5821–5824.

50. Chanvillard C. Infante-Duarte, and R.C. Nayak, The role of natural killer cells in multiple sclerosis and their therapeutic implications. Front Immunol, 2013. 4: 63.

51. Fehniger TA. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. Blood, 2003. 101(8): 3052–3057.

52. Strowig T. Noncytotoxic functions of NK cells: direct pathogen restriction and assistance to adaptive immunity. J Immunol, 2008. 180(12): 7785–7791.

53. Chiesa MD. The natural killer cell-mediated killing of autologous dendritic cells is confined to a cell subset expressing CD94/NKG2A, but lacking inhibitory killer Ig-like receptors. European J Immunol 2003. 33: 1657–1666.

54. Moretta L. Human natural killer cells: their origin, receptors and function. European J Immunol 2002. 32: 1205–1211.

55. Andr´e P. Modification of P-selectin glycoprotein ligand-1 with a natural killer cellrestricted sulfated lactosamine creates an alternate ligand for L-selectin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2000. 97: 3400–3405.

56. Frey M. Differential expression and function of L-selectin on CD56bright and CD56dim natural killer cell subsets. The J Immunol 1998. 161: 400–408.

57. Maghazachi AA. Insights into seven and single transmembrane- spanning domain receptors and their signaling pathways in human natural killer cells. Pharmacological Reviews 2005. 57: 339–357.

58. Cooper MA. The biology of human natural killer-cell subsets. Trends in Immunol 2001. 22: 633–640.

59. Fehniger TA. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. Blood, 2003. 101(8): 3052–3057.

60. Robertson MJ. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. Blood, 1990. 76(12): 2421–2438.

61. Aktas E. Natural killer cells: versatile roles in autoimmune and infectious diseases. Expert Rev Clin Immunol, 2009. 5(4): 405–420.

62. Steinman L. Multiple sclerosis: a two-stage disease. Nat Immunol, 2001. 2(9): 762–764.

63. Moretta A. Natural killer cells and dendritic cells: Rendezvous in abused tissues. Nature Reviews Immunol 2002. 2: 957–964.

64. Biron CA. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. Annual Review of Immunol 1999. 17: 189–220.

65. Maghazachi AA. Compartmentalization of human natural killer cells. Molecular Immunol 2005. 42: 523–529.

66. Gur C. The activating reseptor NKp46 is essential for the development of type 1 diabetes. Nature Immunol 2010. 11: 121–128.

67. Rodacki M. Altered natural killer cells in type 1 diabetic patients. Diabetes 2007. 56: 177–185.

68. Dotta F. Can NK cells be a therapeutic target in human diseases?. European J Immunol 2008. 38: 2927–2968.

69. Guo H. High frequency of activated natural killer and natural killer T-cells in patients with new onset of type 2 diabetes mellitus. Experimental Biology and Medicine 2012. 237: 556–562.

70. Herrera MD. Endothelium-dependent vasorelaxation induced by L-carnitine in isolated aorta from normotensive and hypertensive rats. J Pharm Pharmacol 2002. 54: 1423–1427.

71. Rauchova H. effect of chronic L-carnitine treatment on blood pressure and plasma lipids in spontaneously hypertensive rats. Eur J Pharmacol 1998. 342: 235–239.

72. Ferrannini E. Interaction of carnitine with insulin-stimulated glucose metabolism in humans. Am J Physiol 1988. 255(6 Pt 1): 946–952.

73. Capaldo B. Carnitine improves peripheral glucose disposal in non-insulin-dependent diabetic patients. Diabetes Res Clin Pract 1991. 14(3): 191–195.

74. Erten G. Bağışıklık Sistemi ve Yetersizlikleri. Camcıoğlu Y. (Editör). 2013. 55–62.

75. Abbas A.K. Cellular and molecular immunology. USA, Elsevier Saunders. 2012.

76. Öksüz L. Otoimmün tip 1 diabets mellitusta CD45RA, CD45RO ve IL-12'nin önemi. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İmmünoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 1999.

77. Schoenborn JR. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. Advances in Immunol 2007. 96: 41–101

78. Schroder K. Interferon-gamma: An overview of signals, mechanisms and functions. Journal of Leukocyte. Biology 2004. 75: 163–189.

79. Li X. IL-35 is a novel responsive anti-inflammatory cytokine--a new system of categorizing anti-inflammatory cytokines. PLoS One, 2012. 7(3): 33628.

80. Abbas A.K. Cellular and Molecular Immunology. 6th ed. Philadelphia: Saunders; 2005.

81. Eskdale, J. Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. Immunogenetics, 1997. 46(2): 120–128.

82. Negishi K. Natural killer cell and islet killer cell activities in type 1 (insulin-dependent) diabetes. Diabetologia 1986. 29: 352–357.

83. Hussain MJ. Evidence that the reduced number of natural killer cells in type 1 (insülin-dependent) diabetes may be genetically determined. Diabetologia 1987. 30: 907–911.

84. Lorini R. Cytotoxic activity in children with insulin-dependent diabetes mellitus. Diabetes Res Clin Pract 1994. 23: 37–42.

85. Poorabbas A. Determination of free L-carnitine levels in type II diabetic women with and without complications. Eur J Clin Nutr 2007. 61: 892–895.

86. Ringseis R. Role of carnitine in the regulation of glucose homeostasis and insulin sensitivity: evidence from in vivo and in vitro studies with carnitine supplementation and carnitine deficiency. Eur J Nutr 2012. 51: 1 – 18.

87. Rees DA. Animal models of diabetes mellitus. Diabet Med 2005. 22: 359.

88. Poorabbas A. Determination of free L-carnitine levels in type II diabetic women with and without complications. Eur J Clin Nutr. 2007. 61(7): 892–895.

89. Bieber LL. Carnitine. Annu Rev Biochem 1988. 57: 261–283.

90. Hoppel C. The role of carnitine in normal and altered fatty acid metabolism. Am J Kidney Dis 2003. 41: 4–12.

91. Melegh B. L -carnitine replacement therapy in chronic valproate treatment. Neuropediatrics 1990. 21: 40–43.

92. Melegh B. Effects of oral L -carnitine supplementation in low-birth-weight prematüre infants maintained on human milk. Biol Neonate 1987. 51: 185–193.

93. Melegh B. Carnitine-dependent changes of metabolic fuel consumption during longterm treatment with valproic acid. J Pediatr 1994. 125: 317–321.

94. Vaz FM. Analysis of carnitine biosynthesis metabolites in urine by HPLCelectrospray tandem mass spectrometry. Clin Chem 2002. 48: 826–834.

95. Calvani M. Regulation by carnitine of myocardial fatty acid and carbohydrate metabolism under normal and pathological conditions. Basic Res Cardiol 2000. 95: 75–83.

96. Genuth SM. Plasma and urine carnitine in diabetic ketosis. Diabetes 1979. 28: 1083–1087

97. De PE. Plasma and urine free L- carnitine in human diabetes mellitus. Acta Diabetol Lat 1981. 18: 91–95.
98. Okuda Y. Postprandial changes in plasma ketone body and carnitine levels in normal and noninsulin- dependent diabetic subjects. Endocrinol Jpn 1987. 34: 415–422
99. Pregant P. No effect of insulin treatment or glycemic improvement on plasma carnitine levels in type 2 diabetic patients. Clin Investig 1993. 71: 610–612
100. Noland RC. Carnitine insufficiency caused by aging and overnutrition compromises mitochondrial performance and metabolic control. J Biol Chem 2009. 284: 22840–22852.
101. Cave MC. Obesity, inflammation, and the potential application of pharmaconutrition. Nutr Clin Pract 2008. 23: 16–34.
102. Proulx F. Acquired carnitine abnormalities in critically ill children. Eur J Pediatr 1997. 156: 864–869.
103. Ferrannini E. Interaction of carnitine with insulinstimulated glucose metabolism in humans. Am J Physiol 1988. 255: 946–952.
104. MacKay P. Spontaneous diabetes mellitus in the Bio-Breeding/Worcesterrat.Evidence in vitro for natural killer cell lysis of islet cells. J ClinInvest 1986. 77(3): 916–924.
105. Koevary SB. In vitro natural killer cell activity in the spontaneously diabetic BB/Worrat: effects of serum only sis of insulinoma cells. Diabetes Res.1988. 8(2): 77–84.
106. Nakamura N. Intrinsic cytotoxicity of natural killer cells to pancreatic islets in vitro. Diabetes 1990. 39(7): 836–843.
107. Brauner H. Distinct phenotype and function of NK cells in the pancreas of nonobese diabetic mice. J Immunol 2010. 184: 2272–2280.
108. Gur C. The activating receptor NKp46 is essential for the development of type 1 diabetes. Natr Immunol 2010. 11: 121–128.
109. Rodacki M. Altered natural killer cells in type 1 diabetic patients. Diabetes 2007. 56: 177–185.
110. Maruyama T. Anti-asialo GM1 antibody suppression of cyclophosphamide induced diabetes in NOD mice. Diabetes Res 1991. 17: 37–41
111. Maruyama T. The suppressive effect of anti-asialo GM1 antibody on low-dose streptozotocin-induced diabetes in CD-1 mice. Diabetes Res.1991. 16. 171–175
112. Ellerman K. Natural killer cell depletion and diabetes mellitus in the BB/Wor rat (revisited). Diabetologia 1993. 36: 596–601.
113. Edouard P. CD8+ T-cells are required for adoptive transfer of the BB rat diabetic syndrome. Diabetes. 1993. 42: 390–397.
114. Sobel DO. The role of NK cell activity in the pathogenesis of poly I:C accelerated and spontaneous diabetes in the diabetes prone BB rat. J Autoimmun 1995. 8: 843–857.
115. Poirot L. Natural killer cells distinguish innocuous and destructive forms of pancreatic işlet autoimmunity. Proc Natl Acad Sci U S A 2004. 101: 8102–8107.
116. Brilot F. NK cells interactions with dendritic cells shape innate and adaptive immunity. Front Biosci. 2008. 13: 6443–6454.
117. Martin-Fontecha A. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. Natr Immunol. 2004. 5: 1260–1265.
118. Zimmer J. NK cells and Treg cells: a fascinating dance cheek to cheek. Eur J Immunol. 2008. 38: 2942–2945.

119. Flodstrom-Tullberg M. Natural killer cells in human autoimmunity. Curr Opin Immunol. 2009. 21: 634–640.
120. Rodacki M. NK cells and type 1 diabetes. Clin Dev Immunol. 2006. 13: 101–107.
121. Tamamogullari N. Carnitine deficiency in diabetes mellitus complications. J Diabetes Complications 1999. 13: 251–253
122. Poorabbas A. Determination of free L –carnitine levels in type II diabetic women with and without complications. Eur J Clin Nutr 2007. 61: 892–895.
123. Adams SH. Plasma acylcarnitine profiles suggest incomplete long-chain fatty acid beta-oxidation and altered tricarboxylic acid cycle activity in type 2 diabetic African- American women. J Nutr 2009. 139: 1073– 1081.
124. Cederblad G. Plasma and urine carnitine in children with diabetes mellitus. Clin Chim Acta 1982. 125: 207–217.
125. Soltesz G. The relationship between carnitine and ketone body levels in diabetic children. Acta Paediatr Scand 1983. 72: 511–515.
126. Mamoulakis D. Carnitine deficiency in children and adolescents with type 1 diabetes. J Diabetes Complications 2004. 18: 271–274.
127. Moder M. The pattern of urinary acylcarnitines determined by electrospray mass spectrometry: a new tool in the diagnosis of diabetes mellitus. Anal Bioanal Chem 2003. 375: 200–210.
128. Pregant P. No effect of insülin treatment or glycemic improvement on plasma carnitine levels in type 2 diabetic patients. Clin Investig 1993. 71: 610–612.
129. Rodacki M. Altered natural killer cells in type 1 diabetic patients. Diabetes 2007. 56(1): 177–185.
130. Qin H. Natural killer cells from children with type 1 diabetes have defects in NKG2Ddependent function and signaling. Diabetes 2011. 60(3): 857–866.
131. Mehers KL. An increased frequency of NK cell receptor and HLA-C group 1 combinations in earlyonset type 1 diabetes. Diabetologia 2011. 54(12): 3062–3070.
132. Gur C. Recognition and killing of human and murine pancreatic beta cells by the NK receptor NKp46. J Immunol 2011. 187(6): 3096–3103.
133. Haskins K. Diabetogenic T-cell clones. Diabetes 1996. 45: 1299–1305.
134. Roep BO. The role of T-cells in the pathogenesis of Type 1 diabetes: from cause to cure. Diabetologia 2003. 46: 305–321.
135. Hostens K. Prolonged exposure of human β-cells to high glucose increases their release of proinsulin during acute stimulation with glucose or arginine. J Clin Endocrinol Metab 1999. 84: 1386–1390.
136. Schloot NC. Serum IFN-γ and IL-10 levels are associated with disease progression in non-obese diabetic mice. Diabetes Metab Res Rev 2002. 18: 64–70.
137. Andel M. Chronic mild inflammation links obesity, metabolic syndrome, atherosclerosis and diabetes. Vnitr Lek 2009. 55: 659–665.
138. Ray A. The role of inflammation on atherosclerosis, intermediate and clinical cardiovascular endpoints in type 2 diabetes mellitus. Eur J Intern Med 2009. 20: 253–260.
139. Antoniades C. Effects of insulin dependence on inflammatory process, thrombotic mechanisms and endothelial function, in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary atherosclerosis. Clin Cardiol 2007. 30: 295–300.

140. Pitsavos C. Association between low-grade systemic inflammation and type 2 diabetes mellitus among men and women from the ATTICA study. Rev Diabet Stud 2007. 4: 98–104.
141. Badawi A. Type 2 diabetes mellitus and inflammation: prospects for biomarkers of risk and nutritional intervention. Diabetes Metab Syndr Obes 2010. 3: 173–186.
142. Kempf K. Inflammation in metabolic syndrome and type 2 diabetes: impact of dietary glucose. Ann N Y Acad Sci 2006. 1084: 30–48.
143. Curtiss LK. Participation of innate and acquired immunity in atherosclerosis. Immunol Res 2000. 21: 167–176.
144. Jonasson L. Loss of natural killer cell activity in patients with coronary artery disease. Atherosclerosis 2005. 183: 316–321.
145. Culley FJ. Natural killer cells in infection and inflammation of the lung. Immunology 2009. 128: 151–163.
146. Baecher-Allan C. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. J Immunol 2001. 167: 1245–1253
147. Horwitz DA. The immunoregulatory effects of NK cells: the role of TGF-beta and implications for autoimmunity. Immunol Today 1997. 18: 538–542.
148. Kos FJ. Regulation of adaptive immunity by natural killer cells. Immunol Res 1998. 17: 303–312.
149. Akesson C. Altered natural killer (NK) cell frequency and phenotype in latent autoimmune diabetes in adults (LADA) prior to insulin deficiency. Clin Exp Immunol 2010. 161: 48–56.
150. Lorini R. Cytotoxic activity in children with insulin-dependent diabetes mellitus. Diabetes Res Clin Pract 1994. 23: 37–42.
151. Sobel DO. Gamma interferon paradoxically inhibits the development of diabetes in the NOD mouse. J Autoimmun. 2002. 19: 129.
152. Cnop M. Mechnisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type2 diabetes: many differences, few similarities. Diabetes 2005. 54 suppl. 2: 97.
153. Rasschaert J. Toll-like receptors and STAT-1 contribute to doublestranded RNA+interferon-gamma-induced apoptosis in primary pancreatic beta-cells. J. Biol. Chem. 2005. 280: 33984.
154. Suk K. IFN-gamma/TNF-alpha synergism as a final effector in autoimmune diabetes: a key role for STAT1/IFN regulatory factor-1 pathway in pancreatic beta-cell death. J Immunol. 2001. 166: 4481.
155. Campbell IL. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. Cytotoxicity to murine islets of Langerhans. J Immunol. 1988. 141: 2325.
156. Cardozo AK. IL-1b and IFN-g induce the expression of diverse chemokines and IL-15 in human and rat pancreatic islet cells, and in islets from prediabetic NOD mice. Diabetologia 2003. 46: 255–266.
157. Flodstrom-Tullberg M. Natural killer cells in human autoimmunity. Curr Opin Immunol. 2009. 21: 634–640.
158. Kuczyn´ski S. IL–15 is elevated in serum patients with type 1 diabetes mellitus. Diabetes Res Clin Pract 2005. 69: 231–236.
159. Winkler G. Increased interleukin-12 plasma concentrations in both, insulin-dependent and noninsulin-dependent diabetes mellitus. Diabetologia 1998. 41: 488.
160. Eizirik DL. The role of inflammation in insulitis and beta cell loss in type 1 diabetes. Nat Rev Endocrinol. 2009. 5: 219–226.

161. Feuerer M. How punctual ablation of regulatory T cells unleashes an autoimmune lesion within the pancreatic islets. Immunity 2009. 31(4): 654–664.
162. Staeva TP. Recent lessons learned from prevention and recent onset type 1 diabetes immunotherapy trials. Diabetes 2013. 62(1): 9–17.
163. Lee IF. Regulation of autoimmune diabetes by complete Freund's adjuvant is mediated by NK cells. J Immunol. 2004 172: 937–942.
164. Lee IF. Critical role for IFNgamma in natural killer cell-mediated protection from diabetes. Eur J Immunol. 2008. 38: 82–89.
165. Garzya G. Evaluation of the effects of L-acetylcarnitine on senile patients suffering from depression. Drugs Exp Clin Res 1990. 16: 101–106.
166. Barshes NR. Inflammation-mediated dysfunction and apoptosis in pancreatic islet transplantation: implications for intrahepatic grafts. Journal of Leukocyte Biology 2005. 77: 587–597.
167. Gregg RK. IL-10 diminishes CTLA-4 expression on islet-resident T cells and sustains their activation rather than tolerance. J Immunol 2005. 174: 662–670.
168. You S. Presence of diabetes-inhibiting, glutamic acid decarboxylase-specific, IL-10-dependent, regulatory T cells in naive non-obese diabetic mice. J Immunol 2004. 173: 6777–6785.
169. Arif S. Autoreactive T cell responses show proinflammatory polarization in diabetes but a regulatory phenotype in health. J Clin Invest 2004. 113: 451–463.
170. Balasa B. The paradoxical effects of interleukin 10 in the immunoregulation of autoimmune diabetes. J Autoimmun 1996. 9: 283–286.
171. Bach JF. Regulatory T cells under scrutiny. Nat Rev Immunol 2003. 3: 189–198.
172. Eskdale J. Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. Proc Natl Acad Sci U S A 1998. 95: 9465–9470.
173. Roep BO. Islet inflammation and CXCL10 in recent-onset type 1 diabetes. Clin Exp Immunol 2010. 159: 338–343.

ETİK KURUL KARARI

T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayı: 2013/ 13 31/01/2013

Sn: Prof. Dr. Günnur DENİZ
İÜ Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü

Karar No :2013/ 13

Başvuru :17.01.2013

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, aşağıda çalışma materyali belirtilen **Bio Perihan ŞEMİN** 'e ait "STZ Diyabetik Hayvanlarda L-Karnitinin Doğal Öldürücü Hücreler Üzerine Etkisi." isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul ilkelerine uygun bulunmuştur.

Çalışılacak Hayvanın	Türü	Sıçan
	Cinsiyeti	Erkek
	Sayısı	36 + 5
Proje Başlangıç/Bitiş Tarihi		BAP'tan destek sağlandıktan sonra/ Haziran 2013

Prof. Dr. Alev AKDOĞAN KAYMAZ
İ.Ü.HADYEK Başkanı

Prof. Dr. Mehmet YALTIRIK
İ.Ü.HADYEK Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. Pınar YAMANTÜRK ÇELİK
Üye

Prof. Dr. Ufuk ÇAKATAY
Üye

Doç. Dr. Alper OKYAR
Üye

Yard. Doç. Dr. Altan ARMUTAK
Üye

Uzm.Vet.Hek.Fatma TEKELİ
Üye

Mak.Yük.Müh. Yard.Doç.Dr.Burak OLGUN
Üye

Avukat Selma DEMİR
Üye

İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı İ.Ü. Veteriner Fakültesi Dekanlık katı A 221 nolu Oda Avcılar –İSTANBUL TEL : (0 212) 4737070/ 17031 E mail : hadyek@istanbul.edu.tr

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Perihan	**Soyadı**	ŞEMİN
Doğ.Yeri	Iğdır	**Doğ.Tar.**	29.03.1986
Uyruğu	T.C	**TC Kim No**	75004016272
Email	Perihan_semin@hotmail.com	**Tel**	0539 858 43 99

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mez. Yılı**
Doktora		
Yük.Lis.	İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İmmünoloji A.D.	2014
Lisans	İ.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2009
Lise	MEV Iğdır Anadolu Lisesi	2005

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
1.	Kısmı zamanlı çalışan öğrenci	İ.Ü. DETAE, İMMÜNOLOJİ A.D	2012-2013
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***	**KPDS/ÜDS Puanı**	**(Diğer) Puanı**
İngilizce	Orta	Orta	Orta	52,50	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
ALES Puanı	76,10586		
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**
Microsoft Office	İyi
SPSS 21	Orta
Graphpad 5	İyi

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Fotoğraf çekmek, takı tasarım