



DÜZCE ÜNİVERSİTESİ

T.C.

DÜZCE ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Streptozotocin ile İndüklenmiş Diyabetik Rat Modelinde
Carvacrol'ün Pankreas Hücrelerindeki İnsülin, PI3K/Akt
Yolağı ve GLUT-2 Ekspresyonu Üzerine Etkilerinin
Araştırılması**

DR. DAMLA IRMAK

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DÜZCE-2023



DÜZCE ÜNİVERSİTESİ

T.C.

DÜZCE ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Streptozotocin ile İndüklenmiş Diyabetik Rat Modelinde
Carvacrol'ün Pankreas Hücrelerindeki İnsülin, PI3K/Akt
Yolağı ve GLUT-2 Ekspresyonu Üzerine Etkilerinin
Araştırılması**

Dr. DAMLA IRMAK

Dr.Öğr.Ü. KAYIHAN KARAÇOR

Tez Danışmanı

DÜZCE-2023

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini paylaşan, tez çalışmasının yapımında ve yürütülmesinde desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam ve tez danışmanım Dr.Öğr.Ü. Kayıhan KARAÇOR'a; eğitim ve tez sürecimin her aşamasında desteği, yönlendirmeleri, sorduğum her soruda zaman ayırıp ilgilenmesi ve bilgi paylaşımıyla katkıları için değerli hocam Dr.Öğr.Ü. Hakan SOYLU'ya; tezime olan katkılarından dolayı üniversitemiz emekli öğretim üyesi Prof.Dr.Meryem ÇAM'a; tez çalışmalarımında destek ve yardımları için bölüm arkadaşlarım Dr. Nagehan ULAŞ, Dr. Emrah ŞEFLEK ve Eda Nur ALMALI'ya teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Aldığım her kararda destekleri ve sonsuz sevgileri için hayatta en büyük şansım olan canım annem Mamur SAYBAŞILI ve canım babam Osman Turgut SAYBAŞILI'ya teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez sürecimde desteği ve anlayışı ile hep yanımda olan değerli eşim Anılcan IRMAK'a ve varlığıyla yüzümü her durumda güldüren canım oğlum Gediz IRMAK'a teşekkür ediyorum.

Dr.Damla IRMAK

Ocak- 2023

ÖZET

Diabetes Mellitus, genetik yatkınlığa ek olarak yanlış beslenme, hareketsizlik ve obezite nedeniyle her yıl dünyada görülme sıklığı hızla artmakta olan önemli bir hastalıktır. Diyabetin yol açtığı komplikasyonların yaşam kalitesini düşürmesi nedeniyle tedaviyle kontrol altına alınması gerekmektedir. Kekik yağında bulunan Carvacrol'ün (CRV), antidiyabetik özelliği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Ancak pankreatik dokuda Carvacrol'ün bu etkiyi hangi yolak üzerinden gerçekleştirdiği bilinmemektedir. Bu nedenle çalışmamızda; CRV'nin kan glikozunu düşürücü etkisini ve bu etkisini hangi mekanizmayla gerçekleştirdiğini araştırmak için pankreatik dokuda PI3K/Akt yolağını, Glut-2 ve İnsülin proteinlerinin ekspresyon değişimini immünohistokimyasal yöntemler ile göstermeyi amaçladık. Bu amaçla 40 Wistar Albino rat rastgele 5 gruba ayrıldı: Sham, Kontrol CRV 40, STZ, STZ+CRV 40, STZ+CRV 20. Deney başlangıcında diyabetik gruplara 55 mg/kg STZ intraperitoneal uygulandı. CRV belirtilen dozlarda gavajla 6 hafta uygulandı. Deney süresince ratların kan glikoz düzeyi ve vücut ağırlıkları düzenli olarak ölçüldü. Deney sonucunda STZ grubuna kıyasla STZ+CRV 20 ve STZ+CRV 40 gruplarında kan glikoz düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı azalma tespit edildi. Diyabetik gruba CRV'nin 20 mg/kg dozunda 6 hafta uygulanmasının kan glikoz düzeyini düşürmede daha etkili olduğu bulundu. Diyabetik grupta azalan PI3K, pAkt, Glut-2 ve İnsülin protein ekspresyonlarının 20 mg/kg Carvacrol uygulanması ile anlamlı olarak arttığını immünohistokimyasal yöntemlerle gösterdik. Carvacrol'ün kan glikozunu düşürücü etkisini pankreatik dokuda PI3K/Akt yolağı üzerinden Glut-2 ve insülin ekspresyonunu artırarak gösterdiği sonucuna ulaştık.

Anahtar Kelimeler: Diabetes Mellitus, Pankreas, Langerhans adacığı, Streptozotosin, Carvacrol, İnsülin, PI3K, Akt, Glut2, İmmünohistokimya

ABSTRACT

Diabetes Mellitus is an important disease with a rapidly increasing incidence in the world every year due to malnutrition, inactivity and obesity in addition to genetic predisposition. Complications caused by diabetes should be controlled with treatment because it reduces the quality of life. The antidiabetic property of Carvacrol found in thyme oil has been shown in previous studies. However, it is not known through which pathway Carvacrol exerts this effect in pancreatic tissue. Therefore, in our study; in order to investigate the blood glucose lowering effect of CRV and the mechanism by which it achieves this effect, we aimed to show the PI3K/Akt pathway, the expression change of Glut-2 and Insulin proteins in pancreatic tissue by immunohistochemical methods. For this purpose, 40 Wistar Albino rats were randomly divided into 5 groups: Sham, Control CRV 40, STZ, STZ+CRV 40, STZ+CRV 20. At the beginning of the experiment, 55 mg/kg STZ was administered intraperitoneally to the diabetic groups. CRV was administered by gavage at the indicated doses for 6 weeks. During the experiment, blood glucose levels and body weights of the rats were measured regularly. As a result of the experiment, a statistically significant decrease in blood glucose level was detected in the STZ+CRV 20 and STZ+CRV 40 groups compared to the STZ group. It was found that the administration of CRV at a dose of 20 mg/kg for 6 weeks to the diabetic group was more effective in reducing blood glucose levels. We demonstrated by immunohistochemical methods that the decreased PI3K, pAkt, Glut-2 and Insulin protein expressions in the diabetic group increased significantly with the administration of 20 mg/kg Carvacrol. We concluded that Carvacrol exerts its blood glucose lowering effect by increasing Glut-2 and insulin expression in pancreatic tissue via the PI3K/Akt pathway.

Keywords: Diabetes Mellitus, Pancreas, Islet of Langerhans, Streptozotocin, Carvacrol, Insulin, PI3K, Akt, Glut2, Immunohistochemistry

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Önsöz.....	i
Özet.....	ii
Abstract.....	iii
İçindekiler.....	iv
Simgeler ve Kısaltmalar.....	vi
Şekiller Dizini.....	vii
1. Giriş ve Amaç.....	1
2. Genel Bilgiler.....	3
2.1.Pankreasın Anatomisi.....	3
2.2.Pankreasın Embriyolojisi.....	4
2.3.Pankreasın Histolojisi.....	8
2.3.1.Ekzokrin pankreas.....	8
2.3.2.Endokrin pankreas.....	10
2.3.2.1.Langerhans adacık hücre tipleri.....	10
2.3.3.Adacık aktivitesinin regülasyonu.....	12
2.4.Pankreasın Fizyolojisi.....	13
2.4.1.İnsülin Hormonu.....	13
2.4.1.1.İnsülinin kimyasal özellikleri ve sentezi.....	14
2.4.1.2.İnsülinin hedef hücrelerdeki etkisi.....	16
2.4.1.3.İnsülinin karbonhidrat metabolizması üzerindeki etkisi.....	17
2.4.1.4.İnsülinin yağ ve protein metabolizması üzerine etkileri.....	17
2.4.1.6.İnsülin sekresyon mekanizması.....	18
2.4.2.Glukagon Hormonu.....	20
2.4.3.Somatostatin Hormonu.....	20
2.5.Diabetes Mellitus.....	20
2.5.1.Diabetes Mellitus'un komplikasyonları ve patogenezi.....	22
2.6.Streptozotocin.....	23
2.7.Carvacrol.....	26
2.7.1.Carvacrol'ün farmokokinetik özellikleri ve kimyasal yapısı.....	26

2.7.2.Carvacrol'ün biyolojik özellikleri.....	27
2.8.PI3K.....	30
2.9.Akt (Protein Kinaz B).....	31
2.10.PI3K/Akt Yolağı.....	34
2.11.Glut-2.....	34
3.Gereç ve Yöntemler.....	38
3.1.Deney Hayvanları.....	38
3.2.Deney Grupları.....	38
3.3.Verilen Maddeler ve Dozları.....	39
3.4.Cerrahi Prosedür.....	39
3.5.Işık Mikroskopik İnceleme.....	40
3.5.1.Doku takibi ve parafin blok hazırlama.....	40
3.5.2.Hematoksilen-eozin boyama yöntemi.....	41
3.5.3.İmmünohistokimyasal boyama.....	42
4.Bulgular.....	45
4.1.Denek Ağırlıkları.....	45
4.2.Deneklerin Kan Glikoz Ölçümleri.....	47
4.3.Hematoksilen-Eozin Boyama.....	50
4.4.İmmünohistokimyasal Değerlendirme.....	54
4.4.1.İnsülin immünohistokimyasal boyama.....	55
4.4.2.PI3K immünohistokimyasal boyama.....	59
4.4.3.pAkt immünohistokimyasal boyama.....	63
4.4.4.Glut-2 immünohistokimyasal boyama.....	68
4.5.İmmünohistokimyasal Analiz.....	72
4.5.1.Anti-insulin antibody ile immünohistokimyasal analiz.....	73
4.5.2. Anti-PI3K antibody ile immünohistokimyasal analiz.....	74
4.5.3. Anti-pAkt antibody ile immünohistokimyasal analiz.....	75
4.5.4.Anti-Glut-2 antibody ile immünohistokimyasal analiz.....	76
5.Tartışma.....	77
6.Sonuçlar.....	87
7.Kaynaklar.....	88

SİMGELER ve KISALTMALAR

Akt:	Protein kinaz B
CCK:	Kolesistokinin
CRV:	Carvacrol
DM:	Diabetes mellitus
DNA:	Deoksiribonükleik asit
FDA:	Food and Drug Administration
FGF-2:	Fibroblast growth factor -2
GLUT-2:	Glucose transporter 2
GLUT-4:	Glucose transporter 4
IL-6:	Interleukin-6
IL-10:	Interleukin-10
IRS:	İnsülin reseptör substrat
I.P.:	Intraperitoneal
LD50:	50% Lethal doz
mTORC:	Mammalian target of rapamycin
PAX-4:	Paired box 4
PDK1:	Phosphoinositide-dependent kinase-1
PI3K:	Phosphoinositide 3 kinaz
PTEN:	Phosphatase and tensin homologue
ROS:	Reactive oxygen species
SHH:	Sonic hedgehog
TGF- β :	Transforming growth factor β
TNF- alfa:	Tumor necrosis factor α
T1DM:	Tip 1 Diabetes mellitus
T2DM:	Tip 2 Diabetes mellitus
TRPA1:	Transient receptor potential ankyrin 1
TRPM7:	Transient receptor potential melastatin 7
TRPV3:	Transient receptor potential vanilloid 3
VEGF-A:	Vascular endothelial growth factor A

Şekil Dizini

Şekil-1: Proinsülinin yapısı ve insülin oluşumu

Şekil-2: İnsülin reseptörünün diyagramı

Şekil-3: Pankreas β hücresinin glikoz uyarısı ile insülin sekresyon mekanizması

Şekil-4: Streptozotocin'in kimyasal yapısı

Şekil-5: Carvacrol'ün kimyasal yapısı

Şekil-6: Carvacrol'ün biyolojik etkileri

Şekil-7: PI3K/Akt yolağı

Şekil-8: PDX-1'in nükleustan sitoplazmaya yer değiştirmesinin oksidatif stres artışı ve FOXO aktivasyonu ile indüklenmesi

Şekil-9: Sitoplazmada PDX-1'in aktivitesinin azalması sonucunda Glut-2 ekspresyonunda azalma gerçekleşmesi ve hiperglisemiye tetikleyen kümülatif süreç

Şekil-10: Deney sonunda diseksiyonun gösterilmesi

Şekil-11: Grupların haftalara göre ağırlık değişiminin grafik ile gösterimi

Şekil-12: Deney hayvanlarının kafesleri

Şekil-13: STZ grubu

Şekil-14: STZ+CRV 20 grubu

Şekil-15: Grupların haftalık kan glikoz düzeyi değişiminin grafik ile gösterimi

Şekil-16: Grupların haftalık kan glikoz düzeyi analiz grafiğı

Şekil-17: Tüm grupların pankreas dokusunun Hematoksilen – Eozin boyaması (400x-100x)

Şekil-18: Sham grubunun Hematoksilen-Eozin boyaması (400x)

Şekil-19: Kontrol CRV 40 grubunun Hematoksilen-Eozin boyaması (400x)

Şekil-20: STZ grubunun Hematoksilen-Eozin boyaması (400x)

Şekil-21: STZ+CRV 40 grubunun Hematoksilen-Eozin boyaması (400x)

Şekil-22: STZ+CRV 20 grubunun Hematoksilen-Eozin boyaması (400x)

Şekil-23: Grupların anti-Insulin Antibody ile pozitif ve kontrol negatif boyaması (400x)

Şekil-24: Anti-Insulin Antibody ile Sham grubunun immünohistokimyasal boyaması (400x)

Şekil-25: Anti-Insulin Antibody ile Kontrol CRV 40 grubunun immünohistokimyasal boyaması (400x)

Şekil-26: Anti-Insulin Antibody ile STZ grubunun immünohistokimyasal boyaması (400x)

Şekil-27: Anti-Insulin Antibody ile STZ+CRV 40 grubunun immünohistokimyasal boyaması (400x)

Şekil-28: Anti-Insulin Antibody ile STZ+CRV 20 grubunun immünohistokimyasal boyaması (400x)

Şekil-29: Grupların anti-PI3K Antibody ile pozitif ve kontrol negatif boyaması (400x)

Şekil-30: Anti-PI3K Antibody ile Sham grubunun immünohistokimyasal boyaması (400x)

Şekil-31: Anti-PI3K Antibody ile Kontrol CRV 40 grubunun immünohistokimyasal boyaması (400x)

Şekil-32: Anti-PI3K Antibody ile STZ grubunun immünohistokimyasal boyaması (400x)

Şekil-33: Anti-PI3K Antibody ile STZ+CRV 40 grubunun immünohistokimyasal boyaması (400x)

Şekil-34: Anti-PI3K Antibody ile STZ+CRV 20 grubunun immünohistokimyasal boyaması (400x)

Şekil-35: Grupların anti-pAkt Antibody ile pozitif ve kontrol negatif boyaması (400x)

Şekil-36: Anti-pAkt Antibody ile Sham grubunun immünohistokimyasal boyaması (400x)

Şekil-37: Anti-pAkt Antibody ile Kontrol CRV 40 grubunun immünohistokimyasal boyaması (400x)

Şekil-38: Anti-pAkt Antibody ile STZ grubunun immünohistokimyasal boyaması (400x)

Şekil-39: Anti-pAkt Antibody ile STZ+CRV 40 grubunun immünohistokimyasal boyaması (400x)

Şekil-40: Anti-pAkt Antibody ile STZ+CRV 20 grubunun immünohistokimyasal boyaması (400x)

Şekil-41: Grupların anti-Glut-2 Antibody ile pozitif ve kontrol negatif boyaması (400x)

Şekil-42: Anti-Glut-2 Antibody ile Sham grubunun immünohistokimyasal boyaması (400x)

Şekil-43: Anti-Glut-2 Antibody ile Kontrol CRV 40 grubunun immünohistokimyasal boyaması (400x)

Şekil-44: Anti-Glut-2 Antibody ile STZ grubunun immünohistokimyasal boyaması (400x)

Şekil-45: Anti-Glut-2 Antibody ile STZ+CRV 40 grubunun immünohistokimyasal boyaması (400x)

Şekil-46: Anti-Glut-2 Antibody ile STZ+CRV 20 grubunun immünohistokimyasal boyaması (400x)

Şekil-47: Pankreas dokusu Langerhans adacığının anti-Insulin antikoru ile immünohistokimyasal boyanma yoğunluğunun analiz grafiği ile gösterilmesi.

Şekil-48: Pankreas dokusu Langerhans adacığının anti-PI3K antikoru ile immünohistokimyasal boyanma yoğunluğunun analiz grafiği ile gösterilmesi.

Şekil-49: Pankreas dokusu Langerhans adacığının anti-pAkt antikoru ile immünohistokimyasal boyanma yoğunluğunun analiz grafiği ile gösterilmesi.

Şekil-50: Pankreas dokusu Langerhans adacığının anti-Glut-2 antikoru ile immünohistokimyasal boyanma yoğunluğunun analiz grafiği ile gösterilmesi.



1.GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetes mellitus, hem gelişmiş ülkelerde hem de gelişmekte olan ülkelerde önemli bir halk sağlığı sorunudur¹. Son yıllarda, dünyanın neredeyse tüm bölgelerinde diyabet prevalansında büyük artışlar görülmüştür ve şu anda dünya çapında 415 milyon insan diyabetle yaşamaktadır². İnsülin etkisi ile insülin salınımı arasındaki feedback düzgün çalışmadığında; insülinin karaciğer, kas ve yağ dokusu gibi insüline duyarlı dokulardaki etkisi ve pankreas adacık β -hücreleri tarafından insülin salgılanması etkilenir, bu durum da anormal kan glikoz seviyeleri ile sonuçlanır³.

T1 Diabetes Mellitus(DM), otoimmün reaksiyonun bir sonucu olarak pankreatik beta hücre yıkımı ile karakterize iken; T2DM patogenezi, hedef dokularda insülin direncinin gelişmesi, genetik ve çevresel faktörlerin de kombinasyonu sonucunda beta hücre disfonksiyonu olarak tanımlanmaktadır⁴. Makroanjyopati, mikroanjyopati ve periferik vasküler komplikasyonları içeren vasküler disfonksiyonlar diyabette en sık görülen komplikasyonlardır ve diyabete bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir⁵.

Carvacrol, fenolik bir monoterpenoiddir⁶. Carvacrol, kekik, karabiber ve yabani bergamot gibi aromatik bitkilerin uçucu yağlarında bulunan, kekik kokusuna sahip monoterpenoid bir bileşiktir⁶. Carvacrol, uzun zamandır kekik esansiyel yağının bir bileşeni olarak kabul edilmektedir ve en çok araştırılan bileşenlerinden biridir⁷. Carvacrol, gıdalarda kullanılan, FDA onaylı bir maddedir. Carvacrol; antioksidatif⁸, anti-inflamatuvar⁸, TRPM7 iyon kanalı inhibisyonu⁹ ve ayrıca antimikrobiyal ve antitümör aktiviteler¹⁰ de dahil olmak üzere çeşitli biyoaktiviteleri düzenler.

Fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) 1985 yılında keşfedilmiş ve daha önce bilinmeyen bir fosfoinositid kinaz olarak tanımlanmıştır^{11,12}. AKT aktivasyonunun, hücresel transformasyona ve insülin tepkisine bağlı bir lipid kinaz olan PI3K'nin down regülasyonu sonucu olduğu bulunduğu, AKT sinyal yolağı ilgi odağı haline gelmiştir¹³. PI3K/AKT sinyali, organizmanın

gelişmesi ve glikoz homeostazi, lipid metabolizması, protein sentezi, hücre proliferasyonu gibi kritik hücresel süreçler sırasında büyüme faktörü sinyallerine aracılık ederek hücresel fizyolojide merkezi bir rol oynar¹⁴. Çok sayıda araştırma ile PI3K/AKT yolağının insülin sinyal iletimini düzenlemekle birlikte yağ ve kas dokusu ile karaciğerde glikoz alımını da uyardığı bulunmuştur^{15,16}.

Pankreatik beta hücrelerinde glikoz alımı, glikozla indüklenen insülin sekresyon mekanizmasında önemli bir yeri olan glikoz taşıyıcı izoform-2 (GLUT-2) tarafından kontrol edilir¹⁷. GLUTlar plazma membranından glikozun pasif geçişini kolaylaştırır¹⁸. GLUT-2 proteini; karaciğer hücrelerinin bazolateral membran yüzeylerinde, pankreas beta hücrelerinde, ince bağırsak ve böbrekte bulunur¹⁹. GLUT ailesinin diğer üyelerinden farklı olarak GLUT-2'nin yemek sonrasında önemli olduğu²⁰ ve glikoz homeostazında öncelikle yer aldığı düşünülmektedir²¹. Protein kinaz B(AKT); sitozolden dış membrana yer değiştirerek insülin aracılı GLUT-2/GLUT-4 aktivitesinin temel uyarıcısı olarak işlev görür^{22,23}.

Çalışmamızda Tip 1 diyabette Carvacrol'un kan glikozunu düşürücü ve pankreatik beta hücrelerindeki iyileştirici etkisinin PI3K/AKT yolağı üzerinden olup olmadığını araştırmayı amaçladık. Bu nedenle çalışmamızda diabetes mellitus ve diyabetik pankreasta Carvacrol etkisiyle PI3K/AKT yolağı üzerinden pankreas dokusundaki GLUT-2 ve insülin ekspresyon değişimini immünohistokimyasal yöntemler ile gösterdik.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Pankreasın Anatomisi

Pankreas, sağ tarafta duodenumun 'C' şeklinde kavislenmesinden sol tarafta dalak hilumuna kadar uzanan hem endokrin hem de ekzokrin bir organdır. Retroperitoneal bir organ olan pankreasın ağırlığı 80 gram, uzunluğu yaklaşık 20 cm'dir. Anatomik olarak: Baş, boyun, gövde ve kuyruk olmak üzere 4 kısımdan oluşmaktadır. Pankreasın baş bölgesinin sol alt kısmında uncinata process adı verilen bir çıkıntı bulunmaktadır²⁴. Uncinate process ile pankreasın gövdesi arasında pankreatik notch adında bir çentik bulunmaktadır. Pankreatik notch yapısından superior mezenterik arter ve ven geçmektedir²⁵. Uncinate process yapısının posteriorunda abdominal aorta, anteriorunda superior mezenterik damarlar yer alır. Splenik arter pankreas gövdesinin üst sınırı boyunca dalgalı bir seyirde ilerler²⁴.

Anterior yüzeyde pankreasın baş ile boyun bölümünü gastroduodenal arter sınırlamaktadır. Gövde bölümü, boyun ile kuyruk kısmının arasında yer alır ve üçgen şeklindedir. Kuyruk kısmı splenik damarlar ile lienorenal ligament içerisinde uzanır ve dalağın visceral yüzeyine temas eder²⁴.

Pankreatik kanal, kuyrukta küçük bir kanal olarak başlayıp gövde, boyun ve baş bölgelerinde ilerlerken eklenen dalların sayısı artar ve kanalın boyutu genişler. Pankreatik ana kanal, diğer bir adıyla Wirsung kanalı; duodenumun ikinci kısmındaki duodenal papillaya açılmaktadır. Baş bölgesinin alt kısmı ile uncinata process aksesuar pankreatik kanal (Santorini kanalı) tarafından drene edilmektedir. Santorini kanalı, duodenumun ikinci kısmına ana pankreatik kanaldan yukarıda bir bölgede açılır²⁴. Aksesuar pankreatik kanal duodenumun minör duodenal papillasına açılmaktadır. Duodenuma geçen bu pankreatik salgılar sindirim enzimlerini içeren ekzokrin özellikteki salgılardır²⁵.

Doğumdan itibaren yetişkinliğe kadar pankreasta Langerhans adacıklarının boyutu ve β hücrelerinin sayısı artmaktadır²⁶. Fetüste adacıklar kanallar ile yakın konumludur; yenidoğan ve yetişkinlerde ise adacıklar

kanallardan daha uzaktır²⁷. İnsanlarda pankreas, değişen hacim ve ağırlık ile yaklaşık 30 yaşına kadar büyümektedir²⁸.

Diffüz ve kompakt adacık olmak üzere iki farklı yapıda adacık tanımlanmaktadır. Pankreasın baş bölgesindeki adacıklar diffüz tiptedir. Diffüz tipte trabeküller kompakt adacıklara göre daha gevşek düzenlenmiştir. Pankreasın geri kalanı kompakt adacıklar olarak tanımlanmaktadır. Diffüz adacıklar kompakt adacıklardan daha geniştir ve daha fazla PP hücre içermektedir. Diffüz adacıklara göre kompakt adacıklarda çok daha fazla α , β ve δ hücreleri bulunmaktadır²⁹.

Pankreasın baş kısmının vaskülarizasyonu superior ve inferior pankreatikoduodenal arterler ile, gövde kısmının ise splenik arter ile sağlanır²⁴. Pankreatik β hücrelerden salınan VEGF-A'nın adacık kapillerlerini ve bu kapillerlerin pencereci endotel hücrelerini indüklemeye kilit bir rolü olduğu gösterilmiştir³⁰. Langerhans adacığının perfüzyonu nöronal ve hormonal yol ile düzenlenmektedir³¹. Endokrin pankreasın kanlanması her adacık için 1 ila 5 arteriyol ile sağlanmaktadır. Arteriyoller adacık etrafında kapillerlere ayrılarak glomerulusa benzeyen küre biçiminde vasküler bir yapı oluşturur^{31,32}. Adacıklar arteriyel dolaşım ile paralel bir şekilde iletişim halindedir bu durum da bütün adacıkların aynı anda aynı hormonal uyarıyı almalarını sağlar³³. Baş ve boyun bölümünün venöz drenajı portal vene olmaktadır. Gövde ve kuyruk kısmından gelen kan splenik vene drene olur. Splenik ven, superior mezenterik ven ile birleşerek portal veni oluşturmaktadır²⁴.

Pankreasın dorsal ve ventral kısımlarının innervasyonları farklıdır. Sempatik innervasyonu; dorsal pankreas çölyak gangliyonundan, ventral pankreas ise superior mezenterik gangliyonundan almaktadır. İnsülin salgısı parasempatik uyarılar ile artmaktadır³⁴.

2.2. Pankreasın Embriyolojisi

Hepatik divertikulumun karşısındaki dorsal mezenterde 26. günde başka bir duodenal tomurcuk büyümeye başlar. Bu endodermal divertikül, dorsal

pankreatik tomucuğudur ve dorsal pankreası oluşturacaktır. Dorsal pankreatik tomurcuk dorsal mezentera doğru uzarken; başka bir endodermal divertikül olan ventral pankreatik tomurcuğu, gelişmekte olan safra kesesinin hemen kaudalinde ventral mezenterin içinde gelişmeye başlar. Ventral pankreatik tomurcuk ventral pankreası oluşturmaktadır³⁵.

Duodenum sağ tarafa doğru rotasyon yaptığı zaman “c” şeklini almaktadır. Ventral pankreatik tomurcuk safra kesesiyle birlikte dorsale yer değiştirir. Ventral tomurcuk, dorsal tomurcuğun posteriorunda konumlanır, ilerleyen zamanda ventral ve dorsal tomurcuklar birleşir³⁶. Dorsal pankreatik tomurcuk; pankreasın başını, gövdesini ve kuyruğunu oluştururken, ventral pankreatik tomurcuk çengel benzeri unsinat prosesi meydana getirmektedir. Pankreas dorsal vücut duvarıyla birleşir ve sekonder olarak retroperitoneal hale gelir³⁵.

Sindirim enzimlerini üreten pankreatik asiner hücreler, bu enzimleri taşıyan pankreatik duktal hücreler ve Langerhans adacıklarındaki pankreas endokrin hücrelerinin tamamı pankreatik tomurcukların endoderminden farklılaşmaktadır³⁵.

İntrauterin yaklaşık 10. haftada insülin salgılanmaya başlamaktadır. Öncesinde glukagon ve somatostatin içeren hücreler oluşmaktadır. Daha sonra beta hücreleri farklılaşarak insülin salgılamaya başlar³⁶. Glukagon ve somatostatini oluşturan hücreler gestasyonun 8. haftasında; pankreatik polipeptit ve ghrelini oluşturan hücreler ise gestasyonun 9. haftasında ortaya çıkmaktadır³⁷. Pankreasın bağ doku yapısındaki kılıfı ve lobüller arası septası, pankreasın etrafındaki splanknik mezenkimden köken almaktadır³⁶.

Epitel kümeler oluşur ve ardından intraepitelyal mikrolümenler oluşur. Bu mikrolümenler kısa süre içerisinde bir araya gelerek birleşir ve kesintisiz lümenler oluşturur. Böylelikle ekzokrin ürünleri duodenuma boşaltan bir kanal sistemi oluşmaktadır³⁵.

Ventral ve dorsal pankreatik tomurcuklar birleştiği zaman bu iki yapının kanal sistemleri de birbirine bağlanmaktadır. Dorsal tomurcuğu duodenuma bağlayan kanalın proksimal kısmı genellikle dejenere olur. Hem ventral hem

de dorsal pankreas için duodenuma açılan tek kanal artık, ana pankreatik kanal olmaktadır. Ana pankreatik kanal ve ortak safra kanalı, majör duodenal papilla veya Vater ampullasında biraraya gelerek salgılarını duodenuma boşaltır. Bazı bireylerde ise proksimal dorsal pankreatik kanal varlığını sürdürür. Aksesuar pankreatik kanal olarak isimlendirilen bu kanal minör duodenal papilla ile duodenuma açılmaktadır³⁵. Ana pankreatik kanal ve aksesuar pankreatik kanal çoğunlukla birbiriyle bağlantılı olan iki kanaldır. Fakat insanların 9%'unda bu iki pankreatik kanal birleşemez ve iki ayrı kanal olarak varlığını sürdürür³⁶.

Pankreatik tomurcuklar birleşemediği zaman; pankreas gelişiminin en sık görülen konjenital varyantı olan pankreas divisium (anüler pankreas) meydana gelmektedir. Pankreas divisium popülasyonda 10%, ERCP işlemi yapılan hastalarda 3-7% oranında görülmektedir^{38,39}.

İnsanlarda pankreasın gelişimindeki transkripsiyon faktörlerinin birbiriyle bağlantısı diğer memeli canlılardakine benzemektedir. İnsan embriyosunda intrauterin 4. haftada gelişim ile ilgili olan sonic hedgehog (Shh) ve PDX1 (pancreatic and duodenal homeobox factor-1) tespit edilebilmektedir⁴⁰. Gestasyonun 12 ile 41. haftaları arasında farklılaşmış pankreas adacık hücrelerinin proliferasyonu çok düşük seviyededir⁴¹.

Pankreatik tomurcukların genişlemesi ve dallanması ile pankreas epiteli, PDX1'i düzenli ve homojen bir şekilde eksprese eden kıvrımlı tabakalardan oluşmaktadır. Bu epitelden pankreasın endokrin ve ekzokrin hücreleri oluşmaktadır. Notch sinyali, pankreatik hücre farklılaşmasına aracılık ederek önemli bir rol oynamaktadır. Pankreas endodermindeki Notch sinyalinin aşağı akış hedeflerinden biri Hes1'dir (Hairy and enhancer of split like 1). Bu transkripsiyon faktörü, nörogenin/NeuroD ailesinin bir üyesi olan proendokrin bHLH transkripsiyon faktörü nörogenin-3'ü (Neurog3) aşağı doğru düzenler. Neurog3, pankreas endoderminin dağınık hücrelerinde eksprese edilir ve pankreas gelişimi boyunca ve hatta doğum sonrasında endokrin progenitör hücrelerde ekspresyonu devam eder. Neurog3'ten yoksun fareler, pankreatik endokrin hücreleri geliştirmekte yetersiz olmakla birlikte aynı zamanda

bağırsak enteroendokrin hücrelerinin ve mide endokrin hücrelerinin de gelişimi başarısız olmaktadır. Neurog3, notch sinyalinin yokluğunda pankreatik epitelde endokrin yolağı başlatmak için yeterli olan bir proendokrin transkripsiyon faktörüdür³⁵. PDX-1 geninde homozigot nokta mutasyonu, çerçeve kaymasına neden olarak pankreas agenezine neden olmaktadır. Pankreas agenezisi ekzokrin pankreas yetmezliği ve hiperglisemi ile sonuçlanmaktadır⁴⁰.

Ptf1 (pancreas specific transcription factor-1) kompleksi, erken dönemde pankreatik köken özelleşmesi ve daha sonrasında asiner pankreasın farklılaşması için önemlidir. Ptf1 kompleksinin Ptf1a (p48) bileşenine sahip olmayan farelerde asinüs veya duktal epitel gelişmezken, komşu mezenkim içerisinde pankreatik adacıklar oluşmaya devam etmektedir³⁵.

Alfa ve beta hücrelerinin spesifikasyonu, Pax4 ve Arx (aristaless related homeobox) ekspresyonunun göreceli miktarına bağlı olabilir. Yapılan son araştırmalar, Arx ekspresyonuna kıyasla daha yüksek Pax4 ekspresyon düzeylerinin beta/delta hücre dönüşümünü desteklediğini, oysa daha yüksek Arx ekspresyon düzeylerinin alfa hücre spesifikasyonunu desteklediğini göstermektedir. Bu nedenle; Pax4 ve Arx ekspresyonu arasındaki denge, beta veya alfa hücre serisini belirlemede anahtar rolünde gibi görünmektedir. Nkx2.2 ve Nkx6.1, beta hücre spesifikasyonunu desteklemek için hareket eder³⁵.

Neurog3'ün doğrudan transkripsiyonel hedefi ve bir transkripsiyon faktörü olan NeuroD1, spesifikasyonlarından sonra pankreasın tüm endokrin hücrelerinde eksprese edilmektedir. NeuroD1, adacığın farklılaşmış endokrin ürünlerinin (insülin gibi) ekspresyonuna aracılık etmede önemli bir rol oynamaktadır. NeuroD1 geninden yoksun fareler, adacık hücre tiplerinin normal tamamlayıcısını geliştirir, ancak doğumdan sonra beta hücre maturasyonu yetersizdir. İnsanlarda NeuroD1'deki mutasyonlar, β hücrelerinin kan glikoz seviyelerine karşı duyarsız hale geldiği veya yeterli miktarda insülin sentezleyemediği MODY ile ilişkilidir. NeuroD1'deki mutasyonlar ayrıca insanlarda tip 2 DM ile de ilişkilidir³⁵.

Beta hücre özelleşmesinde yer alan başka bir transkripsiyon faktörü de MafA'dır (v-Maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A). MafA ekspresyonu, erken dönemde pankreastaki beta hücreleri ile sınırlıdır. İnsülin promotörünün güçlü bir aktivatörüdür ve Nkx6.1'in down regülasyonunda işlev gördüğü bilinmektedir³⁵.

2.3. Pankreasın Histolojisi

Pankreas 25 cm uzunluğunda, 150 gram ağırlığında ve bağ dokusu kapsülü ile sarılı bir organdır⁴². Pankreas hem sindirim enzimlerini hem hormonları üreten ekzokrin ve endokrin özellikte karma bir bezdir. Duodenuma yakın geniş bir baş bölgesi ve sola doğru uzanan daha dar gövde ve kuyruk bölgelerine sahip olan uzunlamasına bir retroperitoneal organdır. Pankreas, büyük damar ve kanalları örtmek ve parankimi lobüllere ayırmak için septanın uzandığı ince bir bağ dokusu kapsülüne sahiptir. Salgı asinusları, yalnızca zengin kapiller ağ ile ince bir retiküler lif kılıfı tarafından desteklenen bir bazal lamina ile çevrilidir. Pankreasın endokrin fonksiyonu; öncelikli olarak enteroendokrin hücrelerden daha küçük hücreler içeren ve değişen büyüklükte gruplar şeklinde bulunan Langerhans adacıklarından oluşmaktadır. Sindirim enzimleri; pankreasın daha büyük olan ekzokrin bölümünde seröz asinus hücreleri tarafından üretilir⁴³.

2.3.1. Ekzokrin pankreas

Seröz bez yapısında olan ekzokrin pankreasın salgı bezleri asiner tiptedir. Salgı bezlerinin tek katlı epiteli, piramidal seröz hücrelerden oluşur. Piramidal seröz hücrelerin bazal yüzeyi geniş, luminal yüzeyi ise dardır. Minimal derecede periasiner bağ dokusu bulunmaktadır⁴⁴. Pankreasın büyük bölümünü oluşturan ekzokrin kısmı enzimden zengin alkali sıvı salgılar. Bu sıvı, pankreatik kanal aracılığıyla duodenuma aktarılmaktadır⁴⁵.

Asinus yapısı interkalar kanal ile devam etmektedir. İnterkalar kanal asinusta başlar. Asinus lümenindeki kanal hücrelerine sentroasiner hücreler denilmektedir. Asiner hücrelerin sitoplazmasının bazal kısmı yoğun bazofiliktir. Apikal kısmında ise asidofilik zimojen granülleri yer almaktadır. Sentroasiner hücreler eozin ile soluk boyanma gösterirler. Bu durumun nedeni bu hücrelerde ergasitoplazma ve salgı granüllerinin bulunmamasıdır. Açık renkli boyanma, rutin histolojik kesitlerde bu hücrelerin seçilmesinde kolaylık sağlamaktadır⁴⁴.

Zimojen granüllerde bulunan sindirim enzimleri inaktif özelliktedir ve ince bağırsak lümeninde aktif forma geçerler⁴⁴. Pankreatik asiner hücrelerden salgılanan enzimler: RNase, DNase, lipaz ve amilazdır. İnaktif formdaki proenzimler ise: Elastaz, kimotripsinojen, tripsinojen ve prokarboksipeptidazdır. Asiner hücreler tripsinojenin sitozolde aktive olmasını engellemek için tripsin inhibitörü salgılayarak kendilerini korurlar⁴².

Asiner hücrelerden oluşan asinusun lümeninde birkaç sentroasiner hücre bulunur ve bu hücreler pankreatik kanal sisteminin başlangıcını oluşturmaktadır. Asiner hücreler, apikal bölgesinde proenzimler ile dolu olan zimojen granüller içerir ve hücrenin şekli tepesi kesilmiş piramitlere benzemektedir. Her asiner hücrenin bazal membranında kolesistokininin ve asetilkolin için reseptörler bulunmaktadır⁴².

Her asinusun sentroasiner hücreleri, interkalar kanal ile devamlılık gösterir. İnterkalar kanalların birçoğu birleşerek intralobüler kanalları; intralobüler kanallar da birleşerek interlobüler kanalları oluşturmaktadır. İnterlobüler kanallar ana pankreatik kanala drene olmaktadır. Ana pankreatik kanal safra kesesinden gelen ortak safra kanalı ile birleşerek duodenumda Vater papillasını oluşturur⁴².

Pankreasın ekzokrin salgısı, duodenumun enteroendokrin hücreleri tarafından üretilen iki polipeptid hormon, sekretin ve kolesistokininin ile düzenlenir. Kolesistokininin asiner hücrelerden enzim salgılanmasını uyarır. Sekretin ise kanal hücrelerinden su ve bikarbonat salgılanmasını artırır⁴³. Pankreas otonomik innervasyon etkisinde de olan bir organdır. Sempatik sinir

sistemi pankreasın kan akışını regüle eder; parasempatik sinir sistemi hem sentroasiner hem de asiner hücrelerin faaliyetini uyarır⁴⁴.

2.3.2. Endokrin pankreas

Endokrin pankreas yaklaşık 1 milyon Langerhans adacığından oluşmaktadır. Her bir adacığın etrafı ince, retiküler bir lif kılıfıyla sarılmıştır. Langerhans adacıklarında zengin vasküler kaynak olarak insuloasiner portal sistem bulunmaktadır⁴².

Langerhans adacıklarının boyutları değişkenlik gösterir. Adacıkların en çok sayıda bulunduğu yer pankreasın kuyruk bölümüdür. Adacıklarda farklı polipeptit hormonların salgılamasında görevli çeşitli hücre tipleri bulunmaktadır. Langerhans adacıkları, çok sayıda fenestralı kapiller içeren ince kolajen bir ağ ile desteklenmekte ve yaklaşık 3000 salgı hücresinden oluşmaktadır. Adacıkları çevreleyen ekzokrin pankreatik asinusların büyük hücreleri koyu boyanmaktadır. Endokrin hücreler ise küçüktür ve granüllü sitoplazmaları soluk boyanır⁴⁶.

Endokrin pankreas, çeşitli tipte salgı yapan hücreler içermektedir. Hücre tiplerinin birbirinden ayrımı için hematoksilen-eozin boyaması yeterli değildir⁴⁶. Hematoksilen-eozin ile boyanmış kesitlerde hücrelerin ayrımında hücre boyutu ve bazofilinin varlığı yardımcı olabilir⁴⁷. Hücrelerin birbirinden ayrımı için özel boyama yöntemleri gerekmektedir. Alfa, beta ve delta hücreleri sırasıyla; glukagon, insulin ve somatostatin salgılamaktadır. Hücrelerin salgıladığı hormonun, insülin ve glukagon gibi, immünohistokimyasal teknikler ile tespit edilmesi hücre tipi ayrımında daha doğru sonuçlar vermektedir⁴⁶.

2.3.2.1. Langerhans adacık hücre tipleri

Langerhans ana adacık hücreleri en kolay şekilde immünohistokimyasal boyama yöntemiyle tanımlanır ve incelenir. α (A), β (B) ve δ (D) hücreleri olmak üzere üç ana hücre tipi vardır⁴⁷.

İnsanlarda pankreas adacık hücrelerinin 60-70%'ini β hücreleri oluşturmaktadır. İnsülin salgılayan β hücreleri çoğunlukla adacıkta santral yerleşimlidirler. β hücresindeki salgı granüllerinin boyutu yaklaşık 300 nm çapındadır. Salgı granülünün açık renkli bir matriksi ve santralde polihedral bir yapısı bulunmaktadır. Santraldeki polihedral yapının, kristalize insülin olduğu tahmin edilmektedir⁴⁴.

Küçük bir protein olan insülin, önce preproinsülin olarak granüllü endoplazmik retikulumda sentezlenir. Preproinsülin parçalanarak proinsülini oluşturur. Proinsülin Golgi apparatusunda tekrar parçalanır ve insülini oluşturur. İnsülin, az miktarda bölünmemiş proinsülin ile membrana bağlı sekretuar granüller şeklinde paketlenir ve sekresyon uyarısına kadar sitoplazmada kalır⁴⁶.

α hücreleri primer olarak glukagon salgılar. α hücreleri çoğunlukla periferik yerleşim gösterir. Adacık hücrelerinin yaklaşık 20%'sini oluşturmaktadır⁴⁷.

Somatostatin salgılayan δ hücreleri daha az miktardadır, adacık hücrelerinin 5-10%'unu oluşturmaktadır ve hücreler adacık içerisinde dağınık yerleşim gösterir⁴⁷.

Pankreas adacık dokusunun 5%'i minör adacık hücrelerinden meydana gelmektedir. Bu hücreler, Mallory-Azan boyama tekniği ile açık renkli boyanmış hücreler olarak görülmektedir⁴⁴. Adacıktaki minör hücre tiplerinden biri pankreatik polipeptit salgılayan PP hücreleridir. PP hücreleri daha çok pankreasın baş bölgesinde yer almaktadır⁴⁷. Bir diğer hücre tipi de enterokromafin hücrelerdir ve bu hücreler motilin, substans P, 5-HT ve serotonin gibi farklı birkaç peptit salgılar⁴⁶. Adacıktaki hücrelerin bilinenden farklı hormon tipinde de salgı yapabileceği bulunmuştur. Yapılan immünohistokimyasal çalışma ile; α hücresinde glukagon haricinde gastrin inhibitör peptit (GIP), kolesistokinin (CCK) ve adrenokortikotropin hormon (ACTH) – endorfin hormonlarının da olduğu tespit edilmiştir. Adacıkta G hücrelerinin bulunması ile ilgili net sonuçlar bulunmamaktadır. Fakat adacık hücrelerinden gastrin hormon salgısı da olduğu düşünülmektedir⁴⁴.

Küçük boyuttaki Langerhans adacıkları daha çok sayıda β hücresi içermektedir. Büyük adacıklarda ise α ve β hücrelerinin sayısı birbirine yakındır^{48,49}.

2.3.3. Adacık aktivitesinin regülasyonu

Kandaki glikoz düzeyinin 70 mg/100 mL (70 mg/dL)'den fazla olması pankreatik beta hücrelerinden insülin sekresyonunu uyarır. İnsülin artışı; kas ve karaciğerin glikoz alımına ve burada depolanmasına neden olur. İnsülin salınımı kan glikoz düzeyindeki azalma ile durmaktadır⁴⁴.

İnsülin sekresyonunu uyarıcı etmenlerden biri kanda yağ asidi seviyesindeki yükseldir. Bir diğeri ise dolaşımda bulunan gastrin, CCK ve glukagon hormonlarıdır. Glukagon ve CCK, α hücrelerinden salgılanır. Bu iki hormon, insülin sekresyon artışını parakrin etkisiyle uyarır. Glukagon sekresyonunu uyarıcı etken ise kandaki glikoz düzeyinin 70 mg/dL'den düşük olmasıdır. İnsülin hormonunun tam tersi olarak; kanda yağ asit seviyesindeki düşüş glukagon salgılanmasını uyarır. Alfa hücrelerinden glukagon salgısını azaltan faktörlerden biri de insülin⁴⁴.

Sempatik ve parasempatik etki altında olan adacık hücrelerinin 10%'unun plazma membranında sinir sonlanması yer alır. Bu sinir sonlanmalarında sinaptik transmitterler ile oluşan iyonik değişimler meydana gelir. İyonik aktivite, adacık içerisinde oluklu bağlantılar aracılığıyla iletilmektedir⁴⁴.

Sempatik sistem glukagonu artırırken insülini inhibe etmektedir; parasempatik sistem ise insülin ve glukagon hormon sekresyonunu artırmaktadır⁴⁴. Yapılan bir çalışmada, sempatik innervasyonun; adacık yapısının mimarisinde ve gelişme döneminde maturasyonunda önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir⁵⁰.

Sempatik sinirler; prevertebral çölyak ve superior mezenterik gangliyalardan orijin alan splanchnik sinirler ile pankreasa ulaşmaktadır^{51,52}. Pankreasın parasempatik innervasyonu ise vagus sinirinin dorsal motor

nükleusundan köken almaktadır⁵¹. Parasempatik sinirler; farede α ve β hücreleriyle direkt temasta bulunarak pankreas adacıklarını yoğun şekilde innerve etmektedir fakat insan pankreas adacıklarında innervasyon aralıktır ve kan damarlarını takip etmektedir⁵³. Memelilerde vagal sinirin uyarılması kan dolaşımında hem glukagon hem de insülin artışı ile sonuçlanmaktadır⁵¹.

2.4. Pankreasın Fizyolojisi

Pankreas hem ekzokrin hem de endokrin bez yapısındadır. Ekzokrin kısmı pankreatik sıvıyı salgılayan asinüslardan ve bu enzimatik sıvıları duodenuma taşıyan kanal sisteminden oluşmaktadır. Langerhans adacıklarından oluşan endokrin kısım ise kana hormon salgılamaktadır⁵⁴. İnsanlarda pankreas 1 ila 2 milyon Langerhans adacığı içermektedir. Adacık çapı yaklaşık 0.3 mm'dir. Adacık, morfolojik ve boyanma özellikleriyle birbirinden farklı alfa, beta ve delta hücreleri olmak üzere 3 majör hücre tipinden oluşmaktadır⁵⁵.

Adacıktaki hücrelerin büyük kısmı 60% oranıyla β hücreleridir. β hücrelerinden insülin hormonu salgılanmaktadır. Langerhans adacık hücrelerinin 25%'ini alfa hücreleri, 10%'unu da delta hücreleri oluşturmaktadır. Alfa hücrelerinden glukagon; delta hücrelerinden de inhibisyon etkisi olan somatostatin enzimi salgılanmaktadır. Adacıkta seyrek bulunan PP hücrelerinden pankreatit polipeptit enzim sekresyonu olmaktadır. Bu enzimin fonksiyonu net olarak bilinmemektedir⁵⁵.

2.4.1. İnsülin hormonu

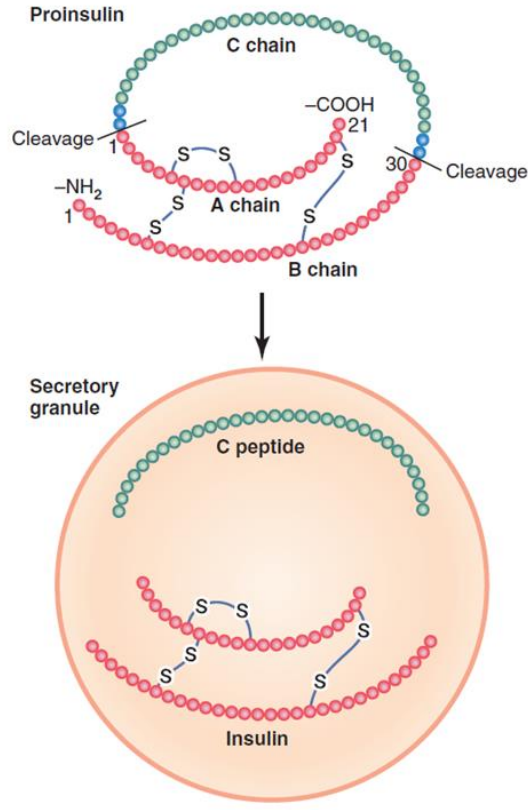
Salgılanan insülin, moleküler ağırlığı 5.8 kDa olan 51 amino asitten oluşur⁵⁶. Küçük bir protein olan insülin, disülfid bağı ile birbirine bağlı iki aminoasit zincirinden oluşmaktadır. İki zincir birbirinden ayrıldığı zaman insülinin aktivitesi sona ermektedir. İnsülin sekresyonu kan glikoz düzeyinin artışı ile aktiveleşir. Diyet ile yüksek enerji veren karbonhidratların fazla miktarda tüketilmesi insülin sekresyonunu uyarır. Karbonhidrat fazla alımında, karaciğer

ve kaslarda glikojen formunda depolanır. Aşırı miktarda glikoz olması durumunda insülin uyarısıyla yağa dönüşerek adipoz dokuya yerleşir. İnsülin, aminoasitlerin hücre içine alımını artırmaktadır. Aminoasitlerden protein sentezini direkt destekleyici bir molekül olan insülin, hücre içindeki proteinin yıkımını da engellemektedir⁵⁵.

2.4.1.1. İnsülinin kimyasal özellikleri ve sentezi

İnsülin geni, preproinsülin olarak bilinen 110 amino asitlik bir prekürsör kodlar. Preproinsülin; sitozolik ribonükleoprotein sinyal tanıma partikülleri (SRP) ile etkileşime giren hidrofobik bir N-terminal sinyal peptidi içermektedir⁵⁶. SRP, granüllü endoplazmik retikulum membranından lümene preproinsülin translokasyonunu kolaylaştırır. Bu süreç, peptit ileten kanal aracılığıyla gerçekleşir^{57,58}. Burada preproinsülin sinyal peptidi, proinsülin oluşturmak için sinyal peptidaz tarafından bölünür⁵⁹. Proinsülin: A, B, C isimli 3 peptit zincirinden oluşmaktadır. Proinsülinin büyük bir kısmı golgi apparatusunda bölünür. Sonuçta salgı granüllerinde birlikte bulunan insülin ile C-peptit oluşur. İnsülin, birbirine sülfid bağı ile bağlanmış A ve B peptit zincirinden oluşmaktadır. C zincir peptidi ise C-peptit (connecting peptide) olarak adlandırılmaktadır. İnsülin ve C-peptit, eş molar miktarlarda salgınır (Şekil -1). En son salgı ürününün 5-10%'u proinsülin yapısındadır. Proinsülin ve C-peptidin insülin aktivitesi bulunmamaktadır⁵⁵.

C-peptit, G-proteine bağlı membran reseptörüne bağlanarak 2 enzim yolağının uyarılmasına neden olmaktadır. Bunlar: Sodyum-potasyum adenozin trifosfat ve endotelial nitrik oksit sentaz enzimleridir. C-peptit düzeyi radioimmunoassay yolu ile ölçülebilmektedir. İnsülin üretimi olmayan T1DMli kişilerde C-peptit seviyesi çok düşük olmaktadır⁵⁵.



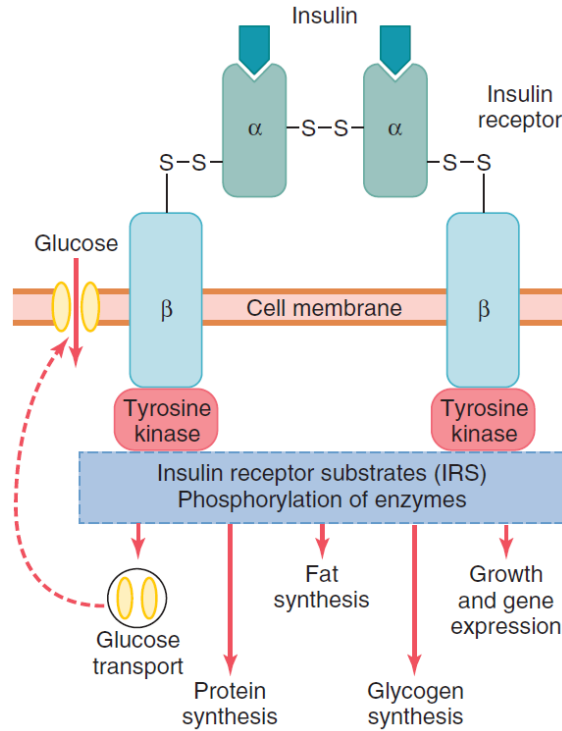
Şekil-1: Proinsülinin yapısı ve insülin oluşumu⁵⁵.

Farelerde her bir β hücresinde yaklaşık 13.000 insülin sekresyon granülü bulunmaktadır. Bu sayı toplam hücre hacminin 10%'undan fazlasını kapsar⁶⁰. Her bir sekresyon granülü yaklaşık 200.000 insülin molekülü içermektedir⁶¹.

İnsülin kanda serbest halde bulunmaktadır. Plazmadaki yarı ömrü yaklaşık 6 dakikadır. Bu nedenle dolaşımdan temizlenmesi 10-15 dakika sürer. İnsülinin hedef hücrelerdeki reseptörlere bağlanan kısmı hariç; insülin, insülinaz enzimi ile esas olarak karaciğerde parçalanır. Daha az miktarda da böbrek ve kaslarda parçalanır⁵⁵.

2.4.1.2. İnsülinin hedef hücrelerdeki etkisi

İnsülin hedef hücrelerde etkisini göstermek için membran reseptörüne bağlanır ve onu aktive eder. Aktive olan reseptör sonraki mekanizmaları uyarır. İnsülin reseptörü disülfid bağı ile birbirine bağlı 4 alt birimden oluşmaktadır. 2 alfa alt birimi hücre membranının dış tarafında yer alır. 2 beta alt birimi ise hücre membranını geçerek hücre içi sitoplazmaya protrüzyon gösterir. İnsülin, insülin reseptörünün membran dışındaki alfa subunitine bağlanır. Disülfid bağlarının etkisiyle beta subuniti de bu durumdan etkilenir. Ve beta subunitinin hücre içine protrüzyon gösteren kısmı otoposforile olur. İnsülin reseptörü, enzim-bağlı reseptörlere aittir. Otoposforile olan beta alt birimi, tirozin kinazı uyarır. Bu aktivasyon insülin reseptör substratları (IRS) gibi birçok intrasellüler enzimin fosforilasyonu ile sonuçlanır (Şekil-2). Farklı IRS (IRS-1, IRS-2, IRS-3) tipleri farklı dokularda etkinlik göstermektedir⁵⁵.



Şekil-2: İnsülin reseptörünün diyagramı⁵⁵.

2.4.1.3. İnsülinin karbonhidrat metabolizması üzerindeki etkisi

İnsülin, karaciğerde:

- a) Glikojeni glikoza dönüştüren fosforilaz enzimini engeller, glikojenin parçalanması baskılanmış olur.
- b) Glikokinaz enziminin etkinliğini artırır. Kandan alınan glikozun glikojen olarak depolanmasını sağlar. Glikokinaz enzimi glikozu fosforilleyerek karaciğer hücrelerinden çıkışını engellemektedir.
- c) Glikojen sentaz gibi glikojen üretimini uyaran enzimlerin aktivitesini uyarmaktadır⁵⁵.

Bu etkiler karaciğerdeki glikojeni artırmayı amaçlamaktadır. Glikojen, karaciğer kütlesinin 5-6%'sını kaplamaktadır. Bu oran da yaklaşık 100 gram glikojeni ifade etmektedir. İnsülin glikoneogenezi de inhibe etmektedir⁵⁵. İnsülin, GLUT-4 aracılığı ile kan dolaşımından glikoz alımını artırır⁴⁴.

2.4.1.4. İnsülinin yağ ve protein metabolizması üzerine etkileri

İnsülin, glikozun yağ asitlerine dönüşümünü uyarmaktadır. İnsülin, adipoz dokunun kılcal duvarlarında lipoprotein lipazı uyarır. Yağ hücrelerinde insülin, hormona duyarlı lipazın aktivitesini engeller. İnsülin eksikliğinde ise hormona duyarlı lipazın aktivitesi belirgin şekilde artış göstermektedir. Bu aktivasyon, depolanmış trigliseritlerin yıkımıyla dolaşıma yüksek oranda serbest yağ asitleri ve gliserolün geçişi ile sonuçlanmaktadır. Plazmada serbest yağ asitlerinin seviyesi yükselince; karaciğerde yağ asitlerinden fosfolipit ve kolesterol oluşumu artmaktadır. Fosfolipit ve kolesterol de lipoprotein şeklinde karaciğerden kana verilir. İnsülin eksikliğinde, plazma lipoprotein düzeyi yaklaşık 3 kat artmaktadır. Şiddetli diabetes mellitus hastalığı olan kişilerde yüksek lipid konsantrasyonu, özellikle de yüksek kolesterol düzeyi aterosklerozis riskini artırmaktadır⁵⁵.

Glikoz yoğun bir şekilde tüketildiği zaman sitrik asit siklusunda aşırı miktarda sitrat ve izositrat iyonları meydana gelmektedir. Bu iyonlar asetil-CoA karboksilaz enzimini uyarak asetil-CoA'dan malonil-CoA oluşumunu

desteklemektedir. Bu reaksiyon yağ asit sentezinin ilk basamağını oluşturmaktadır⁵⁵.

İnsülin, aminoasitlerin bir kısmının hücre içine alımını uyarmaktadır, en fazla taşınan aminoasitler (aa): Valin, lösin, izolösin, tirozin ve fenilalanindir. İnsülin yeni proteinlerin oluşması için gerekli olan mRNA translasyonunu uyarmaktadır. Ribozomal aktiviteyi başlatır; insülin yokluğunda ribozom aktivitesi durur. İnsülin, protein oluşumunu uyarmakta ve protein yıkımını önlemektedir⁵⁵.

İnsülin eksikliğinde: Protein depolaması neredeyse durur, protein yıkımında artış meydana gelir ve protein sentezi de engellenir. Bunun sonucunda plazma aa konsantrasyonu belirgin derecede artar. Yüksek miktardaki aminoasitler ya direkt enerji kaynağı olarak ya da glikoneogenez sırasında kullanılır. Aminoasit yıkımı ile idrarda üre atılımı artmaktadır. İleri diyabet vakalarında idrar ile protein kaybı ciddi bir durumdur. Protein kaybı, güçsüzlük ve organ fonksiyonlarında bozulma ile sonuçlanmaktadır⁵⁵.

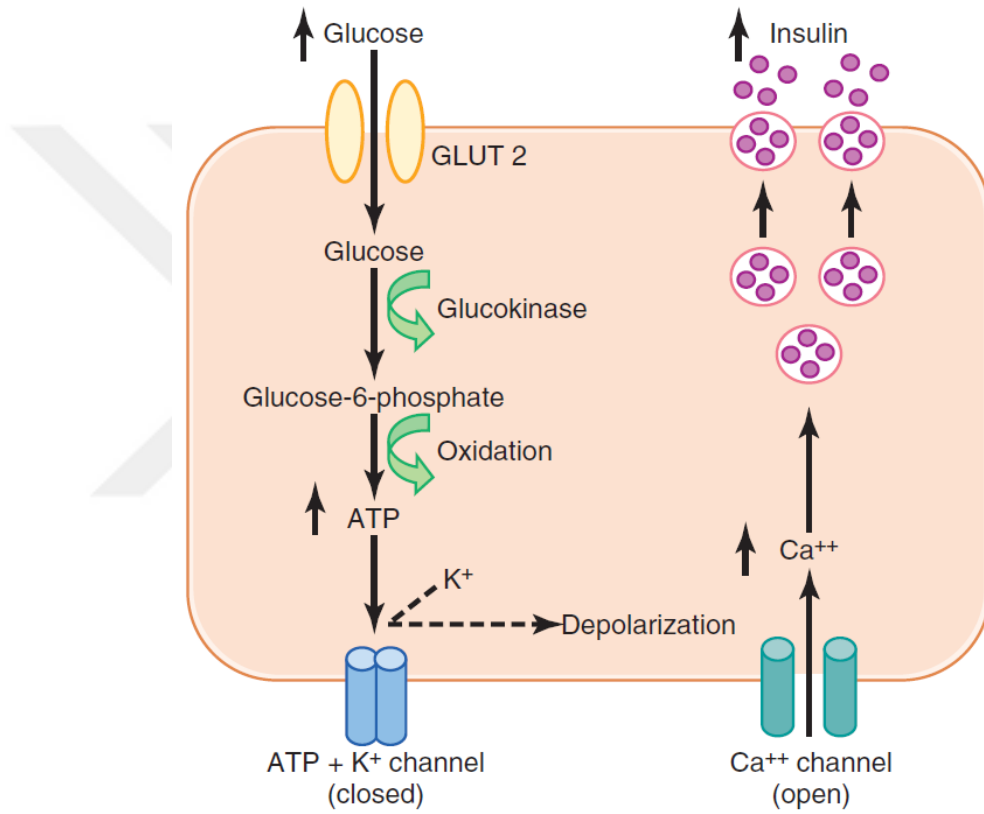
2.4.1.6. İnsülin sekresyon mekanizması

Pankreatik beta hücreleri çok sayıda glikoz taşıyıcısına sahiptir; Glut-2 aracılığı ile hücre içine alınan glikoz, glikokinaz enzimi ile fosforile olarak glikoz-6-fosfatı (G-6-P) oluşturur. Bu fosforilasyon beta hücrelerinde glikoz metabolizması için hız kısıtlayıcı basamaktır. G-6-P okside olur intrasellüler ATP miktarı artar. Bu durum da ATP'ye duyarlı potasyum kanallarını inhibe etmektedir. Potasyum kanalları kapanınca hücre membranı depolarize olur. Depolarizasyon, voltaj-kapılı kalsiyum kanallarının açılmasına neden olur. İntraselüler kalsiyum artışı, hücre membranıyla insülin içeren salgı veziküllerinin füzyonuna neden olur. İnsülinin ekzositoz ile hücre dışına salınması ile sonuçlanır. Mekanizması Şekil- 3'te gösterilmektedir⁵⁵.

Sulfonilürea ilaçları, insülin rezistansı, obezite, glukagon, büyüme hormonu, kortizol, β adrenerjik uyarı, parasempatik uyarı insülin salgısını

artırmaktadır. Somatostatin, leptin, oruç ve α adrenerjik uyarı ise insülin sekresyonunu engellemektedir⁵⁵.

Önceden insülinin pankreatik β hücrelerinin proliferasyonu, insülin sentezi ve sekresyonu üzerinde etkisinin olmadığı ya da olumsuz etkilediği düşünülmekteydi⁶². Sonrasında yapılan çalışmalarda, β hücresinin hayatta kalması, proliferasyonu, insülin salgılanması, transkripsiyon, translasyon, iyon akışı gibi önemli fonksiyonlarda insülinin olumlu etkileri olduğu anlaşılmıştır⁶³.



Şekil-3: Pankreas β hücresinin glikoz uyarısı ile insülin sekresyon mekanizması⁵⁵.

İnsülin sinyal yollarında kilit noktalarda farmakolojik veya genetik manipülasyonlar insülin sekresyonu defekti ile sonuçlanır. Bu durum insülin rezistansı ile metabolik bozukluklar ve kardiyovasküler hastalık riskinde artışa neden olur⁶⁴.

2.4.2. Glukagon hormonu

Kanda glikoz seviyesi azaldığı zaman glukagon sekresyonu uyarılmaktadır. Glukagon, Langerhans adacığının 20%'sini oluşturan α hücrelerinden salgılanan polipeptit yapıda bir hormondur⁵⁴. 29 aminoasit zincirinden oluşan glukagon; 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dozunda uygulandığında kan glikoz düzeyini 20 dakika içerisinde yaklaşık 20 mg/100 ml artırmaktadır⁵⁵.

Glukagon, hücre içi depolardan glikoz salınımını artırmaktadır. Membrana bağlı reseptörlere bağlanır, G proteinlerini aktive eder ve cAMP sentezini artırır. Glukagon, glikojenin parçalanmasına neden olur ve karaciğerde glikoz sentezini artırır. Ayrıca lipitlerin yıkımını da artırmaktadır. Karaciğerden kana salınan glikoz miktarı, glukagon salgısının artmasından sonra dramatik olarak artar. Glukagon, kanı bağırsaklardan ve pankreastan karaciğere taşıyan hepatik portal dolaşıma salgılanmaktadır. Bu nedenle glukagon, etkisinin en fazla olduğu karaciğere daha yüksek konsantrasyonda iletilmiş olmaktadır⁵⁴.

2.4.3. Somatostatin hormonu

Langerhans adacığındaki delta hücrelerinden salgılanan somatostatin, küçük polipeptit hormon yapısındadır. Somatostatin, insülin ve glukagon hormonlarının sekresyonunu baskılar. Somatostatin sekresyonunu düzenleyen faktörler net değildir⁵⁴.

2.5. Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus günümüzde alarm verme seviyelerine ulaşan büyük bir sağlık sorunudur. Dünya çapında yarım milyardan fazla insanı etkilemektedir. Diyabet, 21. yüzyılın en hızlı büyüyen global sağlık acillerinden biridir. 2021 yılında yaklaşık 537 milyon diyabet hastası bulunmaktadır ve bu sayının 2030'da 643 milyona, 2045'te ise 783 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir. 2021 yılında 541 milyon kişide bozulmuş glikoz toleransı olduğu

hesaplanmaktadır. 2021'de 20 ile 79 yaş aralığında tahmini 6.7 milyon insan diyabet ile ilişkili hastalıklar nedeniyle hayatını kaybetmiştir⁶⁵.

Diabetes mellitus, pankreastan insülin hormonunun yetersiz salgılanması ya da hiç salgılanmaması durumunda ortaya çıkan uzun süreli ve ciddi bir durum olarak tanımlanmaktadır. İnsülin yetersizliği durumunda diyabetin klinikte bir göstergesi olan hiperglisemi ortaya çıkmaktadır⁶⁵. T1DM'nin dünya çapında insidansı 3% olmakla birlikte yeni tanılı vaka sayısı yıllık yaklaşık 65.000 kişi olmaktadır^{66,67}.

Diabetes mellitus kendi içerisinde sınıflandırılır:

1- T1DM: Otoimmün β hücre hasarına bağlı olarak insülin eksikliğine neden olmaktadır.

2- T2DM: İnsülin rezistansına eşlik eden β hücresinden yeterli insülin salınımının ilerleyici kaybı nedeniyle oluşur.

3- Farklı nedenlerden kaynaklı spesifik tipleri vardır:

- Monogenik diabetes sendromları: Neonatal diabetes mellitus ve MODY
- Kistik fibrozis ve pankreatit gibi ekzokrin pankreas kaynaklı hastalıklar nedeniyle
- İlaç veya kimyasallar ile indüklenmiş diyabet: Glukokortikoid kullanımı, organ transplantasyonu sonrası, HIV tedavisinde kullanılan ilaçlar nedeniyle de diyabet ortaya çıkabilmektedir.

4- Gestasyonel diabetes mellitus: Hastanın gebelikten önce diyabet tanısı olmayıp gebeliğin 2. veya 3. trimesterında tanı almış olması gerekmektedir⁶⁸.

T1DM'de pankreastaki β hücrelerinin yıkımı değişen oranlarda görülmektedir. β hücrelerinde %70 ve daha fazla yıkım ya da inaktivasyon durumu olduğu zaman semptomlar ortaya çıkar⁶⁹. Bazı β hücrelerinin hibernasyon döneminde olabileceği ve rejenerasyon ihtimalinin olduğu tahmin edilmektedir⁷⁰.

Diyabet belirgin duruma geldiği zaman hastalarda poliüri, polidipsi, kilo kaybı, bulanık görme ve bazen polifaji görülebilmektedir. Kronik hiperglisemi enfeksiyonlara duyarlılıkta artışa ve büyümede yavaşlamaya neden olabilmektedir⁷¹.

2.5.1. Diabetes mellitus'un komplikasyonları ve patogenezi

Diabetes mellitusta komplikasyonların gelişmesinde temelde yatan neden oksidatif strestir^{72,73}. Kısa süreli yüksek glikoz etkisiyle bile reaktif oksijen ara ürünleri ve nitrik oksit üretiminde artış görülmüştür⁷⁴. Yüksek glikozun, metabolik açıdan duyarlı pankreatik β hücrelerinde mitokondriyal süperoksit üretimini engelleyebileceği gösterilmiştir⁷⁵. STZ ile indüklenen diyabet çalışmasında da rat mitokondrilerinde kompleks 1 ve kompleks 3'ten fazla miktarda süperoksit üretimi olmadığı sonucuna ulaşılmıştır⁷⁶. Glikotoksisite ve lipotoksisiteye eşlik eden oksidatif stres; β hücre fonksiyon bozukluğunun patogenezinde yer alan diyabet ile ilişkili durumlardır⁷⁷.

Glikoza yanıt olarak insülin sekresyonunun olması için mitokondriyal ROS üretimi gereklidir⁷⁸. Pankreatik β hücrelerinde birçok antioksidan enzimin ekspresyonu çok düşüktür bu nedenle ROS'un neden olduğu hasara daha duyarlı hücrelerdir. Yüksek glikoz ile başlatılan ROS sinyali insülin salınımını uyarır böylelikle yüksek glikoz ile indüklenen H₂O₂, insülin sekresyonunda artışı sağlamaktadır⁷⁹.

Diabetes mellitus komplikasyonlarının ortaya çıkmasında özellikle dört moleküler mekanizma sorumludur. Bunlar: Poliöl yolağında glikoz akışında artış olması, hücre içi ileri glikasyon son ürünlerinin (AGEs) üretiminde artma, protein kinaz-c'nin uyarılması ve heksosamin yolağı aracılığıyla artan akıştır⁸⁰. Komplikasyonların oluşumunda en kritik olan poliöl yolağıdır⁸¹. Dört moleküler mekanizma da sonuç olarak hücresel stresi tetikleyerek komplikasyonlara neden olur⁸².

Diyabette karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasındaki bozukluğun temel sebebi hedef dokular üzerinde insülinin yeterli etkiyi gösterememesidir.

Kronik hiperglisemi; özellikle göz, böbrek, sinirler, kalp ve kan damarları olmak üzere çeşitli dokularda hasar, disfonksiyon ve yetmezlik ile sonuçlanabilmektedir⁷¹.

Diabetes mellitusta akut komplikasyonlar hayatı tehdit eden ciddi durumlar ile sonuçlanabilmektedir. Hiperglisemiye eşlik eden ketoasidozis ve nonketotik hiperozmolar koma, akut komplikasyonları oluşturmaktadır⁷¹.

Kronik komplikasyonlar:

- 1- Mikrovasküler komplikasyonlar: Nefropati, nöropati ve retinopatidir. Küçük damar tutulumu ile karakterizedir.
- 2- Makrovasküler komplikasyonlar: Koroner arter hastalığı, periferik vasküler hastalık ve serebrovasküler hastalıktır. Büyük damarlarda tutulum yapmaktadır⁸³.

Diyabetin erkek üreme sağlığı üzerinde de olumsuz etkileri bulunmaktadır⁸⁴. STZ ile oluşturulan diyabetik hayvan modeli çalışmalarında serum testosteron düzeyinde bozulma ve testis dokusunda değişen derecelerde lezyonlar tespit edilmiştir^{84,85}. Hiperglisemiye uzun süreli maruziyetin bilişsel fonksiyonları etkileyebileceği düşünülmektedir⁸⁶.

Son zamanlarda T1DM hastalarında yaşam kalitesinde artış olmasına rağmen; mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlardan dolayı ölüm oranı hala yüksektir⁸⁷. Günümüzde tedavide kullanılan sentetik antidiyabetik ilaçların, karaciğer ve böbrek hastalıkları ve hastada hipoglisemik koma durumunun gelişmesi gibi ciddi yan etkiler oluşturma riski vardır. Kullanılan ilaçların büyük bir kısmı gebelik için güvenli bulunmamıştır⁸⁸. Bu nedenle, antidiyabetik etkili bitkisel ürünlerden daha az yan etkisi olan seçeneklerin araştırılmasına daha çok yer verilmektedir⁸⁹.

2.6. Streptozotocin

Streptozotocin, ilk olarak toprak mikroorganizması olan *Streptomyces acromogenesten* izole edilen bir antibiyotiktir. Bir nitrozüre analogudur^{90,91}.

Sahip olduğu nitrozüre özelliği β hücrelerinde hasara neden olmaktadır. STZ, 2-deoxy-2(3-methyl-3-nitrosoureido)-D-glucopyranose yapısındadır(Şekil-4)⁹². Pankreatik β hücrelerinin hücre membranında çok sayıda GLUT-2 reseptörü bulunur ve hidrofilik özellikteki STZ, GLUT-2 reseptörlerini tanır⁹³. STZ, β hücrelerine taşınırken de GLUT-2'yi kullanır^{90,92}. Karaciğer, böbrek ve bağırsak gibi GLUT-2 ekspresyonu olan diğer organlar da STZ'den bu nedenle etkilenir^{90,94}.

Streptozotocin, DNA zincirlerini alkilleyerek ya da kırarak poli-ADP riboz sentaz aktivitesinde artışa ve sonucunda hücre hasarına neden olur⁹⁵. STZ'nin yapısındaki metil grubunun DNA'ya geçişi; DNA yapısına hasar verir⁹⁶ ve DNA fragmentasyonu ile sonuçlanır⁹⁷. DNA'nın yıkımı, STZ'nin toksik etkisini daha da artıracak bir mekanizmayı etkinleştirir. DNA hasarı; aşırı uyarılmış olan poli (ADP-riboz) polimeraz-1'i (PARP-1) aktifleştirir. Bu durum da hücre sel NAD⁺ ve ATP depolarında azalma ile sonuçlanır. Pankreasın β hücrelerindeki depo ATP'nin azalması, hücre nekrozuna neden olur. NAD⁺'daki azalma da β hücrelerinde insülin biyosentezini ve sekresyonunu engelleyerek etki gösterir⁹³.

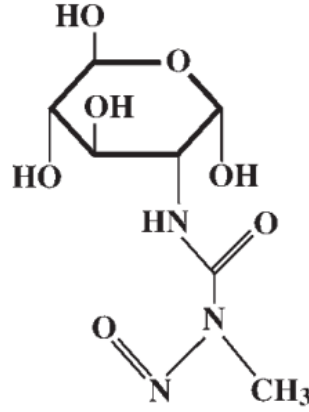
STZ, kemirgenlerde diyabet oluşturmak için intravenöz ve intraperitoneal uygulama ile farklı dozlarda uygulanabilir⁹⁸. Tek yüksek doz STZ ile hızlı ve şiddetli β hücre nekrozu oluşur ve T1DM ile sonuçlanır⁹⁹. STZ ile akut trifazik yanıt oluşur:

- 1) Uygulamadan 2-4 saat sonra karaciğerden glikojen mobilizasyonuna bağlı olarak erken hiperglisemi oluşur. Bu dönemde insülin artışı olmaz.
- 2) 6-10 saat sonra serum insülin düzeyi artar ve hipoglisemi gelişir.
- 3) 24 saat sonra pankreasta insülinin azalmasına bağlı olarak poliüri, glikozüri ve kalıcı hiperglisemi oluřur⁹⁰.

STZ; subkutanöz, intrakardiyak, intramüsküler gibi farklı yollarla uygulanabilir ama en çok intraperitoneal veya intravenöz yol tercih edilmektedir¹⁰⁰. STZ'nin enjekte edildiği saat de diyabet oluşturma etkisini değiştirebilmektedir. En yüksek etki saat 16.00'daki uygulama ile en düşük etki de saat 08.00'deki

indükleme ile oluşmuştur¹⁰¹. STZ dozu cinsiyet ve ırk açısından farklılıklar gösterir ama genel olarak 65 mg/kg'nin üzeri yüksek doz, 40-55 mg/kg orta doz, 35 mg/kg'nin altı düşük doz kabul edilir⁹⁰.

Streptozotocin, saline veya sitrat bufferda çözünmektedir¹⁰². Sitrat buffer ile hazırlandığı zaman enjeksiyon için en uygun ph 4.5'tir⁹⁰. STZ'nin en stabil olduğu ph 4'tür fakat sitrat bufferda çözünmesinden 15-20 dk sonra yapısı bozulmaya başlar. Bu nedenle enjeksiyondan hemen önce hazırlanmalı ve çözüldükten sonra 5 dakika içerisinde kullanılmalıdır. STZ enjeksiyonu öncesinde 4 saat açlık önerilmektedir¹⁰³. STZ ışığa duyarlıdır ve solüsyonlarını içeren tüplerin etrafı alüminyum folyo ile kaplanmalıdır¹⁰⁴.



Streptozotocin

Şekil-4: Streptozotocin'in kimyasal yapısı⁹².

STZ, karaciğerde hızla metabolize edilir ve böbrekten eliminasyonu gerçekleşir¹⁰⁵. Nitrik oksidin pankreas adacık hücrelerine hasar verdiği bilinmektedir. STZ, nitrik oksit donörüdür ve nitrik oksit içermesi nedeniyle STZ'nin DNA hasarının kaynağı NO olarak düşünülmektedir^{106,107}. STZ spontan bir şekilde nitrik oksit donörü değildir. Hücre içerisinde STZ metabolize olduğu zaman NO açığa çıkar ve bu reaksiyon için NO sentaz gerekli değildir¹⁰⁷.

2.7. Carvacrol

Eski zamanlardan itibaren bitkiler, yararlı ve koruyucu özelliklerinden dolayı geleneksel tıpta yer almaktadır. Daha yakın tarihli araştırmalarda beslenmede sebze, meyve, tahıl ve baklagillere ağırlık verildiği zaman tekrarlayan ciddi hastalıkları önlediği bulunmuştur¹⁰⁸. Thyme ve Oregano bitkilerinin esansiyel yağlarının iki ana monoterpenoid bileşeninden biri Carvacrol'dür¹⁰⁹. Thyme ve oregano bitkilerinden elde edilen esansiyel yağlar; antimikrobiyal, antiseptik, antifungal, antioksidan ve antiviral özellikleri nedeniyle kullanılmaktadır¹¹⁰. Amerika Birleşik Devletleri'nde ve Avrupa'da CRV kullanımı gıda aroması için güvenilir bulunmuş, gıda ve gıda katkı maddesi olarak kullanımına izin verilmiştir¹¹¹.

Carvacrol, kekik (*Origanum vulgare*) ve *Thymus vulgaris* gibi Lamiaceae familyasının birçok bitki çeşidinde bulunan küçük bir moleküldür. Carvacrol, 2-metil-5-(1-metiletil)-fenol formülüne sahiptir. Lamiaceae familyasındaki bitkilerde en çok da kekikteki esansiyel yağların esas bileşenidir^{112,113}.

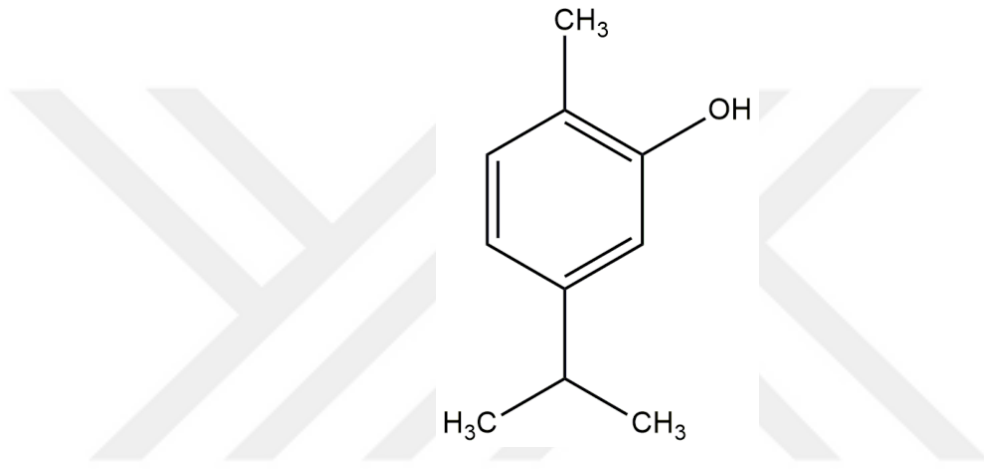
Carvacrol genel olarak yiyeceklerde, baharat içeriğinde ve farmakolojik endüstrilerde kullanımda yer alır¹¹⁴. Diş hekimliği alanında; krezot, karbolik asit ve timolün gliserolüne alternatif olarak Carvacrol; odontalji, hassas dentin ve alveolar apse tedavisinde ve diş pulpa kanallarında antiseptik olarak da kullanılmaktadır¹¹⁵.

2.7.1. Carvacrol'ün farmokinetik özellikleri ve kimyasal yapısı

Carvacrol'ün uygulandığı gün içerisinde etkisi sonlanır çünkü metabolik aktivitesi hızlıdır. Yapılan deneysel hayvan çalışmalarında Carvacrol'ün bir kısmının emilim gösterdiği bulunmuştur. Tavşanlarda emilim oranı 45% olarak bulunmuştur¹¹⁶. Ratlarda oral gavaj uygulaması ile Carvacrol'ün ortalama LD50 dozunun 810 mg/kg olduğu tespit edilmiştir¹¹⁷. Farelerde intravenöz, intraperitoneal, subkutanöz uygulama ile LD50 dozları sırasıyla: 80 mg/kg, 73,3 mg/kg ve 680 mg/kg olarak bulunmuştur. Farelere intraperitoneal yüksek doz Carvacrol (110-233,3 mg/kg) verilmesi durumunda: ataksi, spontan motor

aktivitede azalma, uykululuk halinde artış ve ölüm görülebilmektedir. Köpeklerde intravenöz uygulamada ise LD50 doz seviyesi 310 mg/kg olarak belirtilmiştir¹¹⁸. Tavşanlarda Carvacrol'ün dermal uygulamada LD50 düzeyi 2700 mg/kg'dir¹¹⁹.

Carvacrol'ün kimyasal yapısı Şekil-5'te gösterilmektedir¹²⁰. Yapısındaki tek hidroksil grubu(-OH) metil grubuna yakın bir yerde konumlanmaktadır. Carvacrol'ün kimyasal ve biyolojik özellikleri, -OH grubunun bu kendine özgü konumundan önemli ölçüde etkilenmektedir^{112,121}.



Şekil-5: Carvacrol'ün kimyasal yapısı¹²⁰.

Carvacrol yüksek oranda lipofiliktir. Çözünürlüğü karbontetraklorid, etanol, dietil eter ve asetonunda fazla miktardadır fakat suda çözünmez¹²².

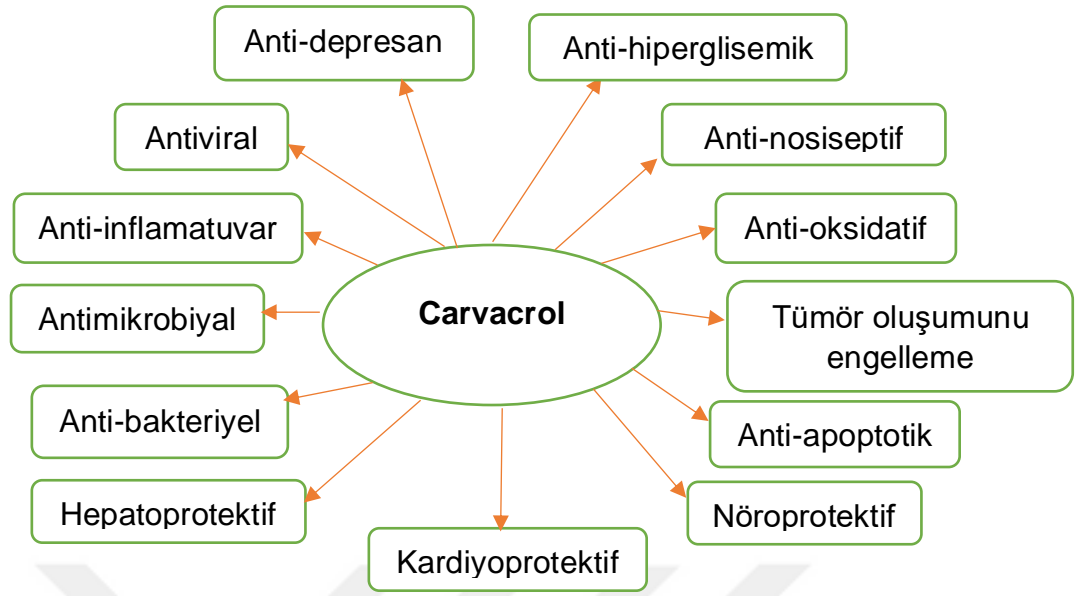
2.7.2. Carvacrol'ün biyolojik özellikleri

Carvacrol'ün farmakolojik etkilerinin geniş olduğu önceden yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar ile Carvacrol'ün; anti-inflamatuar¹²³, antiviral¹²⁴, antibakteriyel¹²⁵, antioksidan¹²⁶, antimikrobiyal¹²⁷ etkilerinin yanı sıra; kardiyoprotektif¹²⁸, apoptozu önleme ve tümör oluşumunu engelleme¹²⁹ gibi katkıları olduğu bulunmuştur. Kaspaz-3 aktivitesindeki düşüş sonucu pro-apoptotik etkilerin azalması CRV'nin anti-apoptotik karakter kazanmasını sağlar¹³⁰.

Carvacrol'ün antinosiseptif etkisi farelerde ağrıyı azalttığı çalışma ile raporlanmıştır¹³¹. İskemik beyin hasarı oluşturulan bir araştırmada CRV uygulanması ile enfarkt bölgesinin azaldığı tespit edilmiştir ve nöroprotektif özellikler gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır¹³². Yapılan bir çalışma ile CRV, etanol ile oluşturulan kognitif bozukluklarda MAPK ve mitokondriyal yollarını modifiye ederek iyileşme sağlamıştır¹³³. Başka bir çalışmada ise iskemi/reperfüzyon ile indüklenen karaciğer hasarında Carvacrol'ün hepatoprotektif etkisinin olduğu raporlanmıştır. Hücrelerin genetik yapısının korunmasında Carvacrol uygulamasının önemli olabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Ratlarda Carvacrol 73 mg/kg dozunda verilmiş ve hepatotoksisiteye neden olmamıştır¹³⁴. Farklı bir çalışma ile CRV'nin karaciğeri koruyucu etkisi olduğu desteklenmiştir¹³⁵.

Yapılan bir çalışmaya göre Carvacrol'ün insanlarda periferdeki lenfositleri, oksidatif stres düzeyini azaltarak ultraviyole B ışın yaymasıyla oluşan lipid peroksidasyonundan koruduğu bulunmuştur¹³⁶. Farelerde yapılan farklı bir çalışmada Carvacrol'ün dopaminerjik sistemi etkileyerek antidepresan benzeri bir etkisi olduğu bulunmuştur. Bu etkinin oluşmasında CRV'nin dopamin seviyesini dengeleyerek depresyon benzeri semptomları azalttığı bulunmuştur¹³⁷.

Streptozotocin ile oluşturulan diyabetik rat modelinde yapılan bir çalışmada CRV'nin kan glikoz düzeyinde düşüş sağladığı ve bilişsel hasarları hafiflettiği sonucuna ulaşılmıştır¹³⁸. T1DM ve T2DM'de oluşabilecek kalp hasarlarına karşı Carvacrol kalbi korumaktadır¹³⁹. Carvacrol, Fosfatidilinositol 3-kinaz / Protein kinaz B (PI3K/Akt) yolağını kısmen uyararak diyabetin neden olduğu aortik hiperkontraktiliteyi azaltmaktadır¹⁴⁰.



Şekil-6: Carvacrol'ün biyolojik etkileri¹²³⁻¹⁴⁰.

Carvacrol iyon kanallarının düzenleyicisi olarak da görev yapar. Transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7)'nin inhibitörü olmasının yanı sıra transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) ve transient receptor potential vanilloid 3 (TRPV3)'ün aktivasyonunu artırmaktadır¹⁴¹⁻¹⁴³. Melastatin-benzeri geçici reseptör potansiyel (TRPM) alt ailesinin üyelerinden biri olan TRPM7 memeli dokularında yoğun bir şekilde eksprese olmaktadır¹⁴⁴. TRPM7 ekspresyonunun engellenmesinin; plazmadaki yüksek glikoz nedeniyle oluşabilecek nöron apoptozisinden koruduğu bulunmuştur. TRPM7'nin yıkılması rat insulinoma INS-1 hücrelerinde aşırı insülin salınımını uyarmaktadır^{145,146}. Diabetes mellitusta glikoz homeostazının sağlanmasında TRPA1'in olumlu etkisi bulunmaktadır¹⁴⁷.

Carvacrol, vücuttaki reaktif oksijen türevlerini (ROS) baskılamada kritik konumdaki güçlü bir monoterpenik fenoldür¹³⁵. Carvacrol açısından zengin esansiyel yağların; askorbik asit, butil hidroksitoluen ve E vitaminine benzer yüksek etkili antioksidan aktivitesi vardır¹⁴⁸. Aynı zamanda endojen antioksidanların etkinliğinin artmasını sağlamaktadır¹⁴⁹.

Yapılan bir çalışmada CRV'nin antioksidan ve sitotoksik etkilerini araştırmak amacıyla kültüre edilmiş insan kan hücrelerinde total antioksidan kapasite (TAC) ve total oksidatif stres (TOS) lmleri yapılmış sitotoksosite için de LDH ölçülmüştür. Çalışmada CRV'nin insan lenfositleri üzerinde mutajenik etkisi olmadığı tespit edilmiştir. 50, 75 ve 100 mg/L CRV tedavisi ile insan lenfosit hücrelerinde TAC düzeyinde belirgin derecede artış tespit edilmiş fakat TOS seviyesinde değişiklik olmamıştır. 150 ve 200 mg/L CRV tedavisi ile TOS düzeyi artış gstermiřtir¹⁵⁰.

Prostaglandin E2 üretiminin azalmasıyla sonuçlanan siklooksigenaz-2 inhibisyonu aracılığıyla CRV, anti-inflamatuar özellik gstermektedir¹⁵¹. CRV; IL-6, IL-10, TNF- α ve indkленebilir nitrik oksit sentaz gibi inflamatuvar aracılardı düzenleyerek inflamasyonu hafifletebilmektedir^{152,153}.

2.8. PI3K

1980lerde ilk kez tanımlanan PI3K hücre içi sinyal iletiminde görev alan bir enzim grubudur^{154,155}. PI3K (Phosphoinositide-3 kinase), ökaryotik hücre membranının yapısındaki fosfatidilinozitol fosforile eden lipid kinaz ailesidir¹⁵⁶. PI3K; p85 regülatör subunit, p55 regülatör subunit ve p110 katalitik subunit isimli 3 alt birimden oluřmaktadır¹⁵⁷. Farklı yapı ve substratlarına göre PI3K, 3 gruba ayrılır: Sınıf 1, sınıf 2 ve sınıf 3^{158,159}. Sınıf 1 PI3K, sınıf 1A ve 1B olmak üzere kendi içerisinde ikiye ayrılır. Sınıf 1A PI3K, p58 regülatör subunit ve p110 katalitik subunitin heterodimeridir. İnsanlarda kanserde en çok görülen sınıf 1A PI3K tipidir¹⁶⁰.

PI3K, hücrenin gelişimi, farklılaşması, apoptozis ve glikoz transportu gibi çok sayıda hüresel görevde rol oynamaktadır^{161,162}. Yapılan alışmalar ile PI3Klerin metabolizma, hücrenin hayatta kalması, kanserin ilerlemesi ve inflamasyon gibi farklı hüresel durumlarda önemli bir konumda yer aldığı bulunmuřtur¹⁶³. PI3K'nin, ovaryan kanserlerde¹⁶⁴ ve servikal kanserlerde ekspresyonu artış gstermektedir¹⁶⁵.

Aktive olmuş sınıf 1A PI3Kler hücre içi membranda, fosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2) substratını fosforiller ve fosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP3) oluşur. Bu fosforillenme yolak akışındaki Akt dahil diğer sinyal proteinlerini çalıştırmak için başlatıcı özelliğindedir¹⁶⁶. Substrat PIP'tan PIP2 oluşumunu sağlayan sınıf 2 PI3K'dir¹⁶⁷. PI3K'nin negatif düzenleyicisi PTEN'dir. PTEN ters etkiyle PIP3'ü defosforile ederek PIP2 dönüşümüne neden olmaktadır¹⁶⁸.

2.9. Akt (Protein Kinase B)

1987 yılında, Akt8 transforming retrovirusten v-Akt onkogeni izole ve amplifiye edilmiştir¹⁶⁹. Akt; pleckstrin homoloğu (PH), orta kinaz ve regülatör karboksi-terminal birim olmak üzere 3 domainden oluşmaktadır¹⁴. Serin/threonine kalıntılarındaki farklılık nedeniyle Akt'nin 3 izoformu vardır: Akt1, Akt2 ve Akt3. Akt1 ekspresyonu her dokuda olabilmektedir. Akt2 daha çok iskelet kası, adipoz doku ve karaciğer gibi insüline duyarlı dokularda eksprese olurken Akt3 ise testis ve beyinde eksprese olmaktadır^{14,170}.

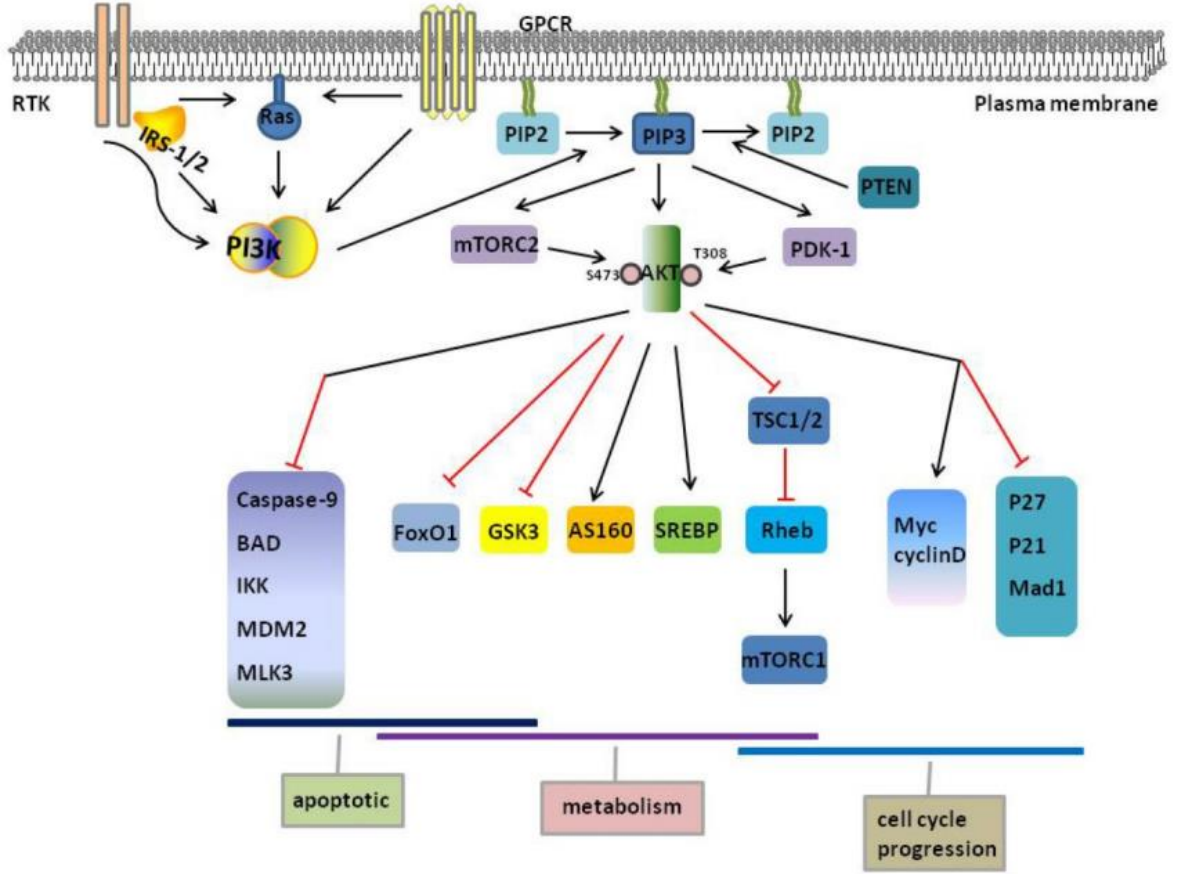
Hücre içinde Akt, heksokinazı uyarır ve glikozun G-6-P'ye dönüşümünü sağlar. Hücresel enerji sağlamak için glikojen sentezini uyarmaktadır¹⁷¹. Akt1 (protein kinaz B- α)'in yapısal uyarısı, β hücrelerinde hiperplazi ve hipertrofi ile sonuçlanmaktadır¹⁷². Yapılan çalışmalarda pankreatik β hücrelerde Akt uyarısına yanıtın, β hücre kütlesini ve insülin salgısını artırması yönünde olduğu tespit edilmiştir¹⁷³. Ayrıca, Akt1 gastrik karsinomalarda¹⁶⁹; Akt2 ise pankreas ve ovarian kanserlerde artmış ekspresyon göstermektedir^{174,175}.

PI3K tarafından başlatılan biyolojik bilgilerin aktarımında Akt (serine threonine kinase) kilit noktadadır. Fosforile olan Akt, PI3K'den gelen sinyallerin akış yönündeki efektörlere iletimini sağlamaktadır^{161,162}. PIP3 ve PIP2 içeren endomembranlar da AKT aktivasyonuna katkıda bulunmaktadır^{176,177}. Plazma membranında yer alan tamamen aktif haldeki fosforile Akt'nin yaşam süresi oldukça kısadır^{177,178}.

Akt'nin aktive olmak için iki esas fosforilasyon yolu vardır. Bu yollardan biri Akt'nin kinaz bölgesindeki threonine 308 (Akt1)'in Phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1) tarafından fosforillenmesidir¹⁷⁹. Diğer yol ise Akt'nin karboksi-terminal düzenleyici alanındaki serine 473 (Akt1) 'ün Mammalian target of rapamycin complex-2 (mTORC2) aracılığı ile fosforillenmesi ile aktivasyonudur^{168,180}. Bu yollar PI3K aktivasyonuna bağlıdır ve Akt'nin uyarılmasıyla sonuçlanmaktadır¹⁸¹. Mekanizma Şekil- 7'de gösterilmektedir¹⁶². Akt2'de T309 ve S474 alanı ile Akt3'te T305 ve S472 alanında benzer özellikte fosforilasyon reaksiyonları görülmektedir¹⁸². Protein fosfataz-2A (PP2A) Akt T308'i¹⁸³; PH bölgesinde yer alan lösinden-zengin tekrar eden protein fosfatazlar (PHLPP1 ve PHLPP2) Akt S473'ü defosforile eder. Defosforilasyon sonucu Akt inaktivasyonu gerçekleşir¹⁸⁴.

Forkhead Box O (FOXO) transkripsiyon faktör ailesi, PI3K/Akt sinyal yolağı down regülasyonunda merkezi rol almaktadır¹⁸⁵. FOXO proteininin; FOXO1, FOXO3, FOXO4 ve FOXO6 olmak üzere dört izoformu yüksek protein homolojisine sahiptir¹⁸⁶. Düzenlenmelerinde Akt ve 14-3-3 proteini etkili olmaktadır¹⁸⁷. Otofajiye neden olan FOXO1, Akt'nin en önemli substratlarından biridir. FOXO1; apoptoz ve otofaji ile ilişkili genler gibi aşağı akışta bulunan hedefleri düzenleyerek apoptotik hücre ölümünü uyarmaktadır¹⁸⁸. Akt aktivasyonu; FOXO1'in nükleustan uzaklaşması ve hareketsizliği ile sonuçlanır. Böylelikle hedef genlerin FOXO1'e bağlı transkripsiyonu baskılanmış olmaktadır¹⁸⁹. FOXO1 sitoplazmada yer aldığı anda aşağı akışta bulunan hedeflerini kontrol edemez duruma gelmektedir¹⁹⁰.

Akt'ye bağlı FOXO1 fosforilasyonu sonucu; FOXO1 aktivitesi inhibe olmaktadır¹⁹¹. Aktif durumdaki Akt çekirdeğe translokasyon yapar ve FOXO'yu korunmuş 3 kalıntıda fosforile eder. Bu durum da FOXO'nun 14-3-3 düzenleyici proteine bağlanmasının artmasına ve ikisinin birlikte sitoplazmik lokasyonuna neden olmaktadır. FOXO'nun PI3K/Akt sinyal yolağı ile kontrolü evrimsel olarak korunmaktadır¹⁹². Hücrel stresin arttığı durumlarda ROS üretiminin de artması ile FOXO yer değiştirerek nükleusta yerleşim göstermektedir. FOXO nükleusta iken aktif halde olup transkripsiyonel aktivitesi artmaktadır¹⁹³.



Şekil-7: PI3K/Akt yolağı¹⁶².

Hücrenin hayatta kalma, çoğalma, farklılaşma ve metabolizma süreçlerindeki genlerin ekspresyonunu kontrol eden protein kinaz B (Akt)'nin substratı olan FoxO1 insülin etkisine de aracılık etmektedir. Esas olarak pankreas β hücrelerinde çoğalan FoxO1 ekzokrin pankreas hücrelerinde çok düşük miktarda eksprese olmaktadır¹⁹⁴. FoxO1 varyantları insanlarda β hücre fonksiyonlarının bozulması, glikoz toleransında azalma ve diabetes mellitus gelişimi ile ilgili bulunmuştur¹⁹⁵. FOXO1'in nükleer ekspresyonu pankreatik ve duodenal homeobox-1 (PDX-1)'in ekspresyonunu azaltarak PDX-1 ile indüklenen β hücre proliferasyonunu engellemektedir¹⁹¹. Bu durum da diyabetin başlangıcını hızlandırmaktadır¹⁹⁶.

2.10. PI3K/Akt Sinyal Yolağı

Pankreatik β hücreleri; kan glikoz düzeyini fizyolojik aralıkta tutmak için kan glikoz konsantrasyonuna yanıt olarak insülin sentezi ve sekresyonu ile glikoz homeostazını sağlamaktadır¹⁹⁷. Diyabetin etkin tedavisi için insülin sekresyonu yapan fonksiyonel β hücrelerin korunması ve onarımı gerekmektedir¹⁹⁸. PI3K/Akt yolağı ile insülin, β hücre fonksiyonlarını ve insülin salgılanmasını düzenlemektedir¹⁶². PI3K/Akt sinyal yolağının uyarılması pankreatik β hücrelerden daha fazla miktarda insülin salınımını sağlamaktadır¹⁶¹. PI3K/Akt insülin sinyal yolağında herhangi bir engel olması durumunda Langerhans adacığındaki β hücrelerde fonksiyon kaybı ve insülin rezistansı oluşmaktadır¹⁹⁹.

Pankreatik ve duodenal homeobox-1 (Pdx-1) insülin transkripsiyonunu tetikleyen önemli bir başlatıcıdır. Pankreatik beta hücrelerinde FoxO1 fosforilasyonu artınca Pdx-1 ekspresyonu da artarak insülin transkripsiyonu hız kazanmaktadır²⁰⁰.

Normalde β hücrelerinde FoxO1 yoğun bir şekilde eksprese olmaktadır. PI3K/Akt sinyal yolağı; FoxO1'i inhibe ederek serbest yağ asitleri ile indüklenen apoptozu azaltmakta ve pankreatik β hücrelerinde lipotoksisiteyi engellemektedir^{201,202}. Foxo1 inhibisyonu; yağ asitleri ve endoplazmik retikulum stresi ile tetiklenen apoptozdan pankreatik β hücrelerini korumaktadır²⁰³. Ayrıca PI3K/Akt sinyal yolağı, hücre büyümesini ve hayatta kalımı uyardığı için kanserde de önemlidir²⁰⁴.

2.11. Glut-2

Glutlar, glikozun plazma membranından pasif geçişine olanak sağlar. İnsanlarda 14 farklı Slc2 geni, Glut ailesinin üyelerini kodlamaktadır. Glutlar substrat özelliklerine göre sınıflandırılır^{205,206}.

Sınıf 1: Glut 1-4 ve Glut-14

Sınıf 2: Glut 5,7,9 ve 11

Sınıf 3: Glut 6,8,10 ve 13'ten oluşmaktadır²⁰⁶.

Glut-2, karaciğer, böbrek, bağırsak ve adacık dokularında çok miktarda bulunmaktadır. Özellikle glikoz homeostazının sağlanmasında pankreatik β hücrelerinde Glut-2 gereklidir. β hücrelerinde glikoz reseptör görevi yapan Glut-2, glikokinaz ile birleşerek hiperglisemi durumunda hücrenin glikoz alımını artırır böylelikle insülin sekresyonu uyarılmış olur²⁰⁷.

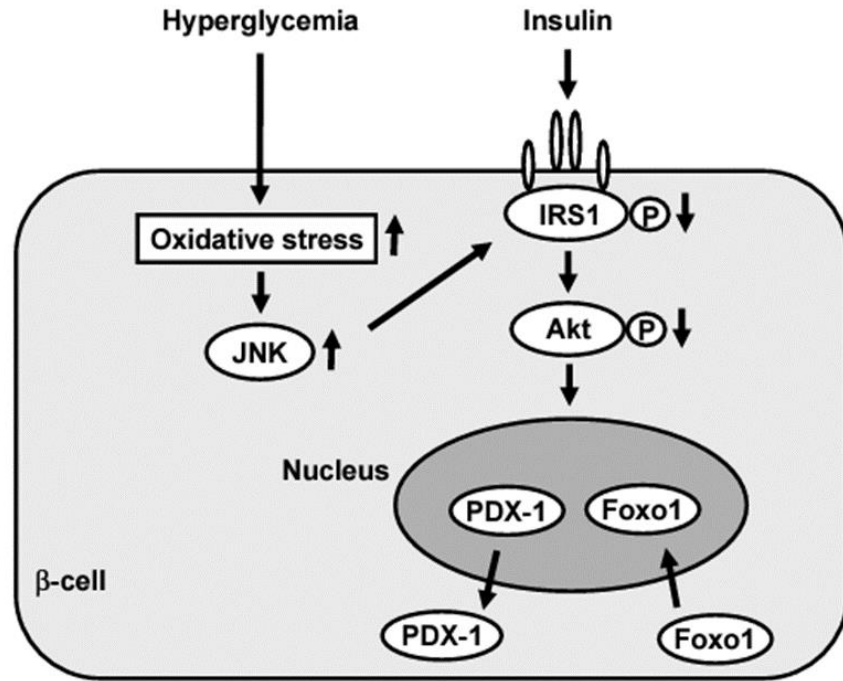
Glikoz uyarısına karşılık pankreatik β hücreleri iki aşamalı bir reaksiyon sonucu insülin salgılamaktadır. Glikoz; insanlarda GLUT-1, kemirgenlerde ise GLUT-2 aracılığıyla β hücrelerine giriş sağlar. Hücre içinde ATP/ADP oranı artar²⁰⁸. Kemirgen pankreatik β hücrelerinde esas glikoz taşıyıcısı Glut-2 iken insan adacık β hücrelerinde ayrıca Glut-1 ve Glut-3 ekspresyonu da olmaktadır^{209,210}. Yaygın olarak eksprese olan taşıyıcı Glut-1'dir, Glut-3 ekspresyonu daha çok nöronlarda olmaktadır²¹¹. Yapılan klinik bir çalışmada Glut-2'de bir sorun ya da hata olması; gestasyonel veya neonatal diabetes mellitusun bir nedeni olarak görülmüştür. Bu sonuç, insanlarda β hücrelerinin fizyolojisinde Glut-2'nin önemini göstermektedir^{212,213}.

β hücrelerinde tespit edilen ilk reseptör olan Glut-2; ekspresyonu β hücrelerinde gerçekleşen tek glikoz taşıyıcısıdır. Glikoz, pankreatik β hücrelerine Glut-2 aracılığıyla kolaylaştırılmış difüzyon yöntemiyle giriş yapmaktadır. Ayrıca Glut-2, karaciğerde ve daha az miktarlarda böbrek ve bağırsak emilim hücrelerinde de eksprese olmaktadır²¹⁴. Ayrıca beyinde üçüncü ventrikülün tabanını ve alt bölgesini döşeyen tanisitlerde de Glut-2 ekspresyonu vardır²¹⁵.

İnsülin sekresyonunu tetikleyen bir besin olan glikoz, pankreatik β hücrelerine GLUT-2 aracılığı ile alınmaktadır. β hücrelerinde glikoz, glikoliz ve Krebs siklusuna girer, ATP/ADP oranı artar. ATP artışı ATP'ye duyarlı potasyum kanallarının kapanmasına neden olmaktadır. Potasyum kanalları kapanınca hücre membranı depolarizasyonu gerçekleşir. Depolarizasyonun etkisiyle voltaj bağımlı kalsiyum kanalları açılır ve β hücrelerinde içeri doğru kalsiyum geçişi olmaktadır. Hücre içi Ca^{++} oranının artması insülin içeren salgı granüllerinin ekzositozunu uyaran sinyali başlatır²¹⁶.

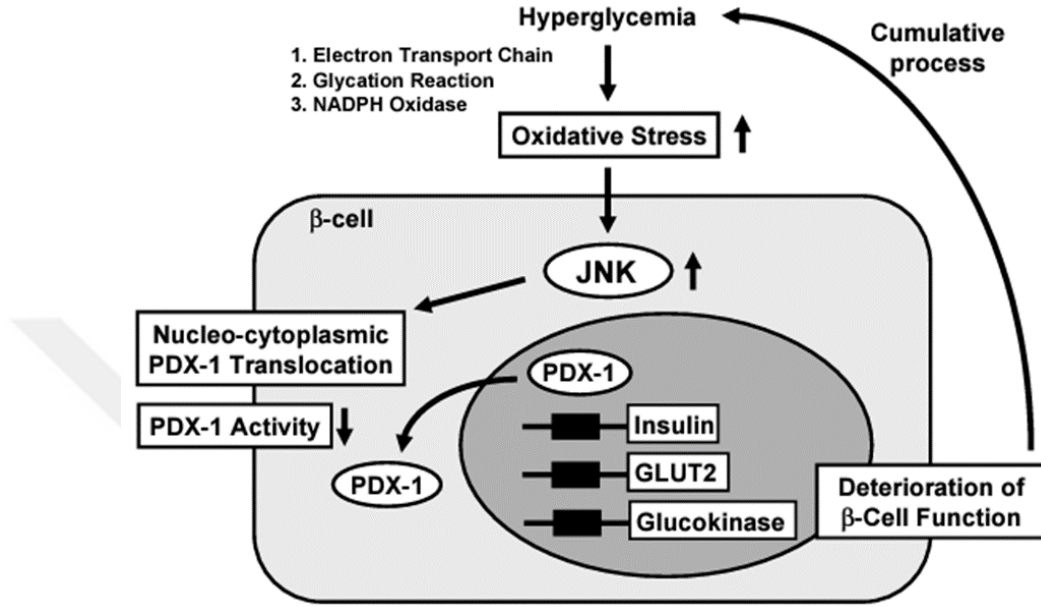
Glut-2, plazma membranında yerleşim gösteren ve STZ'nin pankreatik β hücrelerine alınma aracılığıyla düşük bir glikoz taşıyıcısıdır^{93,217}. Glut-2 ekspresyonu olmayan beta hücreleri STZ'nin etkilerine karşı dirençlidir^{218,219}. Glut-2'nin β hücre membranının dış tarafındaki yerleşimi, β hücresinin fonksiyonu için önem taşımaktadır. Yapılan bir çalışmada glikoza duyarsız neonatal ratlarda Glut-2'nin, β hücresinde intraselüler vezikülde yerleşim gösterdiği tespit edilmiştir²²⁰. Ayrıca Glut-2 gliserolfosfo-inositol²²¹ ve glikozamin de taşımaktadır²²².

β -hücrelerine farklılaşma ve β -hücresi fenotipinin korunması için PDX-1 gereklidir. Olgun β -hücrelerinde PDX-1; insülinin ve GLUT-2 ile glikokinaz gibi glikoz algılama ve metabolizmasında yer alan diğer genlerin aktivasyonunu artırmaktadır^{223,224}.



Şekil-8: PDX-1'in nükleustan sitoplazmaya yer değiştirmesinin oksidatif stres artışı ve FOXO aktivasyonu ile indüklenmesi²²⁵.

PDX-1, GLUT-2 gen promotöründe yer alan oldukça korunmuş 'TAAT' dizisi ile birleşerek GLUT-2'nin transkripsiyonunu ve ekspresyonunu aktive eder. Sonuç olarak β -hücre fonksiyonunu etkilemektedir²²⁶.



Şekil-9: Sitoplazmada PDX-1'in aktivitesinin azalması sonucunda Glut-2 ekspresyonunda azalma gerçekleşmesi ve hiperglisemiye tetikleyen kümülatif süreç²²⁵.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Bu deneysel çalışma Düzce Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun 2021/04/06 nolu onayı alınarak gerçekleştirilmiştir. Tüm ratlar üniversitemizin Deney Hayvanları Araştırma Merkezinden temin edilmiştir. Düzce Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 2021.04.01.1241 proje numarası ile desteklenmiştir.

3.1. Deney Hayvanları

Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi (DÜTF) Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu izni alındıktan sonra deney hayvanları, Düzce Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Laboratuvarında 22-25 °C oda ısısında, 60 ± 5 % nem ve 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık bir ortamda optimal değerlerde tutulan, havalandırma ve iyi hijyen şartlarında, gıda ve suya serbest erişime sahip, 2-3 aylık ve 300-350 gr ağırlığında 40 adet Wistar albino cinsi erkek rat kullanıldı. Ratların ağırlıkları ve kan glikoz düzeyleri çalışmanın başlangıcında ilk gün ölçüldü. Ölçümler her hafta düzenli olarak yapıldı. Çalışma 45 günde tamamlandı.

3.2. Deney Grupları

40 adet rat rastgele 5 gruba ayrıldı:

1.grup: Sham grubu (n=5) – 42 gün boyunca gavaj ile zeytinyağı (400 µl) verildi.

2.grup: Kontrol Streptozotocin grubu (n=10) – 0.günde tek doz 55 mg/kg Streptozotocin intraperitoneal yol ile verildi.

3.grup: Kontrol Carvacrol 40 mg/kg grubu (n=5) – 42 gün boyunca Carvacrol 40 mg/kg dozunda gavaj ile verildi.

4.grup: Streptozotocin + Carvacrol 20 mg/kg grubu (n=10) – 0.günde tek doz 55 mg/kg Streptozotocin intraperitoneal + 42 gün boyunca Carvacrol 20 mg/kg dozunda gavaj ile verildi.

5.grup: Streptozotocin + Carvacrol 40 mg/kg grubu (n=10) – 0.günde tek doz 55 mg/kg Streptozotocin intraperitoneal + 42 gün boyunca Carvacrol 40 mg/kg dozunda gavaj ile verildi.

Gruplara ayrılan hayvanlara 45 gün boyunca 08.00-12.00 saatleri arasında belirtilen maddeler uygulandı.

3.3. Verilen Maddeler ve Dozları

Çalışmamızın başlangıcında; diyabet gruplarına diyabet oluşturmak için tek doz 55 mg/kg Streptozotocin (Sigma, S0130) intraperitoneal olarak uygulandı. Streptozotocin 10 katı kadar distile su ile dilue edildi. Uygulamadan 72 saat sonra kan glikoz ölçümleri yapıldı ve 250 mg/dl'nin üzerindeki ölçümler diabetes mellitus olarak kabul edildi.

Ratlara Carvacrol; 4. gruba 20 mg/kg; 3. grup ve 5. gruba 40 mg/kg dozunda 42 gün boyunca her gün gavaj yoluyla uygulama yapıldı. Sıvı formdaki saflaştırılmış Carvacrol'ü (98%) (Sigma-Aldrich, 282197) çözmek için çalışmada zeytinyağı kullanıldı.

3.4. Cerrahi Prosedür

Tüm gruplarda, her bir hayvana ketamin (90 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) ile anestezi uygulandı. Daha sonra katman katman kesilerek pankreasa ulaşıldı. (Şekil-10). Pankreas dikkatli bir şekilde diseke edildi. Pankreas dokusu alındıktan hemen sonra; her bir hayvan için ayrı ayrı hazırlanmış 10%'luk formaldehit solüsyonuna alındı. Dokular formaldehit içerisinde 48 saat fikse edildikten sonra uygun boyutlarda trimlenerek doku kasetlerine yerleştirildi. Daha sonra doku takip prosedürü uygulanarak parafin bloklara gömüldü.



Şekil-10: Deney sonunda diseksiyonun gösterilmesi

3.5. Işık Mikroskopik İnceleme

3.5.1. Doku takibi ve parafin blok hazırlama

Dokular kasetlendikten sonra sırasıyla aşağıdaki işlemlerden geçirildi. Düşük dereceli etil alkolden yüksek dereceli etil alkole doğru kaplardan geçirilerek ve asetonda bekletilerek dokuların suyunun alınması ve dokuların sertleşip mikrotomda kesime uygun hale gelmesi sağlandı. Daha sonra ksilende şeffaflaştırıldı. En sonunda 75 °C sıcaklıktaki etüvde erimiş parafin içinde bekletildikten sonra gömme işlemi gerçekleştirildi.

- 1- 70%'lik etil alkolde 15 dakika bekletildi.
- 2- 80%'lik etil alkolde 15 dakika bekletildi.
- 3- 90%'lık etil alkolde 30 dakika bekletildi.
- 4- 90%'lık etil alkolde 30 dakika bekletildi.
- 5- 96%'lık etil alkolde 30 dakika bekletildi.
- 6- 96%'lık etil alkolde 30 dakika bekletildi.
- 7- 96%'lık etil alkolde 45 dakika bekletildi.

8- Asetonda 45 dakika bekletildi ve bu aşamadan sonra ksilen aşamasına geçildi.

9- Ksilende 30 dakika bekletildi. Bu aşamada dealkolizasyon ve dokuların şeffaflaştırılması sağlanmış oldu sonrasında; dokular etüvdeki sıvı parafin içerisine alındı.

10- Parafin aşamasında dokular 75 °C sıcaklıktaki etüv içerisindeki sıvı parafin içerisinde 60 dakika bekletildi.

11- Döküm aşaması: Dokular etüv içerisindeki parafinde bekletildikten sonra içinde sıcak parafin bulunan metal gömme kaplarının içerisine yerleştirildi. Blokların sertleşmesi için soğumaya bırakıldı.

Aşamalar sonrasında pankreas dokularımız parafin blok haline getirildi.

Parafin bloklardan Leica RM2245 mikrotomla, Feather marka metal mikrotom bıçakları kullanılarak 4 mikron kalınlığında kesitler alındı. Bu kesitler öncelikle sıcak su havuzuna alınarak düzleştirildi. Daha sonra lam üzerine alınarak boyamaya hazır hale getirildi.

Lam üzerine alınan pankreas dokuları, genel histolojik değerlendirme için Hematoksilen-Eozin ile boyanmıştır. Boyanan kesitler Olympus BX50 mikroskobu ile değerlendirildi ve bu değerlendirme sırasında Zeiss AxioCam ICc 5 kamera kullanılarak fotoğrafları çekildi.

3.5.2. Hematoksilen-eozin boyama yöntemi

1-Hematoksilen-eozin boyama öncesinde; doku dışındaki parafinin erimesi için parafin kesitler 75°C sıcaklıktaki etüvde 40 dakika bekletildi.

2-Kesitler etüvden çıkarıldıktan sonra iki ayrı ksilen kabında 15'er dakika olmak üzere toplam 30 dakika ksilende bekletildi, böylelikle doku içindeki parafinin erimesi sağlanmış oldu.

3- 96%'lık etil alkole 10 defa

- 4- 80%'lik etil alkole 10 defa
- 5- 70%'lik etil alkole 10 defa daldırıldı.
- 6- Akan suda yıkandı.
- 7- Hematoksilende 2 dakika bekletildi.
- 8- Akan suda yıkandı.
- 9- Asit alkole 2 defa daldırıldı.
- 10- Akan suda yıkandı.
- 11- Amonyaklı suya 2 defa daldırıldı.
- 12- Akan suda yıkandı.
- 13- 70%'lik etil alkole 10 defa daldırıldı.
- 14- Eozine 10 defa daldırıldı.
- 15- Akan suda yıkandı.
- 16- 70%'lik etil alkole 10 defa
- 17- 80%'lik etil alkole 10 defa
- 18- 96%'lık etil alkole 10 defa daldırıldı.
- 19- 1-2 dakika etüvde bekletildi.
- 20- Ksilende 10 dakika bekletildi.
- 21- Üzerine entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı.

3.5.3. İmmunohistokimyasal boyama

Çalışmada, diabetes mellitusun ve Carvacrol'un pankreas hücrelerindeki etkisini detaylı değerlendirmek için İnsülin, PI3K, pAkt ve GLUT-2 (SLC2A2) antikorları ile immünohistokimyasal inceleme yapılmıştır. (Anti-insulin- Invitrogen #PA5-120784, Anti-PIK3R1- St John's Laboratory STJ90925, Anti-

pAkt1- St John's Laboratory STJ91024, Anti-SLC2A2- St John's Laboratory STJ111885)

İmmunohistokimyasal boyama için uygulanan aşamalar:

Kesitler Polilizinli lamlara (immün lamı, özel lam) alındı.

1- Kesitler, 75°C etüvde 40 dakika bekletildi.

2- İki ayrı ksilen kabında sırasıyla 10 ve 5 dakika bekletildi.

3- Sırasıyla 100%, 90%, 80% ve 70%'lik etil alkolde 5'er dakika bekletildi.

4- Distile suda 5 dakika bekletildi.

5-Kesitlere mikrodalgada uygun sıcaklıkta sitrat solüsyonu içerisinde 2 kez 5'er dakika antigen retrieval uygulandı.

6- Oda ısısında 20 dakika soğumaya bırakıldı.

7- PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkama yapıldı.

PBS hazırlama:

2,85 gram Di Sodyum Hidrojen Fosfat (N49), 16 gram Sodyum Klorür (N9) ve 0,8 gram Potasyum Dihidrofosfat 2 litre distile su içerisinde çözüldü. pH'si 7,2-7,4 olacak şekilde kontrolü yapıldı.

8- 3%'lük Hidrojen Peroksitte 15 dakika bekletildi. (63 ml Methanol + 7 ml Hidrojen Peroksit olarak hazırlandı.)

9- PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkama yapıldı.

10- Şaleden alınan lamlarda dokuların etrafı kurulandı sonrasında Pap-pen ile dokuların etrafı çizildi.

11- Lamlar immunohistokimya humidity chambera dizildi.

12- Dokulara UV Block damlatıldı. Bu aşamada 7 dakika bekletildi.

13- Primer antikolar hazırlandı. Anti-phospo-AKT1 1:100, Anti-phospo-PIK3R1 1:100, Anti-SLC2A2 1:100 ve Anti-insulin 1:100 oranlarında hazırlandı. Primer antikolar hazırlanırken PBS ile sulandırıldı.

14- Seçilen dokulara primer antikorlar damlatıldı ve kontrol dokularına da PBS damlatıldı. Dokular humidity chamber içerisinde Primer antikor ile +4°C'de gece boyu bekletildi.

15- Ertesi gün şaleye dizilen lamlar 3 ayrı PBS solüsyonu ile 5'er dakika yıkandı.

16- Lamlar humidity chambera dizilerek dokulara sekonder antikor (sarı link) damlatıldı, 1 saat bekletildi.

17- Şaleye alınan lamlar PBS solüsyonu ile 3 kez 5'er dakika yıkandı.

18- Humidity chambera dizilen lamlara Streptavidine (HRP) solüsyonu damlatıldı, 15 dakika bekletildi.

19- Lamlar şalede 3 ayrı PBS solüsyonu ile 5'er dakika yıkandı.

20- Dokulara DAB Chromogen Solüsyonu damlatıldı ve 5 dakika bekletildi. Bu süre içerisinde mikroskopta dokudaki reaksiyon takip edildi. Reaksiyonu durdurmak için distile su kullanıldı.

21- Mayer's hematoksilin ile 1 dakika zıt boyama yapıldı.

22- Çeşme suyunda yıkanan lamlar şaleye alındı.

23- Lamlar sırasıyla 70%lik, 80%lik ve 90%lık alkol serilerinde 10 kez daldırılıp dokular dehidrate edildi. 100%lük etil alkolde 4 dakika bekletildi.

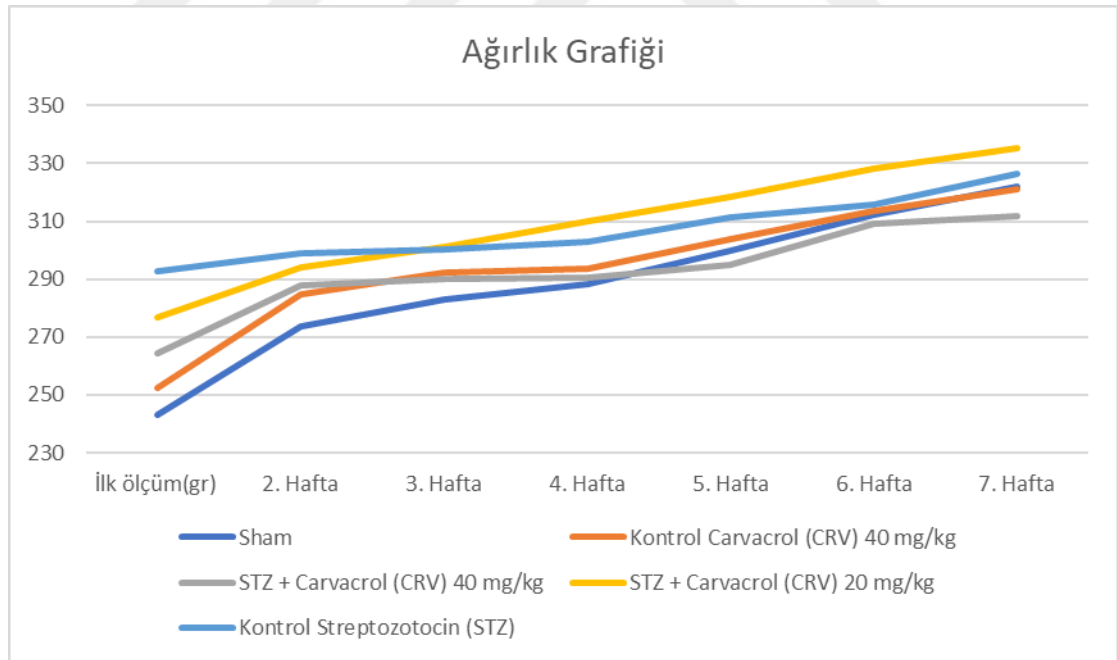
24- 2 ayrı ksilen solüsyonunda 5'er dakika bekletildi.

25- Ksilenden çıkarılan dokuların üzerine entellan damlatılarak lamelle kapatılma işlemi yapıldı.

4.BULGULAR

4.1. Denek Ağırlıkları

Deneyimizin başlangıcında toplam 5 gruptan oluşan 40 adet Wistar cinsi ratın ağırlıkları tartıldı ve hayvanlar gruplara rastgele dağıtıldı. Ratların ağırlık ölçümü darası alınan boş bir kabın içerisinde her hafta düzenli olarak terazi ile yapıldı. Grupların haftalık ağırlık ölçümü ortalamasının grafiği Şekil-11’de gösterilmektedir. Ratların deney başlangıcındaki ve sonundaki vücut ağırlık ölçümleri incelendiğinde: 45 günün sonunda vücut ağırlık artışı en az olan grup STZ grubu oldu. En fazla vücut ağırlık artışı ise Sham ve Kontrol CRV 40 gruplarında gözlemlendi. STZ grubu ile kıyaslandığı zaman STZ+CRV tedavi gruplarında ağırlık artışı daha fazla bulundu. STZ+CRV 20 mg/kg grubundaki ratlarda vücut ağırlık artışının, STZ+CRV 40 mg/kg grubuna kıyasla daha fazla olduğu sonucuna varıldı.



Şekil-11: Grupların haftalara göre ağırlık değişiminin grafik ile gösterimi.

En az ağırlık artışı STZ grubunda; en fazla ağırlık artışı ise Sham ve Kontrol CRV 40 gruplarında gerçekleşti. STZ+CRV 20 grubundaki ratlarda vücut ağırlık artışının; STZ+CRV 40 grubuna kıyasla daha fazla olduğu gözlemlendi.

STZ grubundaki ratlarda belirgin polidipsi, poliüri, besin tüketiminde artış ve dehidrasyon gözlemlendi. Ratların kafesleri günlük temizlendi, değiştirildi (Şekil-12). Poliüri nedeniyle STZ grubunun kafesinde her gün yoğun ıslaklık mevcuttu ve su tüketiminde artış belirgin derecede gözlemlendi (Şekil-13). Kafeslerdeki günlük ıslaklık oranı STZ+CRV 20 grubunda ise fark edilir şekilde azaldı (Şekil-14).



Şekil-12: Deney hayvanlarının kafesleri



Şekil-13: STZ grubu



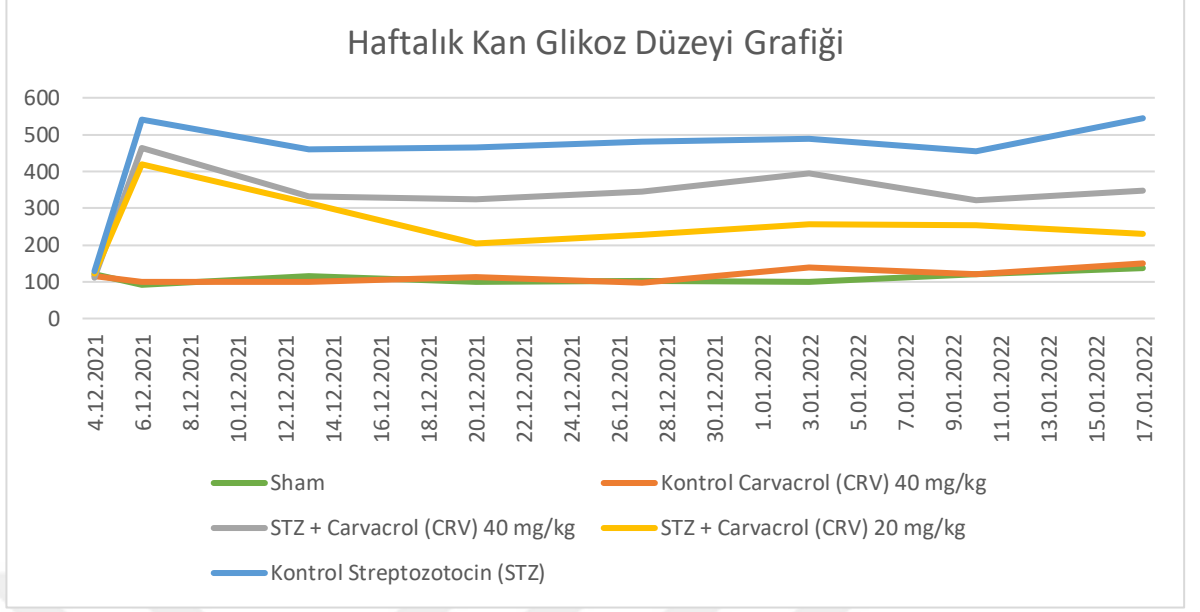
Şekil-14: STZ+CRV 20 grubu

4.2. Deneklerin Kan Glikoz Ölçümleri

Çalışmanın ilk günü Streptozotocin enjeksiyonu öncesinde 40 ratın kuyruktan tail veinden lme-dc marka glikometer cihazı kullanılarak strip ile kan glikoz düzeyi tespit edildi. lme-dc marka glikometer ölçüm aralığı 20-600 mg/dL'dir. Kan glikozu 600 mg/dL ve üzeri olduğunda cihazda sonuç high olarak görünmektedir. Çalışmamızda ölçümde cihazda high sonucu çıkan değerler 600 mg/dL olarak kabul edildi.

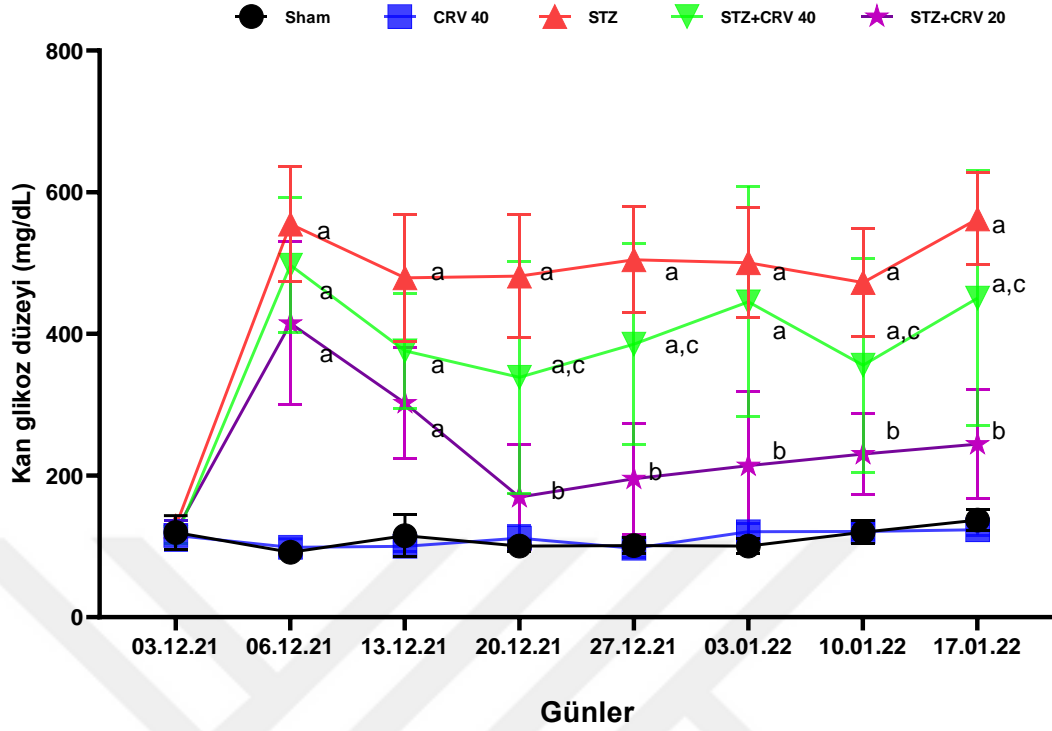
Deney öncesinde 40 ratın kan glikoz düzeyi ortalaması 120 mg/dL olarak bulundu. 40 hayvanın her birinin kan glikoz düzeyi 250 mg/dL'den düşük bulunmuş olup non-diyabetiktir. 0. günde STZ, STZ+CRV 40mg/kg ve STZ+CRV 20 mg/kg gruplarına tek doz 55 mg/kg STZ enjeksiyonu intraperitoneal uygulandı. Uygulamadan 72 saat sonra STZ deney gruplarındaki her ratın kan glikoz ölçümü 250 mg/dL ve üzerinde bulundu ve 3 gruptaki ratlar diyabetik kabul edildi. Aynı gün Kontrol CRV 40 mg/kg, STZ+CRV 40 mg/kg ve STZ+CRV 20 mg/kg gruplarına 42 gün Carvacrol tedavisi belirtilen dozlarda gavaj yolu ile uygulanmaya başlandı. Haftalık kan glikoz ölçümleri ile takip sağlandı.

Deney süreci boyunca kan glikoz seviyesindeki değişim Şekil-15'te gösterilmektedir. STZ+CRV 40 mg/kg ile STZ+CRV 20 mg/kg gruplarının kan glikoz ortalaması Carvacrol uygulamasının 1. haftasında birbirine yakın değerlerde iken ilerleyen haftalarda STZ+CRV 20 mg/kg grubunda kan glikoz düzeyindeki düşüş daha belirgin olmuştur. Deney süresince STZ+CRV 40 mg/kg grubunun seyri inişli çıkışlı olmuştur. 40 mg/kg CRV tedavisinin 1. haftasında kan glikoz düzeyi düşüşe geçti, 4. haftada yükselme eğilimi gösterdi. 5. haftada kan glikoz düzeyinde azalma tespit edildi ve 6. haftada kan glikoz seviyesi tekrar artış gösterdi. Deney boyunca STZ grubu kan glikoz ortalaması 455 mg/dL'nin altına düşmemiştir.



Şekil-15: Grupların haftalık kan glikoz düzeyi değişiminin grafik ile gösterimi.

42 gün Carvacrol uygulanan deney sonunda kan glikoz ortalaması STZ+CRV 40 mg/kg grubunda 348 mg/dL; STZ+CRV 20 mg/kg grubunda ise 230 mg/dL ölçüldü. Sham ve Kontrol CRV 40 gruplarında kan glikozunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. STZ uygulaması ile 3. günde, STZ+CRV 20 mg/kg grubundaki ratların kan glikoz düzeyi ortalama 419 mg/dL olmuştur. 42 gün Carvacrol uygulaması sonucunda kan glikoz değerinin 230 mg/dL'ye düştüğü görüldü.



Şekil-16: Grupların haftalık kan glikoz düzeyi analiz grafiği

Deney sonucunda kan glikoz düzeyi analizi yapıldığında: STZ+CRV 20 grubu ile STZ+CRV 40 grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık görüldü ($p < 0.05$). STZ grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edildi ($p < 0.05$). STZ+CRV 20 grubu ile Sham ve Kontrol CRV 40 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ($p > 0.05$). Sham ve Kontrol CRV 40 grupları arasında da anlamlı farklılık görülmedi ($p > 0.05$). ^aSham ve CRV40'a, ^bSTZ ve STZ+CRV 40'a, ^cSTZ'ye göre anlamlılığı gösterir.

Kan glikoz değerlerinin analizinde 6 haftalık süreç incelendi. Deney süresince ölçülen kan glikoz düzeylerinin analizi 2-way ANOVA testi ile yapıldı (Şekil-16). İlk ölçümde kan glikoz değerleri ratlarda birbirine yakın olup aralarında anlamlı bir farklılık bulunmadı. Carvacrol uygulamasının 2. haftasında STZ grubu ile STZ+CRV 20 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluştu ve deney sonuna kadar da devamlılık gösterdi. 2. haftada STZ grubu ile STZ+CRV 40 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlemlendi ($p < 0.05$). Şekil-16'da 4. haftaya denk gelen 03.01.22 tarihindeki ölçümlere göre; STZ grubu ile STZ+CRV 40 grubu arasında anlamlı

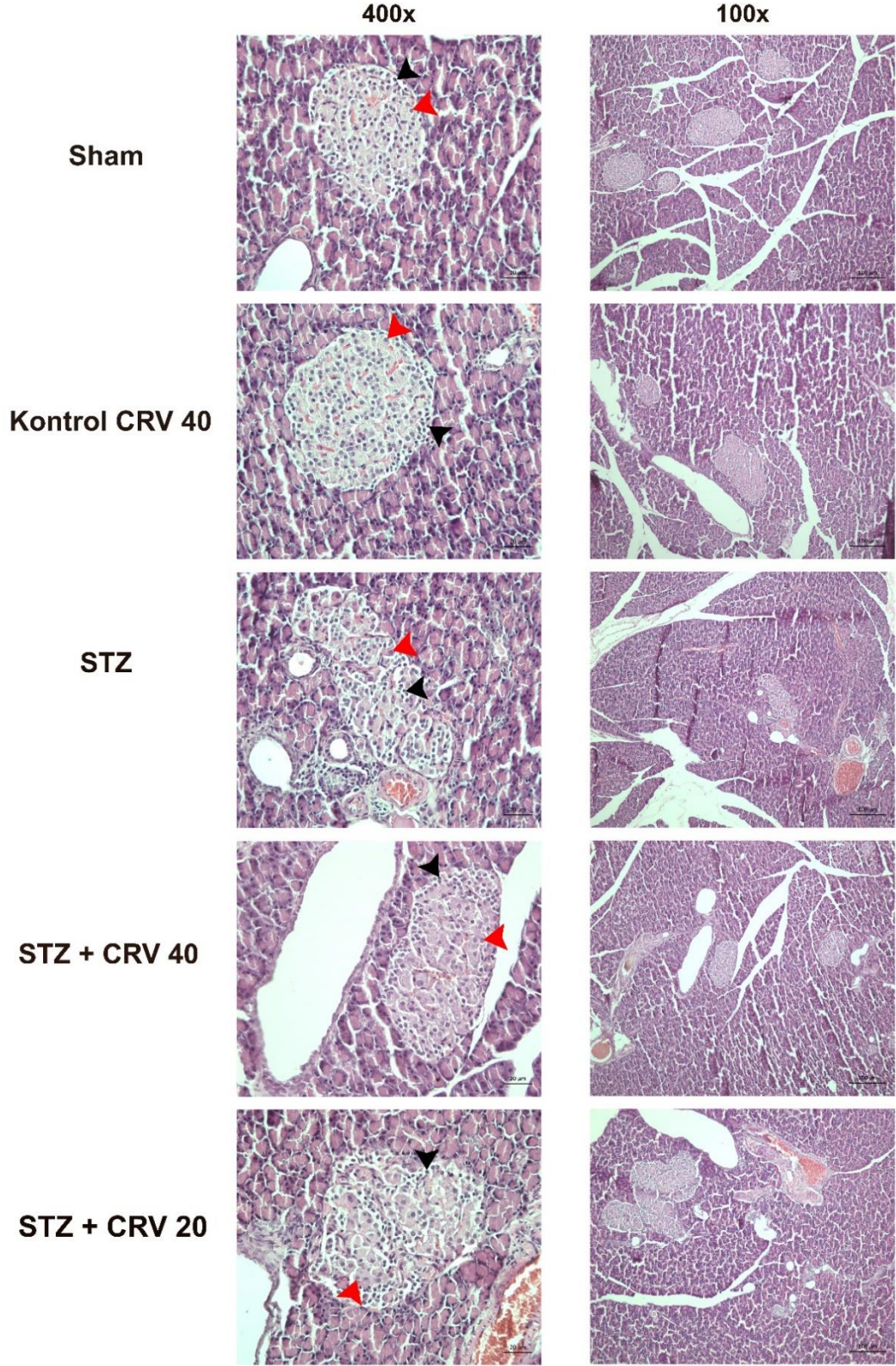
bir farklılık gözlenmedi ($p>0.05$). 5. ve 6. haftadaki ölçümlerde ise STZ grubu ile STZ+CRV 40 grubu arasında tekrar istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edildi ($p<0.05$).

Carvacrol uygulamasının 2. haftasında Sham ve Kontrol CRV 40 grupları ile STZ+CRV 20 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0.05$). Sham ve Kontrol CRV 40 grupları ile STZ+CRV 40 grubu arasında deney süresince istatistiksel olarak anlamlı farklılık korundu ($p<0.05$). 2. haftada yapılan kan glikozu ölçümlerinde, STZ+CRV 40 grubu ile STZ+CRV 20 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edildi ve deney sonuna kadar anlamlı farklılık durumu varlığını sürdürdü ($p<0.05$).

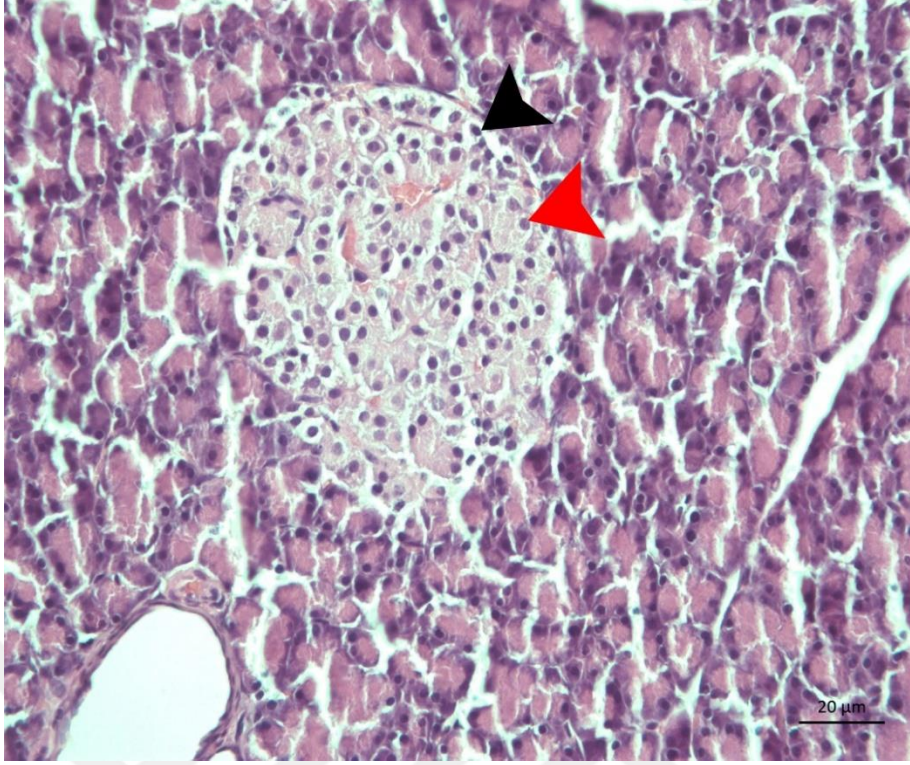
4.3. Hematoksilen – Eozin Boyama

Pankreas ve Langerhans adacıklarının genel morfolojisini göstermek amacıyla formol solüsyonunda fiksasyonu sağlanan dokuların kesitlerine Hematoksilen-Eosin boyası uygulandı. Hematoksilen-Eosin boyaması ile tüm gruplarda pankreas dokusunun genel yapısının korunduğu gözlemlendi. Koyu boyanan pankreatik asiner hücrelerin arasında açık renkli boyanan Langerhans adacıkları gözlemlendi. Tüm gruplarda Langerhans adacıklarının sınırlarının düzgün olduğu belirlendi. Gruplar arasında adacık sayısı farklılığı tespit edilmedi. HE boyama ile β ve α hücreleri seçildi ve Şekil- 17’de gösterildi. Adacık boyutları değişkenlik gösterdiği için HE boyamada gruplar arası β hücrelerinin dağılım oran farklılıkları değerlendirilmedi.

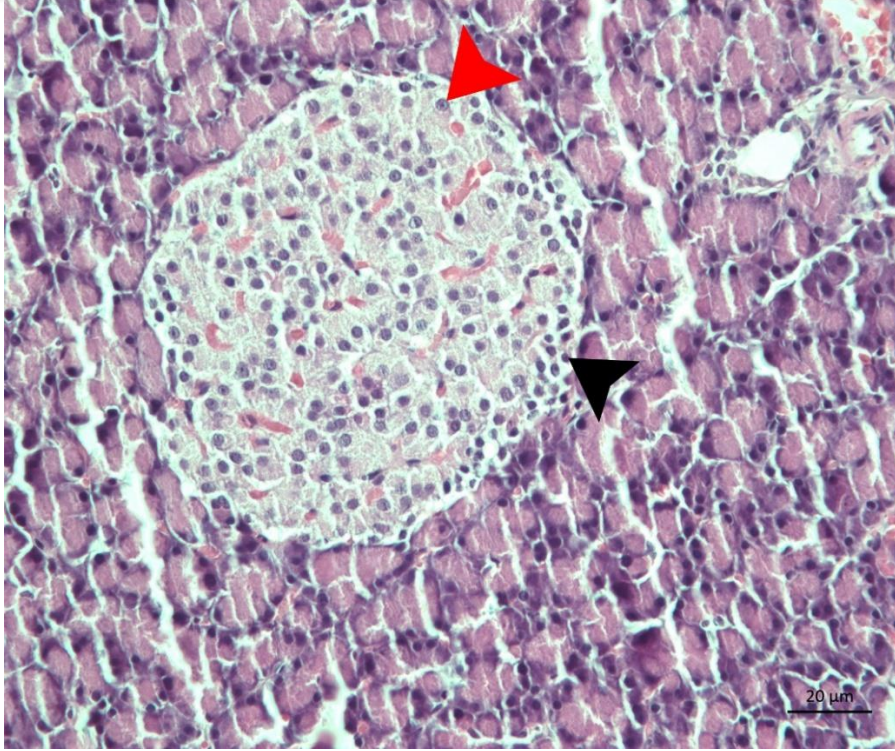
Hematoksilen - Eosin Boyaması



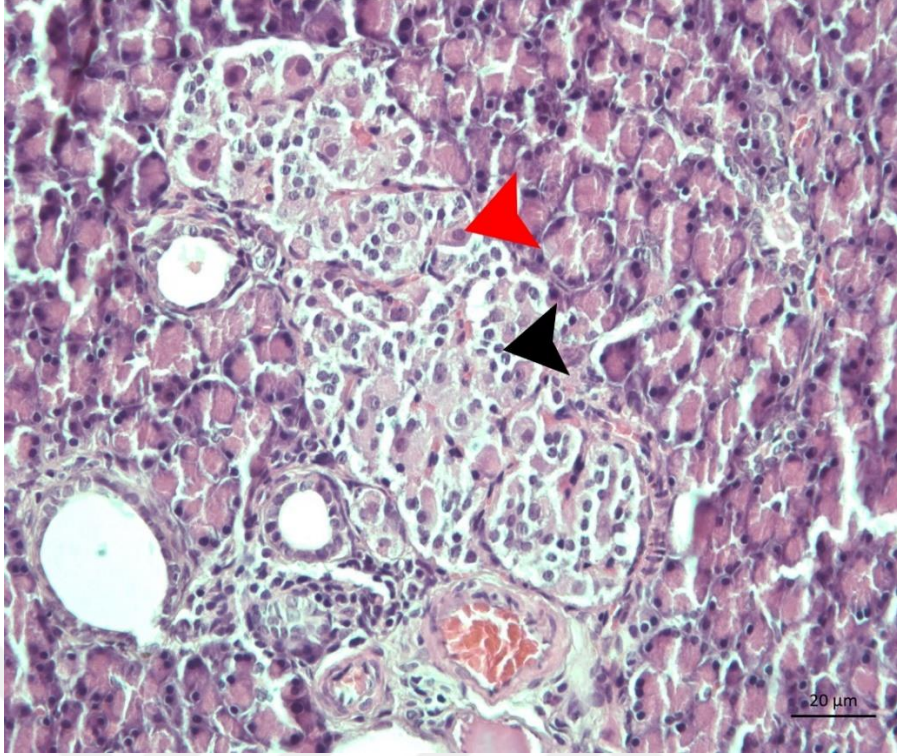
Şekil-17: Tüm grupların pankreas dokusunun Hematoksilen – Eozin boyaması (400x-100x) (Kırmızı ok: β hücresi, siyah ok: α hücresi)



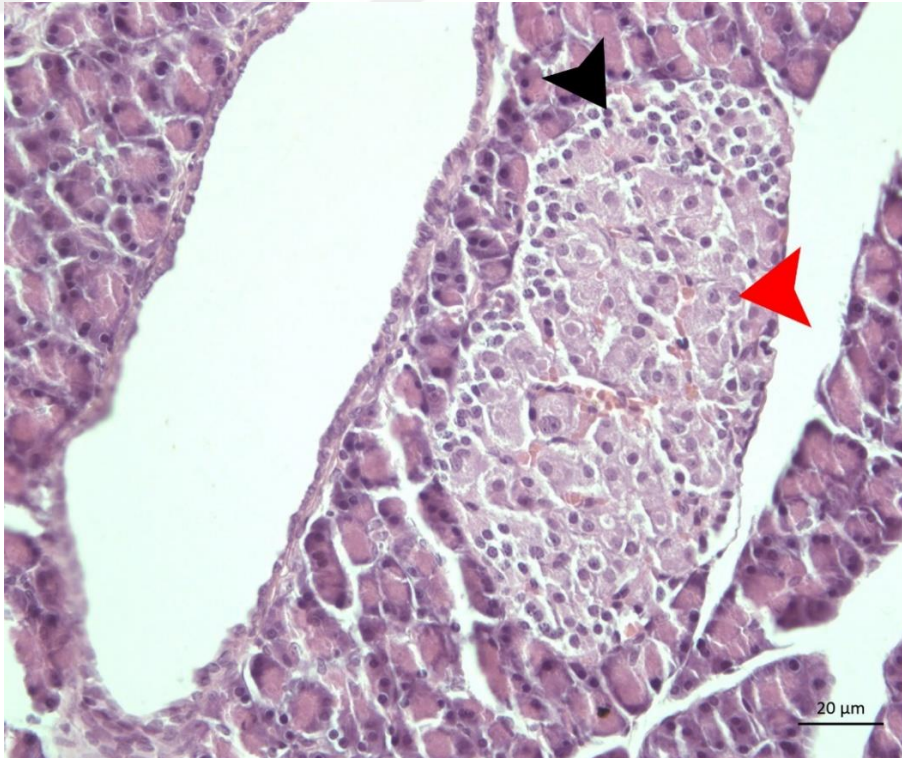
Şekil-18: Sham grubunun Hematoksilen-Eozin boyaması (400x) (Kırmızı ok: β hücresi, siyah ok: α hücresi)



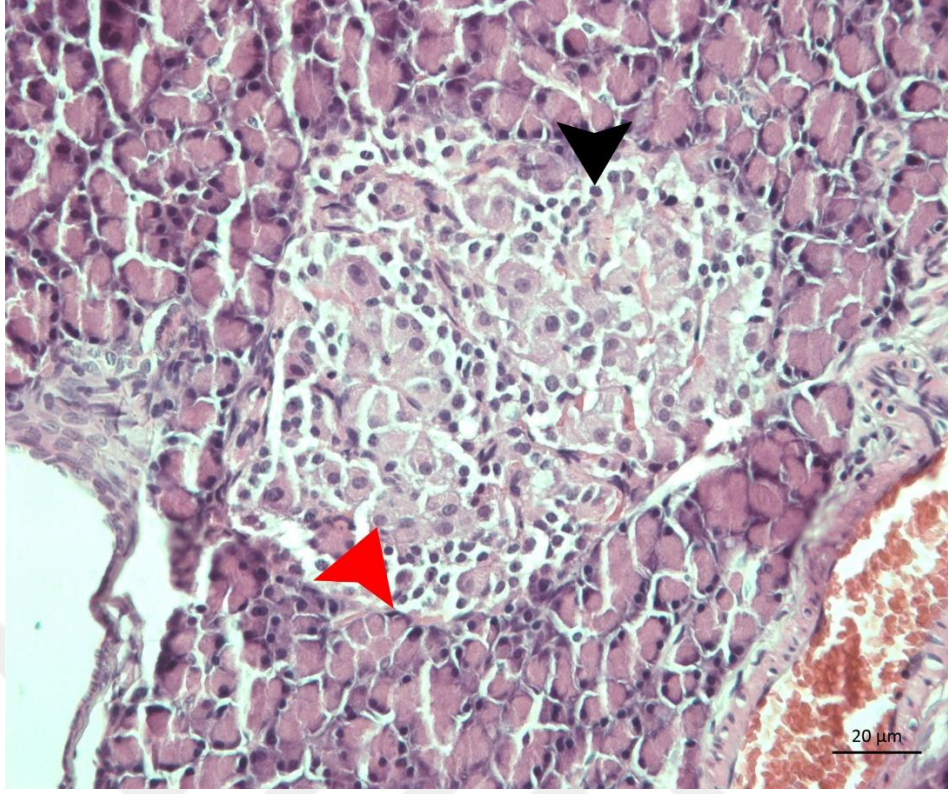
Şekil-19: Kontrol CRV 40 grubunun Hematoksilen-Eozin boyaması (400x) (Kırmızı ok: β hücresi, siyah ok: α hücresi)



Şekil-20: STZ grubunun Hematoksilen-Eozin boyaması (400x) (Kırmızı ok: β hücresi, siyah ok: α hücresi)



Şekil-21: STZ+CRV 40 grubunun Hematoksilen-Eozin boyaması (400x) (Kırmızı ok: β hücresi, siyah ok: α hücresi)



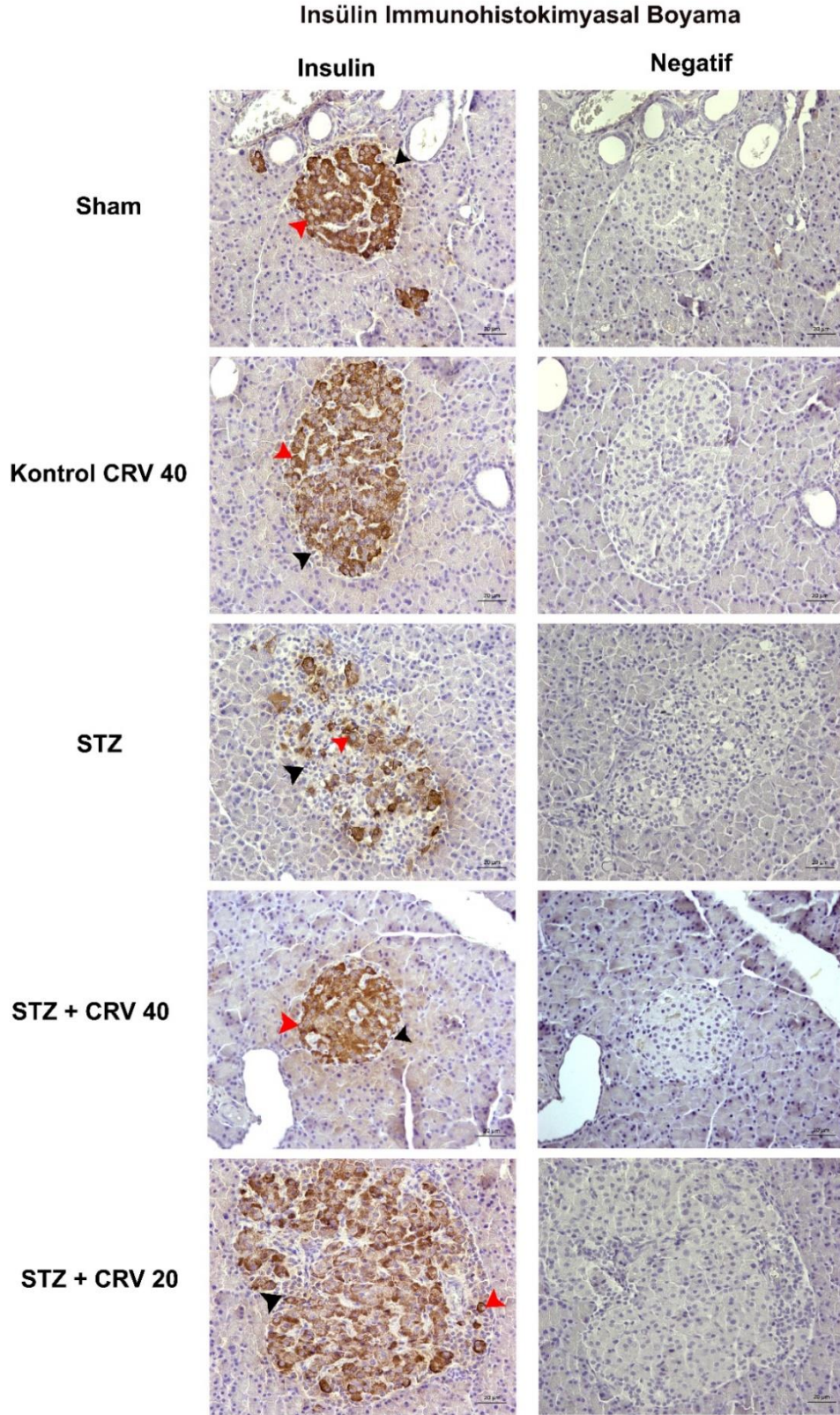
Şekil-22: STZ+CRV 20 grubunun Hematoksilen-Eozin boyaması (400x) (Kırmızı ok: β hücresi, siyah ok: α hücresi)

4.4. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Tüm gruplardaki ratların pankreas kesitlerinde; Langerhans adacıklarında bulunan β hücrelerini göstermek için Anti-insülin, Anti-PI3K, Anti-pAkt ve Anti-Glut-2 antikorum ile immünohistokimyasal boyama yapıldı. Sham ve Kontrol CRV 40 gruplarında anlamlı farklılık gözlenmedi. STZ grubunda 4 antikorda da ekspresyonda azalma tespit edildi. STZ+CRV 40 ve STZ+CRV 20 grupları, STZ grubu ile kıyaslandığında Langerhans adacıklarındaki β hücrelerinde ekspresyon belirgin derecede yoğun görüldü.

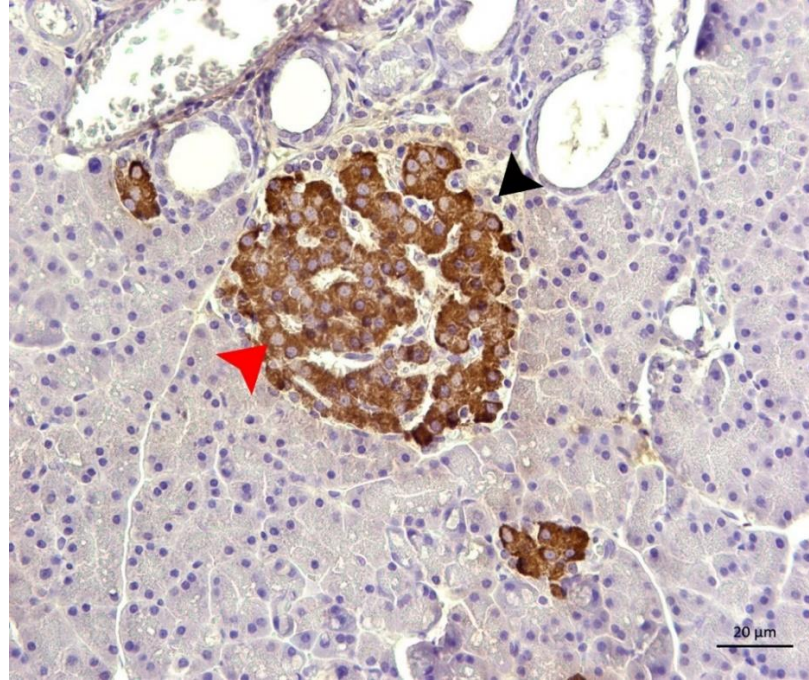
Tüm gruplar p-Akt antikoru ile boyandığında en zayıf ekspresyonun STZ grubunda olduğu görüldü. STZ grubu ile kıyaslandığı zaman STZ+CRV 40 ve STZ+CRV 20 tedavi gruplarında ekspresyonun artmış olduğu gözlemlendi (Şekil-35).

4.4.1. İnsülin immünohistokimyasal boyama

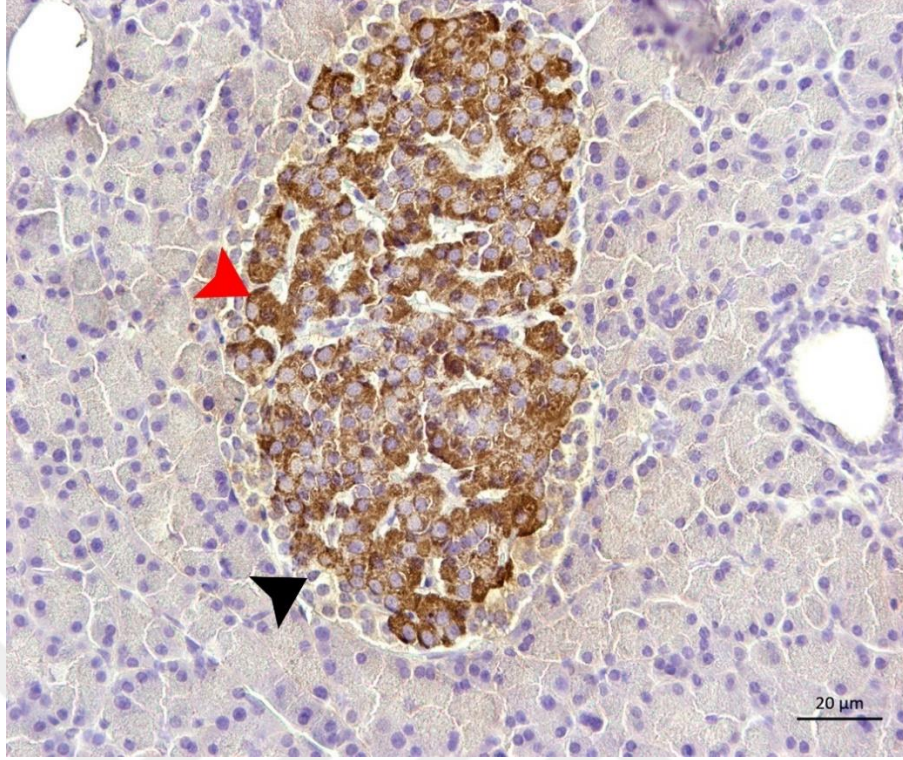


Şekil-23: Grupların anti-İnsulin Antibody ile pozitif ve kontrol negatif boyaması (400x)
(Kırmızı ok: β hücresi, siyah ok: α hücresi)

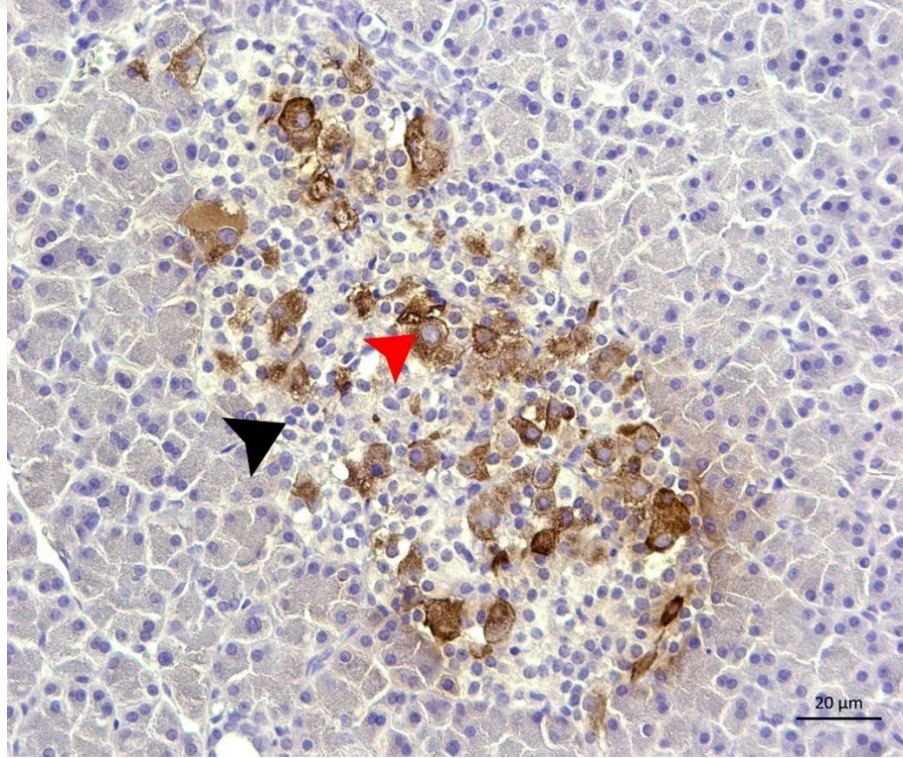
Tüm gruptaki ratların pankreas dokusu Anti-Insulin antikoruna ile immünohistokimyasal boyama sonrası incelendi ve analizi yapıldı. Denek hayvanların pankreas dokusunda Langerhans adacıkları ve ekzokrin kısmı intakt olarak gözlemlendi. Anti-Insülin Antikoru ile yapılan incelemede; insülin sekresyonunun gerçekleştiği Langerhans adacığı β hücrelerinde ekspresyon tespit edildi. Sham ve Kontrol CRV 40 gruplarında β hücrelerinde yoğun insülin ekspresyonu mevcut iken STZ grubunda azalma gözlemlendi. Diyabetik gruplara Carvacrol uygulanması ile insülin ekspresyonundaki değişim Şekil-23'te gösterilmiştir. Sham ile Kontrol CRV 40 grupları arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p=0.107$). STZ grubu; diğer 4 grup ile karşılaştırıldığında insülin ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlemlendi ($p<0.05$). STZ+CRV 40 grubu ile STZ+CRV 20 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ($p<0.05$). Diyabetik gruplar içerisinde Anti-Insulin antikorunun ekspresyonu en yoğun STZ+CRV 20 grubunda gözlemlendi. T1DM rat modelinde Carvacrol'ün 20 mg/kg/gün doz uygulanması ile β hücrelerinden insülin proteininin ekspresyonunda artış tespit edildi. İnsülin sekresyon artışı, çalışmamızda bulduğumuz kan glikoz düzeyindeki azalmayı açıklamaktadır.



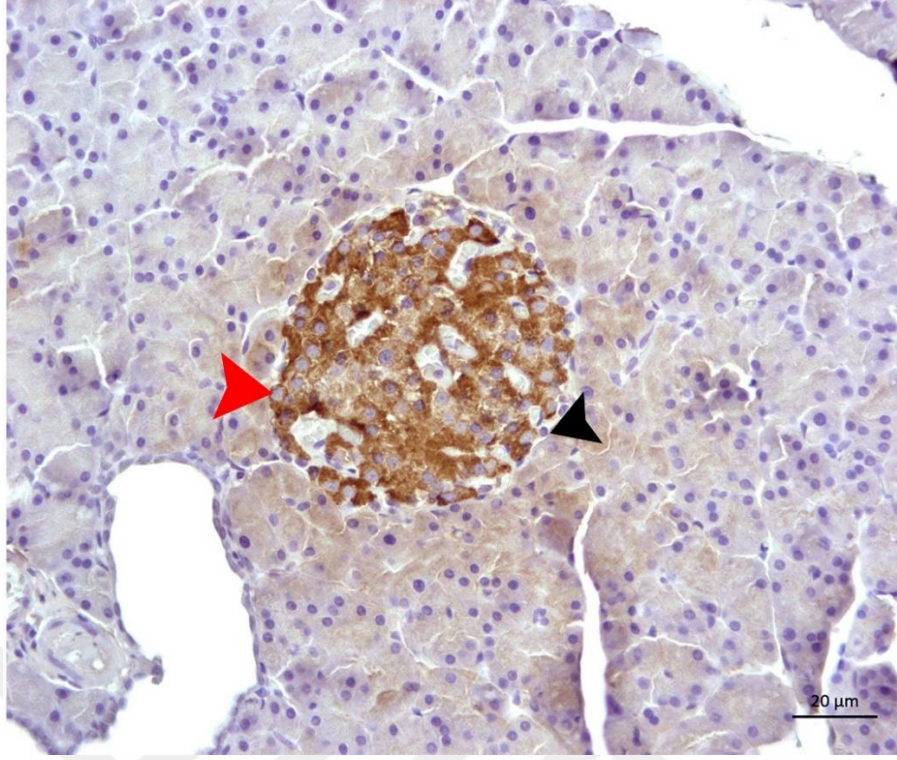
Şekil-24: Anti-Insulin Antibody ile Sham grubunun immünohistokimyasal boyaması (400x) (Kırmızı ok: β hücresi, siyah ok: α hücresi)



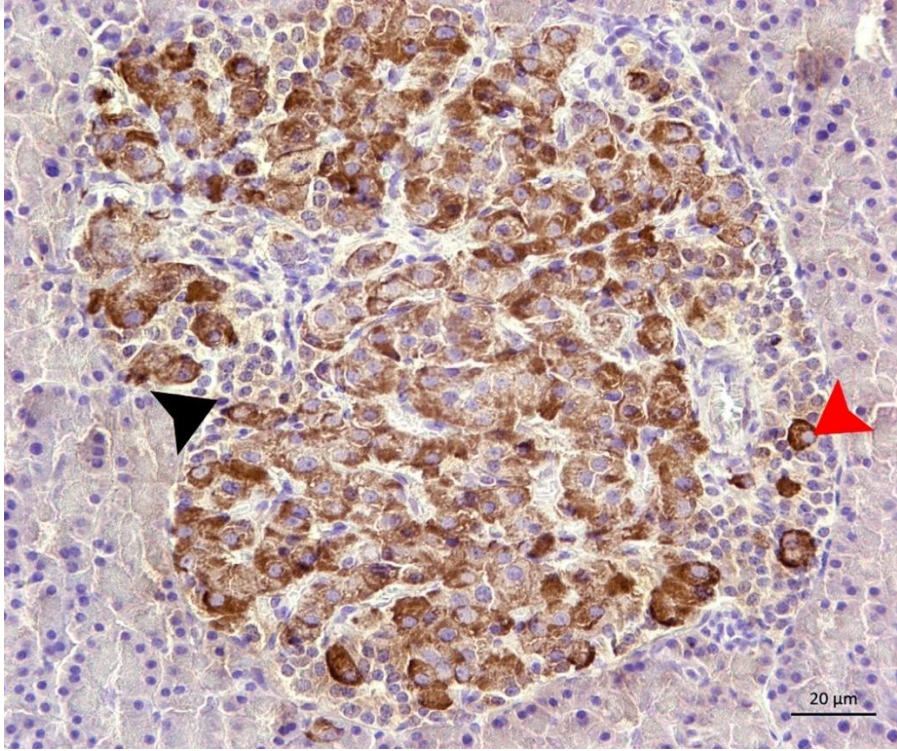
Şekil-25: Anti-Insulin Antibody ile Kontrol CRV 40 grubunun immünohistokimyasal boyaması (400x) (Kırmızı ok: β hücresi, siyah ok: α hücresi)



Şekil-26: Anti-Insulin Antibody ile STZ grubunun immünohistokimyasal boyaması (400x) (Kırmızı ok: β hücresi, siyah ok: α hücresi)

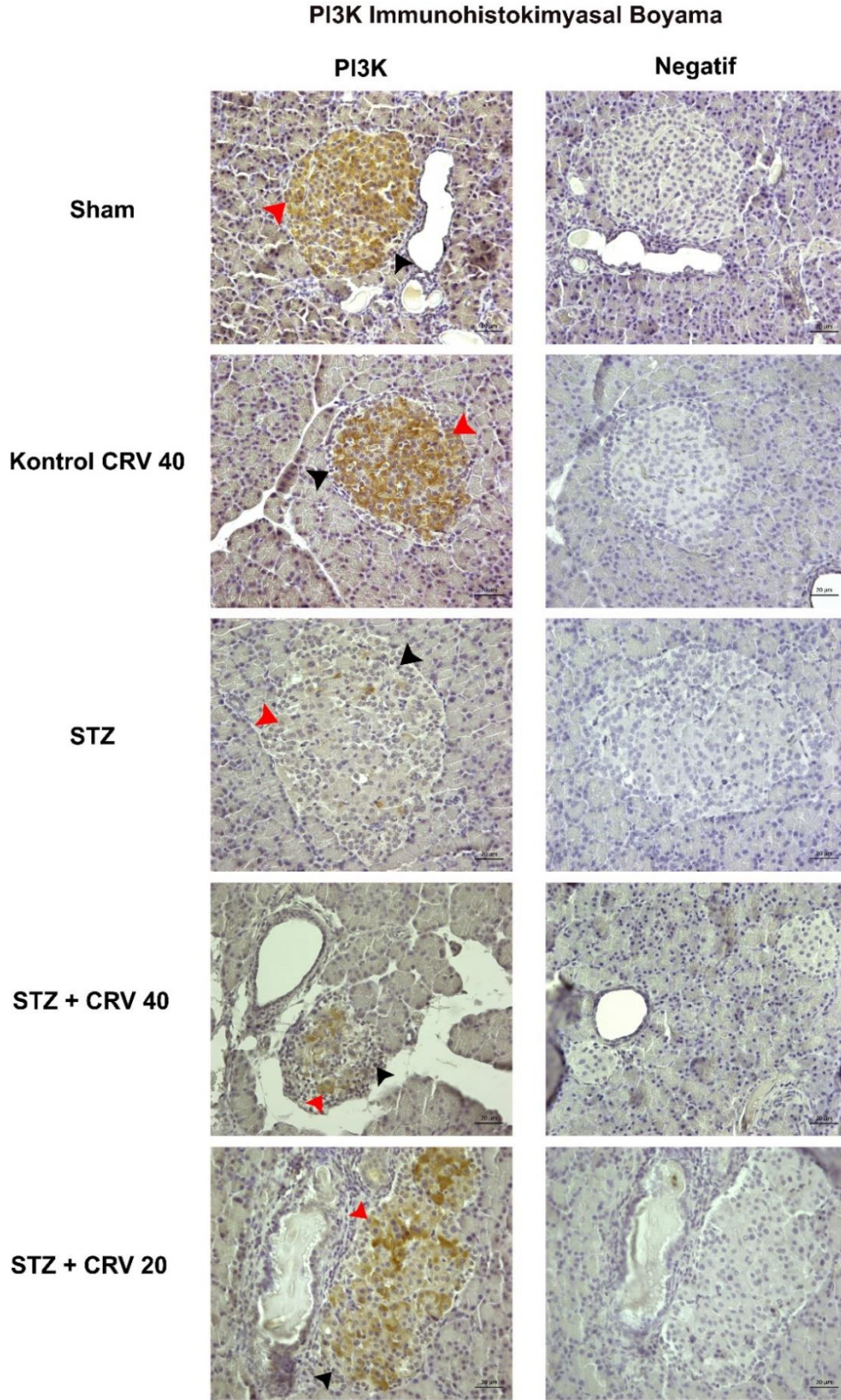


Şekil-27: Anti-Insulin Antibody ile STZ+CRV 40 grubunun immünohistokimyasal boyaması (400x) (Kırmızı ok: β hücresi, siyah ok: α hücresi)



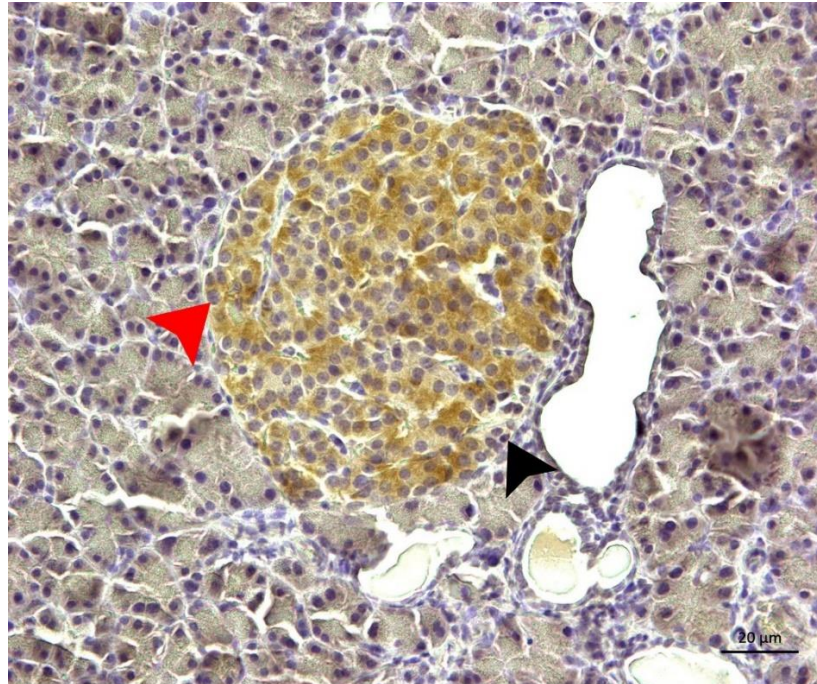
Şekil-28: Anti-Insulin Antibody ile STZ+CRV 20 grubunun immünohistokimyasal boyaması (400x) (Kırmızı ok: β hücresi, siyah ok: α hücresi)

4.4.2. PI3K immünohistokimyasal boyama

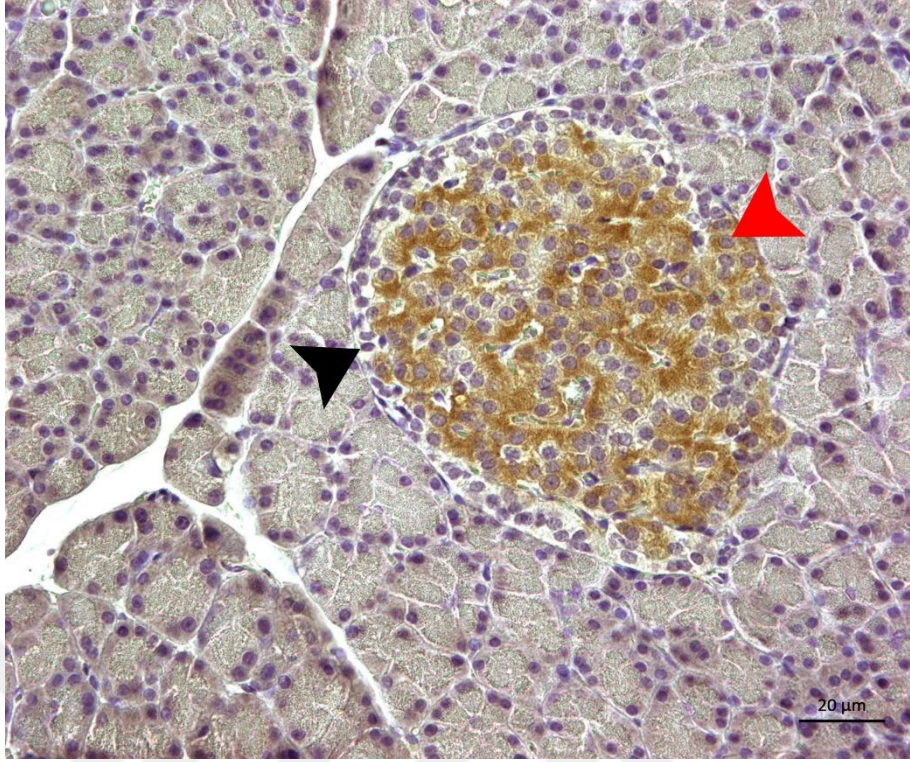


Şekil-29: Grupların anti-PI3K Antibody ile pozitif ve kontrol negatif boyaması (400x)
(Kırmızı ok: β hücresi, siyah ok: α hücresi)

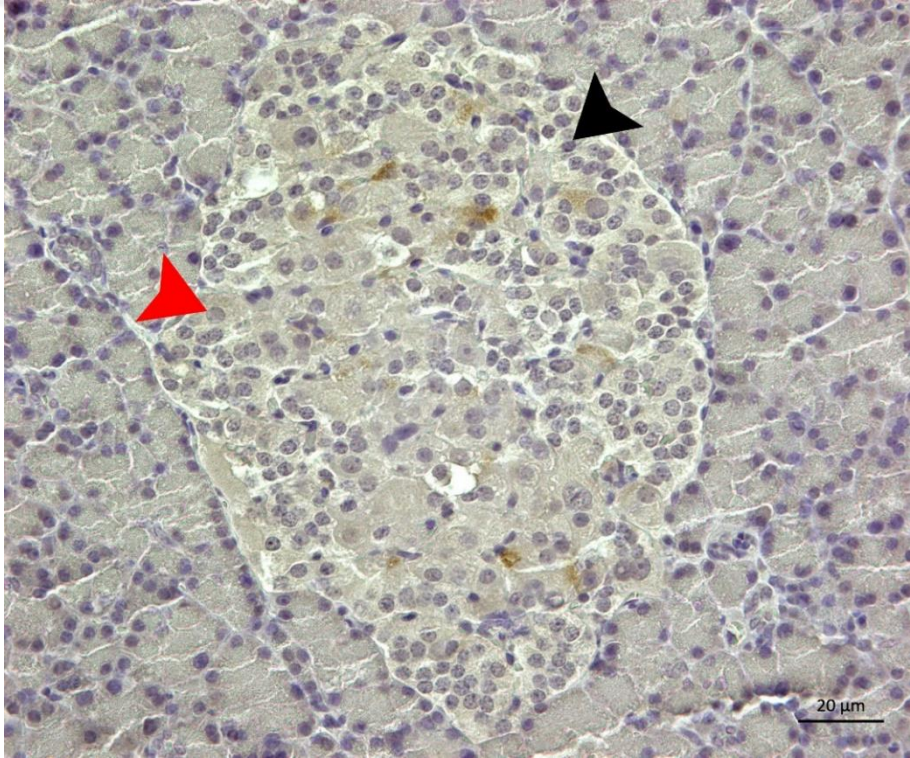
Tüm gruplardaki ratların pankreas dokusu Anti-PI3K antikoruna ile immünohistokimyasal boyama sonrası incelendi ve analizi yapıldı. Denek hayvanların pankreas dokusunda Langerhans adacıkları ve ekzokrin kısmı intakt olarak gözlemlendi. Anti-PI3K Antikoru ile yapılan incelemede; PI3K sekresyonu Langerhans adacığı β hücrelerinde gözlemlenmektedir. Sham ve Kontrol CRV 40 gruplarında β hücrelerinde yoğun PI3K ekspresyonu tespit edildi. Ancak; STZ grubunda zayıf ekspresyon gözlemlendi (Şekil-32). Diyabetik gruplara Carvacrol uygulanması ile PI3K ekspresyonundaki artış Şekil-29'da gösterilmiştir. Sham ile Kontrol CRV 40 grupları arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p=0.513$). STZ grubu; diğer 4 grup ile karşılaştırıldığında PI3K ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdi ($p<0.05$). STZ+CRV 40 grubu ile STZ+CRV 20 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ($p<0.05$). STZ uygulanan gruplar içerisinde; Anti-PI3K antikoruna ile en yoğun ekspresyon STZ+CRV 20 grubunda gözlemlendi. T1DM rat modelinde Carvacrol'ün 20 mg/kg/gün doz uygulanması ile PI3K protein ekspresyonunda artış tespit edildi. İnsülin sekresyonunu başlatan yolak olduğu için, PI3K artışı önemlidir. PI3K proteini, STZ grubundaki gibi azaldığında insülin sekresyonu da bozulmaktadır.



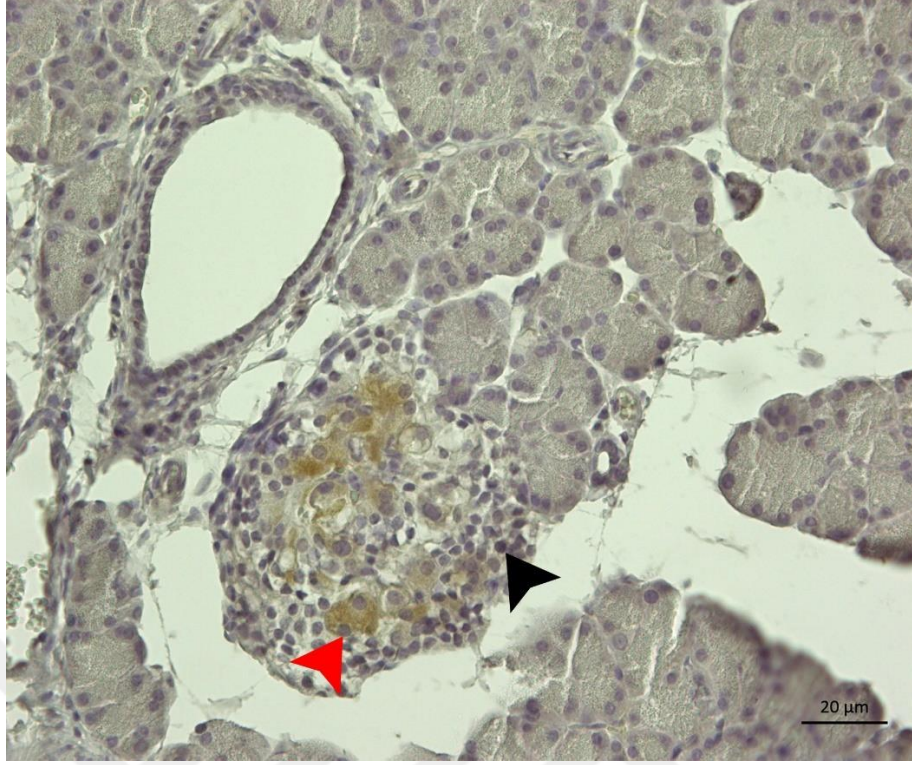
Şekil-30: Anti-PI3K Antibody ile Sham grubunun immünohistokimyasal boyaması (400x)
(Kırmızı ok: β hücresi, siyah ok: α hücresi)



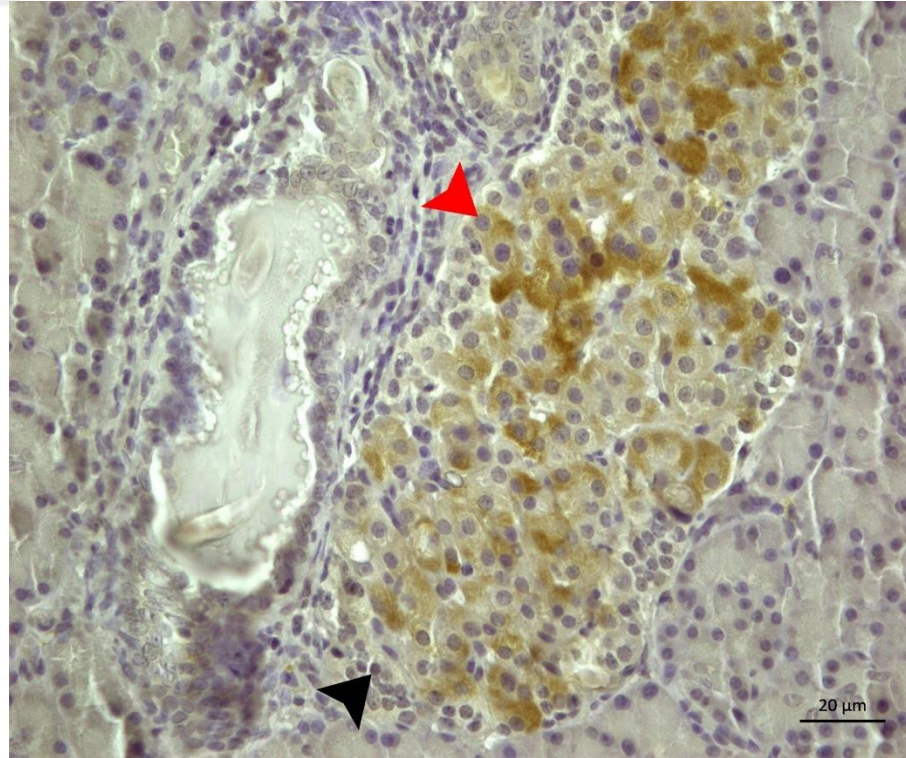
Şekil-31: Anti-PI3K Antibody ile Kontrol CRV 40 grubunun immünohistokimyasal boyaması (400x) (Kırmızı ok: β hücresi, siyah ok: α hücresi)



Şekil-32: Anti-PI3K Antibody ile STZ grubunun immünohistokimyasal boyaması (400x) (Kırmızı ok: β hücresi, siyah ok: α hücresi)

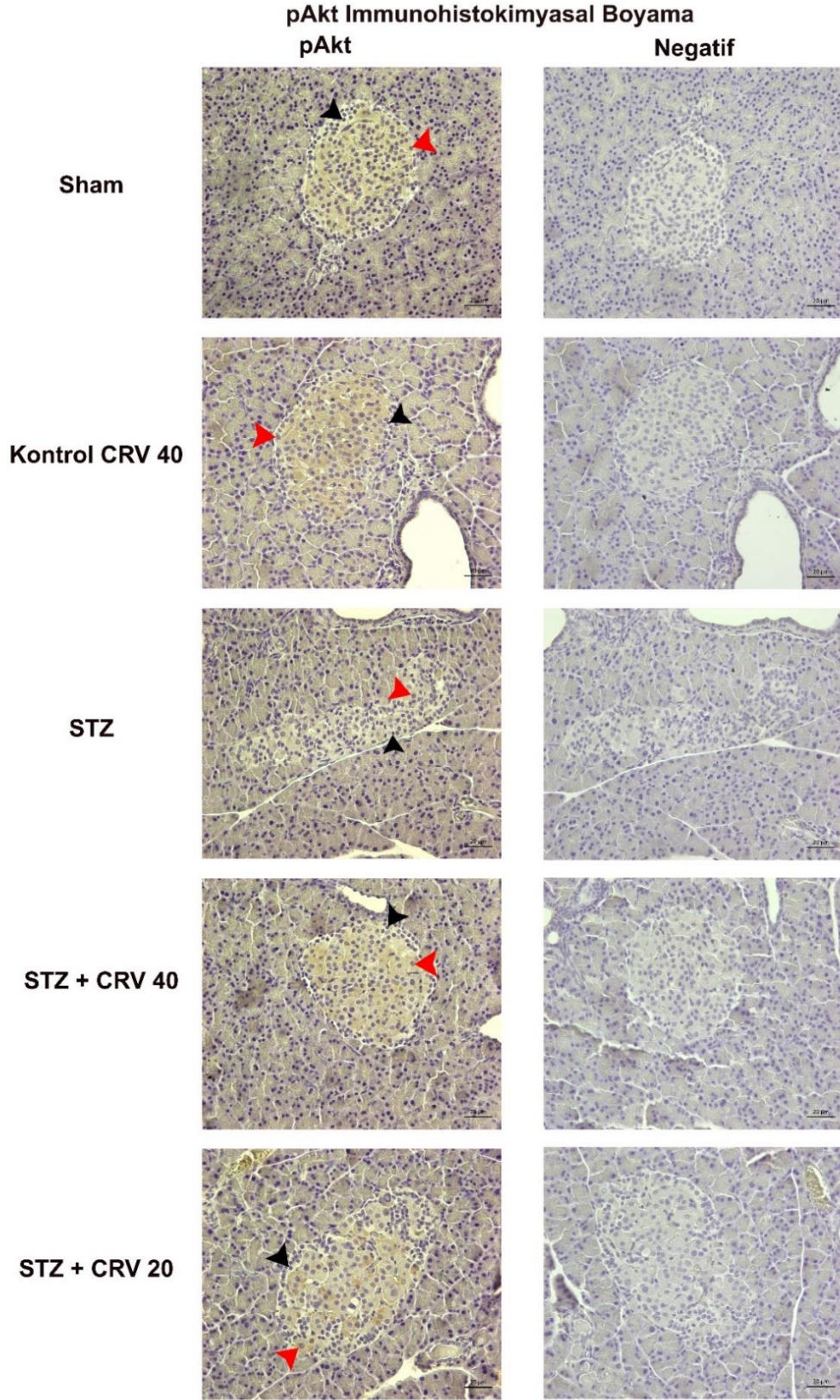


Şekil-33: Anti-PI3K Antibody ile STZ+CRV 40 grubunun immünohistokimyasal boyaması (400x) (Kırmızı ok: β hücresi, siyah ok: α hücresi)



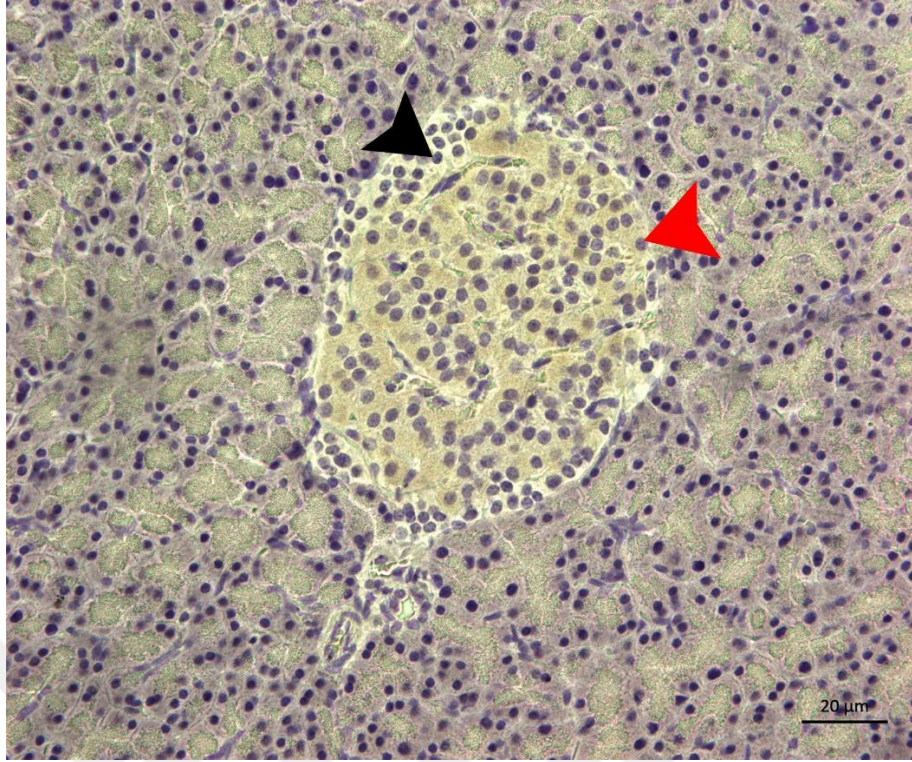
Şekil-34: Anti-PI3K Antibody ile STZ+CRV 20 grubunun immünohistokimyasal boyaması (400x) (Kırmızı ok: β hücresi, siyah ok: α hücresi)

4.4.3. p-Akt immünohistokimyasal boyama

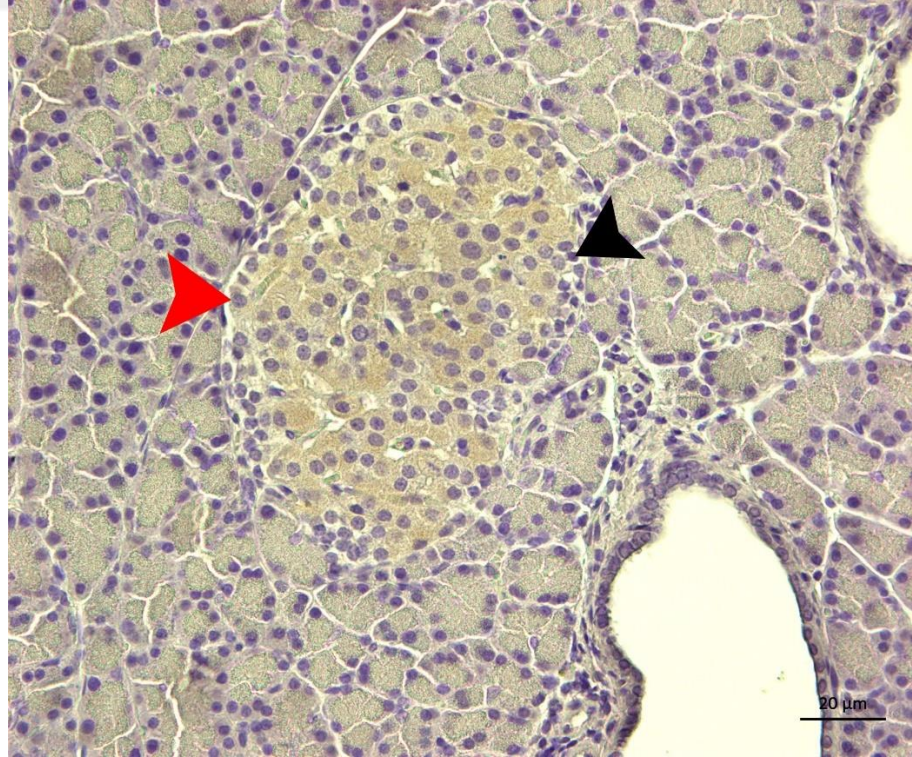


Şekil-35: Grupların anti-pAkt Antibody ile pozitif ve kontrol negatif boyaması (400x)
(Kırmızı ok: β hücresi, siyah ok: α hücresi)

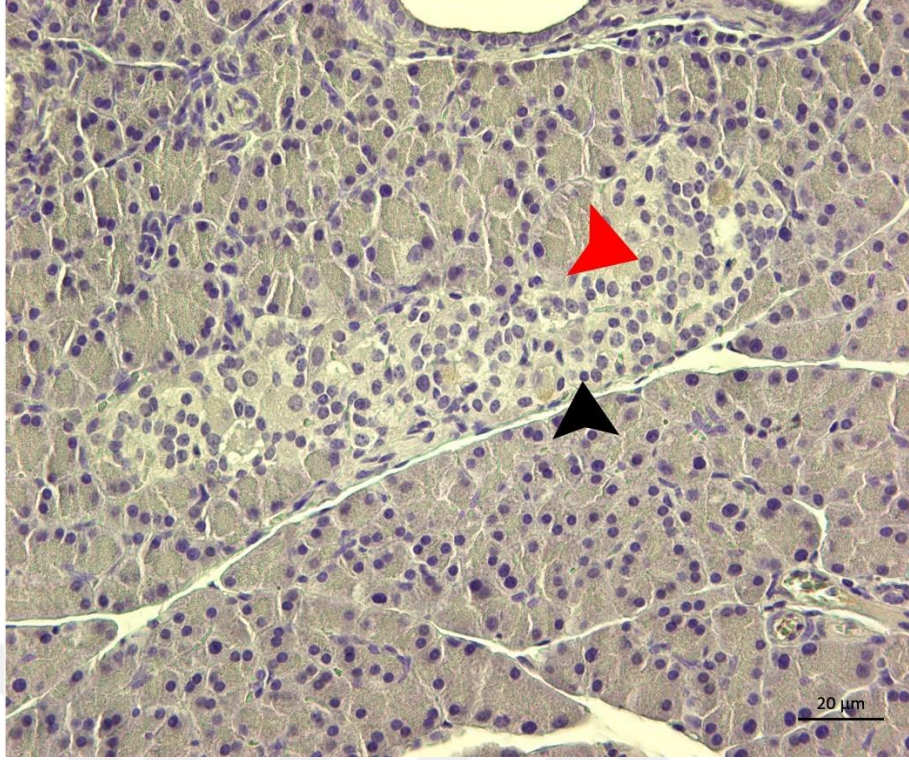
Tüm gruplardaki ratların pankreas dokusu Anti-pAkt antikoruna ile immünohistokimyasal boyama sonrası incelendi ve analizi yapıldı. Denek hayvanların pankreas dokusunda Langerhans adacıkları ve ekzokrin kısmı intakt olarak gözlemlendi. Anti-pAkt Antikoru ile yapılan incelemede; PI3K aktivasyonu ile pAkt ekspresyonunu Langerhans adacığı β hücrelerinde gözlemlemekteyiz. Sham ve Kontrol CRV 40 gruplarında β hücrelerinde belirgin pAkt ekspresyonu tespit edildi. Ancak; STZ grubunda çok zayıf ekspresyon gözlemlendi (Şekil-38). Diyabetik gruplara Carvacrol uygulanması ile pAkt ekspresyonundaki artış Şekil-35'te gösterilmiştir. Sham ile Kontrol CRV 40 grupları arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p=0.352$). STZ grubu; diğer 4 grup ile karşılaştırıldığında pAkt ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdi ($p<0.05$). STZ+CRV 40 grubu ile STZ+CRV 20 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ($p<0.05$). STZ uygulanan gruplar içerisinde; Anti-pAkt antikoruna ile en yoğun ekspresyon STZ+CRV 20 grubunda gözlemlendi. T1DM rat modelinde Carvacrol'ün 20 mg/kg/gün doz uygulanması ile pAkt protein ekspresyonunda artış tespit edildi. İnsülin sekresyonunu tetikleyen sinyal yolağında PI3K, Akt fosforilasyonunu uyarır, pAkt formuna getirerek aktivasyonunu sağlamaktadır. Diyabetik gruplara Carvacrol uygulanması sonucunda; PI3K ekspresyon artışı ile uyumlu olarak pAkt ekspresyonunda da artış tespit edildi.



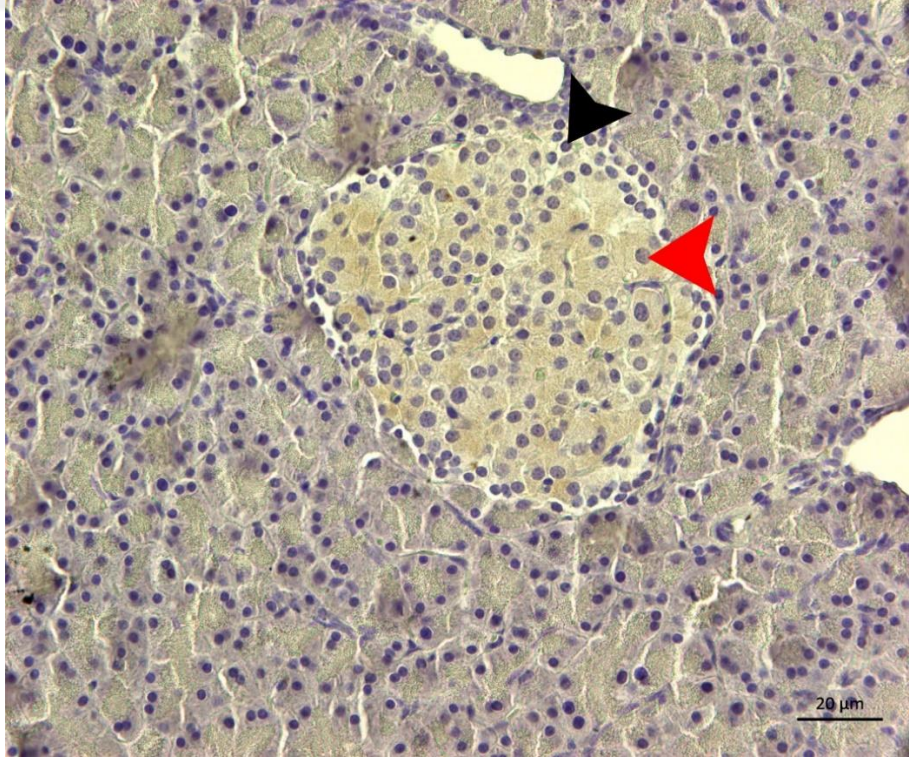
Şekil-36: Anti-pAkt Antibody ile Sham grubunun immünohistokimyasal boyaması (400x) (Kırmızı ok: β hücresi, siyah ok: α hücresi)



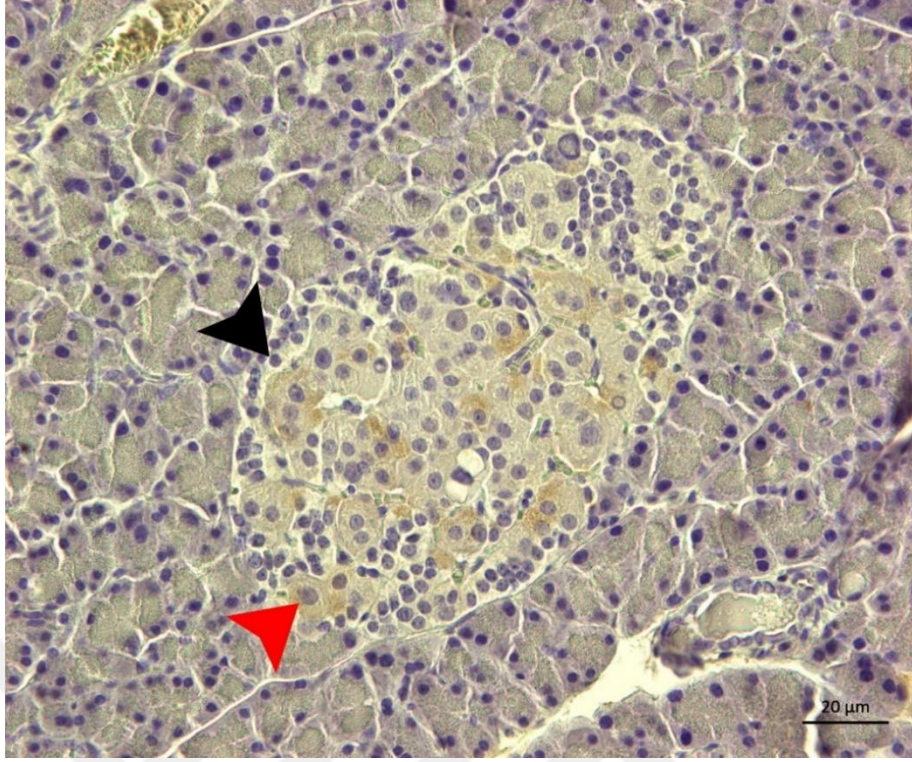
Şekil-37: Anti-pAkt Antibody ile Kontrol CRV 40 grubunun immünohistokimyasal boyaması (400x) (Kırmızı ok: β hücresi, siyah ok: α hücresi)



Şekil-38: Anti-pAkt Antibody ile STZ grubunun immünohistokimyasal boyaması (400x) (Kırmızı ok: β hücresi, siyah ok: α hücresi)

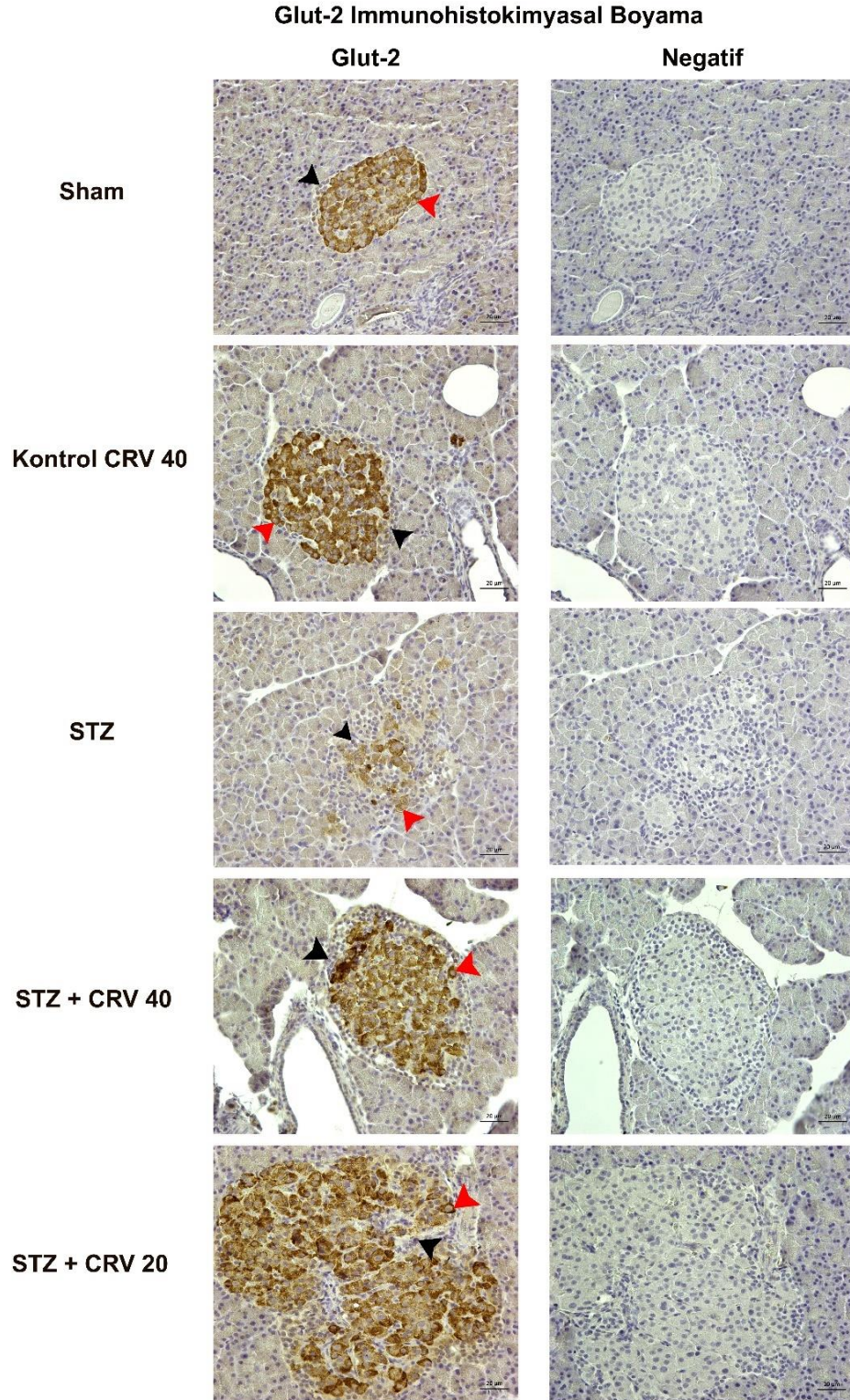


Şekil-39: Anti-pAkt Antibody ile STZ+CRV 40 grubunun immünohistokimyasal boyaması (400x) (Kırmızı ok: β hücresi, siyah ok: α hücresi)



Şekil-40: Anti-pAkt Antibody ile STZ+CRV 20 grubunun immünohistokimyasal boyaması (400x) (Kırmızı ok: β hücresi, siyah ok: α hücresi)

4.4.4. Glut-2 immünohistokimyasal boyama

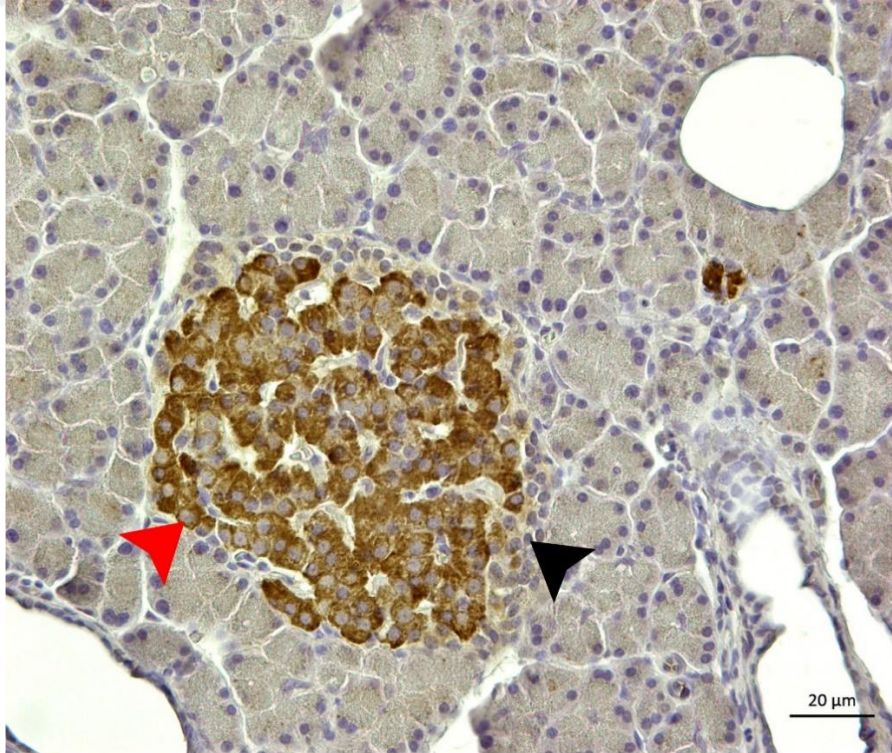


Şekil-41: Grupların anti-Glut-2 Antibody ile pozitif ve kontrol negatif boyaması (400x) (Kırmızı ok: β hücresi, siyah ok: α hücresi)

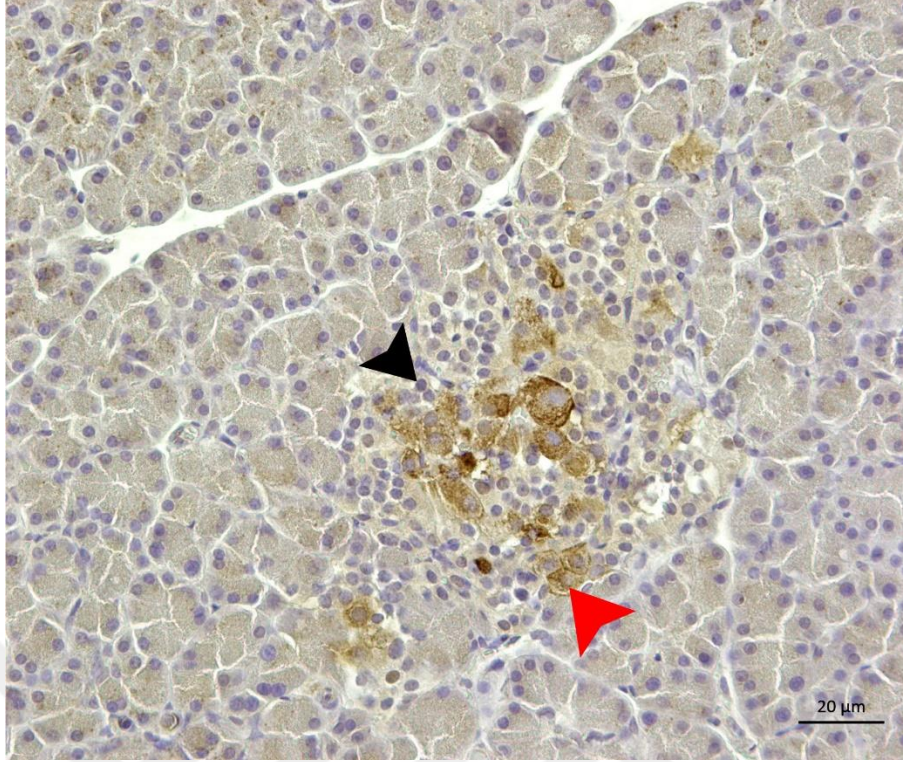
Tüm gruplardaki ratların pankreas dokusu Anti-Glut-2 antikoruna ile immünohistokimyasal boyama sonrası incelendi ve analizi yapıldı. Denek hayvanların pankreas dokusunda Langerhans adacıkları ve ekzokrin kısmı intakt olarak gözlemlendi. Anti-Glut-2 Antikoru ile yapılan incelemede; β hücre membranında yerleşim gösteren Glut-2'nin ekspresyonunu, β hücrelerinde gözlemlemekteyiz. Sham ve Kontrol CRV 40 gruplarında β hücrelerinde yoğun Glut-2 ekspresyonu gözlemlendi. Ancak; STZ grubunda zayıf ekspresyon tespit edildi (Şekil-44). Diyabetik gruplara Carvacrol uygulanması ile Glut-2 ekspresyonundaki artış Şekil-41'de gösterilmiştir. Sham ile Kontrol CRV 40 grupları arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p=0.375$). STZ grubu; diğer 4 grup ile karşılaştırıldığında Glut-2 ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdi ($p<0.05$). STZ+CRV 40 grubu ile STZ+CRV 20 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ($p<0.05$). STZ uygulanan gruplar içerisinde; Anti-Glut-2 antikoruna ile en yoğun ekspresyon STZ+CRV 20 grubunda gözlemlendi. T1DM rat modelinde Carvacrol'ün 20 mg/kg/gün doz uygulanması ile Glut-2 protein ekspresyonunda artış tespit edildi. Glut-2, β hücrelerine glikoz alımını artırarak insülin sekresyonunu uyarır. Diyabetik gruplarda CRV uygulanması ile Glut-2 proteinindeki ekspresyon artışı, insülin protein ekspresyonundaki artışı da açıklamaktadır.



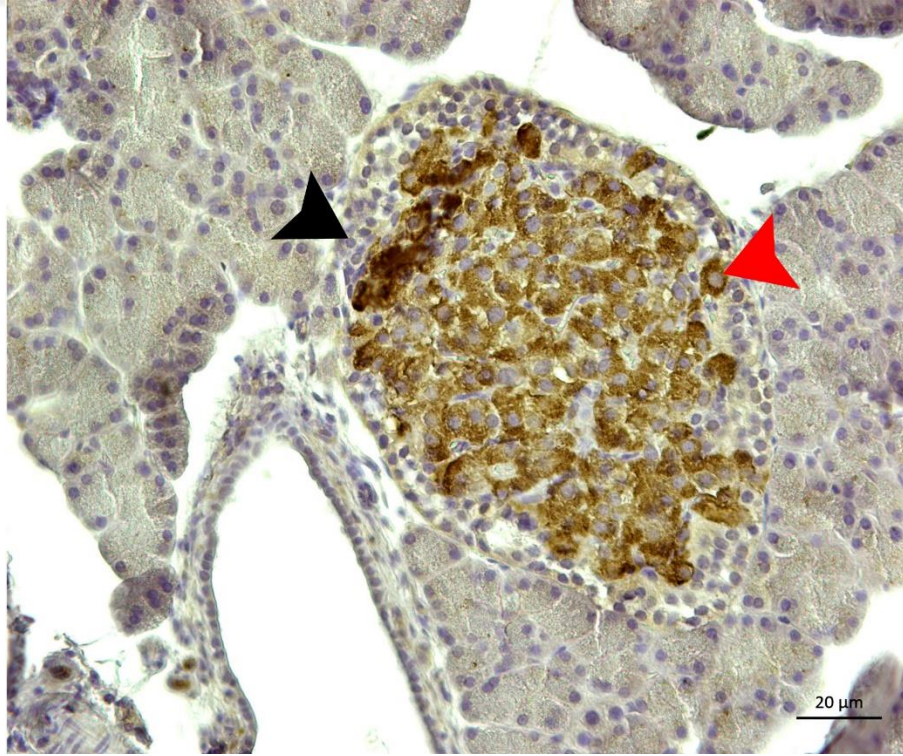
Şekil-42: Anti-Glut-2 Antibody ile Sham grubunun immünohistokimyasal boyaması (400x) (Kırmızı ok: β hücresi, siyah ok: α hücresi)



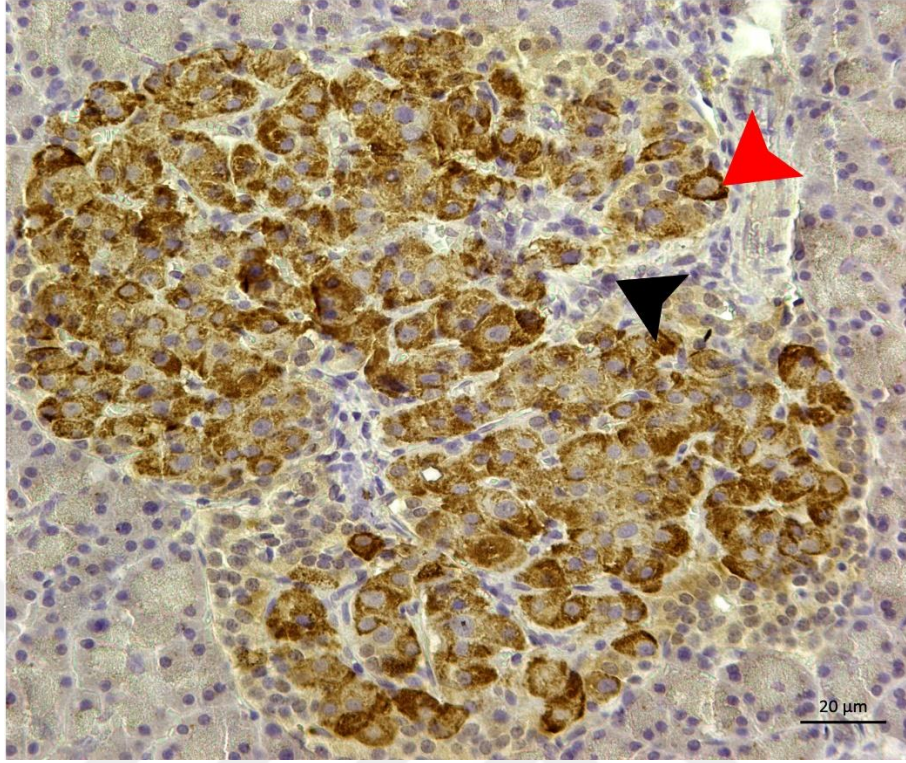
Şekil-43: Anti-Glut-2 Antibody ile Kontrol CRV 40 grubunun immünohistokimyasal boyaması (400x) (Kırmızı ok: β hücresi, siyah ok: α hücresi)



Şekil-44: Anti-Glut-2 Antibody ile STZ grubunun immünohistokimyasal boyaması (400x) (Kırmızı ok: β hücresi, siyah ok: α hücresi)



Şekil-45: Anti-Glut-2 Antibody ile STZ+CRV 40 grubunun immünohistokimyasal boyaması (400x) (Kırmızı ok: β hücresi, siyah ok: α hücresi)

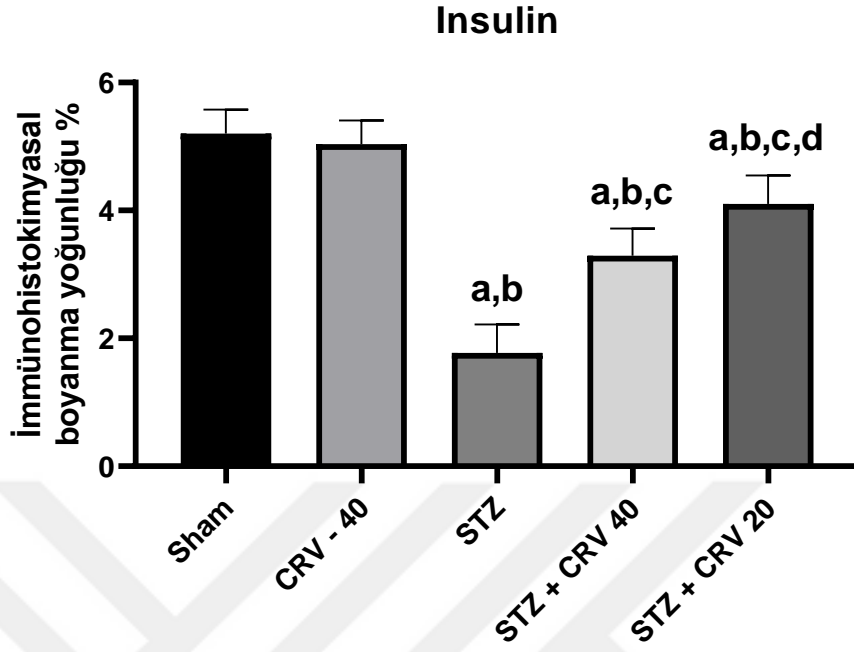


Şekil-46: Anti-Glut-2 Antibody ile STZ+CRV 20 grubunun immünohistokimyasal boyaması (400x) (Kırmızı ok: β hücresi, siyah ok: α hücresi)

4.5. İmmünohistokimyasal Analiz

Tez çalışmamızda immünohistokimyasal yöntem ile boyanan dokuların Olympus BX50 mikroskobu ile Zeiss AxioCam ICc 5 kamera kullanılarak fotoğrafları çekildi. Dokuların görüntüsü Image J programı kullanılarak immünohistokimyasal boyanma yüzdeleri hesaplandı. Image J ile elde edilen veriler GraphPad Prism 8 InStat (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) programında değerlendirildi. Gruplar arası farklılıkta One Way ANOVA testi Holm-Sidak metodu kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ kabul edildi. Anti-Insulin, anti-PI3K, anti-pAkt ve anti-Glut-2 antikorları için ayrı ayrı boyanma yüzdeleri hesaplandı ve analizleri yapıldı.

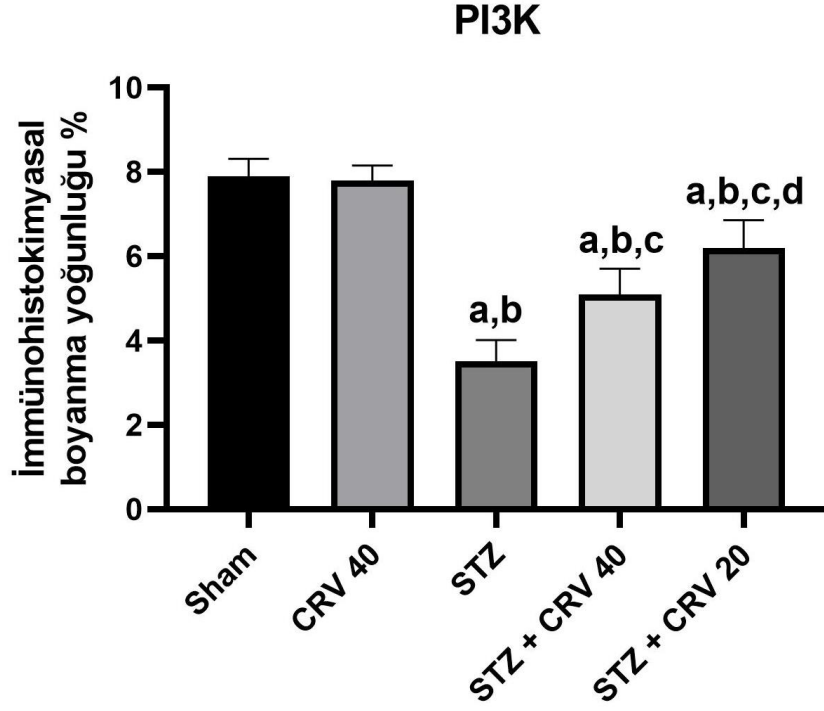
4.5.1. Anti-Insulin antibody ile immünohistokimyasal analiz



Şekil-47: Pankreas dokusu Langerhans adacığının anti-Insulin antikoru ile immünohistokimyasal boyanma yoğunluğunun analiz grafiği ile gösterilmesi.

Sham grubu ile STZ grubu arasında, STZ grubu ile STZ+CRV 40 grubu arasında, STZ grubu ile STZ+CRV 20 grubu arasında ve STZ+CRV 40 grubu ile STZ+CRV 20 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ($p < 0.05$). ^aSham'a, ^bCRV-40'a, ^cSTZ'ye ve ^dSTZ+CRV 40'a göre anlamlılığı gösterir.

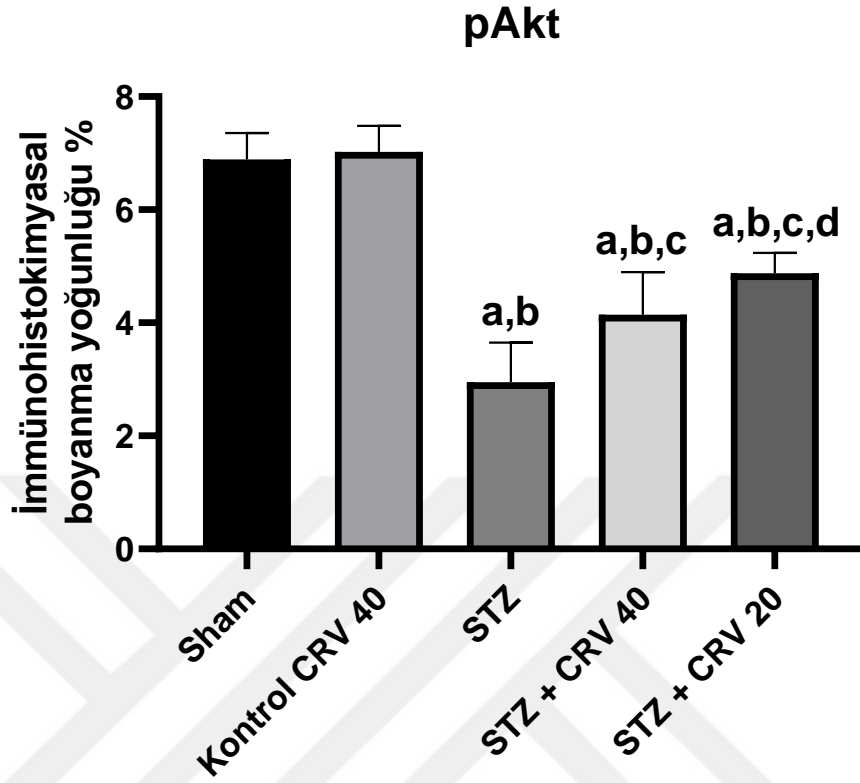
4.5.2. Anti-PI3K antibody ile immünohistokimyasal analiz



Şekil-48: Pankreas dokusu Langerhans adacığının anti-PI3K antikoruna ile immünohistokimyasal boyanma yoğunluğunun analiz grafiği ile gösterilmesi.

Sham grubu ile STZ grubu arasında, STZ grubu ile STZ+CRV 40 grubu arasında, STZ grubu ile STZ+CRV 20 grubu arasında ve STZ+CRV 40 grubu ile STZ+CRV 20 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ($p < 0.05$). ^aSham'a, ^bCRV-40'a, ^cSTZ'ye ve ^dSTZ+CRV 40'a göre anlamlılığı gösterir.

4.5.3. Anti-pAkt antibody ile immünohistokimyasal analiz

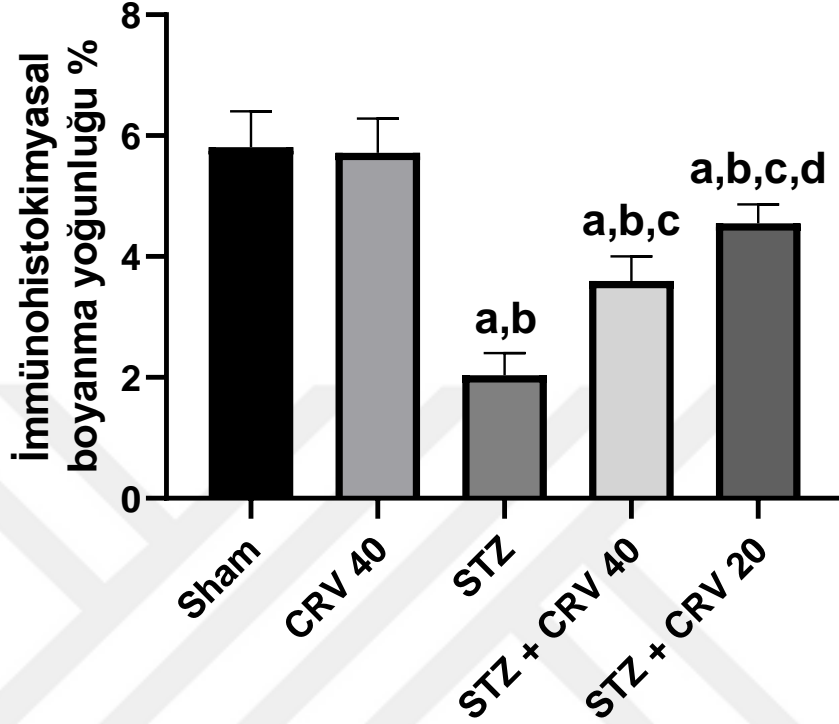


Şekil-49: Pankreas dokusu Langerhans adacığının anti-pAkt antikoruna ile immünohistokimyasal boyanma yoğunluğunun analiz grafiği ile gösterilmesi.

Sham grubu ile STZ grubu arasında, STZ grubu ile STZ+CRV 40 grubu arasında, STZ grubu ile STZ+CRV 20 grubu arasında ve STZ+CRV 40 grubu ile STZ+CRV 20 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ($p < 0.05$). ^aSham'a, ^bKontrol CRV-40'a, ^cSTZ'ye ve ^dSTZ+CRV 40'a göre anlamlılığı gösterir.

4.5.4. Anti-Glut-2 antibody ile immünohistokimyasal analiz

GLUT -2



Şekil-50: Pankreas dokusu Langerhans adacığının anti- Glut-2 antikoruna ile immünohistokimyasal boyanma yoğunluğunun analiz grafiği ile gösterilmesi.

Sham grubu ile STZ grubu arasında, STZ grubu ile STZ+CRV 40 grubu arasında, STZ grubu ile STZ+CRV 20 grubu arasında ve STZ+CRV 40 grubu ile STZ+CRV 20 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ($p < 0.05$). ^aSham'a, ^bCRV-40'a, ^cSTZ'ye ve ^dSTZ+CRV 40'a göre anlamlılığı gösterir.

5.TARTIŞMA

Diabetes mellitus alarm seviyesine ulaşan önemli bir halk sağlığı sorunudur. Günümüzde dünyada diyabet tanılı kişi sayısı yarım milyardan fazladır. Ayrıca 6 gebelikten 1'inde gebelikte hiperglisemi tespit edilmektedir⁶⁵. Diabetes mellitus, yetersiz insülin salınımına eşlik eden yüksek kan glikoz düzeyi ile tanımlanan ve çeşitli nedenler ile ortaya çıkan heterojen bir hastalıktır. Otoimmün bir hastalık olan T1DM, pankreasta β hücrelerin yıkımına neden olmaktadır²²⁷. Carvacrol, Oregano ve thyme(kekik)de bulunan monoterpenik fenollerden biridir²²⁸. Antibakteriyel özellik taşımaktadır²²⁹. Ayrıca CRV'nin anti-inflamatuar, antioksidan ve bakterisidal etkileri bulunmaktadır¹¹⁴. Yapılan bir çalışmada; Carvacrol'ün antioksidatif ve anti-inflamatuar etkilerinin diyabeti önlemede etkin olduğu bulunmuştur¹³⁸.

PI3K/Akt sinyal yolağının insülinin salgılanmasında önemli bir yeri vardır. Glikoz alımı, glikoneogenez ve glikojen bağlanması düzenlenmesinde etkili olan bir yoldur²³⁰. Bu yolak ile glikoz taşınması, insülin gen transkripsiyonu ve β hücresinin varlığını sürdürmesi düzenlenmektedir²³¹. Glut-2; pankreatik β hücrelerde, karaciğerde, ince bağırsakta ve endoderm kökenli diğer hücrelerde yüksek düzeyde bulunmaktadır²³². Glikoz ile uyarılan insülin sekresyonu, metabolik homeostazın normal işleyişinde merkezi bir konumda yer alır. Bu süreç, β hücrelerine Glut-2 aracılığıyla glikoz alımı ile uyarılmaktadır. Bir glikoz taşıyıcısı olan Glut-2, β hücresi içerisinde glikoz alımını tetikleyerek ilk haberci olarak görev almaktadır²³³.

Carvacrol ile ilgili yapılan daha önceki çalışmalarda CRV'nin Tip 1 DM'de kan glikoz seviyelerini düşürdüğü gösterilmiş, ancak bu düşüşün hangi mekanizmalar ile gerçekleştiği bu çalışmalarda gösterilmemiştir. Yine daha önceki çalışmalar içerisinde T1DM'de Carvacrol'ün doğrudan pankreas Langerhans adacığındaki β hücreleri üzerinde etkinliğini gösteren immünohistokimyasal bir çalışma yoktur. Bu nedenle biz araştırmamızda, Carvacrol'ün diabetes mellitus üzerindeki etkisini pankreatik dokuda PI3K/Akt yolağı aracılığı ile Glut-2 ve insülin ekspresyon değişimini immünohistokimyasal yöntemler ile göstererek incelemeyi planladık. Bu

amaçla kontrol, diyabetik ve Carvacrol ile tedavi edilen diyabetik gruplar oluşturduk. Diabetes mellitus intraperitoneal uygulanan streptozotocin ile oluşturuldu. Deney süresince hayvanların kan glikoz düzeyi ve vücut ağırlıkları ölçülerek takip edildi. Deney sonunda pankreas dokuları eksize edildi ve histolojik incelemesi yapıldı. Bu çalışmanın en önemli sonucu; pankreasta Carvacrol'ün kan glikozunu düşürücü etkisini PI3K/pAkt yolağı üzerinden Glut-2 ve insülin ekspresyonunu artırarak göstermesidir.

Çalışmamızda vücut ağırlıklarında gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi. STZ grubunda belirgin hiperglisemi tespit edildi. Kan glikoz düzeyi Carvacrol ile tedavi edilen diyabetik gruplarda düşüş eğiliminde bulundu. Çalışmamız ile Tip 1 diabetes mellitusta; 40 mg/kg/gün Carvacrol ile karşılaştırıldığında 20 mg/kg/gün Carvacrol uygulanmasının kan glikoz seviyesini düşürmede daha etkili olduğu istatistiksel olarak anlamlı düşüş ile de tespit edildi. 20 mg/kg Carvacrol'ün diyabetik ratlarda anti-diyabetik etkinliği belirlenmiş oldu.

Çalışmamızı destekleyecek şekilde; diyabetik model oluşturulup Carvacrol ile tedavi edilen hayvanlarda Carvacrol'ün anti-diyabetik etkisi sonucuna ulaşan başka çalışmalar da bulunmaktadır.

Yilang Li ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptığı bir çalışmada farelerde tip 1 diabetes mellitus oluşturmak için 5 gün süre ile 45 mg/kg i.p. STZ uygulanmış. Tedavi için uygulanacak etkin Carvacrol dozunu belirlemek için öncelikle 3 gruptaki 8'er fareye 10 mg/kg/gün, 20 mg/kg/gün ve 40 mg/kg/gün dozlarında CRV 2 hafta süresince i.p. uygulanmış. Carvacrol, 1% DMSO içerisinde çözdürülmüş. CRV tedavi gruplarında glikoz seviyesindeki azalma 20 mg/kg CRV dozunda daha etkili bulunmuş olup 20 mg/kg ile 40 mg/kg arasında önemli bir farklılık tespit edilmemiştir. Bu nedenle çalışmaya 10 mg/kg/gün ve 20 mg/kg/gün CRV etkisinin karşılaştırılması için devam edilmiştir. CRV'nin uzun süredeki anti-hiperglisemik etkisini görmek için çalışma 4 hafta ile 6 haftaya uzatılmıştır. 20 mg/kg CRV ile tedavi edilen grupta glikoz düzeyi, diyabetik gruba göre önemli ölçüde düşük olduğu ve tedavi süresi uzadıkça kan glikoz düzeyindeki düşüşün arttığı bulunmuştur.

Çalışmada Carvacrol'ün anti-hiperglisemik etkisinin doza bağlı olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Plazma insülin düzeyi ölçülmüş ve diyabetik grup ile CRV ile tedavi edilen diyabetik grup arasında önemli bir farklılık bulunmamıştır²³⁴. Oysa çalışmamızda diyabetik ratlarda 6 hafta CRV uygulanması ile insülin sekresyon artışını pankreatik β hücrelerinde ekspresyon artışı ile gösterdik. Çalışmamız ile benzer olarak bu çalışmada da 20 mg/kg Carvacrol'ün 4 hafta veya 6 hafta süreli tedavisinin diyabette plazma glikoz düzeyini önemli derecede düşürdüğü bulunmuştur. Yilang Li ve arkadaşları çalışmasında Carvacrol'ün etkisini sadece kan glikozu değerleri üzerinden göstermişken biz aynı etkiyi ek olarak histolojik, immünohistokimyasal yöntemler ve mekanizmayla göstermiş olduk.

2020 yılında yapılan farklı bir çalışmada; 5 gün boyunca 45 mg/kg/gün intraperitoneal STZ uygulaması ile diyabet oluşturulan farelerde CRV 6 hafta boyunca intraperitoneal uygulanmıştır. Kontrol, STZ ve CRV verilen 2 tedavi grubundan oluşan toplam 4 hayvan grubu oluşturulmuştur. Tedavi gruplarına her gün düşük doz 10 mg/kg CRV ve yüksek doz 20 mg/kg CRV verilmiştir. Çalışmada farelerin torasik aortaları SM- α -actin, Ki67 ve PCNA antikoları ile immünohistokimyasal açıdan incelenmiştir. Yapılan Western Blot çalışmasında grupların pAkt, PTEN, GSK-3 β ve PDK1 ekspresyonları karşılaştırılmıştır. Diyabetik grupta pAkt, PDK1 ve GSK-3 β ekspresyonu düşük; 10 mg/kg ve 20 mg/kg CRV uygulanan diyabetik gruplarda ise kontrol grubuna benzer sonuç elde edilmiştir. Diyabette majör patolojik değişiklik aorta duvarında incelme olmasıdır. CRV ile tedavi edilen diyabetik gruplar, kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman aort duvar kalınlığında farklılık tespit edilmemesine rağmen diyabetin neden olduğu hipergliseminin belirgin olarak azaldığı sonucuna ulaşılmıştır. 10 mg/kg ve 20 mg/kg CRV verilen gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Ayrıca bu çalışmada; ilk önce PI3K inhibitörü uygulanması ile CRV'nin diyabette aortik hiperkontraktilite üzerindeki etkisinin ortadan kalktığı görülmüştür. Bu sonuç ile CRV'nin, PI3K/Akt yolağını aktive ederek etkili olduğu gösterilmiştir¹⁴⁰. Çalışmamızda da pankreatik β hücrelerindeki CRV etkisini; PI3K/Akt sinyal yolağı üzerinden inceledik: T1DM'de pankreatik β hücrelerinde ekspresyonu azalan pAkt ekspresyonu

diyabetik gruplara CRV uygulanması ile artış gösterdi. Bu çalışma da sonuçlarımızla uyumlu olmaktadır. Ayrıca CRV'nin kan glikozunu düşürücü etkisini; bu çalışmada yapılmayan pankreas Langerhans adacıkları üzerinde anti-PI3K ve anti-pAkt antikoları ile immünohistokimyasal incelemeler yaparak sonucumuzu destekledik. Hiperglisemi durumunda 6 haftalık Carvacrol uygulaması sonucunda iyileşme olması, bizim çalışmamızdaki CRV'nin anti-diyabetik etkisini destekler niteliktedir.

Ning Hou ve arkadaşlarının 2019 yılında farelerde yaptığı çalışmada T1DM oluşturmak için STZ 45 mg/kg/gün dozunda 5 gün art arda intraperitoneal uygulanmıştır. 2 ayrı gruptaki diyabetik farelere CRV 10 mg/kg/gün ve 20 mg/kg/gün dozunda 6 hafta boyunca i.p. yolu ile verilmiştir. Carvacrol çözücüsü olarak 0.1% DMSO kullanılmıştır. 20 mg/kg CRV ile tedavi edilen diyabetik farelerde 4. haftada kan glikoz düzeyinde önemli bir düşüş meydana gelmiştir. 6. haftada; hem 10 mg/kg hem de 20 mg/kg CRV uygulanan diyabetik grupta kan glikoz düzeyi diyabetik gruba göre belirgin derecede düşük bulunmuştur. Hayvanların kalbinin histolojik kesitleri incelendiğinde; diyabetik grupta ventriküler duvar kalınlığında azalma görülmüş olup bu histopatolojik değişikliğin 20 mg/kg/gün CRV ile tedavi edilen diyabetik grupta olmadığı tespit edilmiştir. Diyabetik kalpte oluşan patolojik değişikliklerde; 10 mg/kg CRV'ye göre 20 mg/kg CRV uygulanması ile düzelme daha fazla olmuştur. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında diyabetik grupta hipertrofik kalpte PI3K/Akt sinyal yolağının belirgin derecede baskılandığı bulunmuştur. Bununla ilişkili olarak Western Blot çalışması ile; diyabetik grupta PI3K, PDK1 ve Akt ekspresyonlarında önemli derecede azalma olduğu sonucuna ulaşılmıştır. CRV ile tedavi edilen diyabetik gruplarda ise PI3K, PDK1 ve Akt fosforilasyonunda belirgin artış olduğu bulunmuştur. Kardiyomiyosit hücreleri çalışıldığı için CRV'nin GLUT-4 üzerindeki etkisi incelenmiştir. PI3K/Akt yolağı ile bağlantılı olarak diyabetik durumda azalan GLUT-4 ekspresyonu; diyabette CRV uygulanması ile artmıştır¹³⁹. Diyabetik gruba 6 hafta süreyle uygulanan 20 mg/kg dozunda CRV ile kan glikoz düzeyinde anlamlı düşüş olması bizim çalışmamızı destekler niteliktedir. Deneyimizin 2. haftasında kan glikoz düzeyinde; 20 mg/kg CRV uygulanan diyabetik grup ile Sham grubu arasında

istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı. Kan glikoz düzeyindeki azalmanın nedeni immünohistokimyasal boyama ile de gösterildi. Çalışmamızda CRV uygulanan diyabetik gruplarda pankreatik β hücrelerinde insülin ekspresyon artışı gösterildi. Çalışmamızda CRV'nin etki mekanizmasını incelemek için PI3K ve Akt fosforilasyonunun ekspresyonunu immünohistokimyasal olarak pankreas β adacık hücrelerinde gösterdik. Bu çalışma kardiyomiyositlerde olduğu için GLUT-4 çalışılmış olup biz çalışmamızda pankreatik β hücrelerinde GLUT-2 ekspresyon değişimini inceledik.

Wenjing Deng ve arkadaşları tarafından 2013 yılında yapılan Carvacrol'ün diyabetik ratlarda bilişsel defisiti iyileştirme etkisi ile ilgili çalışmada öncelikle diyabet oluşturmak için 65 mg/kg STZ tek doz i.p. olarak uygulanmıştır. 3 diyabetik tedavi grubu oluşturulmuş ve 25, 50 ve 100 mg/kg/gün CRV dozları 7 hafta boyunca ratlara i.p.olarak verilmiştir. Veriler biyokimyasal analiz ve bilişsel fonksiyon testi ile incelenmiştir. CRV uygulanan diyabetik gruplarda kan glikoz düzeylerinde düşüş olduğu gösterilmiştir. 7 haftalık deneyin sonucunda 25 mg/kg CRV uygulanan ratlarda kan glikoz ortalaması 305 mg/dL, 50 mg/kg CRV grubu ortalaması 295 mg/dL ve 100 mg/kg CRV grubu ortalaması 289 mg/dL olarak ölçülmüştür. Diyabetik grup ile kıyaslandığında 25, 50 ve 100 mg/kg CRV uygulanan diyabetik gruplarda kan glikoz düzeyindeki düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Diyabetik ratlarda CRV tedavisinin bilişsel fonksiyonları iyileştirdiği, nöronal hücre ölümünü azalttığı bulunmuştur. Bulgular ile CRV'nin anti-diyabetik ve nöroprotektif etkilerinin; anti-oksidatif ve anti-inflamatuar özellikleri ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır¹³⁸. CRV'nin diyabette kan glikoz düzeyinde belirgin düşüş olması bizim çalışmamızı destekler niteliktedir. Ancak bu çalışmada 25, 50 ve 100 mg/kg/gün CRV 7 hafta uygulanmış olmasına rağmen kan glikoz düzeyindeki düşüş bizim çalışmamıza göre daha az olmuştur. Bizim çalışmamızda, diyabetik ratlara 6 hafta süreyle 20 mg/kg/gün Carvacrol uygulanması sonucu kan glikoz ortalaması 230 mg/dL bulundu. Ayrıca çalışmanın sadece başlangıcında ve sonunda kan glikoz düzeyi bakılmış olup takibi yapılmadığı için aradaki haftalarda kan glikoz düzeyindeki değişim

gösterilmemiştir. Diğer çalışmalarda ve bizim çalışmamızda en etkin Carvacrol dozu 20 mg/kg/gün olarak gösterilmiştir. Ancak; bu çalışmada Carvacrol dozu arttıkça kan glikozunun daha fazla düştüğü gösterilmiştir fakat 25, 50 ve 100 mg/kg Carvacrol uygulanan gruplar arasında kan glikozunu düşürme etkinliği açısından istatistiksel olarak anlamlılığa bakılmamıştır.

2020 yılında yapılan bir çalışmada diyabetik erkek ratlarda Carvacrol'ün üreme hasarından koruyucu etkilerini araştırmak amacıyla 4 grupta toplam 74 Wistar cinsi rat kullanılmıştır. Diyabetik model oluşturmak için STZ 55 mg/kg tek doz i.p. uygulanmıştır. CRV 75 mg/kg/gün dozunda 4 hafta ve 8 hafta boyunca ratlara gavaj yolu ile verilmiştir. 4. haftanın sonunda 4 gruptaki ratların bir kısmı dekapite edilmiş; 8. haftanın sonunda kalan ratlar ile deney sonlandırılmıştır. Bu çalışmada elde edilen veriler biyokimyasal analiz ve Western blot ile incelenmiştir. 4. haftanın sonunda diyabetik grup ile CRV ile tedavi edilen diyabetik grup arasında serum glikoz değeri açısından farklılık bulunmamışken; 8. haftanın sonunda gruplar arası anlamlı farklılık tespit edilmiştir. Bu çalışmada diyabetik testiste Carvacrol'ün koruyucu etki mekanizmasının Nrf2/HO-1 sinyal yolağını aktive ederek anti-oksidatif etki gösterdiği belirtilmiştir. CRV, diyabetin neden olduğu testiküler hasarı önlemede başarılı bulunmuştur. 75 mg/kg/gün Carvacrol uygulanması ile kan glikoz düzeyinde düşüş bu çalışmada 4. haftada tespit edilmemiş; 8. haftada anlamlı düşüş bulunmuştur²³⁵. Oysa bizim çalışmamızda 2. haftada CRV 20 mg/kg/gün doz ile kan glikoz düzeyinde düşüş sağlandı ve diyabetik gruba kıyasla istatistiksel anlamlı sonuç elde edildi. Biz çalışmamızda 2. hafta itibariyle sonuç almaya başladık. Bu çalışmada ise ileriki haftalarda sonuç alınmasının nedeni yüksek dozda uygulanan CRV olabilir.

Literatür tarandığı zaman, Carvacrol'ün Tip 1 diabetes mellitusta anti-diyabetik etkisinin olmadığını söyleyen çalışmalar da mevcuttur.

2014 yılında yapılan bir çalışmada, STZ ile indüklenmiş diyabetik ratlarda 7 gün süreyle 25 mg/kg/gün ve 50 mg/kg/gün Carvacrol uygulanarak sonuçlar biyokimyasal olarak incelenmiştir. Zeytinyağında çözdürülen CRV, intragastrik tüp aracılığı ile oral yoldan verilmiştir. Biyokimyasal analizde AST ve ALT

değerleri DM grubunda yüksek bulunurken; CRV tedavi gruplarında kontrol grubuna yakın sonuçlar bulunmuştur. Serum insulin düzeyi DM ve CRV tedavi gruplarında benzer şekilde düşük ölçülmüş olup gruplar arasında anlamlı farklılık tespit edilmemiştir. Sonuç olarak Carvacrol'ün kan glikozunu düşürücü etkisinin görülmediği bildirilmiştir. Karaciğeri koruyucu etkisi olabileceği için diyabetik kişilerin diyetine eklenmesinin sakıncası olmadığı görüşüne varılmıştır. CRV ile pankreasta istenilen etkinin oluşmadığı fakat herhangi bir zararlı etkisinin de olmadığı belirtilmiştir¹⁰⁸. Bizim çalışmamızdan farklı olarak bu çalışmada CRV'nin kan glikozuna etki etmeme nedeni: Carvacrol'ün etki göstermesi için 7 günlük deney süresinin kısa olması olabilir.

Carvacrol'ün Tip 2 DM üzerindeki etkinliğini gösteren bilimsel çalışmalar da mevcuttur.

2020 yılında Wei Zhao ve arkadaşları Carvacrol'ün T2DM nedenli vasküler inflamasyon üzerindeki etkisini araştırmak için 45 adet C57BL/KsJ diyabetik fare ve 15 adet non-diyabetik kontrol fare ile çalışma oluşturmuştur. Diyabetik tedavi grupları: DM+5 mg/kg CRV (düşük doz) ve DM+10 mg/kg CRV (yüksek doz) olarak düzenlenen deney 6 hafta sürmüştür. CRV gavaj ile uygulanmıştır. Deney sonunda kan glikoz ve serum insulin düzeyi ölçümü yapılmıştır. İmmunohistokimyasal çalışmada: anti-NF-κB kinase inhibitörü, anti-NF-κB inhibitor-α, anti-NALP3, anti-NF-κB, anti-phosphorylated insulin receptor, anti-phosphorylated insulin receptor substrate-1 ve anti-TLR4 antikorları ile çalışılmıştır. Çalışmada CRV'nin etkisi TLR4/NF-κB sinyal yolağı üzerinden araştırılmıştır. Diyabetik grup ile karşılaştırıldığında DM+CRV tedavi gruplarında kan glikoz düzeyinde azalma olduğu görülmüştür. Diyabetik grupta 5 mg/kg ve 10 mg/kg CRV ile alınan sonuçlar birbirine yakın bulunmuştur. T2DM olan farelerde artış gösteren serum insulin düzeyi 5 mg/kg ve 10 mg/kg CRV uygulanması ile azalarak normal seviyeye yaklaşım göstermiştir. CRV, diyabetik farelerin thoracoabdominal aortalarında insulin sinyal moleküllerinin ekspresyonunu önemli derecede azaltmıştır. Diyabetik hastalarda insulin rezistansının asıl nedeni olan inflamatuvar belirteçlerin serumdaki düzeyi DM+CRV gruplarında belirgin olarak düşüş göstermiştir. Sonuç olarak

Carvacrol TLR4/NF-κB sinyal yolak aktivitesini azaltmıştır. Diyabetik farelerde 5 mg/kg CRV ve 10 mg/kg CRV kan glikoz düzeyinde önemli bir düşüş sağlamıştır²³⁶.

2013 yılında yapılan bir çalışmada yüksek yağlı diyet ile beslenen farelerde diyabet modeli oluşturulmuştur. Carvacrol'ün kan glikoz düzeyine hangi dozda daha etkili olduğuna karar vermek amacıyla öncelikle Carvacrol 10, 20 ve 40 mg/kg/gün dozlarında 15 gün süreyle hayvanlara oral yol ile uygulanmıştır. Kan glikoz düzeyini düşürmede en etkili dozun 20 mg/kg/gün olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Çalışmada kan glikoz düzeyindeki değişim; sadece CRV ve CRV ile bir anti-diyabetik olan Rosiglitazone (RSG) kombine verilerek araştırılmıştır. Deney 35 gün sürmüştür. Yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde yüksek kan glikoz ve insülin düzeyi mevcutken CRV tedavisi ile normal seviyeye yakın kan glikoz ve insülin düzeyi tespit edilmiştir. Bu çalışmada CRV tedavisi ile bir anti-diyabetik olan RSG'nin kan glikozunu düşürücü etkisine benzer bir sonuç elde edilmiş olup kombine kullanımında kan glikoz düzeyinde daha fazla düşüş olduğu gözlenmiştir. Pankreasın sadece hematoksilen-eozin boyaması yapılmıştır²³⁷. Bizim çalışmamızı destekleyerek bu deneyde de Carvacrol'ün anti-diyabetik özelliğinin en etkili dozu 20 mg/kg/gün olarak bulunmuştur. 20 mg/kg CRV tedavisi ile diyabetik farelerin kan glikoz düzeyinde normal düzeye yakın sonuç elde edilmiştir.

Wei Zhao ve arkadaşlarının 2021 yılında yaptığı 6 haftalık deneyde farelerde T2DM oluşturulmuş ve CRV'nin diyabet nedenli oluşan karaciğer hasarındaki koruyucu etkisi araştırılmıştır. CRV 10 mg/kg/gün dozunda 6 hafta uygulanmıştır. Biyokimyasal ve immünohistokimyasal incelemeler yapılmıştır. Diyabetik farelerde 10 mg/kg CRV ile 6 haftalık uygulama sonucunda açlık kan glikozunda önemli derecede düşüş olduğu bulunmuştur. Kanda açlık insülin düzeyi de bakılmış ve diyabetik farelerde artan insülin seviyesinin CRV tedavisi ile düştüğü gözlenmiştir. Karaciğer hasarının göstergesi olan ALT ve AST diyabetik farelerde yüksek; CRV tedavisi sonrası ALT ve AST düzeyinde düşüş tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmada böbrek fonksiyonunu gösteren: BUN, kreatinin ve ürik asit düzeyleri de incelenmiş ve diyabette artan bu değerlerde

Carvacrol tedavisi sonrası normale yakın düzey elde edilmiştir. T2DM'ye bağlı karaciğer ve böbrek hasarında CRV'nin iyileştirici etkisi olduğu biyokimyasal analiz ve histolojik kesitler ile gösterilmiştir. Yapılan immünohistokimyasal çalışmalarda diyabetik fare karaciğerinde; Akt, pAkt, NF-κB, mTOR, TLR4 ekspresyonu yüksek bulunmuştur. CRV tedavisi sonrası karaciğer dokusunda hem total hem fosforile Akt ekspresyonunun belirgin derecede baskılandığı bulunmuştur. Bu bulgular immünofloresan ve Western-Blot sonuçları ile desteklenmiştir. Bu çalışma ile T2DM ile oluşan karaciğer hasarını Carvacrol'ün insülin, TLR4/NF-κB ve AKT1/mTor sinyal yolları aracılığı ile azalttığı gösterilmiştir. 10 mg/kg/gün Carvacrol'ün 6 hafta uygulanması ile diyabetik farelerde kan glikoz düzeyinde belirgin azalma olduğu bulunmuştur²³⁸. Bu sonuç da bizim çalışmamızı desteklemektedir.

Memeli hücrelerinde PI3K/Akt/mTOR/p70S6K sinyal kaskadı, insülin ve IGF-1'in etkilerini düzenlemektedir. Bu kaskadın akışında herhangi bir bozulma olması durumunda insülin rezistansı, T2DM ve kanser ortaya çıkabilir. Protein kinaz Akt, bu kaskadın kilit noktasındaki efektör kinazdır. Akt, Glut-4'ün insüline bağlı translokasyonunu ve glikoz taşınmasını artırır, mTORC1 ve p70S6'yı aktive eder²³⁹. Obezitede yağ dokunun artması; insülin rezistansı ve T2DM gelişimi için önemli bir risk faktörüdür. Obez ve yüksek yağlı diyet ile beslenen kemirgenlerde mTORC1 aktivitesi yüksek bulunmuştur²⁴⁰⁻²⁴².

Carvacrol'ün pankreas dokusuna etkilerinin araştırıldığı başka çalışmalar da bulunmaktadır.

Aslı Şen Dağlı Gül ve arkadaşlarının 2013 yılında yapmış olduğu araştırmada ratların izole pankreas adacıklarında H₂O₂ ile indüklenen hasarın oral Carvacrol tedavisine yanıtı çalışılmıştır. 40 Wistar Albino erkek rat kullanılan çalışmada öncelikle Carvacrol'ün etkin dozunu bulmak için 20, 40 ve 80 mg/kg/gün dozlarında CRV orogastrik tüp ile uygulanmıştır. 9 günlük deney sonucunda en etkili yanıt 20 mg/kg/gün CRV ile elde edilmiştir. H₂O₂ ile oluşturulan oksidatif hasar, 20 mg/kg CRV tedavisiyle iyileşme göstermiştir. Ancak yüksek doz CRV; adacıklarda meydana gelen doku hasarını

engellememiştir. 80 mg/kg CRV uygulanan grupta; kontrol grubuna kıyasla adacık dokusunun canlılık oranında belirgin düşüş olmuştur²⁴³. Yapılan bu araştırmada da çalışmamızı destekler nitelikte Carvacrol 20 mg/kg/gün olarak uygulandığında pankreas dokusunda en etkin doz olduğu bulunmuştur.

Bu sonuçlar göstermektedir ki: Carvacrol dokulardaki oksidatif stresi azaltmakta olup kan glikoz düzeyi üzerinde düşürücü etkiye sahiptir. Biz de çalışmamızda T1DM'de Carvacrol'ün kan glikozunu düşürücü etkisini; pankreatik dokuda PI3K/Akt yolağı üzerinden Glut-2 ve insülin ekspresyonunu artırarak gösterdiği sonucuna ulaştık. Diğer çalışmalarda olduğu gibi bizim çalışmamızda da diabetes mellitusta 20 mg/kg Carvacrol'ün kan glikoz seviyesini düşürmede daha etkili olduğunu gösterdik.

6.SONUÇLAR

Bu çalışma ile Tip 1 diabetes mellitusta Carvacrol'ün kan glikoz düzeyini düşürücü etkisini pankreas Langerhans adacıklarında PI3K/Akt yolağı ile gösterdiği ortaya çıkmıştır. T1DM'de Carvacrol uygulanması ile pankreatik β hücrelerinde Glut-2 ekspresyonunda artış tespit edilmiş olup insülin proteini ekspresyonunun da arttığı immünohistokimyasal yöntemler ile gösterilmiştir. Diyabette; Carvacrol'ün Glut-2 ekspresyonu ve insülin sekresyonunu pankreasta PI3K/Akt yolağı ile artırdığı sonucu bulunmuştur. Diabetes mellitus durumunda; Carvacrol'ün kan glikoz düzeyini düşürmesi ile anti-diyabetik tedavide ek olarak kullanılabileceği; bu sayede insanların yaşam kalitesini artırabileceği öngörülmekte olup sonuçların yapılacak deneysel çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir.

7.KAYNAKLAR

1. Zimmet PZ, Magliano DJ, Herman WH, Shaw JE. Diabetes: a 21st century challenge. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2014; **2**(1): 56-64.
2. Ogurtsova K, da Rocha Fernandes JD, Huang Y, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Res Clin Pract* 2017; **128**: 40-50.
3. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 2005; **365**(9467): 1333-46.
4. Cnop M, Welsh N, Jonas JC, Jorns A, Lenzen S, Eizirik DL. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes* 2005; **54 Suppl 2**: S97-107.
5. Yan X, Chen J, Zhang C, et al. Fibroblast growth factor 21 deletion aggravates diabetes-induced pathogenic changes in the aorta in type 1 diabetic mice. *Cardiovasc Diabetol* 2015; **14**(1): 77.
6. Suntres ZE, Coccimiglio J, Alipour M. The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2015; **55**(3): 304-18.
7. Sikkema J, de Bont JA, Poolman B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev* 1995; **59**(2): 201-22.
8. Chenet AL, Duarte AR, de Almeida FJS, Andrade CMB, de Oliveira MR. Carvacrol Depends on Heme Oxygenase-1 (HO-1) to Exert Antioxidant, Anti-inflammatory, and Mitochondria-Related Protection in the Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells Line Exposed to Hydrogen Peroxide. *Neurochem Res* 2019; **44**(4): 884-96.
9. Parnas M, Peters M, Dadon D, et al. Carvacrol is a novel inhibitor of Drosophila TRPL and mammalian TRPM7 channels. *Cell calcium* 2009; **45**(3): 300-9.
10. Mbese Z, Aderibigbe BA. Biological efficacy of carvacrol analogues. *Recent patents on anti-infective drug discovery* 2018; **13**(3): 207-16.
11. Guo H, German P, Bai S, et al. The PI3K/AKT pathway and renal cell carcinoma. *Journal of genetics and genomics* 2015; **42**(7): 343-53.
12. Whitman M, Kaplan DR, Schaffhausen B, Cantley L, Roberts TM. Association of phosphatidylinositol kinase activity with polyoma middle-T competent for transformation. *Nature* 1985; **315**(6016): 239-42.
13. Cantley LC. The role of phosphoinositide 3-kinase in human disease. *Harvey Lect* 2004; **100**: 103-22.
14. Abeyrathna P, Su Y. The critical role of Akt in cardiovascular function. *Vascul Pharmacol* 2015; **74**: 38-48.
15. Logie L, Ruiz-Alcaraz AJ, Keane M, et al. Characterization of a protein kinase B inhibitor in vitro and in insulin-treated liver cells. *Diabetes* 2007; **56**(9): 2218-27.
16. Wang J, Wang C, Li S, et al. Anti-diabetic effects of Inonotus obliquus polysaccharides in streptozotocin-induced type 2 diabetic mice and potential mechanism via PI3K-Akt signal pathway. *Biomed Pharmacother* 2017; **95**: 1669-77.
17. Olson AL, Pessin JE. Structure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family. *Annu Rev Nutr* 1996; **16**: 235-56.
18. Mueckler M, Thorens B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol Aspects Med* 2013; **34**(2-3): 121-38.
19. Thorens B, Sarkar HK, Kaback HR, Lodish HF. Cloning and Functional Expression in Bacteria of a Novel Glucose Transporter Present in Liver, Intestine, Kidney, and Beta-Pancreatic Islet Cells. *Cell* 1988; **55**(2): 281-90.

20. Thorens B. Molecular and cellular physiology of GLUT-2, a high-K_m facilitated diffusion glucose transporter. *Int Rev Cytol* 1992; **137**: 209-38.
21. Brown GK. Glucose transporters: structure, function and consequences of deficiency. *J Inherit Metab Dis* 2000; **23**(3): 237-46.
22. Xia X, Yan J, Shen Y, et al. Berberine improves glucose metabolism in diabetic rats by inhibition of hepatic gluconeogenesis. *PLoS One* 2011; **6**(2): e16556.
23. Liu M, Wu K, Mao X, Wu Y, Ouyang J. Astragalus polysaccharide improves insulin sensitivity in KKAY mice: regulation of PKB/GLUT4 signaling in skeletal muscle. *J Ethnopharmacol* 2010; **127**(1): 32-7.
24. Kadasne D. Kadasne's Textbook of Anatomy (Clinically Oriented). JAYPEE BROTHERS MEDICAL PUBLISHERS (P) LTD; 2009.
25. Bedia Sancak DA, Meserret Cumhur, Sezgin İlgi, Engin Kural. Fonksiyonel Anatomi Baş - Boyun ve İç Organlar. In: Prof.Dr. Bedia Sancak PDMC, ed. 13. Baskı ed. Ankara; 2021: 236-9.
26. Meier JJ, Butler AE, Saisho Y, et al. Beta-cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of beta-cell mass in humans. *Diabetes* 2008; **57**(6): 1584-94.
27. Watanabe T, Yaegashi H, Koizumi M, Toyota T, Takahashi T. Changing distribution of islets in the developing human pancreas: a computer-assisted three-dimensional reconstruction study. *Pancreas* 1999; **18**(4): 349-54.
28. Saisho Y, Butler AE, Meier JJ, et al. Pancreas volumes in humans from birth to age one hundred taking into account sex, obesity, and presence of type-2 diabetes. *Clin Anat* 2007; **20**(8): 933-42.
29. Orci L, Baetens D, Ravazzola M, Stefan Y, Malaisse-Lagae F. Pancreatic polypeptide and glucagon : non-random distribution in pancreatic islets. *Life Sci* 1976; **19**(12): 1811-5.
30. Lammert E, Gu G, McLaughlin M, et al. Role of VEGF-A in vascularization of pancreatic islets. *Curr Biol* 2003; **13**(12): 1070-4.
31. Jansson L, Carlsson PO. Graft vascular function after transplantation of pancreatic islets. *Diabetologia* 2002; **45**(6): 749-63.
32. Zanone MM, Favaro E, Doublier S, et al. Expression of nephrin by human pancreatic islet endothelial cells. *Diabetologia* 2005; **48**(9): 1789-97.
33. Moldovan S, Brunicardi FC. Endocrine pancreas: summary of observations generated by surgical fellows. *World J Surg* 2001; **25**(4): 468-73.
34. Ahren B. Regulation of insulin secretion by nerves and neuropeptides. *Ann Acad Med Singap* 1999; **28**(1): 99-104.
35. Gary C. Schoenwolf SBB, Philip R. Brauer, Philippa H. Francis-West Larsen's Human Embryology. In: Edition F, ed.: Churchill Livingstone, an imprint of Elsevier Inc.; 2015: 352-5.
36. Keith L. Moore TVNVP, Mark G. Torchia The Developing Human Clinically Oriented Embryology. 10th Edition ed. United States of America: Elsevier; 2016: 219-21.
37. Pan FC, Brissova M. Pancreas development in humans. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2014; **21**(2): 77-82.
38. Mortelet KJ, Rocha TC, Streeter JL, Taylor AJ. Multimodality imaging of pancreatic and biliary congenital anomalies. *Radiographics* 2006; **26**(3): 715-31.
39. Lehman GA, Sherman S. Diagnosis and therapy of pancreas divisum. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 1998; **8**(1): 55-77.
40. Jennings RE, Berry AA, Strutt JP, Gerrard DT, Hanley NA. Human pancreas development. *Development* 2015; **142**(18): 3126-37.
41. Bouwens L, Lu WG, De Krijger R. Proliferation and differentiation in the human fetal endocrine pancreas. *Diabetologia* 1997; **40**(4): 398-404.

42. Leslie P. Gartner J.L.H. Concise Histology. China: Saunders, an imprint of Elsevier Inc.; 2011: 252-3.
43. Anthony L. Mescher P. Junqueira's Basic Histology Fourteenth Edition ed: McGraw-Hill Education; 2016: 332-3.
44. Ross MH. Histology A Text And Atlas With Correlated Cell and Molecular Biology. In: Health WK, ed. Seventh Edition ed; 2016: 643-51.
45. Barbara Young GOD, Phillip Woodford. Wheater's Functional Histology a Text and Colour Atlas. 6th Edition ed. United States of America: Churchill Livingstone, an imprint of Elsevier; 2014: 287-8.
46. Barbara Young GOD, Phillip Woodford. Wheater's Functional Histology a Text and Colour Atlas. 6th Edition ed. United States of America: Churchill Livingstone, an imprint of Elsevier; 2014: 332 - 3.
47. Anthony L. Mescher P. Junqueira's Basic Histology. Fourteenth Edition ed: McGraw-Hill Education; 2016: 427-9.
48. Bonner-Weir S, Sullivan BA, Weir GC. Human Islet Morphology Revisited: Human and Rodent Islets Are Not So Different After All. *J Histochem Cytochem* 2015; **63**(8): 604-12.
49. Kilimnik G, Jo J, Periwal V, Zielinski MC, Hara M. Quantification of islet size and architecture. *Islets* 2012; **4**(2): 167-72.
50. Borden P, Houtz J, Leach SD, Kuruvilla R. Sympathetic innervation during development is necessary for pancreatic islet architecture and functional maturation. *Cell Rep* 2013; **4**(2): 287-301.
51. Ahren B. Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease. *Diabetologia* 2000; **43**(4): 393-410.
52. Woods SC, Porte D, Jr. Neural control of the endocrine pancreas. *Physiol Rev* 1974; **54**(3): 596-619.
53. Rodriguez-Diaz R, Abdulreda MH, Formoso AL, et al. Innervation patterns of autonomic axons in the human endocrine pancreas. *Cell Metab* 2011; **14**(1): 45-54.
54. Cinnamon L. VanPutte JLR, Andrew F. Russo, . Seeley's Anatomy and Physiology. ELEVENTH EDITION ed. New York: McGraw-Hill Education; 2017: 624-32.
55. Hall JE. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology. 13th Edition ed. United States of America: Elsevier; 2016: 983-99.
56. Egea PF, Stroud RM, Walter P. Targeting proteins to membranes: structure of the signal recognition particle. *Curr Opin Struct Biol* 2005; **15**(2): 213-20.
57. Lomedico PT, Chan SJ, Steiner DF, Saunders GF. Immunological and chemical characterization of bovine preproinsulin. *J Biol Chem* 1977; **252**(22): 7971-8.
58. Chan SJ, Keim P, Steiner DF. Cell-free synthesis of rat preproinsulins: characterization and partial amino acid sequence determination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976; **73**(6): 1964-8.
59. Patzelt C, Labrecque AD, Duguid JR, et al. Detection and kinetic behavior of preproinsulin in pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978; **75**(3): 1260-4.
60. Dean PM. Ultrastructural morphometry of the pancreatic -cell. *Diabetologia* 1973; **9**(2): 115-9.
61. Howell SL. The mechanism of insulin secretion. *Diabetologia* 1984; **26**(5): 319-27.
62. Best CH, Haist RE. The effect of insulin administration on the insulin content of the pancreas. *J Physiol* 1941; **100**(2): 142-6.
63. Leibiger IB, Leibiger B, Berggren PO. Insulin feedback action on pancreatic beta-cell function. *FEBS Lett* 2002; **532**(1-2): 1-6.
64. Kadowaki T. Insights into insulin resistance and type 2 diabetes from knockout mouse models. *J Clin Invest* 2000; **106**(4): 459-65.
65. IDF Diabetes Atlas. 2021. <https://diabetesatlas.org/> (accessed 01.09.2022 2022).

66. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 1998; **21**(9): 1414-31.
67. Soltesz G, Patterson CC, Dahlquist G, Group ES. Worldwide childhood type 1 diabetes incidence--what can we learn from epidemiology? *Pediatr Diabetes* 2007; **8 Suppl 6**: 6-14.
68. American Diabetes A. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2021. *Diabetes Care* 2021; **44**(Suppl 1): S15-S33.
69. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. *Lancet* 2014; **383**(9911): 69-82.
70. Januszewski AS, Cho YH, Joglekar MV, et al. Insulin micro-secretion in Type 1 diabetes and related microRNA profiles. *Sci Rep* 2021; **11**(1): 11727.
71. Expert Committee on the D, Classification of Diabetes M. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003; **26 Suppl 1**: S5-20.
72. Pitocco D, Tesauro M, Alessandro R, Ghirlanda G, Cardillo C. Oxidative stress in diabetes: implications for vascular and other complications. *Int J Mol Sci* 2013; **14**(11): 21525-50.
73. Kanter M, Aktas C, Erboga M. Curcumin attenuates testicular damage, apoptotic germ cell death, and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Nutr Food Res* 2013; **57**(9): 1578-85.
74. Du X, Stocklauser-Farber K, Rosen P. Generation of reactive oxygen intermediates, activation of NF-kappaB, and induction of apoptosis in human endothelial cells by glucose: role of nitric oxide synthase? *Free Radic Biol Med* 1999; **27**(7-8): 752-63.
75. Martens GA, Cai Y, Hinke S, Stange G, Van de Castele M, Pipeleers D. Glucose suppresses superoxide generation in metabolically responsive pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 2005; **280**(21): 20389-96.
76. Herlein JA, Fink BD, O'Malley Y, Sivitz WI. Superoxide and respiratory coupling in mitochondria of insulin-deficient diabetic rats. *Endocrinology* 2009; **150**(1): 46-55.
77. Poitout V, Robertson RP. Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev* 2008; **29**(3): 351-66.
78. Leloup C, Turrel-Cuzin C, Magnan C, et al. Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose-induced insulin secretion. *Diabetes* 2009; **58**(3): 673-81.
79. Pi J, Bai Y, Zhang Q, et al. Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 2007; **56**(7): 1783-91.
80. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001; **414**(6865): 813-20.
81. Gabbay KH. The sorbitol pathway and the complications of diabetes. *N Engl J Med* 1973; **288**(16): 831-6.
82. Katsarou A, Gudbjornsdottir S, Rawshani A, et al. Type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers* 2017; **3**: 17016.
83. Baig MA, Panchal SS. Streptozotocin-Induced Diabetes Mellitus in Neonatal Rats: An Insight into its Applications to Induce Diabetic Complications. *Curr Diabetes Rev* 2019; **16**(1): 26-39.
84. Kanter M, Aktas C, Erboga M. Protective effects of quercetin against apoptosis and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rat testis. *Food Chem Toxicol* 2012; **50**(3-4): 719-25.
85. Cai L, Chen S, Evans T, Deng DX, Mukherjee K, Chakrabarti S. Apoptotic germ-cell death and testicular damage in experimental diabetes: prevention by endothelin antagonism. *Urol Res* 2000; **28**(5): 342-7.

86. Diabetes C, Complications Trial/Epidemiology of Diabetes I, Complications Study Research G, et al. Long-term effect of diabetes and its treatment on cognitive function. *N Engl J Med* 2007; **356**(18): 1842-52.
87. Jorgensen ME, Almdal TP, Carstensen B. Time trends in mortality rates in type 1 diabetes from 2002 to 2011. *Diabetologia* 2013; **56**(11): 2401-4.
88. Ali MM, Agha FG. Amelioration of streptozotocin-induced diabetes mellitus, oxidative stress and dyslipidemia in rats by tomato extract lycopene. *Scand J Clin Lab Invest* 2009; **69**(3): 371-9.
89. Habibuddin M, Dagheriri HA, Humaira T, Al Qahtani MS, Hefzi AA. Antidiabetic effect of alcoholic extract of *Caralluma sinaica* L. on streptozotocin-induced diabetic rabbits. *J Ethnopharmacol* 2008; **117**(2): 215-20.
90. Ghasemi A, Khalifi S, Jedi S. Streptozotocin-nicotinamide-induced rat model of type 2 diabetes (review). *Acta Physiol Hung* 2014; **101**(4): 408-20.
91. Srinivasan K, Ramarao P. Animal models in type 2 diabetes research: an overview. *Indian J Med Res* 2007; **125**(3): 451-72.
92. Szkudelski T. Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. *Exp Biol Med (Maywood)* 2012; **237**(5): 481-90.
93. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 2008; **51**(2): 216-26.
94. Deeds MC, Anderson JM, Armstrong AS, et al. Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. *Lab Anim* 2011; **45**(3): 131-40.
95. Ozturk Y, Altan VM, Yildizoglu-Ari N. Effects of experimental diabetes and insulin on smooth muscle functions. *Pharmacol Rev* 1996; **48**(1): 69-112.
96. Pieper AA, Verma A, Zhang J, Snyder SH. Poly (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. *Trends Pharmacol Sci* 1999; **20**(4): 171-81.
97. Yamamoto H, Uchigata Y, Okamoto H. Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature* 1981; **294**(5838): 284-6.
98. Baydas G, Nedzvetskii VS, Nerush PA, Kirichenko SV, Yoldas T. Altered expression of NCAM in hippocampus and cortex may underlie memory and learning deficits in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Life Sci* 2003; **73**(15): 1907-16.
99. Kolb H. Mouse models of insulin dependent diabetes: low-dose streptozocin-induced diabetes and nonobese diabetic (NOD) mice. *Diabetes Metab Rev* 1987; **3**(3): 751-78.
100. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 2001; **50**(6): 537-46.
101. Candela S, Hernandez RE, Gagliardino JJ. Circadian variation of the streptozotocin-diabetogenic effect in mice. *Experientia* 1979; **35**(9): 1256-7.
102. Tay YC, Wang Y, Kairaitis L, Rangan GK, Zhang C, Harris DC. Can murine diabetic nephropathy be separated from superimposed acute renal failure? *Kidney Int* 2005; **68**(1): 391-8.
103. Furman BL. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr Protoc Pharmacol* 2015; **70**: 5 47 1-5 20.
104. National Toxicology P. NTP 12th Report on Carcinogens. *Rep Carcinog* 2011; **12**: iii-499.
105. Karunanayake EH, Hearse DJ, Mellows G. The synthesis of [¹⁴C] streptozotocin and its distribution and excretion in the rat. *Biochem J* 1974; **142**(3): 673-83.

106. Morgan NG, Cable HC, Newcombe NR, Williams GT. Treatment of cultured pancreatic B-cells with streptozotocin induces cell death by apoptosis. *Biosci Rep* 1994; **14**(5): 243-50.
107. Kroncke KD, Fehsel K, Sommer A, Rodriguez ML, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide generation during cellular metabolism of the diabetogenic N-methyl-N-nitroso-urea streptozotocin contributes to islet cell DNA damage. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1995; **376**(3): 179-85.
108. Bayramoglu G, Senturk H, Bayramoglu A, et al. Carvacrol partially reverses symptoms of diabetes in STZ-induced diabetic rats. *Cytotechnology* 2014; **66**(2): 251-7.
109. Enan EE. Molecular response of *Drosophila melanogaster* tyramine receptor cascade to plant essential oils. *Insect Biochem Mol Biol* 2005; **35**(4): 309-21.
110. Lei J, Leser M, Enan E. Nematicidal activity of two monoterpenoids and SER-2 tyramine receptor of *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Pharmacol* 2010; **79**(7): 1062-71.
111. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *Int J Food Microbiol* 2004; **94**(3): 223-53.
112. Marchese A, Arciola CR, Coppo E, et al. The natural plant compound carvacrol as an antimicrobial and anti-biofilm agent: mechanisms, synergies and bio-inspired anti-infective materials. *Biofouling* 2018; **34**(6): 630-56.
113. Nostro A, Papalia T. Antimicrobial activity of carvacrol: current progress and future perspectives. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2012; **7**(1): 28-35.
114. Baser KH. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Curr Pharm Des* 2008; **14**(29): 3106-19.
115. Xu H, Delling M, Jun JC, Clapham DE. Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. *Nat Neurosci* 2006; **9**(5): 628-35.
116. Opdyke DL. Monographs on fragrance raw materials. *Food Cosmet Toxicol* 1979; **17**(Special Issue V.): 695-923.
117. Hagan EC, Hansen WH, Fitzhugh OG, et al. Food flavourings and compounds of related structure. II. Subacute and chronic toxicity. *Food Cosmet Toxicol* 1967; **5**(2): 141-57.
118. Andersen A. Final report on the safety assessment of sodium p-chloro-m-cresol, p-chloro-m-cresol, chlorothymol, mixed cresols, m-cresol, o-cresol, p-cresol, isopropyl cresols, thymol, o-cymen-5-ol, and carvacrol. *Int J Toxicol* 2006; **25** Suppl 1: 29-127.
119. Mc OW, Anderson HH, Estess FM. Comparative toxicity of certain t-butyl substituted cresols and xylenols. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc* 1949; **38**(7): 366-9.
120. Dong RH, Fang ZZ, Zhu LL, Ge GB, Yang L, Liu ZY. Identification of UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in hepatic and intestinal glucuronidation of phytochemical carvacrol. *Xenobiotica* 2012; **42**(10): 1009-16.
121. Ben Arfa A, Combes S, Preziosi-Belloy L, Gontard N, Chalier P. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Lett Appl Microbiol* 2006; **43**(2): 149-54.
122. Ultee A, Slump RA, Steging G, Smid EJ. Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *J Food Prot* 2000; **63**(5): 620-4.
123. Somensi N, Rabelo TK, Guimaraes AG, et al. Carvacrol suppresses LPS-induced pro-inflammatory activation in RAW 264.7 macrophages through ERK1/2 and NF- κ B pathway. *Int Immunopharmacol* 2019; **75**: 105743.
124. Sokmen M, Serkedjieva J, Daferera D, et al. In vitro antioxidant, antimicrobial, and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of *Origanum acutidens*. *J Agric Food Chem* 2004; **52**(11): 3309-12.
125. Menniti AM, Gregori R, Neri F. Activity of natural compounds on *Fusarium verticillioides* and fumonisin production in stored maize kernels. *Int J Food Microbiol* 2010; **136**(3): 304-9.

126. Manouchehrabadi M, Farhadi M, Azizi Z, Torkaman-Boutorabi A. Carvacrol Protects Against 6-Hydroxydopamine-Induced Neurotoxicity in In Vivo and In Vitro Models of Parkinson's Disease. *Neurotox Res* 2020; **37**(1): 156-70.
127. Shoorei H, Khaki A, Khaki AA, Hemmati AA, Moghimian M, Shokoohi M. The ameliorative effect of carvacrol on oxidative stress and germ cell apoptosis in testicular tissue of adult diabetic rats. *Biomed Pharmacother* 2019; **111**: 568-78.
128. El-Sayed el SM, Mansour AM, Abdul-Hameed MS. Thymol and Carvacrol Prevent Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity by Abrogation of Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis in Rats. *J Biochem Mol Toxicol* 2016; **30**(1): 37-44.
129. Khan F, Singh VK, Saeed M, Kausar MA, Ansari IA. Carvacrol Induced Program Cell Death and Cell Cycle Arrest in Androgen-Independent Human Prostate Cancer Cells via Inhibition of Notch Signaling. *Anticancer Agents Med Chem* 2019; **19**(13): 1588-608.
130. Zeidan-Chulia F, Gursoy M, de Oliveira BH, et al. Focussed microarray analysis of apoptosis in periodontitis and its potential pharmacological targeting by carvacrol. *Arch Oral Biol* 2014; **59**(5): 461-9.
131. Guimaraes AG, Oliveira GF, Melo MS, et al. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2010; **107**(6): 949-57.
132. Yu H, Zhang ZL, Chen J, et al. Carvacrol, a food-additive, provides neuroprotection on focal cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *PLoS One* 2012; **7**(3): e33584.
133. Wang P, Luo Q, Qiao H, et al. The Neuroprotective Effects of Carvacrol on Ethanol-Induced Hippocampal Neurons Impairment via the Antioxidative and Antiapoptotic Pathways. *Oxid Med Cell Longev* 2017; **2017**: 4079425.
134. Canbek M, Uyanoglu M, Bayramoglu G, et al. Effects of carvacrol on defects of ischemia-reperfusion in the rat liver. *Phytomedicine* 2008; **15**(6-7): 447-52.
135. Aristatile B, Al-Numair KS, Veeramani C, Pugalendi KV. Effect of carvacrol on hepatic marker enzymes and antioxidant status in D-galactosamine-induced hepatotoxicity in rats. *Fundam Clin Pharmacol* 2009; **23**(6): 757-65.
136. Aristatile B, Al-Numair KS, Al-Assaf AH, Veeramani C, Pugalendi KV. Protective Effect of Carvacrol on Oxidative Stress and Cellular DNA Damage Induced by UVB Irradiation in Human Peripheral Lymphocytes. *J Biochem Mol Toxicol* 2015; **29**(11): 497-507.
137. Melo FH, Moura BA, de Sousa DP, et al. Antidepressant-like effect of carvacrol (5-Isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement of dopaminergic system. *Fundam Clin Pharmacol* 2011; **25**(3): 362-7.
138. Deng W, Lu H, Teng J. Carvacrol attenuates diabetes-associated cognitive deficits in rats. *J Mol Neurosci* 2013; **51**(3): 813-9.
139. Hou N, Mai Y, Qiu X, et al. Carvacrol Attenuates Diabetic Cardiomyopathy by Modulating the PI3K/AKT/GLUT4 Pathway in Diabetic Mice. *Front Pharmacol* 2019; **10**: 998.
140. Liu Y, Wei J, Ma KT, et al. Carvacrol protects against diabetes-induced hypercontractility in the aorta through activation of the PI3K/Akt pathway. *Biomed Pharmacother* 2020; **125**: 109825.
141. Qu Y, Wang G, Sun X, Wang K. Inhibition of the Warm Temperature-Activated Ca(2+)-Permeable Transient Receptor Potential Vanilloid TRPV3 Channel Attenuates Atopic Dermatitis. *Mol Pharmacol* 2019; **96**(3): 393-400.
142. Lee SP, Buber MT, Yang Q, et al. Thymol and related alkyl phenols activate the hTRPA1 channel. *Br J Pharmacol* 2008; **153**(8): 1739-49.
143. Parnas M, Peters M, Dadon D, et al. Carvacrol is a novel inhibitor of Drosophila TRPL and mammalian TRPM7 channels. *Cell Calcium* 2009; **45**(3): 300-9.
144. Runnels LW, Yue L, Clapham DE. TRP-PLIK, a bifunctional protein with kinase and ion channel activities. *Science* 2001; **291**(5506): 1043-7.

145. Huang Y, Leng TD, Inoue K, et al. TRPM7 channels play a role in high glucose-induced endoplasmic reticulum stress and neuronal cell apoptosis. *J Biol Chem* 2018; **293**(37): 14393-406.
146. Gommers LMM, Hill TG, Ashcroft FM, de Baaij JHF. Low extracellular magnesium does not impair glucose-stimulated insulin secretion. *PLoS One* 2019; **14**(6): e0217925.
147. Derbenev AV, Zsombok A. Potential therapeutic value of TRPV1 and TRPA1 in diabetes mellitus and obesity. *Semin Immunopathol* 2016; **38**(3): 397-406.
148. Alma MH, Mavi A, Yildirim A, Digrak M, Hirata T. Screening chemical composition and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from *Origanum syriacum* L. growing in Turkey. *Biol Pharm Bull* 2003; **26**(12): 1725-9.
149. Aeschbach R, Loliger J, Scott BC, et al. Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food Chem Toxicol* 1994; **32**(1): 31-6.
150. Turkez H, Aydin E. Investigation of cytotoxic, genotoxic and oxidative properties of carvacrol in human blood cells. *Toxicol Ind Health* 2016; **32**(4): 625-33.
151. Landa P, Kokoska L, Pribylova M, Vanek T, Marsik P. In vitro anti-inflammatory activity of carvacrol: Inhibitory effect on COX-2 catalyzed prostaglandin E(2) biosynthesis. *Arch Pharm Res* 2009; **32**(1): 75-8.
152. Lima Mda S, Quintans-Junior LJ, de Santana WA, Martins Kaneto C, Pereira Soares MB, Villarreal CF. Anti-inflammatory effects of carvacrol: evidence for a key role of interleukin-10. *Eur J Pharmacol* 2013; **699**(1-3): 112-7.
153. Kara M, Uslu S, Demirci F, Temel HE, Baydemir C. Supplemental carvacrol can reduce the severity of inflammation by influencing the production of mediators of inflammation. *Inflammation* 2015; **38**(3): 1020-7.
154. Courtneidge SA, Heber A. An 81 kd protein complexed with middle T antigen and pp60c-src: a possible phosphatidylinositol kinase. *Cell* 1987; **50**(7): 1031-7.
155. Whitman M, Downes CP, Keeler M, Keller T, Cantley L. Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate. *Nature* 1988; **332**(6165): 644-6.
156. Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC. Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem* 1998; **67**: 481-507.
157. Donahue TR, Tran LM, Hill R, et al. Integrative survival-based molecular profiling of human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2012; **18**(5): 1352-63.
158. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* 2006; **7**(8): 606-19.
159. Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, White S, Timms J, Waterfield MD. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; **17**: 615-75.
160. Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* 2008; **27**(41): 5497-510.
161. Schultze SM, Hemmings BA, Niessen M, Tschopp O. PI3K/AKT, MAPK and AMPK signalling: protein kinases in glucose homeostasis. *Expert Rev Mol Med* 2012; **14**: e1.
162. Huang X, Liu G, Guo J, Su Z. The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. *Int J Biol Sci* 2018; **14**(11): 1483-96.
163. Vanhaesebroeck B, Guillermet-Guibert J, Graupera M, Bilanges B. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; **11**(5): 329-41.
164. Shayesteh L, Lu Y, Kuo WL, et al. PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nat Genet* 1999; **21**(1): 99-102.
165. Ma YY, Wei SJ, Lin YC, et al. PIK3CA as an oncogene in cervical cancer. *Oncogene* 2000; **19**(23): 2739-44.

166. Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC, Toker A. Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* 1997; **275**(5300): 665-8.
167. Hawkins PT, Stephens LR. Emerging evidence of signalling roles for PI(3,4)P₂ in Class I and II PI3K-regulated pathways. *Biochem Soc Trans* 2016; **44**(1): 307-14.
168. Zhang J, Yu XH, Yan YG, Wang C, Wang WJ. PI3K/Akt signaling in osteosarcoma. *Clin Chim Acta* 2015; **444**: 182-92.
169. Staal SP. Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; **84**(14): 5034-7.
170. Krycer JR, Sharpe LJ, Luu W, Brown AJ. The Akt-SREBP nexus: cell signaling meets lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2010; **21**(5): 268-76.
171. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 2007; **129**(7): 1261-74.
172. Tuttle RL, Gill NS, Pugh W, et al. Regulation of pancreatic beta-cell growth and survival by the serine/threonine protein kinase Akt1/PKBalpha. *Nat Med* 2001; **7**(10): 1133-7.
173. Buzzi F, Xu L, Zuellig RA, et al. Differential effects of protein kinase B/Akt isoforms on glucose homeostasis and islet mass. *Mol Cell Biol* 2010; **30**(3): 601-12.
174. Ruggeri BA, Huang L, Wood M, Cheng JQ, Testa JR. Amplification and overexpression of the AKT2 oncogene in a subset of human pancreatic ductal adenocarcinomas. *Mol Carcinog* 1998; **21**(2): 81-6.
175. Cheng JQ, Ruggeri B, Klein WM, et al. Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**(8): 3636-41.
176. Braccini L, Ciraolo E, Campa CC, et al. PI3K-C2gamma is a Rab5 effector selectively controlling endosomal Akt2 activation downstream of insulin signalling. *Nat Commun* 2015; **6**: 7400.
177. Jethwa N, Chung GH, Lete MG, et al. Endomembrane PtdIns(3,4,5)P₃ activates the PI3K-Akt pathway. *J Cell Sci* 2015; **128**(18): 3456-65.
178. Calleja V, Alcor D, Laguerre M, et al. Intramolecular and intermolecular interactions of protein kinase B define its activation in vivo. *PLoS Biol* 2007; **5**(4): e95.
179. Alessi DR, James SR, Downes CP, et al. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol* 1997; **7**(4): 261-9.
180. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 2005; **307**(5712): 1098-101.
181. Liu P, Gan W, Chin YR, et al. PtdIns(3,4,5)P₃-Dependent Activation of the mTORC2 Kinase Complex. *Cancer Discov* 2015; **5**(11): 1194-209.
182. Manning BD, Toker A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell* 2017; **169**(3): 381-405.
183. Andjelkovic M, Jakubowicz T, Cron P, Ming XF, Han JW, Hemmings BA. Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**(12): 5699-704.
184. Gao T, Furnari F, Newton AC. PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol Cell* 2005; **18**(1): 13-24.
185. Burgering BM, Medema RH. Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty. *J Leukoc Biol* 2003; **73**(6): 689-701.

186. Kaestner KH, Knochel W, Martinez DE. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev* 2000; **14**(2): 142-6.
187. Tzivion G, Dobson M, Ramakrishnan G. FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins. *Biochim Biophys Acta* 2011; **1813**(11): 1938-45.
188. Xing YQ, Li A, Yang Y, Li XX, Zhang LN, Guo HC. The regulation of FOXO1 and its role in disease progression. *Life Sci* 2018; **193**: 124-31.
189. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 1999; **96**(6): 857-68.
190. Schall D, Schmitt F, Reis B, Brandt S, Beer-Hammer S. SLY1 regulates T-cell proliferation during *Listeria monocytogenes* infection in a Foxo1-dependent manner. *Eur J Immunol* 2015; **45**(11): 3087-97.
191. Kitamura T, Nakae J, Kitamura Y, et al. The forkhead transcription factor Foxo1 links insulin signaling to Pdx1 regulation of pancreatic beta cell growth. *J Clin Invest* 2002; **110**(12): 1839-47.
192. van der Horst A, Burgering BM. Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; **8**(6): 440-50.
193. Bridge D, Theofilis AG, Holler RL, Marcinkevicius E, Steele RE, Martinez DE. FoxO and stress responses in the cnidarian *Hydra vulgaris*. *PLoS One* 2010; **5**(7): e11686.
194. Kitamura T. The role of FOXO1 in beta-cell failure and type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 2013; **9**(10): 615-23.
195. Mussig K, Staiger H, Machicao F, et al. Association of common genetic variation in the FOXO1 gene with beta-cell dysfunction, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; **94**(4): 1353-60.
196. Okamoto H, Hribal ML, Lin HV, Bennett WR, Ward A, Accili D. Role of the forkhead protein FoxO1 in beta cell compensation to insulin resistance. *J Clin Invest* 2006; **116**(3): 775-82.
197. Zhang J, Liu F. Tissue-specific insulin signaling in the regulation of metabolism and aging. *IUBMB Life* 2014; **66**(7): 485-95.
198. Weir GC, Bonner-Weir S. Islets of Langerhans: the puzzle of intra-islet interactions and their relevance to diabetes. *J Clin Invest* 1990; **85**(4): 983-7.
199. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001; **414**(6865): 799-806.
200. Kaneto H, Matsuoka TA, Miyatsuka T, et al. PDX-1 functions as a master factor in the pancreas. *Front Biosci* 2008; **13**: 6406-20.
201. Wang HW, Mizuta M, Saitoh Y, Noma K, Ueno H, Nakazato M. Glucagon-like peptide-1 and candesartan additively improve glucolipotoxicity in pancreatic beta-cells. *Metabolism* 2011; **60**(8): 1081-9.
202. Wang W, Liu Y, Chen Y, et al. Inhibition of Foxo1 mediates protective effects of ghrelin against lipotoxicity in MIN6 pancreatic beta-cells. *Peptides* 2010; **31**(2): 307-14.
203. Martinez SC, Tanabe K, Cras-Meneur C, Abumrad NA, Bernal-Mizrachi E, Permutt MA. Inhibition of Foxo1 protects pancreatic islet beta-cells against fatty acid and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Diabetes* 2008; **57**(4): 846-59.
204. Wong KK, Engelman JA, Cantley LC. Targeting the PI3K signaling pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2010; **20**(1): 87-90.
205. Hediger MA, Clemençon B, Burrier RE, Bruford EA. The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): introduction. *Mol Aspects Med* 2013; **34**(2-3): 95-107.
206. Barron CC, Bilan PJ, Tsakiridis T, Tsiani E. Facilitative glucose transporters: Implications for cancer detection, prognosis and treatment. *Metabolism* 2016; **65**(2): 124-39.

207. Bian C, Bai B, Gao Q, Li S, Zhao Y. 17beta-Estradiol Regulates Glucose Metabolism and Insulin Secretion in Rat Islet beta Cells Through GPER and Akt/mTOR/GLUT2 Pathway. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019; **10**: 531.
208. Civelek VN, Deeney JT, Kubik K, Schultz V, Tornheim K, Corkey BE. Temporal sequence of metabolic and ionic events in glucose-stimulated clonal pancreatic beta-cells (HIT). *Biochem J* 1996; **315 (Pt 3)**: 1015-9.
209. Thorens B, Sarkar HK, Kaback HR, Lodish HF. Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and beta-pancreatic islet cells. *Cell* 1988; **55(2)**: 281-90.
210. De Vos A, Heimberg H, Quartier E, et al. Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expression. *J Clin Invest* 1995; **96(5)**: 2489-95.
211. Simpson IA, Dwyer D, Malide D, Moley KH, Travis A, Vannucci SJ. The facilitative glucose transporter GLUT3: 20 years of distinction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; **295(2)**: E242-53.
212. Sansbury FH, Flanagan SE, Houghton JA, et al. SLC2A2 mutations can cause neonatal diabetes, suggesting GLUT2 may have a role in human insulin secretion. *Diabetologia* 2012; **55(9)**: 2381-5.
213. Mueckler M, Kruse M, Strube M, Riggs AC, Chiu KC, Permutt MA. A mutation in the Glut2 glucose transporter gene of a diabetic patient abolishes transport activity. *J Biol Chem* 1994; **269(27)**: 17765-7.
214. Suckale J, Solimena M. Pancreas islets in metabolic signaling--focus on the beta-cell. *Front Biosci* 2008; **13**: 7156-71.
215. Garcia M, Millan C, Balmaceda-Aguilera C, et al. Hypothalamic ependymal-glia cells express the glucose transporter GLUT2, a protein involved in glucose sensing. *J Neurochem* 2003; **86(3)**: 709-24.
216. Wang Q, Jin T. The role of insulin signaling in the development of beta-cell dysfunction and diabetes. *Islets* 2009; **1(2)**: 95-101.
217. Tjalve H, Wilander E, Johansson EB. Distribution of labelled streptozotocin in mice: uptake and retention in pancreatic islets. *J Endocrinol* 1976; **69(3)**: 455-6.
218. Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB. STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes* 1994; **43(11)**: 1326-33.
219. Elsner M, Guldbakke B, Tiedge M, Munday R, Lenzen S. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia* 2000; **43(12)**: 1528-33.
220. Navarro-Tableros V, Fiordeliso T, Hernandez-Cruz A, Hiriart M. Physiological development of insulin secretion, calcium channels, and GLUT2 expression of pancreatic rat beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; **292(4)**: E1018-29.
221. Mariggio S, Iurisci C, Sebastia J, Patton-Vogt J, Corda D. Molecular characterization of a glycerophosphoinositol transporter in mammalian cells. *FEBS Lett* 2006; **580(30)**: 6789-96.
222. Uldry M, Ibberson M, Hosokawa M, Thorens B. GLUT2 is a high affinity glucosamine transporter. *FEBS Lett* 2002; **524(1-3)**: 199-203.
223. Ahlgren U, Jonsson J, Jonsson L, Simu K, Edlund H. beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ipf1/Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes Dev* 1998; **12(12)**: 1763-8.
224. Watada H, Kajimoto Y, Umayahara Y, et al. The human glucokinase gene beta-cell-type promoter: an essential role of insulin promoter factor 1/PDX-1 in its activation in HIT-T15 cells. *Diabetes* 1996; **45(11)**: 1478-88.
225. Kaneto H, Miyatsuka T, Kawamori D, Matsuoka TA. Pleiotropic Roles of PDX-1 in the Pancreas. *Rev Diabet Stud* 2007; **4(4)**: 209-25.

226. Waeber G, Thompson N, Nicod P, Bonny C. Transcriptional activation of the GLUT2 gene by the IPF-1/STF-1/IDX-1 homeobox factor. *Mol Endocrinol* 1996; **10**(11): 1327-34.
227. Ashcroft FM, Rorsman P. Diabetes mellitus and the beta cell: the last ten years. *Cell* 2012; **148**(6): 1160-71.
228. De Vincenzi M, Stammati A, De Vincenzi A, Silano M. Constituents of aromatic plants: carvacrol. *Fitoterapia* 2004; **75**(7-8): 801-4.
229. Amanlou M, Fazeli MR, Arvin A, Amin HG, Farsam H. Antimicrobial activity of crude methanolic extract of *Satureja khuzistanica*. *Fitoterapia* 2004; **75**(7-8): 768-70.
230. Maiztegui B, Roman CL, Barbosa-Sampaio HC, Boschero AC, Gagliardino JJ. Role of Islet Glucokinase, Glucose Metabolism, and Insulin Pathway in the Enhancing Effect of Islet Neogenesis-Associated Protein on Glucose-Induced Insulin Secretion. *Pancreas* 2015; **44**(6): 959-66.
231. Mackenzie RW, Elliott BT. Akt/PKB activation and insulin signaling: a novel insulin signaling pathway in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2014; **7**: 55-64.
232. Thorens B. GLUT2 in pancreatic and extra-pancreatic gluco-detection (review). *Mol Membr Biol* 2001; **18**(4): 265-73.
233. Leturque A, Brot-Laroche E, Le Gall M. GLUT2 mutations, translocation, and receptor function in diet sugar managing. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; **296**(5): E985-92.
234. Li Y, Mai Y, Qiu X, et al. Effect of long-term treatment of Carvacrol on glucose metabolism in Streptozotocin-induced diabetic mice. *BMC Complement Med Ther* 2020; **20**(1): 142.
235. Arkali G, Aksakal M, Kaya SO. Protective effects of carvacrol against diabetes-induced reproductive damage in male rats: Modulation of Nrf2/HO-1 signalling pathway and inhibition of Nf-kB-mediated testicular apoptosis and inflammation. *Andrologia* 2021; **53**(2): e13899.
236. Zhao W, Deng C, Han Q, Xu H, Chen Y. Carvacrol may alleviate vascular inflammation in diabetic db/db mice. *Int J Mol Med* 2020; **46**(3): 977-88.
237. Ezhumalai M, Radhiga T, Pugalendi KV. Antihyperglycemic effect of carvacrol in combination with rosiglitazone in high-fat diet-induced type 2 diabetic C57BL/6J mice. *Mol Cell Biochem* 2014; **385**(1-2): 23-31.
238. Zhao W, Chen L, Zhou H, et al. Protective effect of carvacrol on liver injury in type 2 diabetic db/db mice. *Mol Med Rep* 2021; **24**(5).
239. T. S. Vatseba LKS, V. M. Pushkarev, O. I. Kovzun, B. B. Guda, V. V. Pushkarev, M. D. Tronko, N. V. Skrypyuk, L. M. Zaiats. Activation of the PI3K/AKT/MTOR/P70S6K1 signaling cascade in peripheral blood mononuclear cells in patients with type 2 diabetes. *Ukr Biochem J* 2020; **92**.
240. Tremblay F, Brule S, Hee Um S, et al. Identification of IRS-1 Ser-1101 as a target of S6K1 in nutrient- and obesity-induced insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**(35): 14056-61.
241. Um SH, Frigerio F, Watanabe M, et al. Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* 2004; **431**(7005): 200-5.
242. Khamzina L, Veilleux A, Bergeron S, Marette A. Increased activation of the mammalian target of rapamycin pathway in liver and skeletal muscle of obese rats: possible involvement in obesity-linked insulin resistance. *Endocrinology* 2005; **146**(3): 1473-81.
243. Dagli Gul AS, Fadillioglu E, Karabulut I, Yesilyurt A, Delibasi T. The effects of oral carvacrol treatment against H₂O₂ induced injury on isolated pancreas islet cells of rats. *Islets* 2013; **5**(4): 149-55.

