

Yenidoğan Streptozotosin Diyabet Modelinde Pankreatik Beta Hücre Rejenerasyonunu Kontrol Eden Genlerin Ekspresyonu

Fatma KAYA DAĞISTANLI ¹, Melek ÖZTÜRK ¹

¹ İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

Özet

Bu çalışmanın amacı, yenidoğan streptozotosin (yd-STZ) diyabet modelinde, erken dönemlerde beta hücre rejenerasyonunu takip etmek amacıyla, insülin, pankreatik duodonal homeobox gen-1 (pdx-1) ve sinaptofisin gen ekspresyonlarını hem adacık içi hem de adacık dışı hücrelerdeki dağılımlarını tespit etmektir. Ayrıca STZ uygulaması ile bozulan adacık düzeninin yeniden yapılanmasında, endokrin hücrelerin rolünü araştırmaktır. Çalışmada, her birinde 7 adet Wistar albino yenidoğan sıçanlardan oluşan 8 grup oluşturuldu. 4 gruba doğumun 2. günü 100 mg/kg tek doz STZ (yd2-STZ) uygulaması yapıldı ve gruplar sırasıyla doğumun 3., 5., 7. ve 10. günlerinde sağlıklı kontrol grupları ile birlikte dekapite edildiler. Alınan pankreas dokuları % 10'luk formolde tespit edilerek parafine gömüldü. Doku kesitlerine insülin probu kullanılarak in situ hibridizasyon yöntemi, ayrıca insülin, glukagon, somatostatin, sinaptofisin, pdx-1 antikoları kullanılarak immünohistokimyasal boyama yöntemi uygulandı. STZ uygulanan gruplarda kontrol gruplarına göre adacıkların küçüldüğü, Yd2- STZ diyabetik gruplarda insülin mRNA sinyallerini içeren hücrelerin kapladığı alanın, insülin immün pozitif hücrelerin kapladığı alandan daha az olduğu görüldü. Yd2-STZ gruplarında adacık içerisindeki immün pozitif pdx-1 hücrelerinin kontrol gruplara göre azaldığı ayrıca tüm deney gruplarında adacıklardaki tüm endokrin hücrelerin sinaptofisin ekspresyonu yaptıkları tespit edildi. STZ uygulanan gruplarda ekzokrin doku ve kanal epiteli içerisinde çok sayıda sinaptofisin immün pozitif hücrelere rastlandı. yd2-STZ modelinde, STZ'nin neden olduğu beta hücre hasarının en fazla görüldüğü günün yd-2 STZ 5 günlük grup olduğu ve 5. günden başlayarak 7 ila 10. günler arasında hızlı bir rejenerasyonun meydana geldiği, sinaptofisin ve pdx-1'in birlikte, olası öncül hücrelerin endokrin hücreye dönüşümünü tespit etmek için iyi birer belirteç olacakları sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Yenidoğan STZ diyabet modeli, β hücre rejenerasyonu, pdx-1, in situ hibridizasyon, sinaptofisin, streptozotosin

Cerrahpaşa Tıp Derg 2007; 38: 127 - 138

The expression of genes that regulat pancreatic beta cell regeneration in neonatal streptozotocin diabetic model

Abstract

The aims of this study are to determine distribution of gene expression of insulin, pdx-1 and synaptophysin in both intra and extra islet cells, to determine the role of the endocrine cells in the remodelling of islets that was damaged with STZ treatment in the early stages of the neonatal STZ (n-STZ) diabetic model. In this study 8 groups each containing 7 neonatal Wistar albino rats were established. On the second day after birth 100mg/kg STZ (n-STZ) was given four groups. Each group was decapitated on the 3rd, 5th, 7th and 10th day respectively together with the healthy control groups. Pancreas tissue was fixed in % 10 formaline and embedded in paraffin. Digoxigenin labeled insulin was used for in situ hybridization. Insulin, glucagon, somatostatin, synaptophysin and pdx-1 antibodies were used for immunohistochemistry on serial parafine sections. Islet sizes of STZ treated groups were smaller than control groups, while the area containing insulin mRNA signal positive cells in n-STZ diabetic group were smaller than controls. Although pdx-1 immunopositive cells were decreased in STZ diabetic groups compared to control groups. Numerous synaptophysin positive cells were detected in the lining of duct epithelium as well as exocrine tissue in the STZ diabetic groups. Beta cell destruction was in the highest level in n-STZ 5 days group, and an effective beta cell regeneration occurred between 7 th and 10 th day of the experiment. Synaptophysin and pdx-1 may be a useful marker in the detection of precursor cells transforming to β cells.

KeyWords: Neonatal STZ model, β cell regeneration, pdx-1, in situ hybridization, synaptophysin, streptozotocin

Cerrahpasa J Med 2007; 38: 127 - 138

Diabetes mellitus, pankreatik beta (β) hücrelerinin kaybı ya da fonksiyonlarının bozulması nedeni ile β hücreleri-

Alındığı Tarih: 3 Eylül 2007

Yazışma Adresi (Address): Dr. Fatma KAYA DAĞISTANLI

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı,

34098 Cerrahpaşa - İstanbul

E-posta: fkaya@istanbul.edu.tr

nin çoğalma kapasitesinin yetersiz kalmasıyla ortaya çıkan bir hastalıktır. Diyabetik hastalardaki normal β hücre külesinin yeniden yapılanmasında yeni uygulamaların bulunabilmesi amacıyla, erişkin pankreasın β hücrelerindeki rejenerasyon ve neogenez önemli bir araştırma konusudur [1].

Diyabet ve komplikasyonlarının araştırılmasında çeşitli

deneyisel modeller kullanılmaktadır [2-4]. Tip II diyabetine en yakın model olarak geliştirilen "Yenidoğan Streptozotisin (STZ) Modeli"nde yeni doğan sıçanlara doğduklarının 1 ile 5. günleri arasında seçilen bir günde, diyabetojenik ajan olan STZ tek doz olarak enjekte edilerek β hücrelerinin haraplanması hedeflenmektedir [5-9]. STZ enjeksiyonunu takiben yeni doğan sıçanların β hücrelerinde 10-20. günlerde hızlı bir regenerasyonun gerçekleştiği hem morfolojik olarak hem de proliferasyon indeksi ölçülerek saptanmış, yetişkin dönemde ise neogenezin çok sınırlı bir durumda devam ettiği ileri sürülmüştür [4, 6].

β hücre eksikliği ya da kaybı ile ortaya çıkan diyabetin tedavisinde, adacık hücre gelişim mekanizmasının ve rejenerasyonunun bilinmesi yeni beta hücrelerinin oluşumunu uyarıcı mekanizmaların bulunması oldukça önemlidir. Memelilerde pankreas ve karaciğer gibi organlar güçlü rejenerasyon potansiyeline sahiptirler [10]. Pankreasın bir kısmının çıkarılması, pankreatik kanalın bağlanması ya da STZ uygulaması gibi çeşitli deneysel modeller ile β hücrelerinin yenilenmesinde değişik mekanizmaların işlediği gösterilmiştir [11-13]. β hücre neogenezinin, adacık içerisindeki mevcut beta hücrelerinin replikasyonu ile veya ekzokrin doku içerisinde asiner hücrelerin ya da farklılaşmış kanal epitel hücrelerinin β hücresine dönüşümü ile gerçekleştiğini gösteren değişik araştırmalar vardır [13-15]. Son yıllardaki araştırmalar ile pankreas adacık endokrin hücrelerin bir takım öncül hücrelerden de gelişebileceği ileri sürülmüştür [16].

Birçok transkripsiyon faktörü, büyüme faktörleri ve peptidlerin, ekzokrin ve endokrin pankreasın idamesinde, proliferasyon ve farklılaşmasında etkin olduğu ileri sürülmektedir [10]. Kısmi pankreatektomi modeli ile yapılan çalışmalarda transkripsiyon faktörlerinden birisi olan pankreatik duodenal homeobox-1 (pdx-1)'in beta hücre farklılaşmasında rol oynadığı ileri sürülmektedir [17]. Pdx-1, esas olarak embriyonal dönemde pankreas gelişiminde rol oynayan çok önemli bir transkripsiyon faktörüdür. Pdx-1'in erişkin dönemdeki ekspresyonu özellikle β hücresinde ve çok az sayıdaki somatostatin hücrelerinde tespit edilmiştir [18-20].

Sinaptofisin, nöron ve endokrin hücre veziküllerinin önemli integral membran glikoproteinidir [21,22]. Normal ve neoplastik nöroendokrin hücrelerde eksprese edildiği tespit edilmiştir [21]. Normal koşullarda pankreasın tüm endokrin hücrelerinde eksprese edilirlerken, kanal epitel hücrelerinde ve asiner hücrelerde eksprese edilmezler. Bu hücrelerdeki ekspresyonları hücrelerin nöroendokrin hücre özellikleri kazandıklarını gösteren bir belirteç olarak kabul edilir [23].

Bu çalışmada, yenidoğan STZ diabet modelinde, erken dönemlerde β hücre rejenerasyonunun, insülin gen ekspresyonunun protein ve mRNA düzeyinde tespit edilmesi, adacık dışı hücrelerden kaynaklanan β hücrelerinin tespiti için immünohistokimyasal yöntem ile pdx-1 ve sinaptofisin ekspresyonu yapan hücrelerin saptanması, yenilenme sü-

recinde bozulan adacık düzeninin yeniden yapılanmasında endokrin hücrelerin (insülin, glukagon ve somatostatin hücrelerinin) rolünün immünohistokimyasal boyama sonrasında morfometrik yöntemlerle tespit edilmesi amaçlandı.

YÖNTEM ve GEREÇLER

Çalışmada İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanlar Üretim ve Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edilen Wistar tipi albino sıçanlardan üretilen yenidoğan sıçanlar kullanıldı. Yeni doğan sıçanlar doğumu takiben 48 saatlik olduklarında deney gruplarına alındılar. Herbiri 7 sıçandan oluşan 8 adet deney grubu oluşturuldu. Deney Grupları: Doğumu izleyen 2.günde ilk 4 gruba serum fizyolojik içinde eritilmiş [24] 100 mg/kg streptozotisin (STZ, Sigma, USA) intraperitoneal (i.p) tek doz olarak uygulandı. Doğumu izleyen sırası ile 3., 5., 7. ve 10. günlerde sağlıklı kontrol grupları ile birlikte dekapite edildiler.

Morfolojik uygulamalar: Deneysel bitiminde alınan pankreas dokuları % 10'luk nötral formol ile tespit edilip parafine gömüldü. 4 μ m kalınlığında alınan parafin doku kesitlerine, insülin, somatostatin, glukagon, sinaptofisin ve pdx-1 antikoru kullanılarak streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi ile immünohistokimya uygulandı. Ayrıca insülin mRNA'larını saptamak amacıyla, digoksinin işaretli insülin oligo probu kullanılarak in situ hibridizasyon yöntemi uygulandı.

İmmünohistokimyasal boyama: İmmünohistokimyasal boyama için "Histostain Plus Bulk Kit" kullanılarak (Zymed, USA) ve "UltraVision Large Volume Detection System Anti-Mouse, HRP" (LabVision, USA) kitleri kullanıldı. "UltraVision Large Volume Detection System Anti-Mouse, HRP" ile fare monoklonal insülin (1:1500) (Sigma, USA), fare monoklonal glukagon (1:3500) (Sigma, USA) antikoru ve fare monoklonal antikoru Sinaptofisin Ab-2 (Clone SYP02) (Neomarkers, USA), Histostain Plus Bulk Kit ile tavşan poliklonal somatostatin (1:75) (Zymed, USA) ve tavşan poliklonal pankreas duodenal homeobox-1 (1:500) (Prof.Dr.CV Wright, Vanderbilt Üniversitesi, ABD; tarafından hediye edildi.) antikoru boyandı. Kit içinde tavsiye edilen boyama işlem sırası takip edildi.

Boyama özgüllüğünün kontrolü: Negatif kontrol olarak kullanılan kesite immün boyama işlemindeki birincil antikor yerine PBS damlatılarak bu adım atlandı. Diğer adımlar aynen uygulandı.

İnsitu hibridizasyon yöntemi: İnsülin mRNA'sını tespit etmek amacı ile, 5' ucu digoksinin ile işaretlenmiş 6 adet 30 merlik diziden oluşan oligoprob (prob dizisi R&D firması tarafından düzenlenmiştir. <http://www.rndsystems.com>) karışımı kullanıldı. Paraformaldehit ile tespit edilmiş doku kesitleri için uygulanan ISH çalışma protokolü [25], bu çalışmada % 10'luk nötral formol ile tespit edilmiş pankreas doku kesitlerine uygulandı.

Boyama özgüllüğünün kontrolü: Negatif kontrol olarak kullanılan doku kesitine ISH yöntemi aynen uygulandı,

sadece hibridizasyon aşamasında kesit üzerine içinde insülin probu olmayan hibridizasyon tamponu konuldu. Adacık Boyut Ölçümü: Tüm gruplarda pankreas doku kesitlerindeki adacıkların alanları "Leica IM50 Version 4,0" programı yardımı ile hesaplanıp büyüklüklerine göre küçük (<5000 μm^2), orta (>5000-10000 μm^2) ve büyük (> 10000 μm^2) olarak sınıflandırıldılar (26). Aynı program kullanılarak adacık toplam alanı (μm^2) ve immün pozitif (insülin, glukagon) ve insülin mRNA sinyali taşıyan hücrelerin kapladığı alan (μm^2) ölçüldü. Birbirlerine oranlanarak hücrelerin adacık içerisinde kapladığı alanın yüzdesi hesaplandı. Tüm kesit üzerinde immünohistokimya yöntemi ile işaretlenen pdx-1 ve somatostatin immün pozitif hücreler sayıldı.

İstatistiksel yöntemler: Çalışmadan elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde, tek yönlü varyans analizi ve Kruskal Wallis testi kullanıldı. İkili kıyaslamalarda Dunnet, Dunn ve Bonferroni testleri kullanıldı. Anlamlılık seviyesi $p < 0.05$ olarak alındı.

BULGULAR

Adacık boyutu: Morfometri kullanarak elde edilen adacık alan ölçümlerine göre adacıklar 3 boyuta ayrılarak sınıflandırıldı. STZ uygulanan tüm gruplar (STZ3, STZ5, STZ7 ve STZ10) sağlıklı kontrol grupları ile kıyaslandığında adacıkların boyutlarının küçüldüğü gözlemlendi (Tablo 1).

İn situ hibridizasyon (ISH) yöntemine ait bulgular: Sağlıklı kontrol gruplarına ait adacıklarda merkezi olarak yerleşmiş insülin mRNA sinyalleri içeren β hücreleri saptandı (Tablo 2). Yd2-STZ uygulanan 3 günlük grupta ise adacıkların kontrol grubundaki gibi büyük boyutta fakat daha az sayıda insülin mRNA sinyali veren hücreler içerdikleri görüldü ($p < 0.001$) (Tablo 2) (Şekil 1A-1B). Yd2-STZ uygulanan 5 günlük grupta adacıkların kontrole göre hem küçük boyutta oldukları hem de çok az sayıda insülin mRNA sinyali pozitif hücreler içerdikleri ($p < 0.001$) görüldü (Şekil 1C-1D) (Tablo 2). STZ uygulanan 7 günlük grupta ise pankreas kanallarının çevresinde çok sayıda küçük adacıkların yerleştiği görüldü. Bu gruba ait bazı adacıklarda şiddetli insülin mRNA sinyalleri içeren β hücrelerinin daha az alan kapladığı görülürken bazı adacıkların ise kontrole göre küçük fakat insülin mRNA sinyallerine sahip hücrelerle dolu olduğu görüldü (Tablo 2) (Şekil 1F-1H). STZ uygulanan 10 günlük grupta adacıkların kontrole göre küçük boyutta oldukları görüldü. Bu gruptaki bazı

adacıkların az sayıda insülin mRNA sinyali pozitif beta hücreleri içerdiği bazı adacıkların ise kontrol grubundaki adacıklar gibi insülin mRNA'sı pozitif hücreler ile dolu olduğu görüldü ($p < 0.01$) (Tablo 2) (Şekil 1I-1L). Ayrıca STZ uygulanan gruplarda kanal çevresinde ve ekzokrin doku içerisinde pozitif insülin mRNA sinyalleri veren hücreler görüldü (Şekil 1E, 1H).

İmmünohistokimyasal bulgular

İnsülin: İnsülin üreten β hücreleri normal koşullarda adacık merkezine yerleşmiş olarak gözlenir. İnsülin antikoruna ile yapılan immünohistokimya sonuçlarına bakıldığında in situ hibridizasyon sonuçları ile paralellik gösterdiği görüldü. STZ uygulanan tüm gruplarda sağlıklı kontrolleri ile kıyaslandığında adacık içerisinde immün pozitif beta hücrelerinin kapladığı alanın azalmış olduğu, 7 ve 10 günlük gruplarda bazı adacıkların kontrol gruplarına ait adacıklara benzer biçimde insülin pozitif hücreler ile dolu olduğu gözlemlendi (Tablo 2) (Şekil 2E-2H). STZ uygulanan gruplarda ekzokrin doku içerisinde ve pankreas kanalları çevresine yerleşmiş insülin immün pozitif hücreler ve küçük adacıklar gözlemlendi (Şekil 2H).

Glukagon: Normal koşullarda glukagon hücreleri adacıkların periferinde yerleşik olarak bulunurlar. 3, 5, 7 ve 10 günlük sağlıklı kontrol gruplarında glukagon hücrelerinin adacık periferine yerleştikleri görüldü (Şekil 3A, 3C, 3E, 3G). Doğumun 2. günü STZ uygulanan 3, 5 ve 7 günlük gruplarda ise bu düzenin değiştiği, glukagon hücrelerinin adacık periferinden adacığın merkezine doğru dağılım gösterdiği ve adacık içerisinde kapladıkları alanın arttığı gözlemlendi ($p < 0.001$) (Tablo 2) (Şekil 3B, 3D, 3F). Yine bu gruplarda ekzokrin doku içerisinde, kanal epitelinde ve kanal çevresinde glukagon pozitif hücre ve hücre kümeleri gözlemlendi. STZ uygulanan 10 günlük grupta, kontrole göre daha küçük boyutlu fakat glukagon pozitif hücre yerleşimi açısından kontrol grubuna benzer görünüme sahip çok sayıda adacıklara rastlandı. Bazı adacıklarda ise diğer STZ'li gruplarda olduğu gibi glukagon pozitif hücrelerin sayısının arttığı ve adacık merkezine doğru yerleşim gösterdiği tespit edildi ($p < 0.01$) (Tablo 2) (Şekil 3H). Adacıklarda β hücrelerinin kapladığı alan yd2-STZ ve sağlıklı kontrol grupları kendi aralarında kıyaslandığında 3 günlük kontrol grubuna göre 7 ve 10 günlük gruplar, 3 günlük yd2-STZ grubuna göre ise 5 ve 7 günlük gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı (Tablo 2).

Somatostatin: Somatostatin hücreleri adacıkların perife-

Tablo 1. Adacıkların boyutlarına göre deney gruplardaki dağılımları.

	K3 %	STZ3 %	K5 %	STZ5 %	K7 %	STZ7 %	K10 %	STZ10 %
Büyük	58	46	29	0	31	4	15	12
Orta	26	31	52	6	31	28	55	41
Küçük	16	23	19	94	38	68	30	47

STZ; Streptozotosin uygulanan, K; Sağlıklı kontrol

rinde yerleşik olarak bulunurlar. 3, 5, 7 ve 10.gün sağlıklı kontrol gruplarında ince bir sitoplazmaya sahip somatostatin hücrelerinin adacık periferine yerleştikleri görüldü (Şekil 4A-4D). STZ uygulanan gruplarda adacık boyutlarının küçüldüğü ve somatostatin immün pozitif hücrelerinin hipertrofik oldukları görüldü (Şekil 4E-4H). Ayrıca ekzokrin dokuda ve kanal epitelinde (Şekil 4G) somatostatin immün pozitif hücrelere rastlandı. STZ uygulanmış 5 ve 10 günlük gruplarda sağlıklı kontrol gruplarına göre adacık içerisinde somatostatin immün pozitif hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı (Şekil 7).

Pdx-1: Pankreas doku kesitlerinin immünohistokimyasal boyanması sonucu, nukleusları boyanan hücreler pdx-1 pozitif hücreler olarak değerlendirildi. Doğumun 2.günü 100mg/kg STZ uygulanmış 3, 5 ve 7 günlük yavru sıçanların oluşturduğu deney gruplarına ait pankreas doku örnekleri kontrol grupları (Şekil 5A-5C) ile kıyaslandığında adacıklardaki pdx-1 immün pozitif hücre sayıları bakımında aralarında çok ileri derecede anlamlı olarak azalmış olduğu görüldü ($p<0.001$) (Tablo 2) (Şekil 5D-5F) Bu azalma özellikle 5 günlük grupta çok belirgin olarak gözlemlendi (Şekil 5F). STZ uygulanmış 10 günlük grupta bazı adacıklardaki hücre nukleuslarının kontrol grubunki gibi büyük kısmının pdx-1 immün pozitif olduğu görülürken bazı adacıklarında daha az sayıda pdx-1 immün pozitif hücre içerdiği gözlemlendi ($p<0.01$) (Tablo 2) (Şekil 5H). Yd2-STZ 5, 7 ve 10 günlük

gruplarda ekzokrin doku içerisinde dağılmış tek tek veya 2-3 hücreden oluşan pdx-1 immün pozitif hücre kümeleri ve 5 ile 15 adet hücreden oluşmuş çoğu pdx-1 pozitif hücrelerin oluşturduğu küçük adacıklar saptandı. Ekzokrin doku içerisindeki pdx-1 immün pozitif hücre sayısı bakımından kontrol gruplarından istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu tespit edildi (Tablo 2).

Sinaptofisin: Tüm kontrol pankreas doku kesitlerinde, adacıkların tamamı sinaptofisin immün pozitif reaksiyon verirken ekzokrin doku içerisinde az sayıda sinaptofisin pozitif küçük adacık ve hücre kümelerine rastlandı (Şekil 6A, 6C, 6E, 6G).

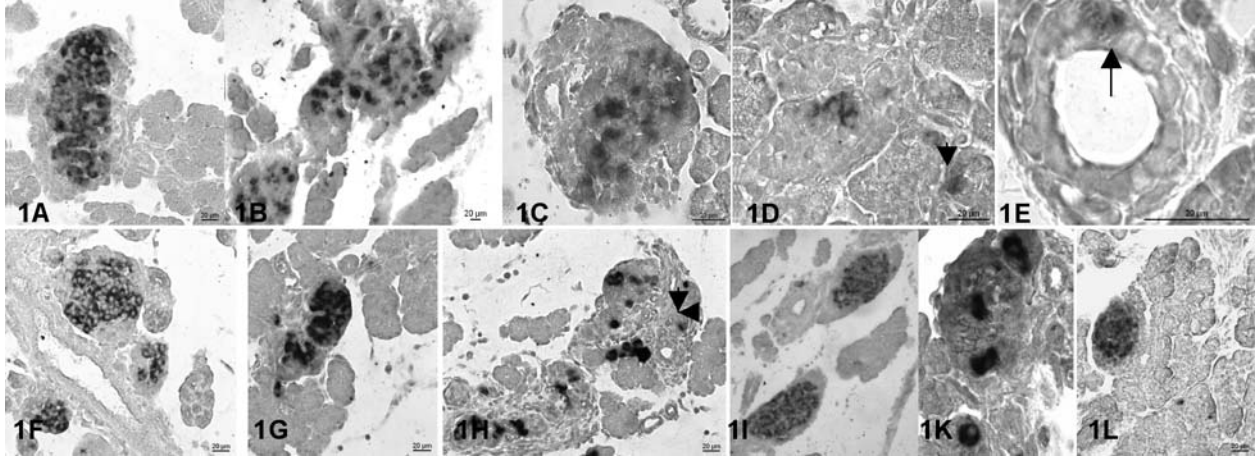
Doğumun 2. günü STZ uygulanmış gruplarda da adacıkların tamamı sinaptofisin pozitif olarak gözlenirken, 3 günlük grupta diğer gruplarla kıyaslandığında ekzokrin doku içerisinde daha az sayıda 3-4 hücreden oluşan endokrin hücre kümeleri ve ayrıca pankreatik sinir uzantıları gözlemlendi (Şekil 6B). STZ 5 ve 7 günlük gruplarda adacıkların kontrollerine göre daha küçük olduğu, ekzokrin doku içerisinde, kanalların çevresinde 3-4 hücreden oluşan endokrin hücre kümeleri ve küçük adacıklar görüldü. Ayrıca kanal epiteli çevresinde sinaptofisin pozitif hücrelere rastlandı (Şekil 6D, 6F). STZ 10. gün grubunda diğer STZ uygulanmış gruplarla benzer bulgulara sahip olduğu, farklı olarak küçük adacıkların daha fazla sayıda olduğu gözlemlendi (Şekil 6H).

Tablo 2. Sağlıklı kontrol ve yd-STZ gruplarına ait verilerin istatistiksel değerlendirilmesi.

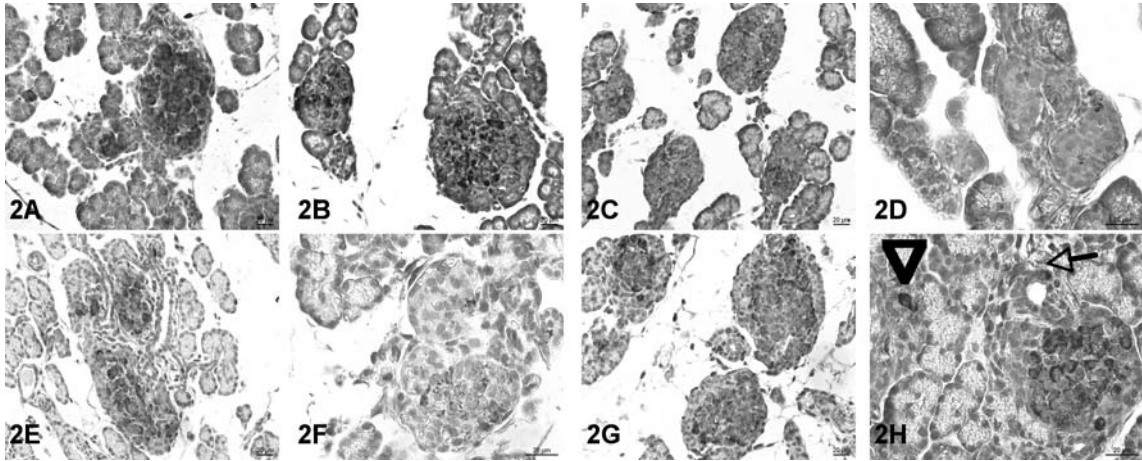
	Grup (n*:7)	3 günlük	5 günlük	7 günlük	10 günlük
İnsülin ISH (+) hücre alanı (%)	Kontrol	67 ± 60	69 ± 5	70 ± 80	71 ± 72
	STZ	24 ± 80 ^a	10 ± 4 ^a	34 ± 18 ^a	48 ± 20 ^{b,c}
İnsülin IHK (+) hücre alanı (%)	Kontrol	71 ± 5	70 ± 5	68 ± 8	69 ± 11
	STZ	50 ± 12 ^a	19 ± 8 ^{a,d}	39 ± 14 ^{a,e}	63 ± 11 ^e
Küçük adacık içi insülin IHK (+) hücre	Kontrol	3 (n:12)	3,5 (n:15)	4 (n:16)	4 (n:15)
	STZ	5 (n:21)	3 (n:21)	3 (n:29)	3.5 (n:36)
Ekzokrin pankreas İnsülin IHK (+) hücre sayısı	Kontrol	8	10	11	13
	STZ	12 ^b	16 b	16 b	20 ^b
Glukagon IHK (+) hücre alanı (%)	Kontrol	23 ± 8	24 ± 7	32 ± 8 ^f	30 ± 9 ^g
	STZ	39 ± 12	57 ± 0.19 ^{c,e}	51 ± 15 ^{e,a}	42 ± 15 ^b
Adacık içi Pdx-1 IHK (+) hücre sayısı	Kontrol	41	24 ^h	25 ^h	27
	STZ	23 ^a	6 ^{a,d,j}	7 ^{a,d,j}	15.5 ^a
Küçük adacık içi Pdx-1 IHK (+) hücre sayısı	Kontrol	3 (n:23)	4 (n:23)	4 (n:25)	4 (n:23)
	STZ	5 ^{i,k,m} (n:11)	2b (n:29)	3 ^l (n:24)	5 ^{l,n} (n:28)
Ekzokrin pankreas Pdx-1 IHK (+) hücre sayısı	Kontrol	7	8	9	7
	STZ	9	15 ^{c,b}	14 ^{b,k}	13 ^a

n: Bir kesit üzerinde sayılan küçük adacık sayısı , n*:Sayılan kesit sayısı.IHK; İmmünohistokimya, ISH; İn situ hibridizasyon.

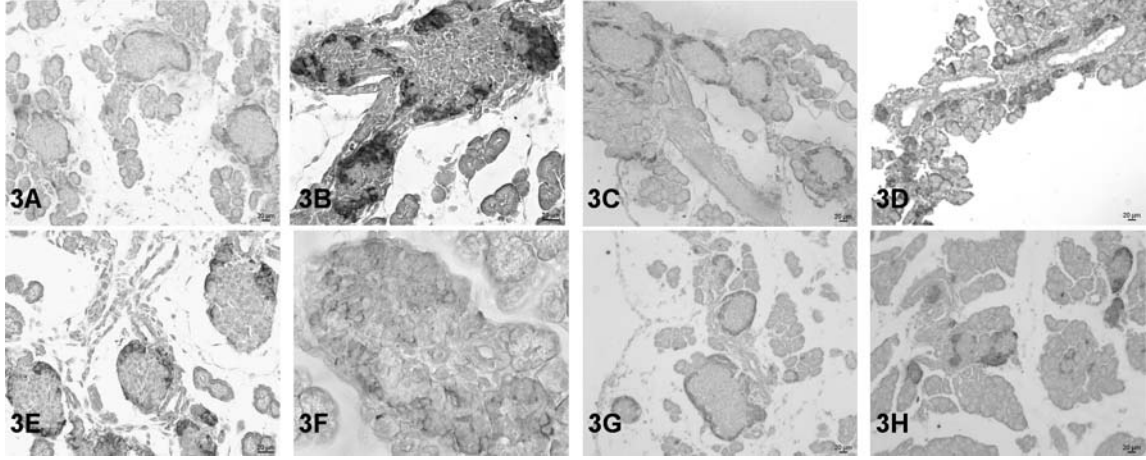
^a $p<0.001$, ^b $p<0.01$, ⁱ $p<0.05$; sağlıklı kontrol gruplarına kıyasla, ^c $p<0.01$, ^d $p<0.001$, ^e $p<0.05$ yd2-STZ 3 günlük gruba kıyasla, ^f $p<0.01$, ^g $p<0.05$, ^h $p<0.001$ kontrol 3 günlük gruba kıyasla, ⁱ $p<0.01$; 10 günlük STZ uygulanmış gruba kıyasla ^k $p<0.001$, ^l $p<0.01$; yd2- STZ 5 günlük gruba kıyasla. ^m $p<0.01$,ⁿ $p<0.05$; yd2- STZ 7 günlük gruba kıyasla.



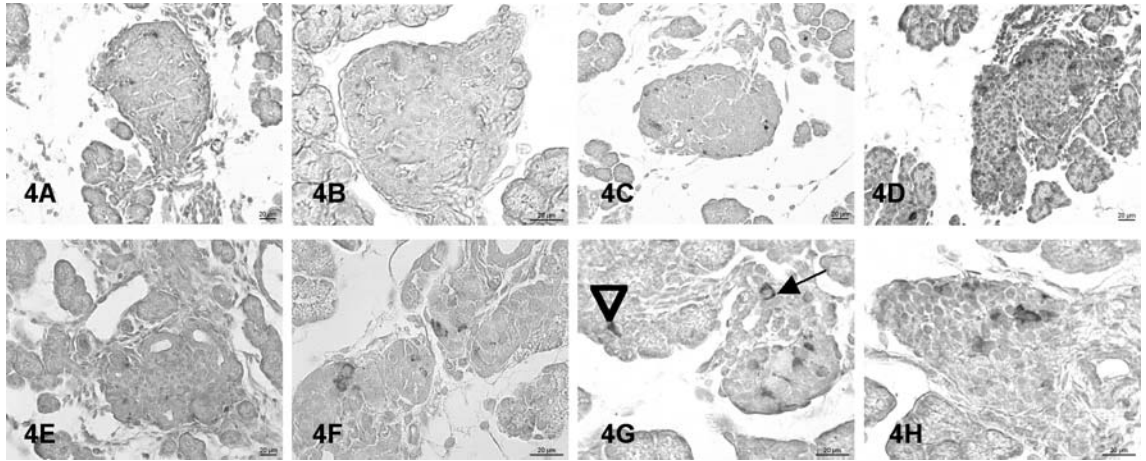
Şekil 1. Pankreas doku kesitlerinde in situ hibridizasyon yöntemi ile insülin mRNA sinyallerinin gösterilmesi. 3, (1A), 5 (1C), 7 (1F) ve 10 (1I) günlük kontrol gruplarının adacıklarında insülin mRNA sinyalleri içeren hücreler ile dolu olduğu görülürken, 3 (1B), 5 (1D-1E), 7 (1H) ve 10 (1K) günlük yd2-STZ gruplarında adacıklarda daha az sayıda insülin mRNA sinyalleri içeren hücreler görülmekte. 7 (1G) ve 10 (1L) günlük yd2-STZ gruplarına ait bazı adacıklar kontrolerine benzer olduğu görülmekte. Kanal epiteli (↑) ve ekzokrin doku (▲) içerisinde insülin mRNA sinyali taşıyan hücreler görülmekte. Bar: 20µm.



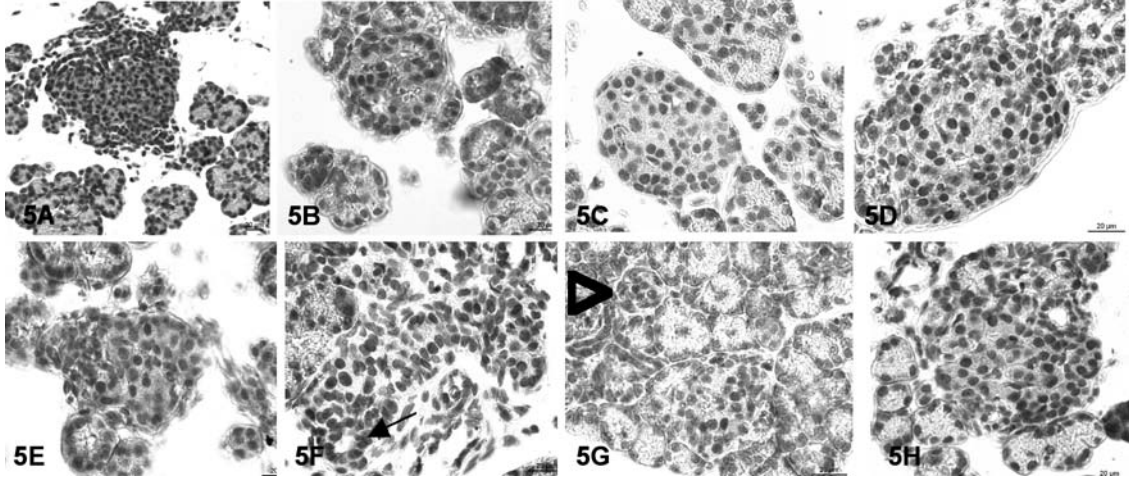
Şekil 2. Gruplara ait pankreas adacık merkezine yerleşmiş immün pozitif hücreler gösterilmekte. 3 (2A), 5 (2C), 7 (2E) ve 10 (2G) günlük kontrol grupları, 3 (2B), 5 (2D), 7 (2F) ve 10 (2H) günlük yd2-STZ grupları. Kanal epitel hücresi (↑) ve ekzokrin hücre (▲). Zit boyası: Hematoksilin. Bar: 20µm.



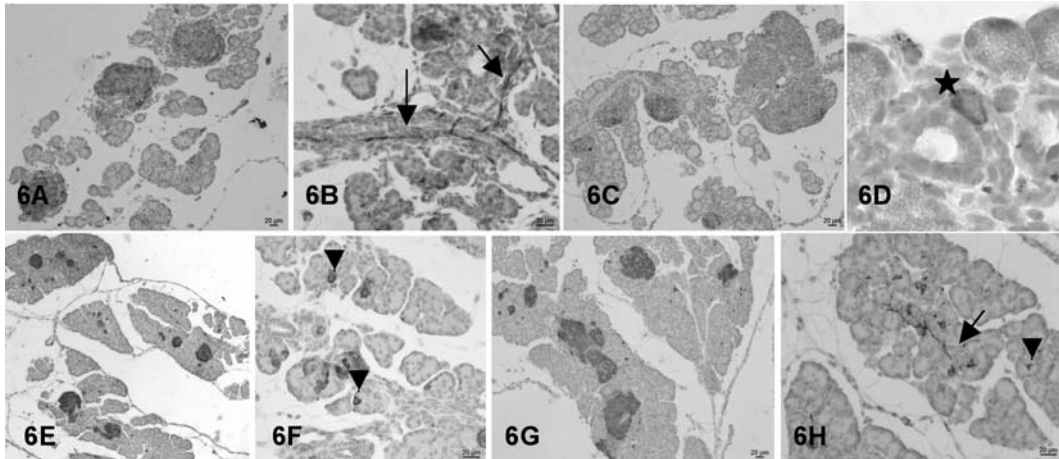
Şekil 3. (3A) 3günlük, (3C) 5 günlük, (3E) 7günlük ve (3G) 10 günlük sağlıklı kontrol gruplarına ait pankreas kesitlerinde adacıkların periferine yerleşmiş glukagon immün pozitif hücreler görülmekte. STZ uygulanan gruplarda sırası ile (3B) 3 günlük, (3D) 7 günlük, (3F) 7günlük ve (3H) 10 günlük gruplarda glukagon immün pozitif hücrelerin adacıkların merkezine doğru yerleşim gösterdikleri görüldü. Kanal epitel hücresi (↑) ve ekzokrin hücre (▲).Zıt boya: Hematoksilen. Bar: 20µm.



Şekil 4. 3 (4A), 5 (4B), 7 (4C) ve 10 (4D) günlük sağlıklı kontrol gruplarında adacık periferinde somatostatin immün pozitif hücreler görülmekte. Doğumun 2. günü STZ uygulanmış 3 (4E), 5 (4F), 7 (4G) ve 10 (4H) günlük gruplarda ise adacık içerisine dağılmış hipertrofik somatostatin immün pozitif hücreler görülmekte. (4G) STZ uygulanan 7 günlük grupta kanal epitelinde (↑) ve ekzokrin doku içerisinde (▲) immün pozitif hücreler görülmekte. Zıt boya: Hematoksilen. Bar: 20µm.

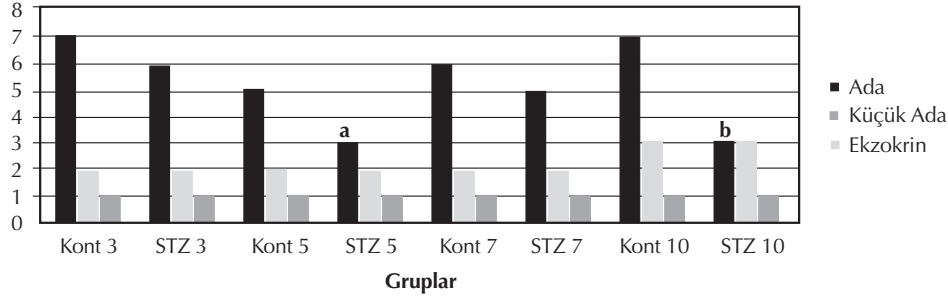


Şekil 5. 3 (5A), 5 (5C), 7 (5E) ve 10 (5G) günlük sağlıklı kontrol gruplarına ait pankreas doku kesitlerinde, adacıklarda pdx-1 immün pozitif nükleus içeren hücreler görülmekte. Doğumun 2.günü STZ uygulanan 3 (5B), 5 (5D), 7 (5F) ve 10 (H) günlük gruplarda adacıkların içerisinde kontrole göre daha az sayıda immün pozitif hücreler görülmekte. Kanal epitel hücresi (↑) ve ekzokrin hücre (▲). Zıt boya: Hematoksilen. Bar: 20µm.



Şekil 6. 3 (6A), 5 (6B), 7 (6C) ve 10 (6D) günlük sağlıklı kontrol gruplarına ait pankreas doku kesitlerinde adacıkların sinaptofisin immün pozitif hücreler ile dolu olduğu görülmekte. STZ uygulanan 3 (6E), 5 (6F), 7 (6G) ve 10 (6H) günlük gruplarda adacıkların dışında kanal epiteli çevresinde (*), ekzokrin doku içinde immün pozitif endokrin hücreler, hücre kümeleri (↑) ve sinir uzantıları (▲) görülmekte. Zıt boya: Hematoksilen. Bar: 20µm.

Somatostatin immün pozitif hücre say



Şekil 7. Tüm gruplara ait adacık, küçük adacık ve ekzokrin doku içerisindeki somatostatin immün pozitif hücre sayıları.

TARTIŞMA

Diyabette hasarlanan β hücrelerinin yeniden kazanılması üzerine çeşitli deneysel modeller ile çalışılmaktadır. Bu uygulamalardan birisi de yeni doğan streptozotosin (yd-STZ) diyabet modelidir. STZ ile uyarılan hasar sonrasında beta hücre rejenerasyonu ya adacık içindeki mevcut beta hücrelerinin replikasyonu ya da adacık dışı öncül hücreler yolu ile olabilir [5, 13, 27, 28].

Yd-STZ uygulamasında farklı yöntemler kullanılmaktadır. STZ uygulamasının; deney hayvanının türüne ve STZ'nin uygulama günlerine göre (doğdukları gün ile 5. günler arasında), ayrıca STZ dozunun farklılığına göre modelin diyabet oluşum şiddetini ve adacık rejenerasyonu üzerine farklı sonuçlar ortaya çıkardığı çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir [9, 13, 29]. Wang ve ark. [29] Wistar sıçanlara doğdukları gün (0.), 2. ve 5. gün 100 mg/kg dozunda STZ uygulaması yapmışlar, yd0'da STZ uygulanan sıçanların 2. gün % 90 beta hücre kaybı ile hiperglisemik olduklarını, 6. haftada kontrole yakın şekilde normoglisemik olduklarını belirlemişlerdir. Beta hücreleri doğumun ilk günü değil de 2. veya 5. günde harap edilirse beta hücre rejenerasyonunun hızla düştüğünü ve sıçanlarda 3. haftada glukoz intoleransı geliştiğini saptamışlardır. Doğumun ilk günü, 2. veya 5. günlerde STZ uygulaması yapılan gruplarda beta hücre hacminin (kapladıkları alan) aynı olmasına rağmen hücre sayısına bakıldığında yd2. ve yd5. gün STZ uygulanan grupların beta hücre sayıları yd0.gün diyabet yapılandırından daha az olduğunu saptamışlardır. Bunun sebebinin ise 2. ve 5. gün diyabet yapılan gruplarda beta hücrelerinin hipertrofik olmalarına bağlamışlardır. Ayrıca bu iki grupta bromodeoksiüridin işaretli beta hücre sayısının yd-0 grubundan anlamlı olarak düşük olduğunu saptamışlardır. Bu grupta 6. haftaya kadar beta hücre proliferasyonunun artış gösterdiği, 6. haftadan sonra beta hücrelerinin boyutça genişlediği fakat sayı artışının olmadığını gözlemişlerdir [29].

Bir başka çalışmada sağlıklı ve doğumun 12. saatinde STZ uygulanmış yenidoğan Wistar sıçanların, 20. güne kadar beta hücre hacmi, sayısı ve proliferasyon aktivitelerini ölçmüşler ve kontrol sıçanlarda ilk 5 güne kadar beta hücre hacminin 3 kat arttığı fakat total beta hücre hacminin 5. günden itibaren 20. güne kadar değişmeden kaldığını gözlemişlerdir. STZ uygulanan yeni doğanların beta hücre sayısının 2. gününde kontrole göre % 90 oranında azaldığını, 20. günde ise normal beta hücre hacminin % 39'unu geri kazanmış olduğunu saptamışlardır. Yd0-STZ grubunda, proliferasyon indeksini, adacık içi beta hücrelerinde normal sıçanlardan daha yüksek bulmuşlar (% 9), adacık dışı beta hücre indeksinde değişiklik gözlememişlerdir. STZ'nin adacık içi beta hücrelerinin replikasyonunu uyardığı sonucuna varmışlardır [13].

Bizim çalışmamızda, Wistar albino sıçanlara doğumun 2. günü 100mg/kg STZ uygulaması ile oluşturulan yd2-STZ diyabet modeli kullanıldı [5, 9]. Yd2-STZ diyabetik sıçanların doğumun 3., 5., 7. ve 10. günlerindeki adacık içinde immün reaksiyon veren beta hücrelerinin kapladığı alan kontrol grupları ile kıyaslanarak değerlendirildi. 3, 5 ve 7. günlerde adacık içindeki beta hücrelerinin kapladığı alan kontrollerine göre anlamlı olarak farklı bulundu. Yd2-STZ uygulanmış 10 günlük grupta ise kontrole göre anlamlı fark bulunmadı. STZ uygulamasının hemen ertesi günü adacık içindeki beta hücrelerinin üzerinde etkili olduğu (yd2-STZ 3 günlük; % 50, kontrol; % 71), en dramatik etkiyi ise doğumun 5. günü uygulamadan 3 gün sonra (yd2-STZ 5 günlük; % 19, kontrol; % 70) gösterdiği saptandı. 7. günden itibaren hızlı bir rejenerasyon sürecine girildi (yd2-STZ 7 günlük; % 39, kontrol; % 68) ve 10. günde beta hücrelerinin adacık içerisinde kapladıkları alanın kontrol grubu ile benzer oldukları (yd2-STZ 10 günlük; % 63, kontrol; % 69) gözlemlendi. Bu gruplarda (3, 5, 7 ve 10 günlük yd2-STZ grupları), adacıklarda insülin mRNA sinyali veren hücrelerin kapladığı alanlar değerlendirildiğinde, mRNA pozitif sinyal veren hücrelerin kapladığı

alanın, insülin proteini içeren hücrelerin kapladığı alandan daha az olduğu tespit edildi. STZ'nin proinsülin sentezini engelleyici etkisine [30, 31] bağlı olarak mRNA pozitif sinyal veren hücrelerin kapladığı alanın daha az olabileceği düşünüldü.

Çeşitli yd-STZ modelleri ile yapılan çalışmalarda adacıklardaki glukagon ve somatostatin hücrelerinin içeriği ile ilgili farklı görüşler bildirilmiştir. Bonner Weir ve ark.'ları [32] yd-2'de Sprague Dawley sıçanlara 90 mg/kg STZ uygulayarak yaptıkları çalışmada, glukagon ve somatostatin hücrelerinin STZ'den etkilenmediğini bildirmişlerdir. yd-2 STZ uygulanan sıçanların 4 günlük veya 6 haftalık iken pankreas dokuları incelendiğinde beta hücresi dışındaki adacık hücrelerinin hacimlerinin değişmediği ve kontrol grupları ile karşılaştırıldığında somatostatin ve glukagon içeriğinin farklılık göstermediğini ileri sürmüşlerdir. Bir başka çalışmada, yd-4 STZ (70mg/kg) uygulanan Wistar sıçanların STZ uygulamasından 2, 4, 8 ve 12 gün sonra pankreas dokuları incelendiğinde glukagon hücrelerinde hiperplazi olduğunu, somatostatin hücrelerinin adacık içerisinde kapladıkları alanın, STZ uygulamasından 8 ve 20 gün sonra kontrol gruplarına göre anlamlı farklılık gösterdiklerini bildirmişlerdir [26]. Li ve ark. [33], yd-1'de 85mg/kg STZ uygulanan sıçanlarda doğumun 4 ve 7. gününde yaptıkları incelemede somatostatin hücrelerinin replikasyonunun arttığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada adacık içerisindeki somatostatin ve glukagon hücrelerine bakıldığında ise, yd-2 STZ uygulanan 3, 5, 7 ve 10 günlük sıçanlarda glukagon hücrelerinin adacık içinde kapladığı alanın Tryssen ve ark. [26] yaptığı çalışmadaki gibi sağlıklı kontrollerine göre arttığı saptandı. STZ uygulanan 3, 5, 7 ve 10 günlük gruplarda somatostatin hücrelerinin sayısındaki artıştan dolayı değil hipertrofik oldukları için hacimlerinin arttığı gözlemlendi. Bunun da STZ etkisi ile somatostatin ekspresyonundaki artıştan kaynaklanabileceği düşünüldü. Yapılan literatür araştırmalarında, kullanılan

yd2-STZ diyabet modelinde doğumun 3, 5, 7 ve 10. günlerinde in situ hibridizasyon ve immünohistokimya yöntemleri kullanılarak insülin biyosentezini inceleyip rejenerasyon takibi yapan, glukagon ve somatostatin ekspresyonlarını inceleyip adacığın diğer hücreleri ile mevcut beta hücrelerini kıyaslayan bir çalışmaya rastlanmadı.

Bizim çalışmamızda bu konudaki ilk çalışmadır. Kemirgenlerde yapılan pankreas rejenerasyon modellerinde, erişkin pankreasında β hücre neogenezinin kanal epiteliinden başladığı gösterilmiştir [12, 34, 35]. İn vitro koşullarda da pankreas adacık hücrelerin farklılaşmasında pankreasın kanal hücrelerinin rol oynadığı bildirilmiştir [15, 36]. Ayrıca pankreas asiner hücrelerinin kanal hücrelerine değiştiği birçok insan ve kemirgen çalışmalarıyla ispatlanmıştır [1, 14]. Roman ve ark. [1], kültürde sıçan pankreas asiner hücrelerinin kanal hücrelerine farklılaşarak sitokeratin-7, sitokeratin-20 ve fetal karaciğer kinaz-1 eksprese ettiklerini göstermişlerdir. Hücresel dönüşüm tamamlandığında yeni

oluşan hücrelerin nörendokrin bir belirteç kabul edilen "protein gen ürünü 9.5" (PGP9.5)'u eksprese etmeye başladıklarını bildirmişlerdir. Asiner tümör hücre soyu AR42J'nin de insülin üreten hücrelere farklılaşabildikleri gösterilmiştir [37]. Ayrıca kanal bağlanması yapılan sıçanlarda ve interferon- γ transgenik farelerde insülin/amilaz ikili boyama ile immün pozitiflik veren hücrelerin varlığı bildirilmiştir [38]. Song ve ark. [14] erişkin Sprague-Dawley sıçanların pankreasından izole edilerek hazırlanan asiner hücre kültüründe bir hafta içinde çok sayıda asiner hücrenin amilaz ekspresyonunu kaybederek kanal hücre fenotipine dönüştükleri göstermişlerdir. Daha sonra kültürde insülin pozitif hücreler gözlenmiş, mevcut bulunan az sayıda insülin pozitif hücrenin sitokeratinleri de birlikte eksprese ettiği gösterilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak kanal hücrelerine değişim gösteren asiner hücrelerin ilerleyen dönemde insülin üreten hücrelere farklılaşabileceği sonucuna varılmıştır. Duitrillaux ve ark. [28] doğumun hemen sonrasında oluşturdukları Yd-STZ-diyabet modelinde, doğumu takip eden 4.günün sonrasında asiner parankima içinde ve kanal epitellerinde çok sayıda insülin pozitif hücrenin bulunuşu ile bir rejenerasyonun gerçekleştiğini ileri sürmüşlerdir. Movasat ve ark.'ları [39], yd0- STZ uygulanan sıçanlara 5 gün insülin tedavisi yaptıklarında tedavili ve tedavisiz yd0- STZ gruplarında yeni oluşan tek tek beta hücrelerinin ya da hücre kümelerinin kanal epitelleri ile ilişkili olduklarını gözlemişler ve bununda kanal epiteli içinde bulunduğu varsayılan öncül hücrelerin beta hücrelerine farklılaşması ile ilişkili olduğu sonucuna varmışlardır. Suzuki ve ark. [40], % 90 pankreatektomi uyguladıkları sıçanlarda 7 gün sonra, ekzokrin doku içerisinde bulunan sentroasiner hücreleri incelediklerinde, büyük sentroasiner hücrelerde insülin immünpozitif ve küçük sentroasiner hücrelerde glukagon immün pozitifliği veren tek tek hücreleri ya da hücre kümelerini saptamışlardır. Ayrıca büyük sentroasiner hücrelerin bazılarında insülin ve glukagon proteinlerinin birlikte eksprese edildiğini tespit etmişlerdir. Sentroasiner hücrelerin beta hücrelerine dönüştüğünü ileri sürmüşlerdir.

Bizim çalışmamızda, yd2-STZ uygulanan tüm gruplarda ekzokrin doku içerisinde tek tek ya da birkaç hücreden oluşan insülin ya da glukagon immün pozitif hücreler gözlemlendi. Ayrıca kanal epiteli içerisinde immün pozitif hücreler gözlenirken, pankreas kanalları çevresinde küçük adacıklara rastlandı. Bu çalışmada, ekzokrin doku ve kanal epitelleri içerisinde insülin mRNA sinyali taşıyan hücrelerinde tespit edilmesi, ekzokrin dokudaki asiner hücreleri ve kanal epiteli içerisindeki olası öncül hücrelerin beta hücresine dönüştüğünün bir bulgusu olarak kabul edildi.

Memelilerde glukoz homeostazı pankreasın beta hücrelerinden insülin salınımının doğru regülasyonu için gereklidir. Salınma için birinci sinyal, depolardaki insülin salınımını uyaran kan glukoz konsantrasyonundaki yükseliştir. Glukoz, ayrıca preproinsülin transkripsiyonunu ve translasyonunu ayrıca mRNA stabilitesini düzenler [41-43].

İnsülin sentez ve salınımına katılan bir diğer önemli noktada insülin gen ekspresyonunu kontrol eden transkripsiyon faktörleridir [44, 45]. Preproinsülin geninin 5' ucu üzerine birçok çalışma yapılmış ve bu bölgede önemli düzenleyici elementler ayrımlanmıştır. Bunlardan biri de homeodomain transkripsiyon faktörlerinden pankreatik duodenal homeoboxgen-1 (pdx-1)'dir [44]. Pdx-1, endokrin pankreas gelişiminde hücre soylarının ayrımlanmasında önemli rol oynamaktadır. Doğum sonrası (postnatal) dönemde sıçanlarda özellikle β hücrelerinde eksprese edilen pdx-1'in olgun β hücrelerinin fonksiyonları için gereklidir [45, 46]. Düşük protein diyetiyle beslenen sıçanlarda dolaşımdaki glukozun seviyesinin düşmesine ve dolayısı ile pdx-1 ekspresyonunda azalmaya neden olabileceği bildirilmiştir [47]. Pdx-1, düşük glukoz koşullarında nukleus periferinde bulunur. β hücreleri glukozla ya da insülin ile uyarıldığında pdx-1 sitoplazmadan nukleusa geçer ve somatostatin, glukokinaz, glut-2 ve insülin genlerini aktifleyici yönde düzenler [43, 48, 49].

Pdx-1 embriyonik dönemde, embriyonik pankreas kanallarında eksprese edilir fakat doğumdan sonra ekspresyonu baskılanır [50, 51]. Pdx-1 eksprese eden kanal hücrelerinin pluripotent özelliklerini geçici olarak tekrar kazanmış, erişkin pankreastaki gerçek öncü hücreler oldukları ileri sürülmektedir [1, 52].

Bizim çalışmamızda, yd2-STZ uygulanan 10 günlük grupta adacık içerisinde immün pozitif pdx-1 nukleusu içeren hücre sayısında artış gözlemlendi. Ayrıca yd2-STZ 5, 7 ve 10 günlük gruplarda ekzokrin doku içerisinde pdx-1 pozitif hücre sayısında kontrollerine kıyasla bir artış gözlemlendi. Ekzokrin dokuda tek tek ya da hücre kümeleri şeklinde gözlenen pdx-1 immün pozitif hücre nukleusları, insülin immünohistokimya ve in situ hibridizasyon sonuçlarını destekler nitelikte idi. Bu bulgular olası öncül hücrelerin endokrin hücrelere özellikle β hücrelerine dönüşümün başladığının göstergesi olarak kabul edildi. Bu çalışma, yd2-STZ modelinde, pdx-1 ekspresyonunun beta hücre rejenerasyonunda rolünü, insülinin biyosentezinin in situ hibridizasyon ve immünohistokimya yöntemleri kullanılarak karşılaştırmalı olarak inceleyen ilk çalışma olma niteliğindedir.

Tüm gruplarda endokrin hücre belirteci olan sinaptofisinin immün pozitifliği incelendiğinde, adacıkların tamamının sinaptofisin ile immün pozitif boyandığı gözlemlendi. STZ uygulanan gruplarda ekzokrin doku ve kanal hücreleri içerisinde sinaptofisin immün pozitif hücre ve hücre kümelerine rastlanması, ekzokrin doku içinde ya da kanal epiteli içinde saptanan insülin, glukagon, somatostatin ve pdx-1 immün pozitif hücre bulgularımızı destekler niteliktedir. Asiner ya da kanal hücre fenotipine sahip hücrelerin endokrin hücre karakterine dönüşebileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak yd2-STZ diyabet modelinde, STZ uygula-

nan gruplarda kontrollerine göre adacıkların küçüldüğü tespit edildi. STZ'nin etkisi ile adacık hücre düzenin 3. günden itibaren bozulduğu, STZ'nin adacıklar üzerine toksik etkisinin en fazla doğumun 5. gününde ortaya çıktığı, 5. günden başlayarak, 10. güne kadar hızlı bir rejenerasyon sürecinin yaşandığı ve 10.günde kontrole yakın bir görünümün ortaya çıktığı gözlemlendi. İnsülin, glukagon, somatostatin, pdx-1 ve sinaptofisin antikorları kullanılarak elde edilen immünohistokimya sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, ekzokrin dokuya ait asiner ve kanal epitel hücrelerinin farklılaşarak pankreatik endokrin hücre özelliği kazandıkları tespit edildi. Ayrıca pdx-1 ve sinaptofisin antikorlarının birlikte kullanımının olası öncül hücrelerden beta hücre farklılaşmasını tespit etmek açısından iyi birer belirteç olacakları sonucuna varıldı.

TEŞEKKÜR

Çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesindeki yardımlarından dolayı Dr. Penbe ÇAĞATAY'a teşekkür ederiz.

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından T-215/06032003 nolu proje olarak desteklemiştir.

KAYNAKLAR

1. Rooman I, Heremans Y, Heimberg H, et al. Modulation of rat pancreatic acinoductal transdifferentiation and expression of PDX-1 in vitro. *Diabetologia* 2000; 43:907-914.
2. Gomez-Dumm CL, Semino MC, Gagliardino JJ. Quantitative morphological changes in endocrine pancreas of rats with spontaneous diabetes mellitus. *Virchows Archiv B Cell Pathol* 1989; 57:375-381.
3. Waguri M Yamamoto K, Miyagawa J, et al. Demonstration of two different processes of β cell regeneration in a new diabetic mouse model induced by selective perfusion of alloxan. *Diabetes* 1997; 46: 1281-1290.
4. Ferrand N, Astesana A, Phan HH, et al. Dynamics of pancreatic cell growth and differentiation during diabetes reversion in STZ treated newborn rats. *Am J Physiol* 1995; 269 (Cell Physiol 38): 1250-1264.
5. Portha B, Blondel O, Serradas P, et al. The rat models of non-insulin dependent diabetes induced by neonatal streptozotocin. *Diabetes Metabolisme*. 1989;15:61-75.
6. Movassat J, Saulnier C, Portha B. Insülin administration enhances growth of the B cell mass in streptozotocin-treated newborn rats *Diabetes* 1997;46: 1445-1452.
7. Oztürk M, Bolkent S, Kaya Dagistanli F, et al. Effects of 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside on pancreas in neonatal streptozotocin diabetic rats. *Acta Diabetol* 2006; 43:61-65.

8. Oztürk M, Tunçdemir M, Bolkent S, et al. Effect of AICA-riboside treatment on aortic alteration in neonatal STZ-induced diabetic rat. In: *Angiogenesis, Models, Modulators and Clinical Applications*. Plenum Press, New York and London. 1998: pp541-542.
9. Kaya F. Yenidoğan streptozotocin diabetik sıçanlarda somatostatin analogu ve kalsiyum kanal blokerinin apoptoz üzerine etkileri. İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı. Bitmiş Yüksek Lisans Tezi; 1998.
10. Risbud MV, Bhonde RR. Models of pancreatic regeneration in diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2002; 58: 155-165.
11. Bonner-Weir S, Trent DF, Weir GC. Partial pancreatectomy in the rat and subsequent defect in glucose-induced insulin release. *J Clin Invest* 1983; 71: 1544-1553.
12. Wang RN, Kloppel G, Bouwens L. Duct- to islet-cell differentiation and islet growth in the pancreas of duct-ligated adult rats. *Diabetologia* 1995; 38:1405-1411.
13. Wang RN, Bouwens L, Kloppel G. Beta-cell proliferation in normal and streptozotocin-treated newborn rats: site, dynamics and capacity. *Diabetologia* 1994; 37:1088-1096.
14. Song KH, Ko SH, Ahn YB, et al. In vitro transdifferentiation of adult pancreatic acinar cells into insulin-expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 316:1094-1100.
15. Bouwens L, Wang RN, De Blay E, et al. Cytokeratins as markers of ductal cell differentiation and islet neogenesis in the neonatal rat pancreas. *Diabetes* 1994; 43: 1279-1283.
16. Bouwens L. Transdifferentiation versus stem cell hypothesis for the regeneration of islet beta-cells in the pancreas. *Microsc Res Tech* 1998; 43:332-336.
17. Zangen DH, Bonner Weir S, Lee CH, et al. Reduced insulin, GLUT2, and IDX-1 in beta cells after partial pancreatectomy. *Diabetes* 1997; 46:258-264.
18. Petropavlovskaja M, Rosenberg L. Identification and characterization of small cells in the adult pancreas: potential progenitor cells? *Cell Tissue Res* 2002; 310: 51-58.
19. McKinnon CM, Docherty K. Pancreatic duodenal homeobox-1, PDX-1, a major regulator of beta cell identity and function. *Diabetologia* 2001; 44: 1203-1214.
20. Fernandes A, King LC, Guz Y, et al. Teitelman G. Differentiation of new insulin-producing cells is induced by injury in adult pancreatic islets. *Endocrinology* 1997; 138: 1750-1762.
21. Wiedenmann B, Franke WW, Kuhn C, et al. Synaptophysin: a marker protein for neuroendocrine cells and neoplasms. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986, 83(10): 3500-3504.
22. Lukinius A, Stridsberg M, Wilander E. Cellular expression and specific intragranular localization of chromogranin A, chromogranin B, and synaptophysin during ontogeny of pancreatic islet cells: an ultrastructural study. *Pancreas* 2003; 27:38-46.
23. Tezel GG, Tezel E. Nöroendokrin-dışı tümörlerde nöroendokrin diferansiyasyon ve nöroendokrin diferansiyasyonun moleküler biyolojisi. Erişim: 26.03.06 http://www.medinfo.hacettepe.edu.tr/tebad/dergi/doc/2005_1/19-27.doc
24. Wali RK, Dudeja PK, Bolt MJG, et al. Correction of abnormal small intestinal cytosolic protein kinase C activity in streptozotocin-induced diabetes by insulin therapy. *Biochem J* 1990; 272: 653-658.
25. Bolkent S, Yilmazer S, Oztürk M. Combined non-radioactive detection of peptide hormones and their mRNAs in stomach somatostatin cells. *Regul Pept* 1995; 22: 17-21.
26. Thyssen S, Arany E, Hill DJ. Ontogeny of regeneration of beta-cells in the neonatal rat after treatment with streptozotocin. *Endocrinology* 2006; 147: 2346-2345.
27. Cantenys D, Portha B, Dutrillaux MC, et al. Histogenesis of the endocrine pancreas in newborn rats after destruction by streptozotocin. An immunocytochemical study. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1981; 35: 109-122.
28. Dutriloux MC, Portha B, Roze C, et al. Ultrastructural study of pancreatic β - cell regeneration in the newborn rats after destruction by streptozotocin. *Virchows Archiv (Cell Pathol)* 1982; 39: 173-185.
29. Wang RN, Bouwens L, Kloppel G. Beta-cell growth in adolescent and adult rats treated with streptozotocin during the neonatal period. *Diabetologia*.1996; 39: 548-547.
30. Jain K, Logothetopoulos J. Proinsulin biosynthesis by pancreatic islets of the rat and the study of alloxan cytotoxicity in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1976; 435: 145-151.
31. Maldonado A, Trueheart PA, Renold AE, et al. Effects of streptozotocin in vitro on proinsulin biosynthesis, insulin release and ATP content of isolated rat islets of Langerhans. *Diabetologia* 1976; 12: 471-481.
32. Bonner-Weir S, Trent DF, Honey RN, et al. Responses of neonatal rat islets to streptozotocin: limited B-cell regeneration and hyperglycemia. *Diabetes* 1981; 30: 64-69.
33. Li L, Yi Z, Seno M, et al. Activin A and betacellulin: effect on regeneration of pancreatic beta-cells in neonatal streptozotocin-treated rats. *Diabetes* 2004;53: 608-615.
34. Rosenberg L. In vivo cell transformation: neogenesis of beta cells from pancreatic ductal cells. *Cell Transplant* 1995; 4: 371-383.
35. Rosenberg L, Brown RA, Duguid WP. A new approach to the induction of duct epithelial hyperplasia and

- nesidioblastosis by cellophane wrapping of the hamster pancreas. *J Surg Res* 1983; 35: 63-72.
36. Cornelius JG, Tchernev V, Kao KJ, et al. In vitro-generation of islets in long-term cultures of pluripotent stem cells from adult mouse pancreas. *Horm Metab Res* 1997; 29: 271-277.
 37. Mashima H, Ohnishi H, Wakabayashi K, et al. Beta-cellulin and activin A coordinately convert amylase-secreting pancreatic AR42J cells into insulin-secreting cells. *J Clin Invest* 1996; 97: 1647-1654.
 38. Gu D, Arnush M, Sarvetnick N. Endocrine/exocrine intermediate cells in streptozotocin -treated Ins-IFN-gamma transgenic mice. *Pancreas* 1997; 15: 246-250.
 39. Movassat J, Saulnier C, Portha B. Insulin administration enhances growth of the beta-cell mass in streptozotocin-treated newborn rats. *Diabetes* 1997; 46: 1445-1452.
 40. Suzuki T, Kadoya Y, Sato Y, et al. The expression of pancreatic endocrine markers in centroacinar cells of the normal and regenerating rat pancreas: their possible transformation to endocrine cells. *Arch Histol Cytol.* 2003; 66: 347-358.
 41. Permutt MA, Kipnis DM. Insulin biosynthesis. I. On the mechanism of glucose stimulation. *J Biol Chem* 1972; 247: 1194-1199.
 42. Ashcroft SJ, Bunce J, Lowry M, et al. The effect of sugars on (pro)insulin biosynthesis. *Biochem J* 1978; 174: 517-526.
 43. German M, Ashcroft S, Docherty K, et al. The insulin gene promoter. A simplified nomenclature. *Diabetes* 1995; 44: 1002-1004.
 44. Ahlgren U, Jonsson J, Edlund H. The morphogenesis of the pancreatic mesenchyme is uncoupled from that of the pancreatic epithelium in IPF1/PDX1-deficient mice. *Development* 1996; 122: 1409-1416.
 45. Ahlgren U, Jonsson J, Jonsson L, et al. Beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ipfl/Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes Dev* 1998; 15:1763-1768.
 46. Stoffers DA, Zinkin NT, Stanojevic V, et al. Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nat Genet* 1997; 15: 106-110.
 47. Arantes VC, Teixeira VP, Reis MA, et al. Expression of PDX-1 is reduced in pancreatic islets from pups of rat dams fed a low protein diet during gestation and lactation. *J Nutr* 2002; 132: 3030-3035.
 48. Elrick LJ, Docherty K. Phosphorylation-dependent nucleocytoplasmic shuttling of pancreatic duodenal homeobox-1. *Diabetes* 2001; 50: 2244-2252.
 49. Wang Y, Egan JM, Raygada M, et al. Glucagon-like peptide-1 affects gene transcription and messenger ribonucleic acid stability of components of the insulin secretory system in RIN 1046-38 cells. *Endocrinology* 1995; 136: 4910-4917.
 50. Melloul D. Transcription factors in islet development and physiology: role of PDX-1 in beta-cell function. *Ann NY Acad Sci* 2004; 1014: 28-37.
 51. Hui H, Perfetti R. Pancreas duodenum homeobox-1 regulates pancreas development during embryogenesis and islet cell function in adulthood. *Eur J Endocrinol* 2002; 146: 129-141.
 52. Bonner-Weir S. Perspective: Postnatal pancreatic beta cell growth. *Endocrinology* 2000; 141: 1926-1929.