



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**KARAYEMİŞ, LİPOİK ASİT VE RUTİN
FLAVONOİDLERİNİN METFORMİN VERİLEN
DİYABETİK RATLARDA ETKİSİ**

Yeliz KAYA KARTAL

**VETERİNERLİK BİYOKİMYASI ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Tevhide SEL**

**ANKARA
2023**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KARAYEMİŞ, LİPOİK ASİT VE RUTİN
FLAVONOİDLERİNİN METFORMİN VERİLEN
DİYABETİK RATLARDA ETKİSİ**

Yeliz KAYA KARTAL

**VETERİNERLİK BİYOKİMYASI ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Tevhide SEL

**Bu tez çalışması Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
21L0239018 proje numaralı “Lisansüstü Tez Projesi (Doktora)” ve Türkiye Sağlık
Enstitüleri Başkanlığı'nın 16614 proje numaralı “A Grubu Acil AR-GE proje çağrısı”
ile desteklenmiştir.**

ANKARA

2023

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Karayemiş, Lipoik Asit ve Rutin Flavonoidlerinin Metformin Verilen Diyabetik Ratlarda Etkisi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan hazırlanmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Yeliz KAYA KARTAL

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veterinerlik Biyokimyası Anabilim Dalında Yeliz KAYA KARTAL tarafından hazırlanan “Karayemiş, Lipoik Asit ve Rutin Flavonoidlerinin Metformin Verilen Diyabetik Ratlarda Etkisi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 16.01.2023

İmza

Prof. Dr. Tevhide SEL
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza

Prof. Dr. Aymelek GÖNENÇ
Gazi Üniversitesi
Üye

İmza

Prof. Dr. Görkem KISMALI
Ankara Üniversitesi
Üye

İmza

Doç. Dr. Güzin ÖZKURT
Aksaray Üniversitesi
Üye

İmza

Doç. Dr. Mert PEKCAN
Ankara Üniversitesi
Raportör

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Sağlık Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tarafından onaylanmıştır.

İmza

Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller	xv
Çizelgeler	xvii
1. GİRİŞ	1
1.1. Glikoz, Taşınması ve Metabolizması	2
1.2. Pankreas	3
1.2.1. İnsulin	5
1.3. Diyabetes Mellitus	6
1.3.1. Tip 1 Diyabet	7
1.3.2. Tip 2 Diyabet	9
1.3.2.1. İnsulin Direnci	10
1.3.3. Gestasyonel Diyabetes Mellitus (GDM)	10
1.3.4. Diyabetes İnsipidus	11
1.4. Diyabetik Komplikasyonlar	12
1.4.1. Akut Diyabetik Komplikasyonlar	12
1.4.2. Kronik Diyabetik Komplikasyonlar	14
1.4.2.1. Diyabetik Ayak Sendromu	14
1.4.2.2. Diyabetik Retinopati	15
1.4.2.3. Diyabetik Nefropati (DN)	16
1.4.2.4. Diyabetik Kardiyomiyopati	17
1.5. Diyabette Alternatif Yolaklar ve Oksidatif Stres	18
1.5.1. Polyol Yolağı	19
1.5.2. İleri Glikasyon Ürünleri (AGE)	19
1.5.3. Glikozun Oto Oksidasyonu	20
1.5.4. Protein Kinaz C Aktivitesi (PKC)	21
1.5.5. Heksozamin Yolu	21
1.5.6. Sitokinlerin Rolü	22
1.5.7. Oksidatif Stres	23
1.6. Antioksidan Mekanizma	25
1.6.1. Doğal Ürünler ve Fenolik Bileşikler	27
1.6.1.1. Karayemiş (<i>Laurocerasus officinalis</i>)	30
1.6.1.2. Rutin flavonoidi	31
1.6.1.2. Alfa Lipoik Asit	33
1.7. Metformin	34
1.8. Amaç	35
2. GEREÇ VE YÖNTEM	37
2.1. Gereç	37

2.1.1. Kimyasal Malzemeler	37
2.1.2. Sarf Malzemeler	39
2.1.3. Kullanılan cihazlar	40
2.1.4. Karayemiş'in temini	41
2.1.5. Deney Hayvanlarının Bakım ve Beslenme Koşulları	41
2.2. Yöntem	42
2.2.1. Karayemiş'in Ekstraksiyonu	42
2.2.2. Total Fenolik Madde Tayini	43
2.2.2.1. Folin Ciocalteu Ayırıcının Hazırlanması	44
2.2.3. Karayemiş ve Doku Örneklerinin Total Antioksidan Kapasitesinin Ölçülmesi	45
2.2.4. Deney Gruplarının Oluşturulması	46
2.2.4.1. Metformin Uygulaması	48
2.2.4.2. Karayemiş Uygulaması	48
2.2.4.3. Alfa lipoik asit Uygulaması	48
2.2.4.4. Rutin flavonoidi Uygulaması	49
2.2.5. Canlı ağırlık ve Açlık Kan Glukoz Ölçümü	49
2.2.6. Oral Glikoz Tolerans Testi	49
2.2.7. Deneyin Sonlandırılması	50
2.2.8. Serum Biyokimya ve Lipit Analizi	51
2.2.9. HbA1c ve Fruktozamin Analizi	52
2.2.10. Antioksidan Analizler	52
2.2.10.1. Paraoksonaz Analizi	52
2.2.10.2. Seruloplazmin Analizi	53
2.2.10.3. Glutatyon Peroksidaz Aktivite Tayini	54
2.2.10.4. Süperoksit Dismutaz Analizi	54
2.2.11. Rat İnsulin Analizi	55
2.2.12. Dokuların Homojenizasyonu	56
2.2.13. Rat Aldoz Redüktaz Tayini	57
2.2.14. Dokuların ve Plazma Örneklerinin Total Oksidan Kapasitesinin Ölçülmesi	57
2.2.15. Dokuların Histopatolojik incelemesi	58
2.2.16. Nitrik Oksit Analizinin Yapılması	59
2.2.17. İdrar Analizi	59
2.2.18. Oksidatif Stres İndeksinin (OSİ) Hesaplanması	60
2.2.19. İstatistiksel Analiz	60
3. BULGULAR	61
3.1. Karayemiş'in fenolik madde içeriği ve total antioksidan kapasitesi	61
3.2. Canlı Ağırlık Ölçümü	61
3.3. Açlık Kan Glikoz Ölçümü	64
3.4. Oral Glikoz Tolerans Testi	66
3.5. Serum Biyokimya Analizi	67
3.6. Lipit Profili	71
3.7. Antioksidan Analizler	73
3.7.1. Paraoksonaz Analizi	73
3.7.2. Seruloplazmin Analizi	73
3.7.3. Glutatyon Peroksidaz Analizi	74

3.7.4. Süperoksit Dismutaz Analizi	74
3.8. HbA1c ve Fruktozamin Analizi	75
3.9. Rat İnsulin Analizi	76
3.10. Total Antioksidan Kapasitesi	77
3.10.1. Serum Total Antioksidan Kapasitesi	77
3.10.2. Göz dokusu Total Antioksidan Kapasitesi	78
3.10.3. Beyin dokusu Total Antioksidan Kapasitesi	78
3.10.4. Böbrek dokusu Total Antioksidan Kapasitesi	78
3.11. Total Oksidan Kapasitesi	79
3.11.1. Serum Total Oksidan Kapasitesi	79
3.11.2. Göz dokusu Total Oksidan Kapasitesi	80
3.11.3. Beyin dokusu Total Oksidan Kapasitesi	80
3.11.4. Böbrek dokusu Total Oksidan Kapasitesi	80
3.12. Oksidatif Stres İndeksi	81
3.12.1. Serum Oksidatif Stres İndeksi	81
3.12.2. Böbrek Oksidatif Stres İndeksi	82
3.12.3. Göz Oksidatif Stres İndeksi	82
3.12.4. Beyin Oksidatif Stres İndeksi	82
3.13. Nitrik Oksit Analizi	83
3.13.1. Plazma Nitrik Oksit Analizi	83
3.13.2. Beyin Nitrik Oksit Analizi	84
3.13.3. Böbrek Nitrik Oksit Analizi	84
3.14. Rat Aldoza Redüktaz Analizi	84
3.14.1. Göz dokusu Aldoza Redüktaz Analizi	85
3.14.2. Plazma Aldoza Redüktaz Analizi	85
3.15. Pankreasın Histopatolojik bulguları	86
3.16. İdrar Analizi	88
4. TARTIŞMA	90
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	102
ÖZET	105
SUMMARY	106
KAYNAKLAR	107
EKLER	120
Ek-1 Etik Kurul Kararı	120
ÖZGEÇMİŞ	122

ÖNSÖZ

Diyetin genel sağlık üzerindeki etkisi oldukça büyük olup bu gerçek son yıllarda daha çok anlaşılmıştır. Birçok kronik hastalığın gelişimi ve bu hastalıklardan ölümlerinin %80'e kadarı diyetle ilişkilendirilmektedir. Diyete doğal veya sentetik maddelerin eklenmesi ve diyet değişikliği ile birçok hastalığın önlenmesi önemli bir konu haline gelmiştir. Diyetle alınan flavonoidlerin de hücrelerin apoptozisinde, farklılaşmasında ve çoğalmasında hastalık önleyici ajan olarak önemli etkileri vardır. Flavonoidlerin antioksidan ve serbest radikal süpürücü aktiviteleri ve ayrıca antiinflamatuvar, antiviral ve özellikle de antikanser özelliklerinin olması ve çeşitli hücresel hedeflerle etkileşimde bulunarak insan sağlığını olumlu yönde etkilemesi bu konuya ilişkin önemi daha da arttırmaktadır. Doğal ürünlerin hastalık riskini azaltma ya da yaşam kalitesini artırma yetenekleri olmasına rağmen düzenli tıbbi bakımın yerini tutmaz. Alternatif ve tamamlayıcı ilaçların öneminin kabul edilmesiyle, gelecekteki tıbbi uygulamalarda geleneksel ve modern tıbbın entegrasyon potansiyeli artmaktadır. Geleneksel tıbbın etnomedikal değerleri, son teknoloji biyomedikal araştırmalarla moleküler düzeyde değerlendirilmelidir. Doğal ürünlerin bilimsel bilgi olmadan kullanımlarında kişi risk altında olabilir- örneğin etkileşime girdiği başka bir tedaviyi kullanmanın ciddi etkileri olabilir. Tez çalışmasında kullanılacak olan oldukça yüksek Antosiyanin içeriğine sahip olan Karayemiş meyvesi yanında a-lipoik asit ve Rutin flavonoidlerinin kan şeker düzeylerinin regülasyonu üzerindeki etki bilinmektedir. Aynı şekilde metforminde kan şeker düzeyini regüle etmek için kullanılan bir ilaçtır. Doğal ürünleri deneysel diyabette kan şeker düzeyine etkileri ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışma da ise Karayemiş meyvesi, a-lipoik asit ve Rutin flavonoidleri ile metforminin Tip2 diyabet oluşturulan ratlarda birlikte kullanımının kan ve dokudaki biyokimyasal değerlere etkisi araştırılacaktır.

Çalışma sırasında kullanılan Sarf ve Kimyasal Malzemeler "Karayemiş, lipoik asit ve rutin flavonoidlerinin metformin verilen diyabetik ratlarda etkisi" başlığı

altında Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinatörlüğünün desteklediği 21L0239018 no'lu doktora tez projesinden ve aynı başlıklı Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı tarafından A grubu Acil AR-GE proje çağrısı 16614 no'lu projeden karşılanmıştır.

Tezimin her aşamasında yanımda olan ve gece gündüz desteğini esirgemeyen doktora eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle bana rehberlik eden değerli danışman hocam Prof. Dr. Tevhide SEL olmak üzere tez izleme komitesinde yer alan sayın Prof. Dr. Aymelek GÖNENÇ ve sayın Prof. Dr. Görkem KISMALI hocalarıma çok teşekkür ediyorum. Jüri üyeleri sayın Doç. Dr. Güzin ÖZKÜRT ve Doç. Dr. Mert PEKCAN hocalarıma katkıları ve tavsiyeleri için teşekkürlerimi en içten şekilde sunarım. Ayrıca Biyokimya Anabilim Dalı'nda tüm hocalarıma desteklerinden dolayı teşekkürlerimi iletiyorum.

Tüm doktora sürecinde yanımda olan anneme, babama, ablama ve arkadaşlarıma ve yine tez aşamasında desteğini benden hiç esirgemeyen sevgili eşime teşekkürü borç bilirim. Biyokimya Laboratuvarında bana yardımcı olan sevgili doktora öğrencilerine yine çok teşekkür ederim. Ayrıca tez yazımı ve istatistiksel analiz sırasında sürekli bana yardımcı olan ve desteğini hep üzerimde hissettiğim dostum Dr. Sinem PEHLİVAN'a sonsuz teşekkürler.

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	yüzde
µg	mikrogram
µM	mikromolar
µmol	mikromol
ABTS	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
ADA	Amerikan Diyabet Örgütü
ADH	Antidiüretik Hormon
ADP	Adenozin difosfat
AGE	İleri glikasyon ürünleri
ALP	Alkalen fosfataz
ALT	Alanin Aminotransferaz
AMP	Adenozin monofosfat
AR	Aldoz Redüktaz
AST	Aspartat Aminotransferaz
ATP	Adenozin Trifosfat
BB	Bio Breeding
BUN	kan üre azotu
C	Karbon
°C	Santigrat derece
C ₆ H ₈ O ₇ x H ₂ O	sitrik asit
Ca	Kalsiyum
CAT	Katalaz
CD	Yüzey Farklılaşma Antijenleri

CDİ	Santral Diyabetes İnsipidus
c-JNK	c-Jun-N terminal kinaz
CP	Seruloplazmin
CuCl	bakırklorür
DAG	Diaçilgliserol
DHLA	Dihidroksilipoik asit
dk	dakika
dL	desilitre
DM	Diyabetes Mellitus
DMSO	dimetilsülfoksit
DN	Diyabetik Nefropati
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DR	Diyabetik Retinopati
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
ELİSA	enzim işaretli immunosorbent assay
FAD	Flavin Adenin Dinükleotid
Fe	Demir
FTS	fizyolojik tuzlu su
g	gram
GAD65	Glutamik Asit Dehidrojenaz
GAPDH	Gliseraldehit -3-fosfat dehidrojenaz
GDM	Gestasyonel Diyabetes Mellitus
GFR	Glomerüler Filtrasyon Hızı
GGT	gamma glutamil transferaz
GLUT	Kolaylaştırıcı Glukoz Taşıyıcıları
GPx	Glutasyon Peroksidaz

GR	Glutasyon Redüktaz
GST	Glutasyon S transferaz
H	Hidrojen
H&E	Hematoksilen & Eosin
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
H ₃ PO ₄	Fosforik asit
HbA1c	Glikolize Hemoglobin A1c
HCl	Hidroklorik asit
HDL	Yüksek dansiteli lipoprotein
HLA	İnsan Lökosit Antijeni
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografi
IFN	İnterferon
IL	İnterlökin
i.p.	intraperitoneal
İddm1	İnsulin Dependent Diabetes Mellitus
İR	İnsulin Resptörü
İRS	İnsulin Reseptör Substrat
K	Potasyum
KCl	potasyum klorür
kg	kilogram
KY	karayemiş
L	litre
LA	lipoik asit
LADA	Latent Autoimmune Diabetes in Adults
LDL	Düşük dansiteli lipoprotein,
Li ₂ SO ₄	lityum sülfat

LPO	Lipit Peroksidasyon
MAPK	Mitojen aktive edilmiş protein kinaz
MDA	Malondialdehit
Met	metformin
Mg	Magnezyum
mg	miligram
MHC	Major Histocompatibility Complex
mL	mililitre
mmol	milimol
mOsm	miliosmolar
MTT	3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NA	Nikotinamid
Na	Sodyum
Na ₂ CO ₃	sodyum karbonat
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	sodyum molibdat dihidrat
Na ₂ WO ₄ x 2H ₂ O	sodyum tungstat dihidrat
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NaOH	sodyum hidroksit
NBT	nitroblue tetrazolyum
NDİ	Nefrojenik Diyabetes İnsipidus
Nf-kB	Nükleer Faktör kappa B
ng	nanogram
NIDDK	Ulusal Diyabet ve Sindirim ve Böbrek Hastalıkları Enstitüsü
nm	nanometre
NO	Nitrik Oksit

NOS	Nitrik Oksit Sentaz
O	Oksijen
O.D.	optik dansite
O ₂ ⁻	Süperoksit radikalleri
O-GlcNAc	O-N-asetilglukozamin
OGTT	Oral Glikoz Tolerans Testi
OH•	Hidroksil radikalleri
Ort	ortalama
OSİ	oksidatif stres indeksi
P	Fosfor
PBS	Fosfat Tampon solüsyonu
PKC	Protein Kinaz C
PON	Paraoksonaz
PP	Polipeptid
R	Rutin
RAW 264.7	Fare Monositik makrofaj lösemi hücreleri
RNS	Reaktif nitrojen türleri
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
rpm	bir dakika içerisinde gerçekleştirilen dönüş
SAPK	stresle aktive olan kinaz
SGLT	Sodyum Glukoz Ko-transporter
sn	saniye
SOD	Süperoksit Dismutaz
Std	Standart
Std	Standart
STZ	Streptozotosin

T.P.	Total Protein
T1DM	Tip 1 Diyabetes Mellitus
T2DM	Tip 2 Diyabetes Mellitus
TAS	total antioksidan kapasite
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tümör Nekroz Faktör
TOS	total oksidan kapasite
UDP	Uridin difosfat
UV	Ultra Viyole
V	hacim
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörleri
VLDL	çok düşük dansiteli lipoprotein
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Sağlıklı pankreasın histolojik görüntüsü	4
Şekil 1.2. İnsulinin moleküler yapısı	6
Şekil 1.3. Fenol ve basit yapılı fenolik bileşikler	28
Şekil 1.4. Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması	28
Şekil 1.5. Meyve ve sebzelerde yer alan önemli fenolik maddeler	29
Şekil 1.6. Karayemiş meyvesi	31
Şekil 1.7. Rutin ve hidroliz ürünü olan kuersetinin yapısı	32
Şekil 1.8. Alfa Lipoik Asitin yapısı	34
Şekil 1.9. Metformin HCl'in yapısı	35
Şekil 2.1. Karayemiş ağacı ve meyveli dalının görünümü	41
Şekil 2.2. Ekstrakte edilmiş karayemiş	42
Şekil 2.3. Gallik Asit Standart Eğrisi	43
Şekil 2.4. Fenolik madde tayininde inkubasyon sonrası gözlenen renk değişimi	44
Şekil 2.5. Deney gruplarının bulunduğu kafesler	46
Şekil 2.6. Sakrifikasyon sonrası doku alımı için ratların açılmasına ait görüntü	50
Şekil 2.7. Kullanılan hayvan materyalleri ve yapılan analizleri gösteren şema	51
Şekil 2.8. İnsuline ait Standart Eğrisi	56

Şekil 2.9. Rat Aldoz Redüktaz Standart Eğrisi	57
Şekil 3.1. Deney gruplarının haftalık ağırlık değişimleri	62
Şekil 3.2. Deney gruplarına ait canlı ağırlık karşılaştırması	64
Şekil 3.3. Deney gruplarına ait kan şeker düzeyi karşılaştırması	65
Şekil 3.4. Deney gruplarının haftalık kan şeker düzeyi değişimleri	65
Şekil.3.5. Oral Glikoz Tolerans Testi	67
Şekil 3.6. Dokuların TAS yönünden karşılaştırılması	77
Şekil 3.7. Dokuların TOS yönünden karşılaştırılması	79
Şekil 3.8. Dokuların OSI yönünden karşılaştırılması	81
Şekil 3.9. Dokuların NO yönünden karşılaştırılması	83
Şekil 3.10. Dokuların AR yönünden karşılaştırılması	85
Şekil 3.11. Gruplar arası karşılaştırmalı histopatolojik bulgular	88

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Fenolik Madde Tayininin Yapılışı	43
Çizelge 2.2. Folin Ciocalteu ayırıcının hazırlanması	45
Çizelge 2.3. Deney gruplarının oluşturulması ve gruplara uygulanacak işlemler	47
Çizelge 2.4. SOD Analizinde kullanılan çözeltilerin hazırlanması	55
Çizelge 3.1. Karayemişin metanolik ekstraksiyonun fenolik madde içeriği (mg/L) ve antioksidan kapasitesi (mmol/L)	61
Çizelge 3.2. Deney gruplarının kan şeker düzeylerinin normal, insulin direnci ve diyabet yönünden değerlendirilmesi (%)	66
Çizelge 3.3. Serum Biyokimya sonuçları	71
Çizelge 3.4. Lipit değerlerine ait sonuçlar	72
Çizelge 3.5. Antioksidan analizlerin sonuçları	73
Çizelge 3.6. Fruktozamin ve HbA1c sonuçları	76
Çizelge 3.7. Deney gruplarının serum insulin konsantrasyonları (ng/mL)	76
Çizelge 3.8. Pankreastaki histopatolojik bulguların semi kantitatif derecelendirilmesi	86
Çizelge 3.9. İdrarın glikoz, keton ve protein yönünden değerlendirilmesi	88

1. GİRİŞ

Sağlıklı insan ve hayvanlarda glikoz metabolizması sürekli bir denge içerisinde hareket etmektedir. Açlık kan şekeri seviyesi arttığında hemen insulin devreye girmekte ve kan şeker seviyesini normal seviyelere taşımaktayken ancak açlık kan şekeri seviyesi normalin altına düştüğünde glukagon devreye girmekte ve glikoz seviyesini normal düzeylere çıkarmaktadır. İnsulin ve glukagonun bu uyumlu antagonist çalışma şekli vücudun homeostasisi için oldukça önemlidir. Glikozun dokulardan kana geçişini destekleyen tek hormonal sistem glukagon değildir. Glukagonun yanında katekolaminler, kortizol ve büyüme hormonunda kan şeker seviyesini arttırıcı etkiye sahiptir. Ancak insulin, kan şekerini düşüren tek hormon olup salınımının kontrol altında tutulabilmesi metabolizma için önem teşkil etmektedir (Gerich, 1988).

Moleküler bakış açısına göre, hiperglisemi Krebs döngüsüyle mitokondriyal elektron taşıma zincirinin kapasitesini aşan elektron donörlerinin nikotinamid adenin dinükleotidi (NAD) ve flavin adenin dinükleotitinin (FAD) üretimine yol açmaktadır. Fazla elektronlar oksijene aktarılmakta ve süperoksit ve diğer reaktif oksijen türlerine yol açmakta böylece DNA kırılmaları tetiklenmektedir. Sonrasında DNA tamir enzimi poli-ADP-riboz polimerazın aktifleşmesini sağlamakta böylece enzim gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenazı (GAPDH) etkisizleştirmektedir. GAPDH'nin inaktivasyonu, hiperfiltrasyon, endotel hasarı, mikrovasküler hastalık ve albuminüri ile bağlantılı olan diğer zararlı metabolik yollara yönlendirilen yukarı akış glikolitik ürünlerin birikmesine neden olmaktadır. Her ne kadar glomerüler patoloji, diyabetik hasarın primer bölgesi olarak kabul edilse de artık tubulointerstisyel hasarın, diyabetik böbrek hastalığının ilerlemesinde kritik bir rol oynadığı kabul edilmektedir. Yüksek plazma glukozu renal tübüler hücrelere doğrudan zarar verir ve bu da çok çeşitli metabolik ve hücresel işlev bozukluklarına neden olmaktadır. Üç önemli ve birbirine bağlı yolak, hiperglisemi tarafından tetiklenir ve diyabetik böbrek hastalığının ilerlemesine yol açmaktadır. Bunlar; ROS'un aşırı üretimi, apoptotik yolun aktivasyonu ve otofajinin

başlatılmasıdır. Hiperglisemi, endotel disfonksiyonunun gelişmesine de katkıda bulunmaktadır. Artmış oksidatif stres, artmış inflamatuvar faktörlerin üretimi, anormal anjiyogenez ve bozulmuş endotel onarımıyla sonuçlanan nitrik oksit üretimini azaltarak endotel disfonksiyonunun gelişmesine katkıda bulunmaktadır. Tüm hücrelerin enerji merkezi olan mitokondri, bu olayların meydana geldiği yer olarak kabul edilmektedir (Wei ve Szeto, 2019).

1.1. Glikoz, Taşınması ve Metabolizması

Glikoz, karbon (C), hidrojen (H) ve oksijen (O)'den meydana gelen altı karbon içeren bir aldoz grubu ihtiva eden monosakkarittir. Karbonhidrat metabolizmasının temel organik molekülü olup beynin kullanabildiği tek enerji kaynağıdır. Glikoz birçok metabolik yolda kullanılmaktadır. Yapısal polimer sentezi, depolama, glikoliz ve pentoz fosfat yolağı aracılığıyla oksidasyon gibi birçok durumda glikoza ihtiyaç duyulmaktadır (Nelson ve Cox, 2016). Glikoz transport mekanizmasında rol alan iki farklı sistem vardır. Bunlardan ilki GLUT sistemi olup Michaelis-Menten kinetiğine göre difüzyon yoluyla glikozun enerji harcamadan hücre içine taşınmasında rol oynarlar. GLUT 1 pankreasın alfa hücrelerinde bulunur dolayısıyla glukagon salgılanışını düzenler. GLUT 3 en düşük Km değerine sahip ana nöronal taşıyıcıdır. GLUT 4 ise iskelet ve kalp kası ile yağ dokuları tarafından insulin ile uyarılan glikoz alımına yardımcı olmaktadır. Bu üç taşıyıcı sistem yüksek affiniteli taşıyıcı iken GLUT 2 düşük affiniteli olup pankreasın beta hücrelerinde bulunmaktadır. GLUT 2, glikoz akışının yüksek olduğu bağırsak, karaciğer ve böbrek gibi dokularda da yüksek oranda bulunur (Bouche ve ark., 2004). İkinci glukoz transport sistemi ise SGLT'dir. Böbrek proksimal tübülleri, SGLT 1 ve SGLT 2'nin bulunduğu yerlerden biri olup bu sistem glikozun idrardan atılımını önleyerek glomerüllerden geri emiliminden sorumludur.

Metabolizmaya kısaca göz atacak olursak; glikoz bilindiği gibi en önemli ve temel enerji kaynağıdır. Birçok doku glikozdan yararlanmakta ve glikoliz evresi ile glikoz piruvata kadar parçalanmaktadır. Oksijenden yararlanabilen doku ve organlarda

piruvata parçalanarak glikozlar, bir takım zincir reaksiyonlar sonucunda asetil koA'ya dönüşür ve Krebs siklusuna katılarak su ve karbondioksit kadar okside olmaktadır. Böylece enerji gereksinimi karşılanmaktadır. Bazı dokular ortamda yeterli oksijen bulunmadığında anaerobik glikoliz ile glikozu laktik aside yıkarak ATP üretmektedir. Yani her iki durumda da glikoz ana enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır (Gözükara, 2011).

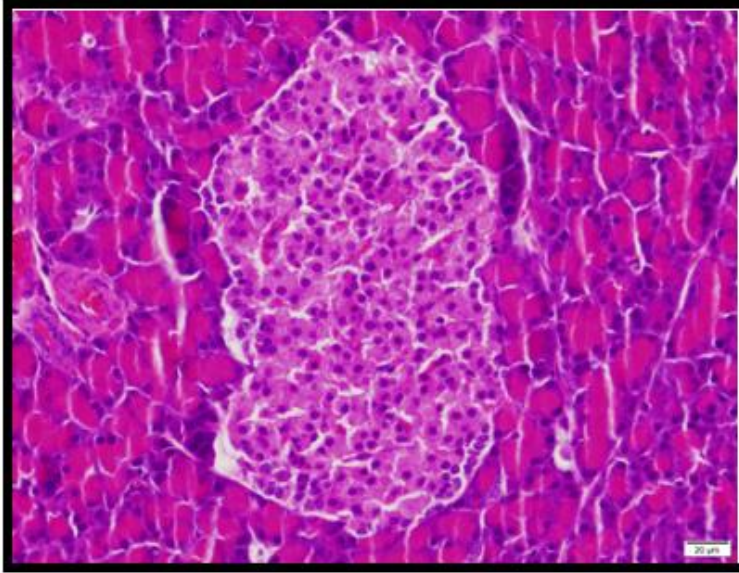
Ortamda yeterince glikoz olmadığı durumlarda ise karaciğer, yağ asitlerinden keton cisimlerini üreterek diğer dokulara enerji sağlarken, glikozun fazlası karaciğer aracılığıyla glikojene dönüştürülerek depo edilmekte ve ihtiyaç halinde bu depolardan kana glikoz sağlanmaktadır. Ancak bu depolar boşaldığında glukoneogenez olayı başlamakta ve karbonhidrat olmayan maddeler enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. Tüm bu metabolik olayları düzenleyen başlıca hormonlar olan insulin ve glukagon pankreas dokusunun endokrin bez görevi gören kısmında farklı hücreler tarafından salgılanmakta ve antagonist etki göstermektedirler. Bu nedenle diyabet tüm metabolizma ve dokuların akıbetini değiştirerek ciddi komplikasyonlara yol açmaktadır. (Nelson ve Cox, 2016 ve Rodwell ve ark., 2018).

1.2. Pankreas

Pankreas, hem endokrin hem de ekzokrin görevi olan duodenum başlangıcıyla mide çıkışının hemen arasında kalan ince uzun şeffaf bir bezdir. Ekzokrin görevi sindirime yardımcı olmakta ve dokunun %95'lik bölümünü oluşturmaktayken oldukça büyük bir öneme sahip olan endokrin görevi ise tüm metabolik olayları şekillendirmektedir. Endokrin bez kısmı Langerhans adı verilen adacıklardan oluşmakta ve alfa (glukagon salgınır), beta (insulin salgınır), delta (somatostatin salgınır), pankreas polipeptid (PP) ve epsilon (ghrelin hormonu salgınır) olarak adlandırılan hücrelere sahiptir. Her hücrede ayrı bir hormon üretilmektedir. Beta hücrelerinden salgılanan insulin bu hormonlar arasında önemli bir yere sahiptir. Beta hücreleri

endokrin bez görevi gören %5'lik kısmın %65-80'ini oluşturmaktadır (DeFronzo ve ark., 2015).

İnsan pankreasında alfa ve beta adacıkları birbirine yakın ve ilişkili halde bulunurken, kemirgenlerde beta hücreleri merkezde ve diğer hücreler etrafında bulunacak şekilde konumlanmışlardır. Tip 1 diyabetes mellitus (DM)'da beta adacıklarının kütleli olarak azaldığı ve lenfositik infiltrasyonun arttığı histopatolojik bir görüntü ortaya çıkmaktadır. Pankreasa T hücreleri, yüzey farklılaşma antijenleri (CD4 ve CD8), B lenfositleri ve makrofajlar akın etmekte ve insülin salgılanması azaldığında veya tamamen bittiğinde, özellikle CD8 hücreleri yok olmaktadır. Tip 2 DM'de ise Langerhans adacıklarındaki amiloid birikimi söz konusu olup yıllar sonra amiloidlerin aslında beta hücrelerini yeniden düzenleyen polimerizasyon ürünleri olduğu anlaşılmıştır. Ancak rat ve fare modellerinde amiloid birikimine rastlanmamıştır. Ayrıca tip 2 diyabet olmadığı halde sağlıklı pankreasta da bu tür değişimler gözlemlenince bu amiloid birikiminin üzerindeki ilgi azalmıştır (Chandalia ve ark., 2014). Şekil 1.1'de sağlıklı bir rat pankreasının histolojik yapısı gösterilmiştir.



Şekil 1.1. Sağlıklı pankreasın histolojik görüntüsü.

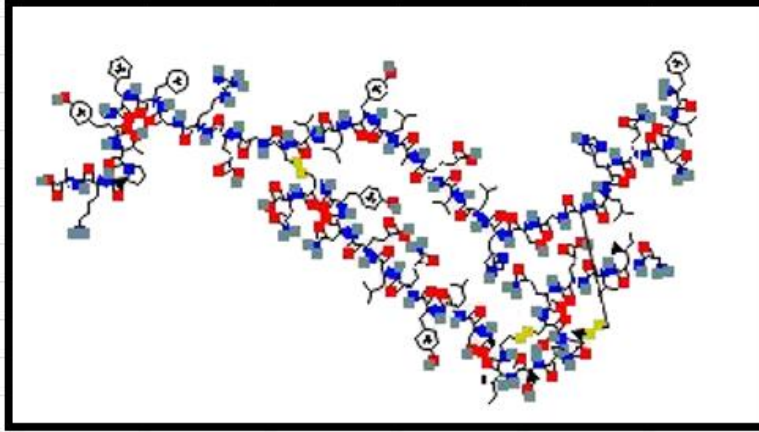
1.2.1. İnsulin

Kanada da bir üniversitenin fizyoloji bölümünde profesör olarak görev yapmakta olan John JR MacLeod, öğrencisi Frederick Banting'in laboratuvarında çalışmasına izin vermiş ve Banting, Charles Best ile pankreas üzerinde diyabeti tedavi etmek için deneysel çalışmalar yapmıştır. Özellikle pankreas ekstraktının pankreası alınmış köpeklerle verilmesiyle görülen etkileri incelemişler ve 1923 yılında McLeod ve Banting Nobel Tıp ödülünü kazanmışlardır. İnsulin ilk kez Frederick Banting ve Charles Best tarafından keşfedilmiş ve “İsletin” olarak isimlendirilmiştir. İnsulin 1900’lü yılların başında deMayer tarafından ortaya atılmış insulın adı ise MacLeod tarafından sonraki yıllarda verilmiştir. İnsulinin, diyabetteki rolü tamamen anlaşılmasının ardından purifiye edilmesi ve tedavide kullanılmasına ilişkin çalışmalar hızını arttırarak devam etmiştir (Bliss, 2007 ve Poretsky, 2017).

Rat insulın, A ve B olmak üzere iki polipeptid zincirinden oluşan birbirine disülfid bağıyla bağlanan bir hormondur. A zinciri 21, B zinciri 30 adet aminoasitten oluşmaktadır. İnsulin kandaki glikozu adipoz ve kas hücrelerine taşıyarak hipoglisemik etkiye neden olmaktadır. Glukozun dokulara taşınmasında kullanılan transport sistem ise insulın bağımlı taşıyıcı sistem olan GLUT-4’tür. İnsulin sadece karbonhidrat değil yağ ve aminoasitlerinde dokulara taşınmasında görevlidir. Ayrıca hekzokinaz enzimini stimüle ederek glikozun metabolik yollarda katabolize olmasına neden olmaktadır (Holt ve ark., 2010).

İnsulin salınımına neden olan durumlar, kan glikoz düzeyinin artışı ve parasempatik sinirlerin asetilkolin tarafından aktive edilmesi; kan glikoz düzeyinin azalması, pankreastan somatostatin hormonunun salınımı, norepinefrin ve sempatik sinirlerin aktivasyonu gibi nedenler insulın salınımını inhibe etmektedir. İnsulinin görevini yerine getirebilmesi için insulın reseptörlerine (IR) bağlanması gerekmektedir. İnsulin reseptörü alfa ve beta alt ünitelerinden oluşan heterotetramerik

glikoprotein yapısındadır. İlk alt ünite olan alfa, insulinin bağlanmasını sağlayan hücre dışı boşlukta bulunurken diğer alt ünite beta, hücre içi alanda transmembran bir protein olup tirozine has protein kinaz aktivitesini içinde bulundurmaktadır (Norris ve Scott, 1996; Ohkura ve ark., 2000 ve Samols, 1991). Şekil 1.2’de insulinin moleküler yapısı gösterilmiştir.



Şekil 1.2. İnsulinin moleküler yapısı (Pubchem).

1.3. Diyabetes Mellitus

Diyabet antik çağlardan beri bilinen bir hastalık olup “Diabetes” adı ilk olarak Arethaeus tarafından yaklaşık 1800 yıl önce verilmiştir. Poliüri ve polidipsi’yi gözlemleyen bu Kapadokya’lı hekim süzülme anlamına gelen “diabetes” adını bu yüzden tercih etmiştir. 1600’lü yıllarda ise idrarın tatlı olmasından dolayı bal anlamına gelen “mellitus”, Willis tarafından eklenmiştir (Karaman ve Elgin Cebe, 2016). Diyabetin pankreas ile olan ilişkisini ortaya atan ilk isim ise 1700’lü yılların sonuna doğru pankreatik hasar gelişen bireylerin diyabete yakalanması sonucu bu kaniya varan Thomas Crawley olmuştur. Yine aynı yüzyılda Matthew Dobson tarafından diyabetin böbrek kaynaklı olmayıp, sistemik bir hastalık olduğu anlaşılmıştır (Medvei, 1982).

DM birden çok etkene bağlı gelişen kronik seyirli ve hiperglisemi ile karakterize bir hastalık olup insülin salınımının yetersizliği, insülin direnci veya her

ikisinden kaynaklanmakta ve karbonhidrat, yağ, protein metabolizmasının bozulmasına neden olmaktadır. Tüm metabolizmayı etkilediğinden birçok organ dolaylı olarak etkilenebilmektedir (WHO, 1999). Dünya nüfusunun %8'inden fazlasını etkilediği bilinmekte ve Uluslararası Diyabet Örgütüne göre 2035 yılına kadar bu oranın artacağı düşünülmektedir (Coşansu, 2015).

DM ülkemizde ve dünyada yaygın olarak görülmekte, oluşumunda genetik ve çevresel faktörler rol oynamaktadır. Pankreas beta hücrelerinin otoimmün yıkımına neden olan tip 1 ve çok faktörlü olduğu bilinen tip 2 DM, bozulmuş yağ asidi metabolizması, insulin direncine yol açan merkezi yağ birikimi, beta hücresi salgısı defekti ve obezite gibi çeşitli nedenlerle oluşabilmektedir (Liu ve ark., 2019 ve Shah ve ark., 2007).

Büyümesi geciktirilmiş fetüslerde, düşük oksijen seviyeleri, elektron taşıma zincirlerinin aktivitesinin azalması nedeniyle serbest radikallerin üretimini meydana getirmekte böylece enerji üretimini azaltan DNA, protein ve mitokondriyal hasar oluşmaktadır. Bu mitokondriyal disfonksiyon, yüksek enerji gereksinimi olan ve insulin proliferasyonu ve sekresyonu için normal ATP üretimine bağlı olan beta hücre fonksiyonu üzerinde öldürücü etkilere sahiptir. Beta hücre bozulmasının artmasının bir başka nedeni de antioksidan enzim ifadesinin pankreas adacıklarında çok düşük olmasıdır (Shah ve ark., 2007).

1.3.1. Tip 1 Diyabet

Bir diğer adıyla insulin bağımlı diabetes mellitus özellikle insanlarda otoimmün bir hastalık olup etiolojisinde genetik faktörler yer almaktadır. Özellikle 6. kromozom üzerinde MHC alellerinde bulunan HLA geni bazı insanlarda otoimmün hastalık oluşturmakta ve özellikle pankreasın beta hücrelerine saldırmaktadırlar. Ancak bu tek başına meydana gelen genetik bir faktör değildir. HLA genleri MHC

proteinlerini salgılamakta ve sınıf 2 MHC proteinleri özellikle diyabet gelişiminin çoğundan sorumludurlar. Köpeklerde ise DLA geni insanlarda olduğu gibi tip 1 diyabete yatkınlık gelişmesine neden olmaktadır. BB Ratlarda iddm1 olarak adlandırılan otozomal resesif bir lokusun otoimmün diyabet gelişimi ile yakından ilgili olduğu bilinmekte ve kromozom 4 üzerinde bir lenfopeni fenotipinden de sorumlu tutulmaktadır (Cudworth ve Woodrow, 1975; Jacob ve ark., 1992; MacMurray ve ark., 2002; Poretsky, 2017 ve Rand ve ark., 2004). Tüm bu genetik faktörlerin sonucunda tip 1 diyabet; pankreasın beta hücre hasarı sonucu insulin üretememesi veya yetersizliği ile karakterizedir. Hücrenin immun yıkımının markerları arasında: adacık hücresi otoantikorları, insulin otoantikorlar, GAD65'e karşı otoantikorlar ve tirozin fosfataz'a karşı otoantikorlar sayılabilir ve bu antikorlar tanıda oldukça duyarlıdır (Chiang ve ark., 2014).

Önceki yıllarda tip 1 tanısı sadece yeni doğan ve bebeklere konulmaktayken artık tip 1 diyabetin ileri ki yaşlarda da ortaya çıkabileceği bilinmektedir. Genetik olarak yatkın olan ve beta hücre hasarına neden olabilecek otoantikorları bulunduran her birey tip 1 diyabet tanısı için birer adaydır. İleri yaşta görülen LADA olarak adlandırılan tip 1 diyabet çeşidinde genelde tanısı konmadan önce de bir beta hücre hasarı mevcuttur. Ancak ketoasidoz görülmemekte ve hücre hasarı yıllarca devamlılığını sürdürse de tip 2 diyabete benzer semptomlar gösterebilmektedir (Naik ve ark., 2009). Bir diğer tip 1 diyabet çeşidi ise idiyopatik tip 1 diyabetes mellitus dediğimiz kişide insulin yetersizliğinin olması ancak hücre hasarına neden olan otoantikorların olmaması durumudur. Bu duruma çok nadir rastlanılsa da ırk predispozisyonunun buna neden olabileceği düşünülmektedir ve insanlarda genelde Afrika ve Asya kökenli bireylerde idiyopatik nedenli tip 1 diyabet yapılan araştırmalar sonucunda görülmüştür (ADA, 2021).

1.3.2. Tip 2 Diyabet

Diyabetin bu şekilde beta hücre hasarı ve insulin salgılanamamasından ziyade, salgılanan insuline karşı direnç gelişmesinden kaynaklı hiperglisemi oluşumu vardır. İnsulin direnci yanında insulin salgılanmasında noksanlık ve glukagon hormonun fazla salgılanması da tip 2 diyabette hiperglisemiye eşlik eder. Beslenme ve obezite sık karşılaşılan nedenlerden olsada birçok genetik faktör tip 2 DM oluşumuna neden olabilmektedir. Bu faktörlerden biri de insulin reseptörlerinde meydana gelen mutasyonlar olup bu mutasyonlar sonucunda insulin salgılandığında dahi reseptör hasarı nedeniyle insülin görevini yerine getirememekte ve insulin reseptörünü bozan birçok mutasyonun olduğu bilinmektedir. Bir diğer genetik faktörse insulin gen mutasyonu olup genelde proinsulinin fazla salgılanması ve kusurlu insülin üretilmesine neden olmakta böylece hedef dokularda azalan bir etki göstermektedir (Fakruddin, 2019 ve Flannick ve ark., 2013).

İnsulin üretimi sadece kandaki glikoz seviyesini azaltmakla kalmayıp serbest yağ asitlerinin üretilmesini engellemekte VLDL'lerin damar endotelinden uzaklaşmasına yardımcı olmaktadır. Dolayısıyla insülin üretimi veya insülinin kullanımıyla ilgili bir problem varlığında plazma lipit düzeyleri de dengesizleşmekte ve glikoz intoleransı oluşmaktadır. Tip 2 DM oluşmadan önce bir prediyabet süreci meydana gelmekte ve bu süre içinde glikoz düzeyini dengede tutabilmek için beta hücreleri ilk olarak fazla çalışarak insüline karşı azalan duyarlılığı telafi etmeye çalışmaktadır. Uzun bir süre bu şekilde idare edilse de zamanla beta hücrelerinde de birtakım bozulmalar başlayarak diyabete duyarlılık ortaya çıkmaktadır. Bu olayı başlatan asıl bozukluğun insulin reseptörlerinin mutasyon veya defektine bağlı olduğu düşünülmektedir. (DeFronzo, 1992; DeFronzo, 1997; Warram ve ark., 1990 ve Weyer ve ark., 1999).

1.3.2.1. İnsulin Direnci

Bu terim aslında insulinin biyolojik etkisini geniş bir konsantrasyon aralığında göstermesinde azalan etki olarak da tanımlanabilir. Yani aslında salgılanan insulinin etkisi azaldığı için insulin takviyesine ihtiyaç duyulması anlamına gelmektedir. Özellikle açlık durumunda artan insulin üretimi defektli insulin reseptörlerinin dirençteki rolünü kanıtlar. İnsulin etkisini gösterirken oluşturduğu özel sinyal yolağı oldukça karmaşık bir yapıdır ancak çok önemlidir. İnsulin reseptörlerinden bahsedildiğinde beta subünitenin hücre içine iletimi sağladığı söylenmiştir. Burada bulunan insulin reseptör substrat (İRS) protein ailesi vasıtasıyla sinyal yolaklarının devamlılığı ve kan glikoz homeostazisi sağlanmaktadır. İRS-1 proteini tanımlanan ilk reseptör ailesi ve en çok salgılanan proteindir. Özellikle tip 2 DM’de insulin direncine sebep olan İRS-1 gen polimorfizmleri nedeniyle de en çok araştırılan proteindir. İRS-1 ile İR arasındaki bağlantının kopmasında inflamasyonda rol oynayan sitokinler ve yolaklar devreye girmektedir ve insulin direnci ile farklı dokularda da patolojik gelişmeler meydana gelmektedir (Eriksson ve ark., 1989; Görgişen, 2018 ve Matthaei ve ark., 2000).

1.3.3. Gestasyonel Diyabetes Mellitus (GDM)

Gebeliğin ilerleyen dönemlerinde ortaya çıkan klinik olarak istikrarlı bir hiperglisemi ile seyreden diyabet çeşididir. Aslında bu diyabet çeşidinin diğer iki tip diyabetten ayırt edilmesi oldukça önemlidir. Asıl sebebin gebelik sürecinden kaynaklı mı yoksa gebelik öncesi var olan ancak teşhis edilememiş bir diyabet mi olduğu büyük bir soru işaretidir. GDM genelde gebelik esnasında salgılanan hormonların kan glikoz seviyelerini yükseltmesi ve pankreastan salgılanan insulinin bu şeker seviyelerini dengelemeye yetememesinden kaynaklı bir sendromdur. Bu sendromun gelişmesinin en önemli nedeni annenin yaşı ve kilosudur. Ancak gebelik sona erdiğinde kalıcı tip 2 DM’ye sebep olabileceği için riskli bir diyabet çeşididir. Sadece anneye değil fetüse

de zararları olabilmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda gestasyonel diyabet geçirip doğum yapan annelerin çocuklarında da diyabet gelişme riskinin arttığı görülmüştür. Bunun sebebi ise glikozun fetüse geçerken anneden insülinin geçememesi kaynaklı fetüsün kendi insülinini salgılaması ve bu sırada büyüme faktörlerinin uyarımı nedeniyle fetüsün normalden irileşmesi olarak bildirilmiştir. Bahsedilen bu sebep-sonuçların dışında da birçok farklı risk faktörü mevcuttur. Özellikle doğan çocuk kız ise ilerde gebelik yaşarken aynı sendromu geçirebilir, fetüs ölebilir veya anomalili doğumlar gerçekleşebilir. Bu nedenle oldukça önemli bir diyabet türü olduğu söylenebilir (Barbour ve ark., 2007; İlgen ve Koçak, 2019 ve Öztürk ve Altuntaş, 2015).

1.3.4. Diyabetes İnsipidus

Aslında diyabetle ilişkisi olmayan ancak diyabetle karışan bu yüzden yalancı diyabet olarak adlandırılan fizyolojik bir durumdur. Santral, nefrojenik veya aşırı sıvı alımı nedeniyle olabilmektedir. Aşırı ürinasyon şekillenir ve buna bağlı olarak da polidipsi görülmektedir. Hastanın hayatını tehlikeye atacak bir rahatsızlık olmamasına karşın aşırı sıvı tüketimi ve ürinasyon gündelik hayatı oldukça sıkıntıya sokabilmektedir. Normal şartlarda hipotalamusun uyarımıyla salgılanan antidiüretik hormon (ADH = vazopressin) sayesinde böbrekler daha az idrar yapımına odaklanmakta ve suyun geri Emilimi sağlanarak daha konsantre idrar oluşturulmaktayken vazopressin üretiminde bir problem teşkil ettiğinde santral diyabetes insipidus (CDİ) baş göstermektedir. Eğer vazopressin üretiminde problem olmadığı halde suyun geri Emilimi veya atılımında aksamlar devam ediyorsa nefrojenik diyabetes insipidus (NDİ) ile karşı karşıya kalınmaktadır. Böbrekler ADH uyarımına cevap veremediği için su geri Emilimini sağlayamamaktadır. Nefrojenik Dİ kendi içinde primer ve sekonder olmak üzere ikiye ayrılır ve primer NDİ’da genelde ADH reseptörleri ile alakalı bir sorun olup özellikle kedilerde şimdiye kadar vaka bildirilmemiştir. Sekonder NDİ’da ise genelde böbreği ya da sıvı tüketimini etkileyen farklı nedenler rol oynamaktadır. Bu nedenler arasında en çok görülenler ise pyometra,

pyelonefritis, hipokalemi veya hiperkalsemidir. Köpeklerde genelde nefrojenik Dİ yayginken, kedilerde santral Dİ daha fazla görülmektedir (DiLorgi ve ark., 2012; NIDDK, 2022; Rand, 2013 ve Willard ve Tvedten, 2012).

1.4. Diyabetik Komplikasyonlar

Diyabet metabolik bir hastalık olup beraberinde birçok farklı rahatsızlıkları da getirmektedir. Özellikle lipit metabolizmasının bozulmasıyla LDL seviyelerindeki artış nedeniyle damar sertliği ve sonucunda kalp rahatsızlıklarına zemin hazırlamaktadır. Zamanla böbrek eşiğini aşan glikozun idrarla atılımı sonucunda sekonder olarak böbrek rahatsızlıkları meydana gelebilmektedir. Bunların dışında hiperglisemiye dengelemek için alternatif yolların devreye girmesiyle göz, beyin, tüm sinir sistemi, yara iyileşmesinin gecikmesi, karaciğer hastalıkları vb. daha birçok ikincil hastalıklar da görülmektedir. Bu komplikasyonlar akut ve kronik komplikasyonlar olarak düşünmek daha doğru olur. Akut komplikasyonlar aniden çok yüksek hiperglisemiden kaynaklanmaktadır. Genelde ketoasidoz (genelde diyabetik komaya neden olur), laktik asidoz, bakteri veya mantar enfeksiyonları gibi rahatsızlıklar iken kronik komplikasyonlar ise hipergliseminin uzun süre sonunda neden olduğu organ ve doku yetersizlikleridir. Diyabetik komplikasyonların seyri özellikle % HbA1c (Glikolize hemoglobin, 3 aylık ortalama kan şekeri değerini vermektedir) değerleri ile doğru orantılıdır (NIDDK, 2022 ve Uludağ, 2010).

1.4.1. Akut Diyabetik Komplikasyonlar

En önemli akut komplikasyonlarından biri olan diyabetik ketoasidoz vakasıdır. Bu komplikasyona neden olan asıl sorun hücre ve dokuların enerji kaynağından yoksun kalarak alternatif enerji oluşturmak için yağ dokusundan keton maddelerinin oluşmasıdır. Yükselen kan glikoz seviyelerinde normalde insulin sayesinde kandan

dokulara glikoz taşınarak hiperglisemik kontrol sağlanmakta ancak ortamda insulin yeterli görev yapamıyorsa o zaman hücreler açlık çeker ve açlıkta oluşan keton cisimleri oluşmaktadır. Keton cisimleri bilindiği üzere aseton, asetoasetik asit ve beta hidroksi bütirik asit olup, karaciğer, kaslar ve beyin de %20'lik enerji ihtiyacını karşılayabilmektedir ancak beraberinde ciddi problemleri de getirmektedir (Feldman ve Nelson, 2004; Guyton ve Hall, 2006 ve Rodwell ve ark., 2018).

Kesin olarak tespit edilebilmesi için ilk aşamada idrar stripleri ile keton varlığının tespit edilmesi gerekirken negatif sonuç elde edildiğinde plazma ketonlarına bakılmalıdır. Ayrıca pH ölçümü yine çok önemli bir tanıya çeşidi olup özellikle ketonometre ile ölçülen sonuçlarda 2,8 mmol/L'den daha düşük sonuçlar negatif, 3,5 mmol/L'den yüksek sonuçlar pozitif ve bu ikisi arasında kalan ölçümler şüpheli olarak nitelendirilmiştir. Şüpheli durumlarda daha ayrıntılı veya tekrar edilen testler yarar sağlamaktadır. (Hume ve ark., 2006 ve Stajonovic ve Ihle, 2011)

Diyabetik ketoasidoz vakalarında aşırı zayıflama, aseton kokusu, kusma, letarji gibi klinik semptomlarla karşılaşılır ve eğer acilen tedavi edilmezse diyabetik koma şekillenmektedir. Tedavide sıvı sağaltımı, insulin ve asit baz dengesinin korunması için uygulamalar yapılmaktadır. Her geçen gün bu komplikasyondan kaynaklı koma ve ölümler azalmaktadır (Kitabchi ve ark., 1994).

Akut diyabetik komplikasyonlar başlığı altında incelenebilecek ancak ketoasidozla genelde birlikte seyreden diğer komplikasyonlar; laktik asidoz ve hiperglisemik hiperosmolar non-ketotik aşamadır. Nonketotik aşama ölüm oranı oldukça yüksek ve sık olan bir komplikasyondur. Genelde 700 mg/dL'yi aşan kan şekeri seviyeleri mevcuttur ve serum osmolaritesi 320 hatta koma halinde 340 mOsm/L'ye kadar artmıştır (Siperstein, 1992). Laktik asidoz yine oldukça sık görülen bir akut komplikasyondur ve oldukça sinsi seyretmektedir. Tedavi edilmediği ya da fark edilemediği için tedaviye geç kalındığı takdirde ölümle sonuçlanabilen kötü seyirli bir komplikasyondur. Kan pH'sı 7,35'in altına düştüğünde ve arteriyel kan

laktatının 45 mg/dL'nin üzerine çıkması laktik asidoza işaretler. Ancak aynı sonuçlar karaciğer rahatsızlıkları gibi farklı hastalıklarda da ortaya çıkabilmektedir. Dokuların oksijeni kullanması azaldığında glikolizin devamında dokular pirüvatı laktik aside çevirir ve bu şekilde laktatın kandaki oranı artmaktadır (Narins ve ark., 1980 ve Stacpoole, 1993).

1.4.2. Kronik Diyabetik Komplikasyonlar

Kronik komplikasyonları genelde mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar şeklinde 2 başlık altında izlemek mümkündür. Kardiyovasküler hastalıklar, serebrovasküler hastalıklar ve periferik damar hastalıklarını makrovasküler hastalıklar başlığı altında incelemek gerekirken diyabetik nefropati, diyabetik retinopati ve diyabetik nöropati mikrovasküler hastalıklar başlığı altında incelenmektedir (Donaghue ve ark., 2009).

1.4.2.1. Diyabetik Ayak Sendromu

Oldukça sık karşılaşılan bir komplikasyon olduğu için çok korkulan bir sorun olup ayak veya bacağın amputasyonuna kadar ilerleyebilmektedir. Kronik hipergliseminin sinir liflerine zarar vermesi sonucunda ayaklarda ülser, nekroz, kangren gibi komplikasyonlar ortaya çıkabilmekte, ayakta deformiteler oluşabilmektedir. Ayrıca ayak tırnakları da bu durumdan etkilenebilir hatta tırnak kaybı meydana gelebilmektedir. Özellikle duyuşal sinir liflerinin kaybıyla ayak daha az acı hissederken ve travma ve yaralanmalara karşı ise daha duyarlı hale gelmektedir. Enfeksiyona açık hale gelen hastaların ayaklarının mikrop kapması durumunda ise tablo kötüleşmektedir. Yara iyileşmesinin gecikmesi de bu durumun düzelmesini iyice

zorlaştırmaktadır. Nöropati şekillenmesi ya/ya da vasküler hastalık durumunda ayak etkilenmektedir (Levin ve ark., 1993 ve Sharad, 2003).

1.4.2.2. Diyabetik Retinopati

Mikrovasküler komplikasyonlardan biri olan retinopati tip 1 DM ve tip 2 DM’de de ortaya çıkan bir komplikasyondur ve genelde hiperglisemide alternatif yolların devreye girmesi sonucunda oluşmaktadır. Kronik seyirli hiperglisemide alternatif olarak glikoz dengesini sağlamak için polyol yolağı devreye girmektedir ve aldoz redüktaz (AR) enzimi ile glikoz sorbitole dönüştürülmekte ve fruktoza çevrilmektedir. Özellikle sorbitol birikiminin gözde çok yoğun olduğu yapılan araştırmalar sonucunda belirlenmiştir. Çünkü sorbitolün fruktoza dönüşmesi yavaş bir reaksiyon iken sorbitol gitgide birikmeye başlar. Sorbitolü oluşturan aldoz redüktaz seviyeleri de yine özellikle göz dokusunda çok yüksek bulunmuştur. Hatta yapılan bazı deneysel rat çalışmalarında kullanılan aldoz redüktaz inhibitörlerinin diyabette retinopati gelişimini azalttığını hatta durdurabildiğini göstermiştir (Asnaghi ve ark., 2003; Happens ve ark., 2006 ve Sun ve ark., 2006).

Hiperglisemi tek başına bir inflamasyon kaynağıdır ve kronikleştiğinde inflamatuvar sitokinler bölgede birikir. Gözde TNF-alfa ve IL-6 yapılan çalışmalar sonucunda belirlenmiştir. Buna bağlı olarak inflamatuvar sitokin oranı gözde arttıkça retinopati gelişimi de o kadar artmaktadır. Ayrıca Protein Kinaz C yolağının aktifleşmesi sonucu diaçilgliserol (DAG) birikimide yine diyabetik retinopati ile ilişkilendirilebilmektedir. Bu yolağı aktiveştiren etkiler oksidatif hasar, vasküler endotelyal büyüme faktörleri (VEGF) ve ileri glikasyon son ürünleridir (Joussen ve ark., 2004 ve Nishiwaka ve ark., 2000).

Histolojik olarak gözde perisit kaybı gerçekleşmektedir. Bu durum erken tanı için oldukça önemlidir. Çünkü gözün patognomonik bir bulgusudur. Perisit kaybı sonucunda gözde mikroaneurizmalar ve kan beyin bariyerinin bozulması gibi sonuçlar görülmektedir. Retinopatili hastalarda gözün bazal membranında bir kollagen birikimi şekillenir ve zamanla körlüğe neden olabilir (Kuwabara ve Cogan, 1963 ve Orlidge ve D'Amore, 1987).

1.4.2.3. Diyabetik Nefropati (DN)

Kimmelstein ve Wilson (1936) tarafından ortaya atılan ilk nefropati tanımı, diyabetin bir diğer önemli komplikasyonudur. Diyalize kadar ilerleyen bir böbrek yetmezliği şekillenir. Bu yüzden üzerinde durulan önemli konulardan birisidir. DN gelişmesindeki faktörler çok sayıdadır ve ilk sırayı tabi ki hiperglisemi almaktadır ancak onun dışında sigara, genetik ve ırksal faktörler de önemlidir. Sigara tüketen hastaların filtrasyon hızları tüketmeyenlere göre daha çabuk düşmekte ve böbreği etkilemektedir (Satman, 2010). Ancak genetik faktörler de oldukça önemlidir çünkü intron 16 isimli bir genin polimorfizmi sonucunda DN'ye yatkınlık olduğu Marre ve ark. (1996)'nın yaptıkları bir çalışmada bulunmuştur.

DN patogenezinde birçok rol vardır bunlardan biri yine polyol yolağı ve ileri glikasyon ürünlerinin oluşmasıdır. Bunun dışında aminoasit ve lipidlerin glikasyon ürünleri (Maillard reaksiyonu sonucu Schiff bazı oluşturması) ve oksidatif strese büyük bir öneme sahiptir. Özellikle hipertansiyon ile renin anjiotensin sisteminde meydana gelen bozulmalar sonucunda böbrekler daha fazla etkilenir. Protein Kinaz C yolağıda aktive olmaktadır. Özellikle fibronektin, tip 4 kollagen ve TGF-beta1 sentezi artışına neden maktadır. Böbreklerde artan bu yapılar sonucunda glomeruloskleröz şekillenmektedir (Dyer ve ark., 1993 ve Ha ve Kim, 1999).

Nefropati gelişimi klinik olarak 5 evrede incelenmektedir. Bu evreler, ilk önce glomerüler hiperfiltrasyon ile başlamakta ve GFR hızı oldukça artmaktadır. Bununla birlikte çok çalışmaya bağlı böbrek boyutlarında büyüme de görülebilmektedir. Bir sonraki klinik aşamada normoalbuminüri görülmekte ve erken renal evre de denmektedir. Devamında mikroalbuminüri görülmeye başlanır ve bu dönem artık nefropati evresinin tamamen geliştiğini göstermektedir. Bu evre tip 2 DM'li hastalarda daha sık rastlanır çünkü diyabet gelişiminden bile önce var olan bir olgu olabilmektedir. İnsanlarda bu evrenin ortaya çıkış süresi 15 yılı bulabilmektedir. Bir sonraki evre artık ilerlemiş nefropati evresidir ve genelde böbrek yetmezliğinin şekillendiği aşamadır. Son evre olan son dönem böbrek yetersizliği evresinde artık iyileşme belirtisi çok zordur. Genelde diyalize ihtiyaç duyulmaktadır (Herman ve Teutsch, 1985; Mogensen ve ark., 1995 ve Molitch ve ark., 2003).

1.4.2.4. Diyabetik Kardiyomiyopati

Kardiyovasküler hastalıklarda tıpkı böbrek ve karaciğerdeki gibi diyabetiklerde risk oluşturmaktadır. Diyabetin en önemli sonuçlarından olan kardiyovasküler hastalıkların oluşum süreci hiperlipidemi, obezite ve hipertansiyondan kaynaklanmaktadır. HbA1c'nin her %1'lik artışı kalp yetmezliği oranını %12 arttırmaktadır. Hiperinsulinemi su-tuz tutulumu artışına sebep olmakta ve diyabete hipertansiyon eşlik eder sonucunda da diyastolik kalp yetmezliğine ortam hazırlamaktadır. Ayrıca ateroskleroz riski de büyük oranda artar ve damarlara histopatolojik inceleme yapıldığında aterom plağı içinde makrofaj ve lenfosit sayısı ve aktivitesinin arttığı, aktif bir inflamasyon süreci olduğu bildirilmektedir (Çayır ve ark., 2015 ve Işık ve ark., 2009).

Makrovasküler bir diyabetik komplikasyondur ve mortalitesi yüksek sık karşılaşılan bir durumdur. Bu nedenle en az diğer komplikasyonlar kadar önem teşkil etmektedir. Erkeklerle oranla daha fazla yağ dokuya sahip olmaları nedeniyle kadınlar

(dişiler) predispozedir. Tıpkı nefropatideki gibi sigara içme durumu yine yatkınlığı arttıran etkenlerden biri olup kilo, yaş ve kan lipid profilleri de komplikasyonun oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Özellikle artan trigliserite karşın artmış LDL ve azalmış HDL oranları damar sertliği ve buna bağlı olarak kalp krizine neden olabilmektedir. LDL ile kalp hastalıkları arasında doğrudan bir ilgi bulunmaktadır. Kalp problemleri şekillenirken genelde sistolik ve diastolik kan basınçlarında da dalgalanmalar olmaktadır. Kalp yetmezliğinde kan basıncı oranı %12 artarken diyabette bu oranın %17 olduğu bulunmuştur ve diyabetin sarsıcı metabolik etkisini buradan da anlamak mümkündür (Huxley ve ark., 2006 ve Turner ve ark., 1998).

Kalbin elektriksel ve mekaniksel fonksiyonunda bozulmalar meydana gelir ve bunların Ca^{+2} dengesinin sağlanamaması ile yakından ilişkisi bulunmaktadır. Ca^{+2} dengesinin sağlanmasında proteinlerin rolü vardır. Ancak glikolize olan proteinler damar elastikiyetini azaltarak kollagen artışı ile seyretmektedir. Tüm bunların sonucunda ateroskleroz şekillenir ve miyokardiyal infarktüse sebep olabilmekte ve infarktüs geçiren bir hastada tekrar infarktüs şekillenme riski bulunmakta ve bu hastaları sonraki dönemlerde daha zorlu bir hayat tarzı beklemektedir. Her ne kadar sebepleri ve oluşum mekanizması anlatılmaya çalışılsa da günümüzde hala tam aydınlatılamamış bilgiler mevcuttur (Poirier ve ark., 2001 ve Singh ve ark., 2010).

1.5. Diyabette Alternatif Yolaklar ve Oksidatif Stres

Glikoz metabolizmasından bahsedilirken normal glikoz düzeylerinde meydana gelen metabolik yolaklara değinilmişti. Ancak uzun süreli hiperglisemide artan glikozun alternatif yolaklarla dengelenmeye çalışılması farklı sorunları beraberinde getirmektedir. Özellikle kronik diyabetik komplikasyonların da ana kaynağını oluşturmaktadır (Asnaghi ve ark., 2003).

1.5.1. Polyol Yolağı

Özellikle aldoz redüktazın yer aldığı sorbitol birikimiyle sonuçlanan önemli bir alternatif yoldur. Mikrovasküler komplikasyonların önemli nedeni olup glikoz doyunluğuna ulaşan yolların artık daha fazla glikozu katabolize edememesinden kaynaklanmaktadır. Hücre içi sorbitol artışı zamanla sinyal iletiminde aksamalara neden olur ve nöropati gelişimindeki rolü bu şekilde başlamaktadır. Sorbitoldeki artış genelde taurin ve miyoinozitolün tükenmesine yol açarken özellikle miyoinozitolün tükenmesiyle prostaglandin mekanizması ve nitrik oksit sentezi azalmakta hatta bozulmaktadır. Taurinin azalması ise Schwan hücrelerini olumsuz etkilemekte, siklooksijenaz yolağı bozulmakta ve ganglion, sinir lifleri gibi nörolojik yapılarda bozulmalar meydana gelmektedir. Glutasyon redüktaz bu yolda azalmaktadır. Çünkü aldoz redüktaz sorbitol oluştururken NADPH’da kullanılmaktadır. Polyol yolağı oksidatif strese neden olmakta ve birçok başka yolağın aktifleşmesine katkıda bulunmaktadır (Askwith ve ark., 2009; Cubeddu ve Hoffmann, 2002 ve McFarlane ve ark., 2001).

1.5.2. İleri Glikasyon Ürünleri (AGE)

Enzimatik ve nonenzimatik glikasyon ürünleri oksidatif stres mekanizmalarını da aktifleştirerek çeşitli olumsuzluklarla sonuçlanmakta ve komplikasyonların şekillenmesinde rol oynamaktadır. Özellikle protein ve lipitler gibi organik moleküller nonenzimatik olarak 1912 yılında Maillard tarafından keşfedilen ve kendi adıyla adlandırılan Maillard reaksiyonu şekillendirmekte ve Schiff bazı oluşturarak sonrasında daha stabil hale gelmekte sonuçta Amadori ürünleri oluşmaktadır. Proteinler ve Lipitlerin Schiff bazı oluşturması ortamdaki şekerlerin varlığı ile olmaktadır. Özellikle proteindeki amino grubu ile kondenzasyon ürünü oluşturmaktadır. İndirgeyici şekerlerin karbonil grupları tepkimeye girmekte dolayısıyla kronik hiperglisemi durumunda ortamdaki glikoz AGE oluşumu için bulunmaz bir fırsat oluşturmaktadır. Tabi öncesinde oluşan amadori ürünleri hemen

AGE oluşturmamakta, aradan bir süre geçmesi gerekmektedir. İşte bu glikasyon ürünleri diyabette yeri çok önemli olan HbA1c ve fruktozamindir. Diyabet tanısında özellikle HbA1c oranları çok önemlidir. Ortalama 3 aylık kan şekeri sonuçlarını verdiği için anlık glikoz ölçümüne tercih edilmekte ve %6,5 ve üzeri çıkan sonuçlar diyabetik olarak kabul edilir (ADA, 1998; Altan ve ark., 2006; Deedwania, 2000 ve Kılınç, 2011).

AGE oluşumuna neden olan bir diğer durum ise amadori ürünlerinin dikarbonil bileşiklere dönüşmesidir. Genelde oksidatif streten kaynaklı oluşmaktadırlar. AGE'ler kendilerine ait reseptörlere bağlanarak işlev gösterirler ve bu reseptörlere bağlandıktan sonra da genelde reaktif oksijen türlerini (ROS) oluşturmamakta ve daha fazla oksidatif strese neden olmaktadır. AGE'ler özellikle diyabette endotel bozukluğuna sebep olurlar ve metilglioksal oluşumunu arttırmakta, böylece oksidatif stres artmakta ve NO oluşumu azalmaktadır. Aminoguanidin gibi AGE inhibisyonunu sağlayan tedavi yöntemleri dışında antioksidan madde kullanımı veya şelat oluşumunu destekleyen (aspirin vb.) ilaçlar da diyabet komplikasyonlarının ve AGE oluşumlarının önlenmesi için kullanılmaktadır (Parmaksız, 2011 ve Stirban ve ark., 2006).

1.5.3. Glikozun Oto-oksidasyonu

Fizyolojik koşullarda glikozun çoğu elektron transport zincirine katılarak enerji üretir ve bu işlem esnasında ise süperoksit radikalleri oluşur. Hiperglisemi kronik bir hal aldığında ise daha fazla süperoksit radikalleri oluşarak, oksidatif hasara neden olmaktadır. DM'nin oksidatif stres hasarını ilk başlatan olayın bu olduğu düşünmektedir. Reaktif oksijen türleri özellikle oksijen radikalini oluşturmakta ve oksijen radikalinin Nf-κB yolağını aktifleştirdiği varsayılmaktadır. Daha sonra protein kinaz C yolağı devreye girerek daha fazla ROS ve RNS (reaktif nitrojen türleri)

retmekte ve bu Şekilde oksidatif stres baŐlatılmaktadır (Harris, 1993; Johansen ve ark., 2005 ve Memişoğulları, 2005).

1.5.4. Protein Kinaz C Aktivitesi (PKC)

Aslında diğer yolakların aktifleŐmesine neden olmaktadır. Nf-κB'yi özellikle endotel hücrelerinde aktifleŐtirmekte ve damar endotelindeki komplikasyonlara neden olmaktadır. Hiperglisemide NADH ve NAD oranı artması sonucu diaćilgliserolun ortamda artması ve makrovasküler komplikasyonlarının artıŐı ile PKC'nin aktive olmasıyla olaylar baŐlamakta, PKC aktivasyonu aynı zamanda mitojen aktive edilmiŐ protein kinazı (MAPK) da aktive etmektedir. Bu durum ateroskleroz ve apoptozise yol aćmakta ve bunu sağlayan ısı Őok proteinleri ve c-JNK kinazlardır. Antioksidanlar PKC aktivasyonunu önlemektedir. Vasküler endotelyal büyüme faktörünü (VEGF) indükler ve damarlaŐmayı arttırarak endotelyal komplikasyonların artmasına neden olmaktadır (MemiŐoĐulları, 2005; UKPDS, 1998 ve Vincent ve ark., 2004).

1.5.5. Heksozamin Yolu

Artan glikozun dengelenmesini sağlayan bir diğer yolak ise heksozamin yoludur. İnsulin direnć mekanizmasını destekleyen bir yolak olup aynı zamanda beta hücre bozulmasını arttırır. Fruktoz-6-fosfat heksozamin yoluna girmekte ve fruktoz-6-fosfat amidotransferaz enzimi ile glukozamin-6-fosfata dönüşmekte daha sonrasında da UDP-N-asetilglukozamine dönüşmektedir. Bu rn glikozaminoglikanların öncül maddesidir. UDP-N-asetilglukozamin daha sonra O-GlcNAc (O-N-asetilglukozamin) dönüşmekte ve dokuda birikmektedir. UDP-N-asetilglukozamin proteinlerin posttranslasyonel modifikasyonlarını hızlandırmaktadır (Buse, 2006; Du ve ark., 2003 ve Goldstein, 2002).

Başlıca devreye giren bu alternatif yollar dışında yine birçok hastalıkla birlikte diyabette de devreye giren başka sinyal yolları da mevcuttur. Oksidatif stres artışı proapoptotik genlerin uyarılmasından sorumlu olan JNK yolağının aktivitesini de uyarmakta ve bu yolla birlikte beta hücrelerinin ölümü görülmektedir. Normal bir beta hücresinde süperoksit dismutaz, katalaz ve glutation peroksidaz (GPx) enzimleri daha az bulunduğu için reaktif oksijen türlerini oluşturma meyli daha fazladır (Dhanasekaran ve Reddy., 2008 ve Grankvist ve ark., 1981). Kronik hale gelen oksidatif stres NfκB, JNK/SAPK ve p38 gibi bir dizi strese duyarlı sinyal yolağını aktifleştirdiği ve IRS proteinlerinin fosforilasyonunu bozduğu bilinen bir durumdur. Bu 3 sinyal yolağı da serin/threonin protein kinaz ailesine mensuptur ve ve aktifleştiklerinde insulinin sinyal yolağındaki IRS proteinlerini fosforile ederek tirozin fosforilasyonunu sekteye uğratmakta, artmış IRS-1 serin fosforilasyonu ise bize insulin direncini göstermektedir (Rains ve Jain, 2011).

1.5.6. Sitokinlerin Rolü

Sitokinler, çeşitli vücut bölümlerindeki farklı hücre tiplerinin işlevlerini uyumlu bir bağışıklık yanıtına entegre ettikleri bağışıklık sistemindeki hücreler arası habercilerdir. Son zamanlarda sitokinlerin hastalıklarla olan ilişkisi ayrıntılı olarak incelenmektedir. Sitokinlerin aktivasyonu, antijene özgü olmayan bir şekilde bir konağın sisteminde, sağlığa zararlı olabilecek uygunsuz cevaplardan kaçınmak için düzenlenebilir. Sağlıklı bireylerde sitokin hareketi, sadece antijen veya güçlü inflamatuvar uyarılara, hücre dışı sıvılar ve bölmelerdeki sitokinlerin kısa yarı ömrü ve hem aktif hem de aktive olmamış yüzeydeki kısıtlı reseptör ekspresyon profillerine yanıt olarak geçici üretimleriyle hedef hücrelerin yanı sıra diğer mekanizmalar aracılığıyla da düzenlenmektedir. Patolojik hastalık ile sonuçlanan sitokin düzensizlik örnekleri de olup, sitokinlerin reseptörlere bağlanması sonucu fizyolojik tepkileri arasında hücresel ve humoral immün yanıtın gelişmesi, inflamatuvar yanıtın uyarılması, hematopoezin düzenlenmesi, hücresel proliferasyonun kontrolü ve farklılaşması ve yara iyileşmesinin indüklenmesi gibi olaylar gerçeklemektedir. Bunun dışında,

sitokinler sıklıkla diğer sitokinlerin sentezini indüklerler ve bu da, sitokinlerin, onu salgılayan eski sitokinlerin aktivitesini etkilediği bir döngüye neden olmaktadır. (Gulati ve ark., 2016 ve Testar, 2018)

Özellikle diyabette salınımı artan veya azalan Sitokinler ele alınacak olursa bunlar: Tümör Nekroz Faktör alfa (TNF- α), Interferon gamma (IFN- γ), Interlökin-1alfa, Interlökin-1beta, Interlökin-6, Interlökin-7, Interlökin-8, Interlökin-10, Interlökin-12, Interlökin-18, Interlökin-21 ve Interlökin-33 olarak sıralanabilir. Bunlardan kimi yalnızca Tip 1 diyabet üzerinde etkiliyken bazıları yalnızca tip 2 diyabet bazıları ise her ikisi üzerinde de etkili olabilmektedir. Bu sitokinlerin başlıcalarından biri TNF-alfa'dır. Çünkü çok sayıda çalışma hem kültürlenmiş adiposit hem de tüm hayvan modellerinde TNF-alfa'nın insulin direncinde bir role sahip olduğunu göstermiştir. Hücrelerin veya dokuların fizyolojik insulin düzeylerine yanıt verme yeteneğinin azalması olarak tanımlanan insulin direnci ise tip 2 diyabetin birincil kusuru olduğu bilinen bir gerçektir. Bununla birlikte TNF-alfa inflamatuvar bir sitokin olup proinflamatuvar bir sitokin olan Interlökin-6'nın salınımını aktive etmektedir (Chen ve Goeddel, 2002; Kabayama ve ark., 2005 ve Yarım ve ark., 2016).

1.5.7. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türlerinin antioksidanlara baskın geldiği durumlarda oluşan bir olaydır. Fizyolojik koşullarda bile ROS'lar üretilmeye devam etmekte, solunum zincirinin ardından elektron transport sistemine geçişte enerji üretilirken bile serbest radikaller oluşmakta ve bunlar da oksidatif strese neden olmaktadır. Önemli olan oluşan serbest radikallerin, antioksidan mekanizmalarca dengelenmesi ve oksidatif stres oluşturmamasıdır. Serbest radikaller kararsız yapıda ve dış orbitallerinde ortaklanmamış elektron bulunduran yapılardan olup kararsız yapıları nedeniyle en hızlı şekilde bir yere bağlanarak kararlı yapıya gelmeye çalışmaktadır. Moleküler oksijenin bir kısmı elektron alarak reaktif oksijen

türlerini oluşturmaktadır. Moleküler oksijenin bir elektron almasıyla süperoksit radikalleri (O_2^-), iki elektron almasıyla hidrojen peroksit (H_2O_2) ve 3 elektron almasıyla hidroksil radikali ($OH^\bullet$) oluşur. Özellikle süperoksit radikali çok reaktiftir (Rayne ve ark., 2009 ve Sarma ve ark., 2010).

Nitrik Oksit (NO-) düşük dozlarda yararlı etkilere sahiptir ve nitrik oksit sentaz (NOS) ile L-arjininden sentezlenmektedir. Özellikle kas gevşemesinde rolü olmasına rağmen patojenlere karşı savunma sisteminde rol oynaması gibi önemli fonksiyonlara da sahiptir. Fizyolojik durumlarda olduğu kadar fizyopatolojik durumlarda da NO görülmektedir. Örneğin NO ile süperoksit radikali bir araya gelerek çok daha zararlı olan peroksinitriti oluşturabilmektedir. Bu oluşan radikal ise direkt olarak proteinleri etkiler ve onlara zarar verir. Aslında az miktarda ROS ve RNS metabolizmadaki enzim reaksiyonları ve biyolojik devamlılık için gereklidir. Ne zaman ki gerekli olduğu miktarı aşmaya başladığında (homeostazis bozulur) organik moleküllerle kararlı hale gelerek canlı hücrelerinde bozulma ve DNA'da hasar oluşmaktadır. Bu oldukça hassas bir çizgidir (Guardia ve ark., 2001; Gutteridge, 1995; Pekcan ve ark., 2011 ve Tunçtan ve Abacıoğlu, 1998).

Serbest radikal oluşumuna sebep olan birçok neden vardır ve iki şekilde adlandırılmaktadır. Bunlardan biri olan endojen faktörler; stres, hastalık, yaşlılık, enfeksiyon gibi alt nedenlerken diğeri olan eksojen faktörler; sigara, alkol, radyasyon, UV, pestisitler ve beslenme gibi dış etmenlerdir. ROS'ların en çok neden oldukları oksidan oluşumu lipit peroksidasyonudur (LPO). LPO ürünleri oldukça yıkıcıdır çünkü oluşumu engellenemezse otolize kadar zincirleme hasar oluşturur. Lipit peroksidasyon ürünlerinden olan Malondialdehit (MDA) 3 karbonlu bir dialdehittir ve zar yapısını değiştirerek hasar verir. Diğer lipit peroksidasyon ürünleri arasında hegzenal ve 4-hidroksinonenal örnek verilebilir (Akkuş, 1995; Basaga, 1990; Cighetti ve ark., 2002; Çaylak, 2011; Esterbauer ve ark., 1991 ve Gutteridge, 1995).

Diyabetin başlaması ve ilerlemesinde oksidatif stresin birebir rol aldığı uzun sürelerdir bilinen bir gerçek olup diyabetik komplikasyonun olduğu organlar incelendiğinde oksidatif stresin o dokularda arttığı tespit edilmiştir. Diyabette açığa çıkan oksidatif stresin birincil kaynağı elektron transport zincirinde oluşan süperoksit radikalındır. Devamında daha önce bahsedilmiş olan yolaklar işin içine girmekte hiperglisemi kontrol altına alınamadığı sürece oksidatif stres sürekli olarak oluşmaya devam etmektedir (Altan ve Dinçel, 2006 ve Giacco ve Brownlee, 2010).

1.6. Antioksidan Mekanizma

Bu mekanizma canlılar için oldukça önemlidir çünkü oluşan ROS'ların oksidatif stres oluşturmalarını engellerler, vücudun en önemli savunma mekanizmalarından biridir. İlk olarak serbest radikallerin oluşumunu önleyerek görevine başlamaktadır. Serbest radikallerin oluşumu durumunda onları etkisiz hale getirmek de bir diğer görevidir. Bu etkisini gösterirken antioksidan enzimler oluşan radikallerin daha etkisiz hale gelmesinde yardımcı olurlar ki buna scavenging yani toplayıcı etkisi denmektedir. Ayrıca antioksidanların bastırıcı, onarıcı ve zincir kırıcı etkileride mevcuttur. Zincir kırıcı etki özellikle Hemoglobin, mineral maddeler ve seruloplazmin gibi antioksidan etkiye sahip molekülleri kapsamaktadır (Halliwell, 1990 ve Rodwell ve ark., 2018).

Antioksidanlar endojen ve eksojen antioksidanlar olarak sınıflandırmak mümkündür ancak bunlarda kendi içinde ayrıca sınıflandırılmaktadır. Endojen yani doğal antioksidan mekanizmalar primer ve sekonder olarak ikiye ayrılmaktadır. Primer endojen antioksidanlar arasında süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), Glutasyon peroksidaz (GPx), Glutasyon S-transferaz (GST) ve glutasyon redüktaz (GR) enzimleri sayılabilir. SOD özellikle oksijeni fazla kullanan dokularda yani süperoksit radikallerini oluşturan dokularda onun etkisini azaltır ve detoksifikasyon basamağını oluşturur. CAT enzimi ise genelde karaciğer, böbrek ve eritrositlerde

aktivite göstermekte ve oluşan H_2O_2 'yi su ve moleküler oksijene parçalar. GPx, glutasyon aracılığıyla H_2O_2 'nin indirgenmesinde rol oynayan enzimdir. GPx'in 2 farklı rolü olup bunlardan ilki H_2O_2 'yi indirgemekken diğeri organik hidroperoksitleri indirgemektir. Bu enzime hemen hemen her dokuda rastlanılmaktadır ancak en çok bulunduğu dokular eritrosit, karaciğer ve böbrektir. GST'ler birçok izoenzime sahiptirler buna bağlı olarak birçok dokuda eksprese edilebilmektedirler. Etkileri de GPx'e benzemektedir. GR ise pentoz fosfat yolunda üretilen NADPH'ı $NADP^+$ 'ya çevirmekte ve hidrojen açığa çıkarmaktadır. Açığa çıkan hidrojen ise okside glutasyonun redükte glutatyona indirgenmesini sağlamaktadır. Dolayısıyla NADPH oluşumu bu mekanizmanın devamlılığı için önemli bir maddedir (Adachi ve ark., 1990; deHaan ve ark., 1998; Harris, 1992; Knapen ve ark., 1999 ve Özkan ve Fışkın, 2004).

Sekonder antioksidanlar arasında en önemli olan madde glutasyon tripeptitidir. İçerisinde bulunan tiyol grubu sayesinde antioksidan özellik kazanmakta, hidroksil radikallerini temizlemekte ve ksenobiyotiklerin zararsız hale getirilerek idrarla atılımını sağlamaktadır. Yine endojen antioksidan olup nonenzimatik çalışan önemli antioksidanlar mevcuttur bunlar melatonin, ürik asit, bilirubin, albümin, koenzim Q10, selenyum, alfa-lipoik asit, transferrin, ve seruloplazmindir. Melatonin, GPx'in indüklenmesini sağlar ve H_2O_2 'nin suya indirgenmesinde rol alır. Ürik asit her ne kadar atık madde olarak tanımlansa da kanın total antioksidan kapasitesinden sorumlu olup çok iyi bir süpürücü etkiye sahiptir. Albumin ise plazmadaki en önemli antioksidan proteindir (Akkuş, 1995; Halliwell ve Gutteridge, 1999; Kumar ve ark., 2015; Mytilineou ve ark., 2002; Roche ve ark., 2008 ve Sen ve Chakraborty, 2011).

Eksojen antioksidanlar denildiğinde akla ilk gelen vitaminler olsa da eksojen daha birçok antioksidan madde mevcuttur. Vitaminlerden antioksidan özelliğe sahip olanlar alfa-tokoferoller yani Vitamin E, beta-karotenler yani Vitamin A, Vitamin C olarak bilinen Askorbik asit ve folik asit (B9)'dir. Vitamin E genelde serbest radikalleri sabitlerken onları zararsız hale getirmektedir. Ayrıca zincir kırıcı etkileri olup birçok yönden antioksidan etkiye sahiptir. Bu yüzden antioksidan kapasitesi

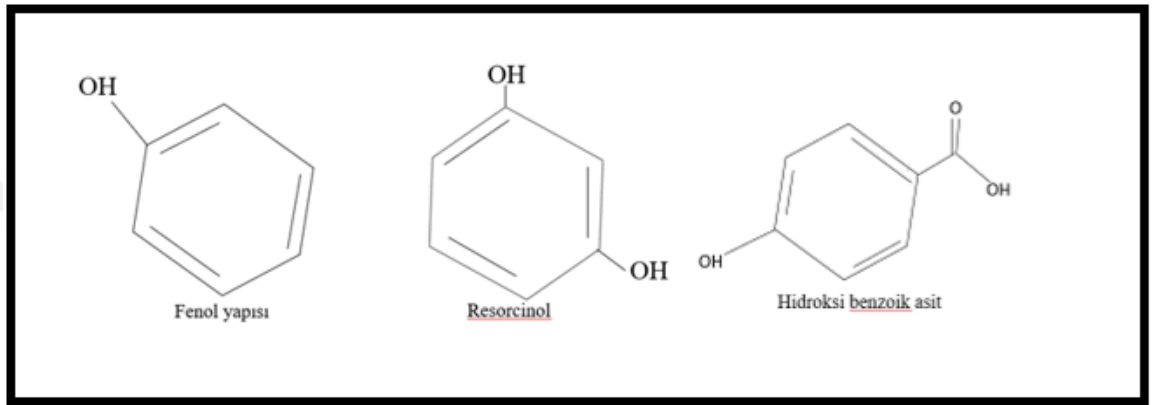
oldukça güçlüdür. Hem antioksidan etkisi sayesinde birçok reaktif oksijen türlerini temizleme, hem de ferrik (Fe^{+3}) iyonunu ferröz (Fe^{+2}) iyonuna indirgeyerek oksidatif etki gösteren Vitamin C ise daha karmaşık bir etkiye sahiptir. Provitamin olan beta-karoten en güçlü singlet oksijen temizleyicisidir ve antioksidan etkileri yapılarındaki konjuge çift bağdan kaynaklanır. Folik asit bir diğer deyişle vitamin B9 ya da Vitamin M, DNA sentezinde oldukça önemli olup aynı zamanda kırmızı kan hücre üretiminde de görev almaktadır. Çok önemli metabolik görevlerinin yanında bir de plazma homosistein seviyelerini düşürmede antioksidan rol üstlenmektedirler. (DiMascio, 1991; Dünder ve arslan, 1999; Hussein ve ark., 2012; Sen ve Chakraborty, 2011 ve Title ve ark., 2000).

Eksojen Antioksidanlar grubunda yer alıp ilaç veya doğal ürünler olarak kullanılan maddeler de vardır. Bunlardan örnek olarak Trolox, Ksantin oksidaz inhibitörleri, NADPH oksidaz inhibitörleri, rekombinant süperoksit dismutaz, Asetilsistein, mannitol, demir şelatörleri gibi kimyasallar genelde ilaç olarak kullanılırken, doğal ürünler genelde içerilerinde bulunan fenolik veya flavonoid maddelerin antioksidan etkileri sayesinde yararlı hale gelmektedir. Fenolik bileşikler, antioksidan özelliklerini aynı zamanda: antialerjik, antienflamatuvar, antidiyabetik, antikarsinojenik, antimikrobiyal, antitrombotik gibi yetenekleri ile birlikte gösterirler. Bitki, meyve ve diğer gıdaların antioksidan içeriklerinin araştırılması son yıllarda çok önem kazanmış ve insan ve hayvan sağlığında öne geçmeye başlamıştır (Burak ve Çimen, 1999; Scalbert ve ark., 2005 ve Sen ve Chakraborty, 2011).

1.6.1. Doğal Ürünler ve Fenolik Bileşikler

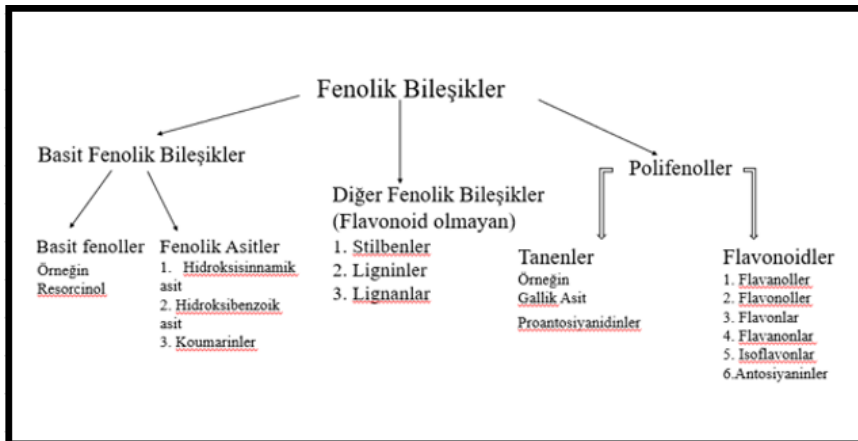
Bir diğer adıyla polifenoller olarak da bilinen fenolik bileşikler, aromatik benzen halkasına sahip maddeler olup meyve ve sebzelerin biyolojik olarak aktif maddelerini oluşturmaktadır. Polifenoller, gıdaların tatlarını, renklerini ve hatta kokularını belirleyen antioksidan özelliğe sahip bileşiklerdir (Dragovic-Uzelac ve ark.,

2007). En basit yapıdaki fenolik bileşikler bünyesinde bir adet fenol grup içeren basit fenoller ve fenolik asitlerdir. Fenolik asitler (karboksilik asit içermektedirler) ise kendi içinde hidroksisinnamik asit, hidroksibenzoik asit ve koumarinler olarak üçe ayrılmaktadır. Asıl önemli olan polifenoller ise flavonoidler ve tanenler olmak üzere iki alt başlıkta incelenmektedir (Mamari, 2021). Aşağıda verilen Şekil 1.3’de fenolik bileşiklerde bulunan fenol grubu ve bazı basit yapıları fenolik bileşikler verilmiştir.



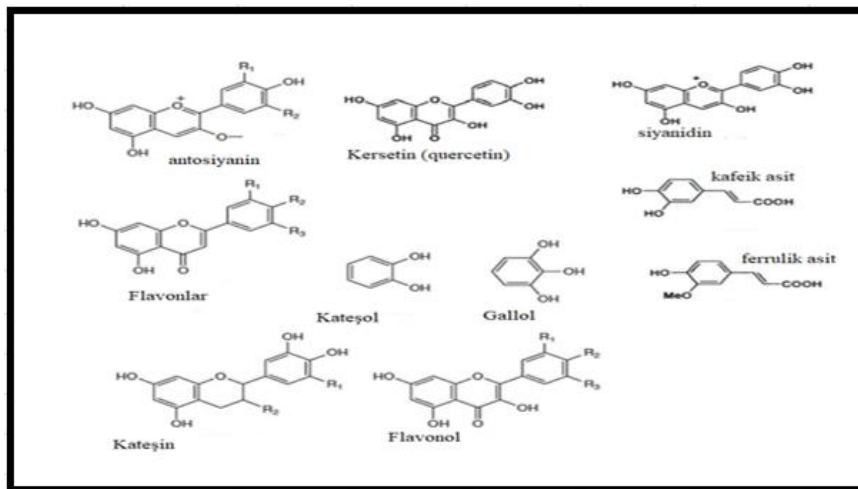
Şekil 1.3. Fenol ve basit yapıları fenolik bileşikler.

Flavonoidler asıl önemli olan, kırmızı ve mor meyve ve sebzeye koyu rengini veren çok güçlü antioksidan etkiye sahip doğal ürünler olup kendi içinde flavanoller, flavonoller, flavonlar, flavanonlar, isoflavonlar ve antosiyanininler olarak 6’ya ayrılmaktadır. Flavonoid olmayan doğal ürünler ise stilbenler, ligninler ve lignanlar olarak 3’e ayrılmaktadır. Tüm bu ürünler kendi içinde ayrı ayrı gruplara ayrılır. Şekil 1.4’de Fenolik Bileşiklerin sınıflandırılmasına yer verilmiştir (Mamari, 2021).



Şekil 1.4. Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması.

Obezite ve prediyabette, kronik olarak yükselmiş insulin seviyeleri mitokondriyal solunumun artmasına ve sonuçta reaktif oksijen türlerinin oluşumunun artmasına neden olmaktadır. Yükselen ROS üretimi, antioksidan savunmaların nötrleştirme kapasitesini arttırmakta ve oksidatif strese neden olmaktadır. Uzun süreli oksidatif stres kas ve yağ dokusunda glikoz alımını bozar ve pankreas beta hücrelerinden insulin salgılanmasını azaltmakta, böylece Tip 2 diyabetes mellitusun patolojik sürecini hızlandırmaktadır. Meyve ve sebze alımını arttırıcı yönde bir beslenme şekli oluşturmak kronik dejeneratif hastalıkların oluşumunu önlemede oldukça yararlıdır. Böylelikle hem obezite önlenmiş olur hem de obezitenin sonucunda oluşan T2DM'a yakalanma riski azaltılabilmektedir. Bu meyve ve sebzelerin önemi içerdikleri polifenollerden ileri gelmektedir. Bu polifenollerin en önemlileri ise kateşin, resveratrol, lipoik asit ve antosiyaninlerdir. Tsuda ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada C57BL / 6 J farelerine, mor mısır rengine antosiyanin içeren (diyetten 2 g/kg) ve içermeyen yüksek yağlı diyet, 12 haftalığına verilmiştir. Antosiyanin takviyesinin yüksek yağlı diyetin yol açtığı vücut ağırlığı kazancını ve beyaz ve kahverengi yağ dokusu içindeki yağ birikimini önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir. Antosiyaninler serbest radikal temizleyiciler, hidrojen veren bileşikler, tekli oksijen söndürücüler ve metal iyonu şelatörleri olarak görev yapabilir ve bu nedenle oksijen radikal emme kapasitesi ve ferrik indirgeyici antioksidan potansiyeli gibi antioksidan özelliklerin in vitro analizlerinde yüksek derecede yer almaktadır (Guo ve ark., 2015 ve Tsudo ve ark., 2003). Şekil 1.5'de önemli bazı fenolik maddeler verilmiştir.



Şekil 1.5. Meyve ve sebzelerde yer alan önemli fenolik maddeler.

1.6.1.1. Karayemiş (*Laurocerasus officinalis*)

Karayemiş adıyla da bilinen taflan bitkisi Türkiye’de Karadeniz bölgesinde özellikle Trabzon, Ordu ve Samsun bölgelerinde *Laurocerasus officinalis* cinsi Spermatophyta bölümünün Angiospermae altbölümü, Dicotyledonae sınıfı, Rosaceae familyası, Prunoideae alt familyası içerisinde yer alan kırmızı ve mor renkte bir yaz meyvesidir. Balkanlar, Kuzey İrlanda, Batı Avrupa, Güney ve Batı Kafkasya, İran, Doğu Marmara ve bazı Akdeniz lkelerinde de yetişmektedir. Genel olarak killi-kumlu topraklarda ve nemli ortamlarda, ılıman iklimlerde yetiştirilebilmektedir. Taflanın besin içeriği oldukça zengindir özellikle Ca, Mg ve P yönünden zengin bir içeriğe sahiptir. Karbonhidrat içeriği protein ve yağ içeriklerine göre daha yüksektir. Su içeriği oldukça fazladır. Tüm bunların dışında Na, K, Fe de az miktarda mevcuttur. Lutein ve beta karotenden zengindir. Kısacası oldukça besleyici ve yararlı bir meyvedir. Bunun dışında Antioksidan içeriği yüksek bir meyvedir (Damlacı, 2009; Karaman ve ark., 2016 ve Karataş ve ark., 2018).

Bitkinin antioksidan etkisi ele alınacak olursa HPLC analizine göre elde edilen fenolik madde içeriğine göre fenolik asit ve flavonoid bakımından zengin bulunmuştur. Fenolik asitlerden; gallik asit, protokateşik asit, p-hidroksi benzoik asit, klorogenik asit, vanilik asit, kumarik asit gibi etkenler bulunmuştur. Flavonoidlerde ise kateşin ve antosiyaninlerin mevcut olduğu görülmüştür. Farklı fitokimyasal testler sonucunda özellikle bitkinin yapraklarında tanenler, alfa tokoferoller, steroller ve nişasta bulunmuştur. İnce tabaka kromatografi ile steroller belirlenmiştir. Bitkinin meyve kısımlarında yapılan çalışmalarda ise Fenolik asitler ve karboksilik asitlere rastlanmıştır. Tohum kısımlarında ise önemli yağ asiterine rastlanılmıştır (Damlacı, 2009 ve Karahalil ve ark., 2011).

Flavonoidlerin en önemli pigmenti olan Antosiyaninler, en önemli antioksidan etkili maddelerden biridir. Antosiyaninlerin biyosentezinde fenilpropanoid yolu söz konusu olup fenilalanin ile başlamaktadır. Bir takım karmaşık reaksiyonlardan geçerek

antosiyantinler oluşur ve hidroksilasyon, glikozilasyon ve metilasyon aşamalarına uğrayarak sağlam renkli yapısını almaktadır. Antosiyantinler güçlü antioksidanlar olup birçok hastalığa karşı olumlu etkisi önemli inceleme konularındandır. Antioksidanlar vücudumuzdaki oksidatif stresi azaltmak ve bunlardan kaynaklı oluşabilecek hastalıkları önleyebilecek önemli maddelerdir. Bu yüzden özellikle son yıllarda giderek daha büyük önem kazanmaya başlamıştır (Karabulut ve ark., 2016 ve Keleş, 2015). Şekil 1.6’de karayemiş meyvesi verilmiştir.



Şekil 1.6. Karayemiş meyvesi.

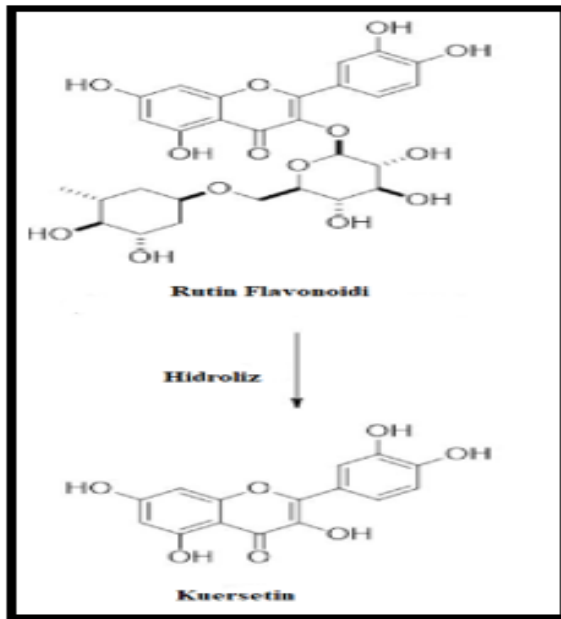
1.6.1.2. Rutin Flavonoidi

Flavonoid rutini (quercetin 3-O rutinoside), flavonol quercetin ve disakarit rutinozundan oluşan bir flavonol glikozittir. Adı içerisinde rutin bulunan *Ruta graveolens*ten gelir. Rutin, *Viola tricolor* (% 3,36), *Capparis spinosa* (% 0,28), Elma (% 0,17), *Lycopersicon esculentum* (%0,002-%0,009) ve daha pek çok bitkide bulunan bir sitrus flavonoid glikozittir. Rutin, 'clingstone' şeftalilerinde bulunan başlıca flavonollerden biridir ve en yoğun bulunduğu kaynak karabuğdaydır. Rutin, hücre içi askorbik asit seviyelerini artırma, kılcal geçirgenliği ve kırılabilirliği azaltma, oksidanları ve serbest radikalleri azaltma yeteneğine sahiptir, kemiklerin tahrip edilmesini önler, aynı zamanda kalp hastalıkları riskini azaltır. Diyabetik sıçanlara rutin uygulaması gıda tüketimini azaltır ve vücut ağırlığını iyileştirmektedir ve bu

durum diyabetik sıçanlarda hiperglisemik durumun daha iyi kontrolüne bağlı olabilmektedir (Gupta ve ark., 2014 ve Kamalakkannan ve ark., 2005).

İnsan çalışmalarında alınan sonuçlara göre rutin in ince barsaktan çok az emildiği ve 9 saat sonra plazma da pik yaptığı bulunmuştur. Absorbe edildikten sonra glukuronidasyon, metilasyon ve sülfatlanma aşamasından geçerek kan dolaşımına geçmeden önce hepatosit ve enterositlere geçer. Kanda ise albümin ile taşınır ve kan beyin bariyerini dahi geçebilir. Quercetin kolon, karaciğer, kas, böbrek, akciğer ve beyinde bulunabilir ve atılımı böbreklerden olur (Boyle ve ark., 2000 ve Graf ve ark., 2006).

Rutin RAW 264.7 hücrelerine sitotoksik etkisi araştırılmış olup MTT analizi yapılmıştır ve 0,1; 1,0; 10; 30; 50 ve 100 μ M konsantrasyonda kullanılmıştır. 50 μ M doza kadar hücre canlılığını azaltıcı etkisi bulunmazken 100 μ M dozda hücre canlılığında bir azalma meydana gelmiştir (Lee ve ark., 2015). Şekil 1.7’da rutin flavonoidinin kimyasal yapısını ve hidroliz ürünü olan kuersetinin yapısı verilmiştir.



Şekil 1.7. Rutin ve hidroliz ürünü olan kuersetinin yapısı (Slamova ve ark., 2018).

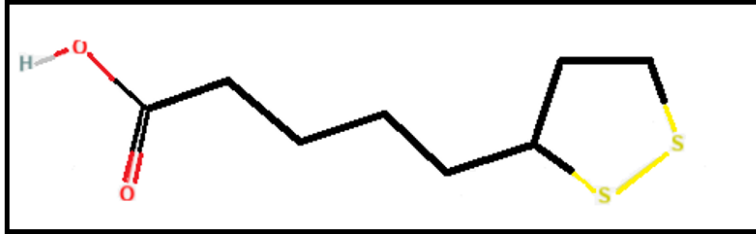
1.6.1.3. Alfa Lipoik Asit

Düşük molekül ağırlığa sahip ve tiyol grubu ihtiva eden alfa lipoik asit de novo olarak sentezlenir. Sentezlenme lipoik asit sentaz tarafından ve mitokondride gerçekleşmektedir. Sitrik asit siklusunun da önemli bir kofaktörüdür. İndirgeme özelliği oldukça yüksek olan bu molekül ditiyolan halkasına sahiptir. Fizyolojik olarak sentezlenebilen bir molekül olduğu için eksojen kullanımı ve hatta ilaç olarak kullanımı oldukça yaygındır. Nitrik oksit sentaz (NOS) ve P₄₅₀'yi inhibe etme özelliğine sahiptir. Tiyol bileşiği içerdiği için ortamda O₂, H₂O₂ veya OH gibi radikallerin varlığında prooksidan etkisi de olabilmektedir. Hemen hemen tüm hücreler lipoik asiti dihidroksilipoik asit (DHHA)'e çevirir ancak lipoik asitin antioksidan etkisi DHHA kadar yüksek değildir (Çakatay, 2006; Goralska ve ark., 2003 ve Liang ve Akaike, 2000).

Tip 2 diyabette artmış kan glukozunu düşürebilme yeteneğine sahip olan lipoik asitin bu etkisinin nerden geldiği hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Bununla ilgili ortaya atılan bir fikir, lipoik asit bileşiğinin hafif prooksidan etkisinin diyabetteki indirgeyici stres üzerine azaltıcı etkisinin olması ve oksidatif strese karşı adaptasyona yol açabilmesi şeklindedir (Roy ve ark., 1997). İnsulinle aktive olduğu ve böylelikle hipoglisemik ajan olarak görev alabildiği de düşünceler arasındadır. Oksitlenmiş lipoik asit glikoz alımını uyarır. Kısa süreli LA uygulamalarında oksidatif stres kolaylaşırken uzun süreli uygulamalarda hücre içi glutatyon düzeyleri artmış ve glikoz alım oranını azaltmıştır (Moini ve ark., 2002 ve Mottley ve Mason, 2001).

Alfa-lipoik asit içerdiği bilinen brokoli, havuç, ıspanak gibi sebzelerinde lipoik asit sayesinde antioksidan etkileri bilinmektedir. Oral lipoik asit takviyesinin etkileri üzerine 12 hasta topluluğuna sahip bir çalışma, diyabetik hastalarda insulin duyarlılığını arttırdığını göstermiştir. Obez hastalarda yapılan 12 haftalık bir çalışma, alfa-lipoik asit alımının (1.000 mg/gün), egzersiz yapılmadan alındığında LDL'nin aterojenitesini artırabileceği ve böylece ateroskleroz patogenezinin ve kardiyovasküler

hastalığın gelişimine katkıda bulunabileceği sonucuna varmıştır. Bununla birlikte, egzersizle birleştirildiğinde, bu aterosjenik etki ortadan kalkmış ve takviye faydalı olmuştur (Abdali ve ark., 2015). Şekil 1.8’de alfa lipoik asitin kimyasal yapısını görebilirsiniz.



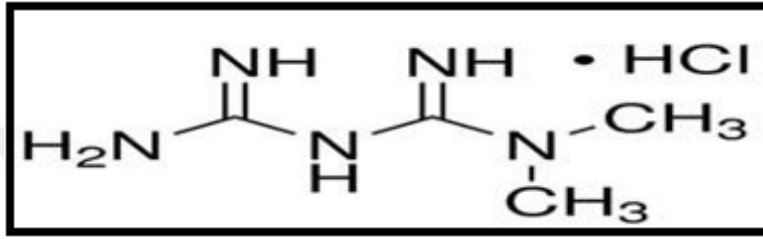
Şekil 1.8. Alfa Lipoik Asitin yapısı.

1.7. Metformin

Özellikle tip 2 diyabette hipergliseminin şiddetini azaltmak adına kullanılan bu ilacın etkeni neredeyse 1000 yıldır bilinmektedir. Avrupaya özgü olan *Galega officinalis* bitkisinin poliüriyi azaltıcı bir etkisi olduğu yıllarca bilinmekteydi ve bitki ekstraktlarında bulunan guanidin kalıntılarının aslında bu etkiye neden olduğu ancak 1930 yılında keşfedilebilmiştir. Bugünkü adıyla biguanidinler sentezlenerek bir ilaç geliştirilmiş oldu ve bugün hala antidiyabetik etkisi ile bilinen biguanidin içerikli ilaç metformindir (Chandalia ve ark., 2014).

Lipofilik bir ajan olan metformin mitokondri membran fosfolipitlerine bağlanarak etki gösterir. Hepatosit, iskelet kası hücreleri ve adipositleri hedef alır. Adenozin monofosfat (AMP) protein kinaz veya aktive protein kinaz ilk hedef aldığı enzimdir ve bu enzimler glikoz ve yağ metabolizmasında etkilidirler ve enerji üretimini düzenlerler. Hepatositleri hedef alırken glikoz üretimini azaltıcı olarak etki eder ve kaslarda ise glikojen sentezini destekleyerek kan glikoz seviyelerini sabit tutmaya çalışır. AMP kinaz aktivasyonu yoluyla etki ettiği için protein sentezinde azalma ve hücre sağkalımında yine azalma gibi etkileri de mevcuttur. Rat

alışmalarında glial hücrelerini yenilediği kanıtlanmıştır. En çok hissedilen bariz yan etkisi gastrointestinal sistemde bozukluktur. İşhal ve mide rahatsızlıklarına neden olmaktadır. Kullanım dozu azaltıldığında kendiliğinden dzelebilse de bazı durumlarda ilacın her dozuna karşı intolerans olabilir. Ciddi yan etkisi ise laktik asidoza sebep olabilmektedir ve bu durum genelde renal yetmezlik gelişenlerde görülmektedir (DeFronzo, 2011; Holt ve ark., 2010; Pijl ve ark., 2000; Speakman ve ark., 2012 ve Via ve ark., 2010). şekil 1.9’de metforminin yapısını görebilirsiniz.



şekil 1.9. Metformin HCl’in yapısı.

1.8. Amaç

Diyabetin yaygınlaştığı ve oldukça önem kazandığı ve diyabete bağlı komplikasyonların ve ölümlerin arttığı düşünüldüğünde kullanılan ilaçların etkinliği ve hastalığın ilerlemesini durdurmak hayati önem taşıma boyutuna gelmiştir. Bitkilerde bulunan biyoaktif bileşiklerin araştırılması için sürekli çaba sarf edilmektedir, dolayısıyla bu alanda yapılan araştırmalar her yıl artmaktadır. Flavonoidler, patojenik mikroorganizmalar ve UV ışınlarından koruyarak bitkinin fizyolojik hayatta kalmasını sağlar. Ek olarak, flavonoidler, polinatrler ve tohum dağıtıcıları, morfojenez, cinsiyet tayini ve bitki-mikrop etkileşimlerini çekmek için çiçekler, meyveler ve tohumlar için pigmentasyonda yer alırlar. Aynı zamanda, meyve ve sebzelerin nutrasötik özelliklerine katkıda bulunurlar ve antioksidan, anti-inflamatuar, anti-alerjik, hepato-koruyucu, anti-trombotik, antiviral ve anti-kanserojen aktivitelere sahip oldukları uzun zamandır bilinmektedir. Flavonoidlerin sağlık üzerine etkileri, anahtar enzimlerle etkileşimlere, sitokinler ve transkripsiyon faktörlerini içeren sinyal kaskadları veya antioksidan sistemler ile ilişkilidir. Doğal bileşiklerin

ilaçlarla tedavide ikili kullanımı son yıllarda yeni tedavi stratejisinde umut verici bir yaklaşım haline gelmiştir. Özellikle antikanser ilaçların doğal ürünlerle kombinasyonu ile ilaç dirençlerinin ortadan kalkması ya da ilacın etkinliğinin artması ile daha düşük doz uygulamaları hem ekonomik hem de sağlık açısından fayda sağlamaktadır. Doğal bileşiklerin bu etkileri yanında ilaçlarla etkileşimleri sonucu ilacın etkinliğinde azalmaya da neden olabilmektedirler. Bu gibi durumlarda ise ilacın tedavi edici etkisi ortadan kalkmaktadır.

Bu tezde amaç metformin kullanan diyabetik hastaların metformin kullanımının yanında doğal ürünler takviyesinin metformin ile etkileşimlerini araştırmaktır. Doğal ürün olarak kan şekeri düzeyinde etkileri çeşitli çalışmalar ile ortaya konulan oldukça yüksek antosiyanin içeriğine sahip olan karayemiş meyvesi ekstraksiyonu ile alfa lipoik asit ve rutin flavonoidleri yer almıştır. Streptozotosin ve nikotinamid ile Tip2 diyabet oluşturulan ratlara metformin ve metformin ile alfa lipoik asit, rutin ve karayemiş ekstraksiyonunun kombinasyonları verilerek kan örneklerinde serum biyokimya, antioksidan ve oksidatif stres parametreleri ile diyabette önemli belirteçler olarak sayılan insülin, HbA1c, Fruktozamin ve Aldoz redüktaz analizleri ve doku örneklerinde yine oksidatif stres parametreleri ile birlikte aldoz redüktaz ve nitrik oksit analizleri yapılmış olup bu parametrelerdeki etkileri araştırılmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

Bu tez çalışması Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu izniyle (karar no: 2021-5-29) yapılmış olup, deneysel çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarında yürütülmüştür. Biyokimyasal analizler Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında ve histopatolojik incelemeler Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında yapılmıştır.

2.1.1. Kimyasal Malzemeler

Kimyasal madde adı	Üretici	Kat. No.
%85'lik fosforik asit	Honeywell Fluka	04107-1L
Alfa lipoik asit	Merck	62320-25G-F
Amonyum sülfat	Merck	A4418-1KG
Anhidr kalsiyum klorür	Merck	1023791000
Anhidr sitrik asit	Merck	791725-1KG
Bakırklorür	Merck	AL.222011-250G
Dimetil sülfoksit	Honeywell Fluka	41640-1L
EDTA	Merck	E9884-100G
Formaldehit	Merck	1040022500
Fosfat Buffer	Merck	P4417-100TAB
Gallik asit	Merck	G7384-100G
Glasiyel asetik asit	Honeywell Fluka	27221-1L
Glikoz	Merck	1083421000
Glisin	Honeywell Fluka	15527H-1KG
Glutatyon Reduktaz	Merck	9001-48-3
Hidrojen peroksit	Merck	H1009-500ML

Hidroklorik asit	Honeywell Fluka	FL07102-2,5L
İndirgenmiş glutatyon	Merck	G4251-5G
Ketamin %10	Richterpharma AG	Ketasol 10 mL
Ksantin	Merck	X7375-10G
Ksantin oksidaz	Merck	682151-50U
Ksilazin %2	Bioveta A.Ş.	Xylazin Bio 50 mL
Lityumsülfat	Merck	L6375-100G
Luperox	Merck	458139-1L
Metformin HCl	Novartis	Glukofen® 1000 mg
Methanol	Merck	1060092500
NADPH	Merck	10621706001
Nikotinamid	Merck	72340-100G
Nitrikoksit test kiti	Elabscience	E-BC-K035-S
Nitroblue tetrazolium	Merck	11585029001
p-fenil diamin	Merck	8072461000
Paraokson	Merck	36186-100MG
Rat Aldoz Redüktaz	BT LAB	E1221Ra
Rat Insulin ELISA kit	Elabscience	E-EL-R2466
Rutin	Thermofisher	A13570.22
Serum Alanin transferaz	Randox	AL8304
Serum Albumin	Randox	AB8301
Serum Alkalen fosfataz	Randox	AP8302
Serum Aspartat transferaz	Randox	AS8306
Serum fosfor	Randox	PH8328
Serum GGT	Randox	GT8320
Serum glikoz	Randox	GL8319
Serum HDL-C	Randox	CH8311
Serum kalsiyum	Randox	CA8309
Serum Kreatinin	Randox	CR8316
Serum Toplam Protein	Randox	TP8336
Serum trigliserit	Randox	TR8332
Serum toplam kolesterol	Randox	CH8310

Serum toplam bilirubin	Randox	BR8377
Serum Üre	Randox	UR8334
Sığır albumin	Merck	A2153-100G
Sodyum klorür	Merck	1064041000
Sodyum asetat trihidrat	Merck	1062671000
Sodyum hidroksit	Merck	S5881-1KG
Sodyum karbonat	Merck	223530-1KG
Sodyum molibdat dihidrat	Merck	M1003-500G
Sodyum tungstat dihidrat	Merck	223336-100G
Streptozotosin	Merck	S0130-1G
Total antioksidan test kiti	Relassay	RL0017
Total oksidan test kiti	Relassay	RL0024
Tris	Chem Cruz	SC-3715A
Trisodyum sitrat dihidrat	Merck	S1804-1KG

2.1.2. Sarf Malzemeler

Sarf Malzeme Adı	Marka	Kat. No.
2 cc enjektör	Beybi	21G
5 cc enjektör	Beybi	22G
1000 ul pipet ucu	LP ITALIANA	L151146
200 ul pipet ucu	Biosigma	N403366
10 ml cam pipet	Lamtek	LT1002811
1.5 cc eppendorf tüpleri	Isolab	078.03.002
2 cc eppendorf tüpleri	Isolab	078.03.003
15 ml Falcon tüpleri	Isolab	078.02.001
50 ml Falcon tüpleri	Isolab	078.02.003
Cam beher (50 mL)	Lamtek	LT1001270
Cam mezür (2000 mL)	Lamtek	LT1002100
EDTA'lı tüp	Hemalab	S0391
Kan alma tüpü (boş)	Hemalab	S0386

Cam balon joje (100 mL)	Lamtek	LT1001120
ELISA plate 96 well	Isolab	122.11.196
Manyetik balık	Lamtek	LT1002370
Cam Deney tüpleri	Isolab	077.01.005
Quartz Küvet	Isolab	098.01.008
Çelik spatül	Isolab	047.02.180
Havan ve Tokmağı	Lamtek	LT1001660
Cam Erlen (2000 mL)	Lamtek	LT1001580
Cam ayırma hunisi	Lamtek	LT1002831

2.1.3. Kullanılan Cihazlar

Cihaz adı	Marka	Model
Glukometre	Roche	Accu Chek Performa Nano
Hassas terazi	Precisa	XB220A
Serum Biyokimya Cihazı	Randox	Rx Monaco
Soğutmalı Santrifüj (6000)	Heraeus	Minifuge RF
Vortex	Heidolph	Reax 2000
ELISA okuyucu	Tecan	Sunrise RS 232
Spektrofotometre cihazı	Shimadzu	UV-1202
Vakumlu etüv	Heraeus	VTR5036
pH metre	Hanna Instruments	HI 221
Manyetik karıştırıcı	Biosan	MMS 3000
Etüv	Stuart	SI 500
Geri soğutucu	Elektro Mag	6M25
Buzdolabı	Vestel	COOL 540 HG
-80 °C dondurucu	Brunswick Scientific	U410 Premium
Soğutmalı santrifüj (10000)	Sigma	3K30
200 ul pipet	Socorex	Acura825/20-200µL
50 ul pipet	Socorex	Acura825/5-50µL
1000 ul pipet	Gilson	Y67303A

2.1.4. Karayemiş'in Temini

Ağustos 2019'da İstanbul/Pendik'e Katamonu ve Bartın illerinden getirilen karayemişler satın alınmıştır. Aynı gün içinde karayemişlerin meyve kısımları saplarından ayrılıp çekirdekleri çıkarılmış ve -20 °C'de kullanımına kadar muhafaza edilmiştir. Karayemiş ağacı (solda) ve meyvesi (sağda) Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Karayemiş ağacı ve meyveli dalının görünümü.

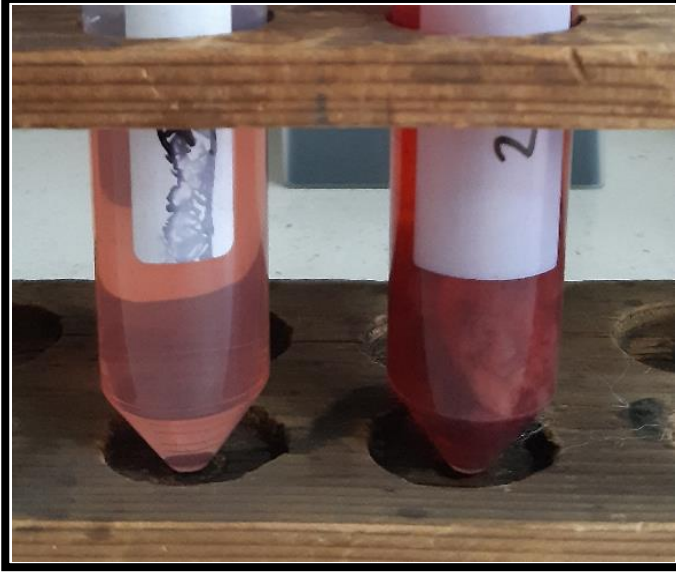
2.1.5. Deney Hayvanlarının Bakım ve Beslenme Koşulları

Çalışmada 60 adet, 8 haftalık erkek Wistar albino sıçanlar kullanılmıştır. Düzenli olarak 12 saat ışık ve 12 saat karanlık olacak şekilde ışık kontrolü sağlanmıştır. Su ve yem adlibitum olarak verilmiş olup kontrol grubuna yem ve su dışında hiçbir uygulama yapılmamıştır. Oda sıcaklığı 25-27°C'ye ayarlanmıştır. Kafeslerde 5 adet sıçan barındırılacak şekilde gruplandırılmıştır. Çalışmada özellikle erkek hayvanların tercih edilme sebebi insülin direnci oluşturmaya daha yatkın olmaları ve dişilerdeki östrojen hormonunun beta hücre hasarına karşı koruyucu etkinliğinin olmasındandır (King ve Austin, 2017).

2.2. Yöntem

2.2.1. Karayemiş'in Ekstraksiyonu

Karayemiş Ekstraksiyonu Ağcam ve Akyıldız (2015)'ın belirledikleri yöntem modifiye edilerek yapılmıştır. İlk olarak 5 gram (g) karayemiş meyvesi tartılmış ve havanda küçük parçalar haline gelene kadar ezilmiştir. Falcon tüplerine aktarılan karayemiş önceden hazırlanan metanolik ekstraksiyon çözeltisi (metanol:0,1N HCl, 85:15, v/v) ile 20 mL'ye kadar tamamlanmıştır (Bronnum-Hansen ve ark., 1985). Oda ısısında 20 dakika (dk) bekletildikten sonra yüksek devirde 30 saniye (sn) vortexlenmiştir. Tüpler 4.000 rpm'de 10 dk +4 °C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi tamamlandıktan sonra süpernatantlar başka bir tüpe ayrılmış ve bu işlem 50 mL ekstraksiyon elde edene kadar tekrarlanmıştır. Şekil 2.2'de Ekstraksiyon sonrası karayemişin görüntüsü verilmiştir.



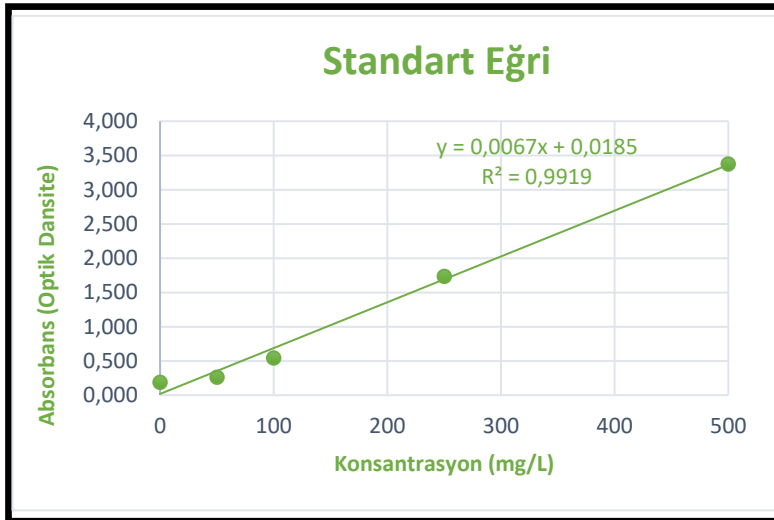
Şekil 2.2. Ekstrakte edilmiş karayemiş.

2.2.2. Total Fenolik Madde Tayini

Karayemiş, ekstraksiyona tabii tutulduktan sonra fenolik madde tayini Singleton ve ark. (1965)'nin geliştirdiği yönteme göre modifiye edilerek yapılmıştır. Standart olarak gallik asit (Roche® Germany) kullanılmıştır. Folin Ciocalteu yöntemi olarakta bilinen analizin yapılışında Folin Ciocalteu ayıracından 150 µL, %20'lik Na₂CO₃'tan 450 µL ve 30 µL'de karayemiş ekstraksiyon örneği/distile su/gallik asit çözeltisi (Örnek/Blank/Standart) eklendikten sonra distile su ile 3000 µL'ye tamamlanmış ve 45 °C'de 30 dk'lık inkübasyonun ardından oluşan mavi renkli bileşiğin absorbansı 765 nm'de spektrofotometrede okunmuştur. Standartlar, standart grafik oluşturulabilecek şekilde 0 mg/mL (Blank), 50 mg/L, 100 mg/L, 250 mg/L ve 500 mg/L konsantrasyonda hazırlanmıştır ve örnek, grafikte yerine yerleştirilerek gallik asit eşdeğeri cinsinden içeriği bulunmuştur. Analizin yapılışı Çizelge 2.1'de gösterilmiştir ve standart grafik Şekil 2.3'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Fenolik Madde Tayinin Yapılışı.

30 µL	Folin Ciocalteu Reaktifi	%20'lik Na ₂ CO ₃	Distile su
Örnek	150 µL	450 µL	2370 µL
Blank	150 µL	450 µL	2370 µL
Standart	150 µL	450 µL	2370 µL
45 °C'de 30 dk inkübe edildi 765 nm'de spektrofotometrede ölçüldü			



Şekil 2.3. Gallik Asit Standart Eğrisi

Çalışmada hayvanlara verilen karayemiş'in ekstraksiyonu 10 günde bir yenilendiği için her bir ekstraksiyon sonrası metanol uçurulmuş olup 1 mL DMSO'da çözdürüldükten sonra PBS ile 50 mL'ye tamamlanmış ve fenolik madde tayinleri paralel çalışılarak yapılmıştır. Fenolik madde tayininde inkübasyon sonrası oluşan mavi rengin görünümü Şekil 2.4'de verilmiştir.



Şekil 2.4. Fenolik madde tayininde inkübasyon sonrası gözlenen renk değişimi.

2.2.2.1. Folin Ciocalteu Ayırıcının Hazırlanması

Singleton ve Rossi (1965)'nin geliştirdiği metota göre hazırlanmış olup 100 ml ayıraç hazırlamak için 10 g $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 2,5 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 70 mL distile su, 5 mL %85'lik H_3PO_4 ve 10 mL konsantre HCl karıştırılarak geri soğutucuda 10 saat boyunca kaynatılıp ardından 15 g Li_2SO_4 ve birkaç damla H_2O_2 çözeltiye eklenmiş ve karıştırılmıştır. Daha sonra 100 °C'de 15 dk'lık süreyle kaynatılmış ve distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Sarı renkli bir ayıraç elde edilmiştir. Gereken kimyasallar ve yapılış şekli Çizelge 2.2'da gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Folin Ciocalteu ayırıcının hazırlanması.

Kimyasal	Miktar (g ve mL)
Sodyum tungstat dihidrat ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	10 g
Sodyum molibdat dihidrat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	2,5 g
Distile su	70 mL
%85'lik fosforik asit (H_3PO_4)	5 mL
Konsantre Hidroklorik asit (HCl)	10 mL
10 saat süre boyunca geri soğutucu ile 100 °C'de kaynatılır	
Lityum sülfat (Li_2SO_4)	15 g
%30'luk Hidrojen peroksit (H_2O_2)	Birkaç damla
15 dk süre ile 100 °C'de geri soğutmadan kaynatılır	
Distile su ile 100 mL'ye tamamlanır	
Sarı renkli Folin Ciocalteu ayıracı elde edilmiş olur	

2.2.3. Karayemiş ve Doku Örneklerinin Total Antioksidan Kapasitesinin Ölçülmesi

Total Antioksidan Kapasitesinin ölçülmesi için direkt ölçüm sağlayan test kiti kullanılmıştır (Relassay, Türkiye). Kit prensibi koyu mavi yeşil renkli ABTS radikalini renksiz indirgenmiş ABTS formuna dönüşmesi esasına göre çalışmakta ve sonuçlar 660 nm'de O.D.'lerin okunmasıyla elde edilmiştir. Test kiti kolorimetrik yöntemeye dayalı olup, standart olarak Trolox kullanılmıştır. R1 olarak adlandırılan ayırıcın içinde asetat tamponu, R2 ayırıcında ise ABTS prokromojen solüsyonu yer almaktadır. R1'den 300 µL ve örnek/blank/standart çözeltilerinden ise 18 µL karıştırılır ve 30 sn sonra ilk absorbanslar kaydedilir (A1) ardından üzerine R2'den 45 µL eklenir ve oda ısısında 10 dk bekletildikten sonra 660 nm'de absorbansları okunur (A2). Kaydedilen sonuçlar optik dansitelerdir ve litre başına mmol Trolox eşdeğeri birimine dönüştürmek için yapılması gereken hesap aşağıda verilmiştir (Erel, 2004).

$$A2 - A1 = \Delta\text{Abs (örnek/blank/standart)}$$

($\Delta\text{Abs blank} - \Delta\text{Abs örnek}$) / ($\Delta\text{Abs blank} - \Delta\text{Abs standart}$) sonuca eşittir.

2.2.4. Deney Gruplarının Oluşturulması

Gruplar oluşturulurken 60 adet Wistar albino ırkı sıçanlar rastgele olarak her grupta 10 hayvan ve her kafeste 5 hayvan olacak şekilde 6 gruba ayrılmıştır. İlk grubu kontrol grubu olarak değerlendirmek amacıyla STZ ve NA uygulaması bu gruba yapılmamıştır, ikinci grup diyabet oluşturulan ancak tedavi uygulanmayan gruptur, üçüncü grup diyabetli ve metformin verilen grup, dördüncü grup diyabetli gruba metformin ve karayemiş ekstraksiyonu verilen grup, beşinci grup diyabetli olup metformin ve rutin flavonoidi uygulanan grup ve son grup ise yine diyabetli olup metformin ve alfa lipoik asit uygulanan grup olarak belirlenmiştir. şekil 2.5’de deney hayvanlarının bulunduğu kafesler gösterilmiştir.



şekil 2.5. Deney gruplarının bulunduğu kafesler.

Deney gruplarında tip 2 diyabet oluşturulmadan önce sıçanlar her kafeste 5 adet olacak şekilde gruplandırılmış ve 3 günlük adaptasyon sürecine tabii tutulmuşlardır. Sonrasında her bir sıçan hassas terazi ile tartılmıştır. Ertesi gün 110 mg/kg dozda Nikotinamid (Sigma®Germany) fizyolojik tuzlu suda (FTS) zndrlerek intraperitoneal olarak uygulanmıştır ve 15 dk sonra 0,1 M sitrat buffer içinde zdrlen Streptozotosin (Sigma®Germany) 65 mg/kg dozunda yine intraperitoneal yolla enjekte edilmiştir (Makom Ndifossap ve ark., 2010). Amaç tip 2 diyabet oluşturmak olduğu için pankreas adacıklarından insulin salınımını tamamen bloke

etmek için değil salgılanan insuline karşı bir direnç geliştirmek için Nikotinamid kullanılmıştır. STZ, beta hücrelerinde DNA alkilasyonuna ve nikotinamid adenin dinükleotit depolarını boşaltarak ATP içeriğini azaltmaya neden olmakta ve NA ise DNA hasarını azaltarak beta hücre yenilenmesini sağlamakta ve adacık hücresi büyümesini arttırmaktadır. Bununla birlikte, STZ uygulamasından önce NA uygulamasının, DNA metilasyonunu azaltan pankreas β hücreleri dışında diğer organlarda DNA metilasyonu üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı bildirilmiş olup bu etkisi hala tam olarak aydınlatılamamıştır (Ghasemi ve ark., 2014).

Sitrat tampon hazırlamak için 0,960615 g sitrik asit ($C_6H_8O_7 \times H_2O$) ve 1,4705 g sodyum sitrat dihidrat ($C_6H_5O_7Na_3 \times 2H_2O$) 1 litre %0,09'luk serum fizyolojik içinde çözünerek hazırlanmıştır. Streptozotosinin sebep olduğu diyabet oluşmadan önce hayvanların hipoglisemiden (insülin düzeyi yükseldiğinden) ölümlerinin önüne geçilmesi için deney hayvanlarına uygulamadan 6 saat sonra 12 saatliğine %10'luk glikoz çözeltisi verilmiştir (su içersinde) (Kurçer ve Karaoğlu, 2012).

Tip 1 diyabet oluştururken tek başına Streptozotosin kullanımından 3 gün sonra kan şeker düzeyi yükselir ve deney protokolüne başlanabilmektedir. Ancak tip 2 diyabet oluşumu daha komplekstir. Glikoz yükselmesi tip 2 DM sonrasında ya normal ya da çok az yükselme göstermektedir. Bu yüzden oral glikoz tolerans testinin yapılması tavsiye edilmektedir. Uygulamalara başlamadan önce OGT testi yapılmış ve uygulamalara STZ ve NA enjeksiyonundan 21 gün sonra başlanmıştır (King ve Austin, 2017). Gruplara uygulanacak işlemler aşağıda Çizelge 2.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Deney gruplarının oluşturulması ve gruplara uygulanacak işlemler.

Gruplar	n	DM oluşturma	Metformin	Doğal ürün Uygulama
Kontrol	10	-	-	-
DM	10	Streptozotosin + Nikotinamid	-	-
DM + Met	10	Streptozotosin + Nikotinamid	+	-
DM + Met + KY	10	Streptozotosin + Nikotinamid	+	Karayemiş
DM + Met + R	10	Streptozotosin + Nikotinamid	+	Rutin
DM + Met + LA	10	Streptozotosin + Nikotinamid	+	alfa Lipoik asit

Tabloda görüldüğü üzere kontrol grubu sağlıklı ve hiçbir uygulama yapılmayan grup olarak belirlenirken diğer tüm gruplarda STZ ve NA ile tip 2 diyabet oluşturulmuştur. DM olarak adlandırılan ikinci grup diyabetli + kontrol grubudur ve tip 2 diyabet oluşturulduktan sonra hiçbir işlem uygulanmamıştır. DM + Met olarak isimlendirilen üçüncü grup ise tip 2 diyabetli metformin verilen gruptur. Bundan sonraki 4., 5. ve 6. gruplar ise ilaç ve doğal ürün etkileşimlerini göstermek amacıyla oluşturulmuş gruplardır. Kullanılan ilaç metformin doğal ürün ise dördüncü grupta karayemiş, beşinci grupta rutin flavonoidi ve altıncı grupta alfa lipoik asittir.

2.2.4.1. Metformin Uygulaması

Sağlıklı ve uygulama yapılmayan diyabetli gruplar hariç her gruba 500 mg/kg (Meng ve ark., 2017) dozunda metformin distile suda eritilerek gavaj yoluyla verilmiştir. Eczaneden tablet şeklinde temin edilen metformin hazırlanırken hayvanların sayısı ve kilosu dikkate alınarak her gün taze olarak tabletler uygun dozda distile suda süspansiyon haline getirilmiş ve verilmiştir.

2.2.4.2. Karayemiş Uygulaması

Karayemiş eksrakte edildikten sonra metanol, vakumlu etüvde uçurulmuş ve toplam çözeltinin %1'ini geçmeyecek şekilde dimetilsülfoksitte (DMSO) (Merck®Germany) eritilip fosfat tampon solusyonunda (PBS) sulandırılmıştır. Hayvan başına 0,05 gr karayemiş düşecek şekilde karayemiş ekstraksiyonu gavajla verilmiştir.

2.2.4.3. Alfa Lipoik Asit Uygulaması

Alfa lipoik asit (Sigma®Germany) apolar karakterde bir bileşen olduğu için 100 mg/kg dozunda (Karafakioğlu, 2019) etken önce DMSO'da bir miktar çözülerek

(toplam çözeltinin %1'ini geçmeyecek şekilde) ardından distile su ile sulandırılarak gavaj yoluyla deney gruplarına verilmiştir (Abdul-Hamid ve ark., 2020).

2.2.4.4. Rutin Flavonoidi Uygulaması

Son gruba uygulanacak olan rutin flavonoidinin (Supelco®USA) dozu 60 mg/kg (Hao ve ark., 2012) olarak belirlenmiştir ve uygun dozda tartıldıktan sonra bir miktar DMSO'da çözündürölüp, PBS ile sulandırılarak deney hayvanlarına gavajla verilmiştir.

2.2.5. Canlı Ağırlık ve Açlık Kan Glukoz Ölçümü

Her grupta 10 adet sıçan olacak şekilde 6 grup oluşturulmuştur. Her hafta düzenli olarak canlı ağırlık ve her iki haftada bir kuyruk venlerinden açlık kan glüköz düzeyleri glukometre ile (Roche® Germany) ölçülmüştür.

2.2.6. Oral Glukoz Tolerans Testi

Tip 2 diyabet oluşturulduktan sonra 3 haftalık süreç boyunca hayvanların takibine devam edilmiştir. Açlık kan şeker seviyeleri tip 2 diyabette normal veya çok az yüksek çıkmakta bu yüzden de OGTT tavsiye edilmektedir. Özellikle nokturnal olan bu hayvanlarda gece boyu aç bırakılmak açlık kan şeker seviyelerini değil uzun süreli açlığa bağlı kan şeker seviyelerini göstermiş olacaktır (King ve Austin, 2017). OGTT için ratlara gavaj ile şekerli su verilmiştir (2 g/kg) ardından 0. dk, 30. dk, 1. saat ve 2. saat kan şeker ölçümleri glukometre ile yapılmış ve not edilmiştir (Chaimum-aom ve ark., 2017 ve). OGT testi sonrasında anestezi altında seçilmiş hayvanlardan kalp içi kan alınmış ve bu sonuçlar da ayrıca değerlendirilmiştir.

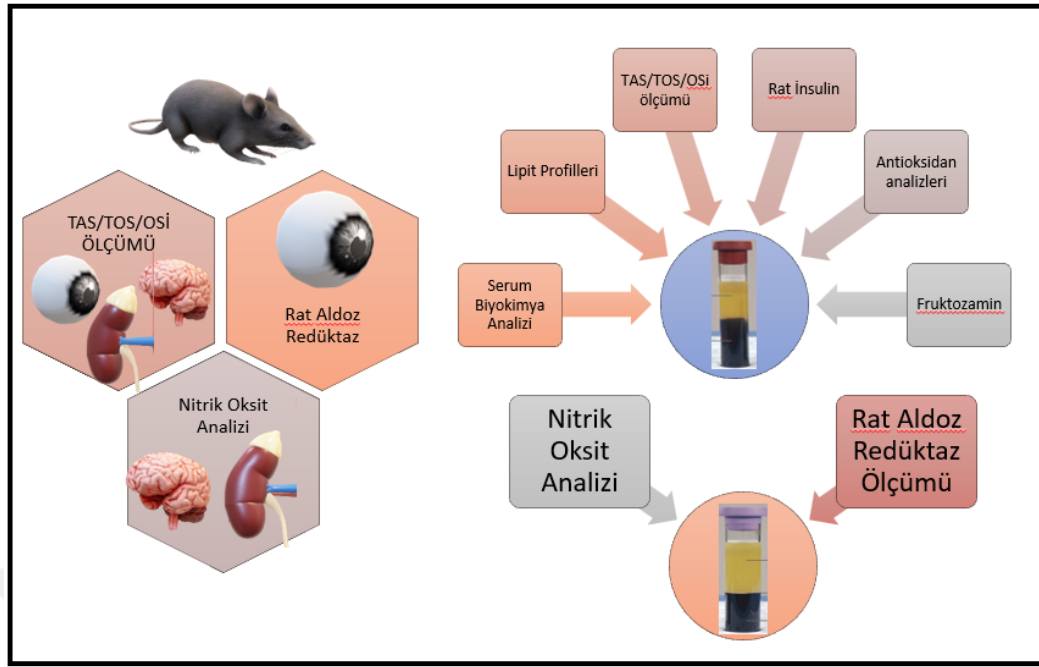
2.2.7. Deneyin Sonlandırılması

Deney hayvanlarına ilaç ve doğal ürünlerin uygulanmasına 12 hafta (84 gün) sonra son verilmiş olup, sıçanlar Ketamin (RichterPharma®) ve Ksilazin (Bioveta®) etkisi altında uyutulup kalp içi kanları alınarak sakrifiye edilmiştir. Sakrifikasyon öncesinde son kez sıçanlar tartılmış olup kuyruk veninden kan şekeri ölçümleri yapılmıştır. Sakrifikasyondan sonra hayvanların dokuları alınmak üzere gerekli prosedür uygulanmıştır. Kalp içi kanları hemogram ve kırmızı kapaklı tüplere alınmıştır. Dokular ise biyokimyasal analiz için olanlar fizyolojik tuzlu suda yıkanarak -80 °C’de analize kadar muhafaza edilmiştir, histopatolojik incelemeye tabii tutulacak organlar ise tamponlu formalin solüsyonuna alınmış ve bu şekilde muhafaza edilmiştir. Şekil 2.6’da sakrifikasyon sonrası dokuların alınması işleminin hemen öncesine ait fotoğraf verilmiştir.



Şekil 2.6. Sakrifikasyon sonrası doku alımı için ratların açılmasına ait görüntü.

Deneyler sonlandırıldıktan sonra alınan dokular ve yapılan analizler Şekil 2.7’de özetlenmiştir.



Şekil 2.7. Kullanılan hayvan materyalleri ve yapılan analizleri gösteren şema.

2.2.8. Serum Biyokimya ve Lipit Analizi

Kalp içi kanlar kırmızı kapaklı ve hemogram tüplerine alınmıştır ve soğuk zincirde Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Klinik Biyokimya Laboratuvarı'na getirilmiştir. Tüpler 2800 rpm'de +4 °C'de 10 dk santrifüj edildikten sonra serum kısımları 1,5 mL'lik Eppendorf tüplerde taksimatı yapılarak analize kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir. Genel Biyokimyasal kan analizleri Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Merkez Tanı Laboratuvarında hazır kitler kullanılarak Biyokimya otoanalizörlerinde (Randox®UK) ölçülmüştür. Üre, Kreatinin, Pi, Ca, Glikoz, Toplam Protein, Albumin, ALT, AST, ALP, GGT, Toplam Bilirubin, Toplam Kolesterol, HDL ve Trigliserit değerleri ölçülmüştür. BUN (Karagül ve ark., 2000) ve LDL (Friedewald ve ark., 1972) ise aşağıdaki şekilde hesaplanarak bulunmuştur.

$$\text{BUN (mg/dL)} = \text{Üre} / 2,14$$

$$\text{LDL (mg/dL)} = \text{T. Chol} - ((\text{T.G.}/5) + \text{HDL})$$

2.2.9. HbA1C ve Fruktozamin Analizi

Fruktozamin ($\mu\text{mol/L}$) analizi hizmet alımı şeklinde Sekans Hayvan Sağlığı Laboratuvarında otoanalizörde fotometrik yöntemle ölçülmüştür. HbA1C (%) ise Venö ve de Koning (2017)'in belirttiği fruktozamin ve HbA1c bağıntısına göre hesaplanmıştır. HbA1c yüzdelere ilişkin sonuçlar %78'lik bir doğruluk payına sahiptir ($R^2=0,78$). Fruktozamin ve HbA1c yüzdesine ait bağıntı aşağıda verilmiştir.

$$(\text{Fruktozamin } (\mu\text{mol/L}) \times 0,017) + 1,61 = \% \text{HbA1c}$$

2.2.10. Antioksidan Analizler

2.2.10.1. Paraoksonaz Analizi

Aviram ve Rosenblat (2008)'in geliştirdiği yöntem kullanılarak yapılmıştır. Paraoksonazın enzimatik hidrolizi sonucu oluşan sarı renkli p-nitrofenolün 412 nm'deki optik dansiteleri belli süreler içinde ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Glisin tampon çözeltisinden 250 ml hazırlamak için; 0,05 M glisin çözeltisi ve 0,001 M CaCl_2 çözeltisinden 125 mL hazırlanmış ve pH 10,5'a yoğun NaOH ile ayarlanarak son hacim 250ml'ye, hazırlanan çözeltiler ile tamamlanmıştır. Daha sonra metanolde hazırlanmış 0,4 M paraoxon glisin tampon çözeltisi ile sulandırılarak derişimi 4 mM'e düşürülmüştür. Blank ve sulandırılmamış örneklerden 5 μL ve 100 μL PON çözeltisinden kullanılarak mikropateler ile 412 nm'de ELISA okuyucuda 0. ve 3. dk'da OD'leri ölçülmüştür. Aşağıda bulunan optik dansitenin U/mL olarak verilebilmesi için gereken formül verilmiştir:

$$k = (\text{toplam } V \times 1.000.000) / (E_c \times L \times \text{numune } V)$$

k = katsayı faktörü

V = hacim (μL)

E_c = Ekstinksiyon katsayısı ($18.290 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

L = ışık yolu (0,273 cm)

$$U/mL\ PON = k \times (\Delta Abs\ \text{örnek}/dk - \Delta Abs\ \text{blank}/dk)$$

$$U/mL\ PON = 4203,45 \times \text{Optik dansite}$$

2.2.10.2. Seruloplazmin Analizi

Seruloplazmin, mor renkli bir ürün vermek üzere P-fenilen diamin diklorid'in (PPD) oksidasyonunu katalize eder. Renk yoğunluğu, numunedeki seruloplazmin konsantrasyonu ile orantılıdır ve analiz 5,5 pH ortamında çalışmaktadır. Kullanılacak çözeltiden 50 mL hazırlamak için; 0,598 M sodyum asetat trihidrat çözeltisinden 40 mL hazırlanmış ve glasiyel asetik asit ile pH 5,5'e ayarlandıktan sonra çözelti 50 mL'ye tamamlanmıştır. Reaksiyonun şekillenmesini sağlayan PPD'den 0,0135 M hazırlanmıştır (61,5 mg PPD/25 mL sodyum asetat tamponu). Hazırlanan PPD çözeltisinden 100 µL ve blank ve örneklerden 10 µL kullanılarak 550 nm'de ELISA okuyucuda 0. ve 3. dk'larda absorbansları okunarak sonuçlar kaydedilmiştir (Ceron ve Martinez-Subiela, 2004). Bulunan optik dansite değerlerinin U/mL birimine çevrilmesi için rat modellerinde yapılması gereken işlem aşağıda verilmiştir (Curzon ve Vallet, 1960).

$$k = (\text{toplam } V \times L) / (0,01 \times 7 \times \text{numune } V)$$

k = katsayı faktörü

V = hacim (mL)

L = yol uzunluğu (3,66)

0,01 = 550 nm'de okunan absorbans değişimi

7 = Reaksiyon hacmine göre üniteye çevirme faktörü

$$U/mL = k \times (\Delta Abs\ \text{örnek}/dk - \Delta abs\ \text{blank}/dk)$$

$$U/mL = 575,14 \times \text{optik dansite}$$

2.2.10.3. Glutasyon Peroksidaz Aktivite Tayini

Glutasyonun, glutasyon peroksidaz tarafından katalize edilen oksitlenmiş glutatona yükseltgenmesi prensibine dayanmakta, oksitlenmiş glutasyonun glutasyon redüktaz ve NADPH kullanarak tekrar glutatona geri dönüşümüyle sonlanmaktadır. Flohe ve Guntzler (1984)'in metotunun modifiye edilmiş hali kullanılmıştır. Tampon solusyonunda 0,05 M Tris ve 0,005 M EDTA, HCl ile pH'sı 8,0 olacak şekilde ayarlanmış ve analizi gerçekleştirecek enzim ayırıcı içinde 0,005 M NADPH, 0,042 M indirgenmiş glutasyon ve 10 U/mL glutasyon redüktaz karıştırılıp, tampon çözeltiden 37 mL ve enzim çözeltisinden 2 mL karıştırılarak Reaktif 1 (R1) hazır hale getirilmiştir. Tert-bütil hidroperoksit içeren Luperoxtan 28,6 µL alınıp üzerine 20 mL bidistile su ilave edilerek Reaktif 2 (R2) çözeltisi hazırlanmıştır (Thoobbucha, 2015). Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Merkez Tanı Laboratuvarının Biyokimya otoanalizörlerinde R1 ve R2 ayıraçları kullanılarak kinetik olarak ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Otoanalizörde çıkan sonuçların birimi U/L cinsindendir ancak kullanılan birim U/mg protein'dir. Toplam Protein sonuçlarının mg/mL'ye çevirdikten sonra U/mL'ye bölünmesi ile sonuçlar elde edilmiştir.

$$U/L \text{ GpX} = U / 1000 \text{ mL ve g/dL protein} = 1000 \text{ mg} / 100 \text{ mL}$$

$$U/1000mL / 1000mg/100mL$$

Bu durumda GpX sonuçları 1000'e ve daha sonra toplam proteinin mg/mL cinsine bölünerek sonuç kaydedilir.

2.2.10.4. Süperoksit Dismutaz Analizi

Sun ve ark. (1988)'nın geliştirdiği yöntemle göre analiz gerçekleştirilmiştir. Süperoksit dismutaz aktivitesi için, bir süperoksit oluşturuç olarak kullanılan ksantin - ksantin oksidaz ile nitroblue tetrazolyum indirgemesinin inhibisyonunu içerir. Gerekli çözeltiler Çizelge 2.4'da listelenmiştir.

Çizelge 2.4. SOD analizinde kullanılan çözeltilerin hazırlanması.

Çözelti	Derişimi	Hazırlanışı
Ksantin Stok Çözeltisi	3 mmol/ Lt	23 mg Ksantin 5 mL 0,1 N NaOH içinde çözüldü, bidistile su ile 50 mL'ye tamamlandı
Ksantin Oksidaz Enzim Çözeltisi	25 U/mL	2 M amonyum sülfatta çözülerek elde edildi
EDTA çözeltisi	0,5 mmol/Lt	0,233 gr EDTA bidistile su ile 1 Lt'ye tamamlandı
NBT çözeltisi	0,15 mmol/Lt	12,3 mg NBT bidistile su ile 100 mL'ye tamamlandı
Na ₂ CO ₃ çözeltisi	400 mmol/Lt	4,24 gr Na ₂ CO ₃ bidistile su ile 100 mL'ye tamamlandı
Sığır Albumin çözeltisi	1 g/Lt	100 mg Sığır albumin bidistile su ile 100 mL'ye tamamlandı
CuCl çözeltisi	0,8 mmol/Lt	13,6 mg CuCl bidistile su ile 100 mL'ye tamamlandı
Ksantin çalışma çözeltisi	0,3 mmol/Lt	Ksantin stok çözeltisi 10 kat bidistile su ile seyreltilir

Çözeltiler hazırlandıktan sonra reaktif karışımı (R1) elde etmek için 20 mL ksantin çalışma çözeltisi, 10 mL EDTA çözeltisi, 10 mL NBT çözeltisi, 6 mL Na₂CO₃ çözeltisi ve 3 mL Sığır Albumin çözeltisi karıştırılır ve 4900 µL çekilir ve 100 µL enzim çözeltisi (R2) ile karıştırılarak R3 karışımı oluşturulur. Elde edilen bu R3 karışımından pleytlere 125 µL eklenmiştir. Serum örnekleri ve blankten 25 µL kuyucuklara ilave edildikten sonra 20 dk inkübasyona bırakılmıştır (oda ısısında ve karanlıkta). İnkübasyon süresinin ardından 50 µL CuCl (stop solusyonu) kuyucuklara ilave edilmiş ve 560 nm'de ELISA okuyucuda sonuçlar kaydedilmiştir.

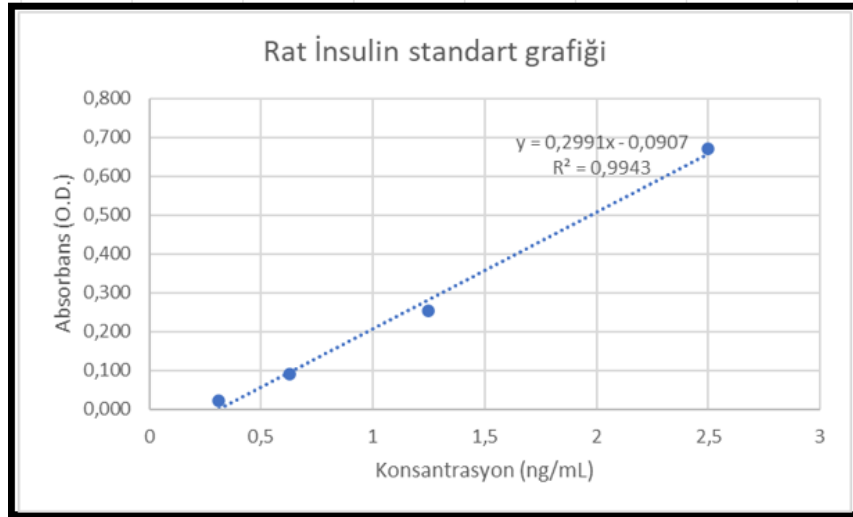
Hesaplama yapmak için; % inhibisyon = ((Blank abs. – Test abs) / Blank abs) x 100 formülünden faydalanılır ve 1 Unite SOD'un %50 inhibisyona sahip olduğu bilindiği için oran orantı işlemi yapılarak %inhibisyon sonuçlarının kaç Unite SOD'a eşit olduğu belirlenmiştir. Kullanılan birim GPx'teki gibi U/mg protein olduğu için bulunan Unite SOD'lar mg/mL proteine bölünür.

2.2.11. Rat İnsulin Analizi

Elabscience Rat Insulin (Elabscience®Texas, ABD) ELISA kiti kullanılmıştır. Kit Sandwich ELISA prensibine göre çalışmaktadır. Kitin içindeki kullanım

kılavuzuna bağılı kalınarak test prosedürü adım adım uygulanmış ve standart grafik oluşturularak ng/mL cinsinden sonuçlar kaydedilmiştir.

ELISA prensibine göre tüm adımlar gerçekleştirilmiş olup standartlara ait grafik çizilmiş ardından grafikteki denkleme göre çıkan sonuçlar hesaplanmıştır. Blankten düşük çıkan örnekler değerlendirilmediği için ND kodu ile belirtilmiştir. Standartlar 0,31 ng /mL, 0,63 ng/mL, 1,25 ng/mL ve 2,5 ng/mL'dir Blank O.D.'si standart absorbanslarından çıkarıldıktan sonra grafik çizilmiştir. Şekil 2.8'de insulinin standart grafiği verilmiştir. Standart grafik oluşturulduktan sonra denklemde örneklerin optik dansitesi x yerine koyulmuştur ve y değeri olan konsantrasyonlar bulunmuştur.



Şekil 2.8. İnsuline ait Standart Eğrisi.

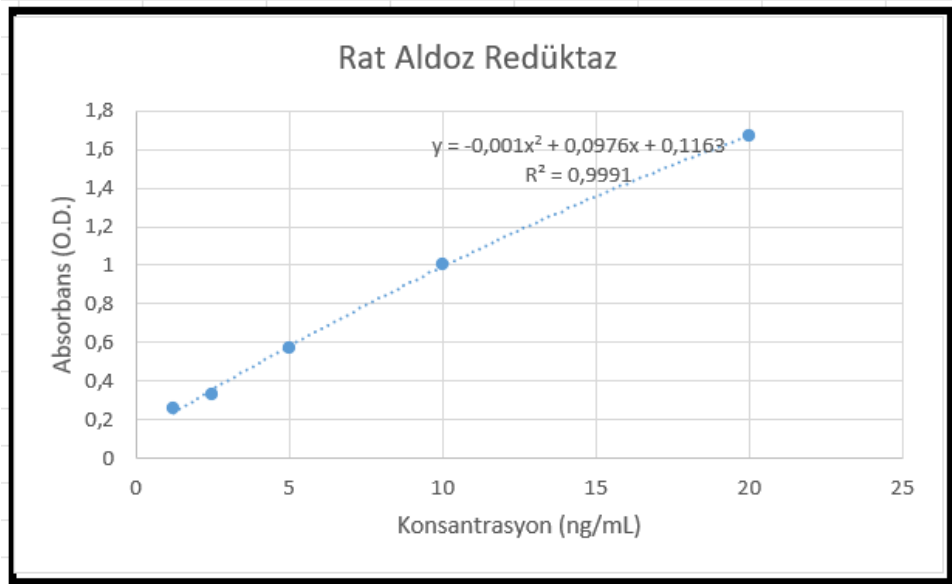
2.2.12. Dokuların Homojenizasyonu

Dokular 140 mmol/L KCl çözeltisinde 1 g dokuya 9 mL homojenizasyon çözeltisi olacak şekilde karıştırıldıktan sonra el homojenizatörü ile dokular tamamen sıvıda parçalanıp görünmez hale gelene kadar homojenize edilmiştir. Daha sonra soğutmalı santrifüjde 5000xg'de 5 dk bir süre ile santrifüj edilmişlerdir. Süpernatant kısımları eppendorf tüplere uygun şekilde porsiyonlanarak analize kadar -80 °C'de

muhafaza edilmiştir. Tüm bu işlemler buz üzerinde gerçekleştirilmiştir (Silveira ve ark., 2015).

2.2.13. Rat Aldoz Redüktaz Tayini

Hazır ELISA kitleri (BT LAB® Shangai, Korea) kullanılarak, kit prospektüsünden çıkan prosedüre göre adım adım uygulanmıştır. Göz dokusu homojenizatından yapılan analizin sonuçları standart grafikten okunarak ng/ml cinsinden bulunmuştur. Şekil 2.8’da Rat Aldoz Redüktaz’a ait standart grafik verilmiştir.



Şekil 2.9. Rat Aldoz Redüktaz Standart Eğrisi.

2.2.14. Dokuların ve Plazma Örneklerinin Total Oksidan Kapasitesinin Ölçülmesi

Hazır kit kullanılarak ölçüm yapılmış olup, kitin prensibine göre, numunede bulunan oksidanlar, demir iyonu şelatör kompleksini demir iyonuna okside etmektedir. Oksidasyon reaksiyonu, reaksiyon ortamında bol miktarda bulunan arttırıcı moleküller

tarafından uzatılmaktadır. Demir iyonu, asidik bir ortamda kromojen içeren renkli bir kompleks oluşturmaktadır. Spektrofotometrik olarak ölçülebilen renk yoğunluğu, numunede bulunan toplam oksidan molekül miktarı ile ilgilidir. Deney, hidrojen peroksit ile kalibre edilmekte ve sonuçlar, litre başına mikromolar hidrojen peroksit eşdeğeri ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eşdeğeri / L) cinsinden ifade edilmektedir. Yine Total Antioksidan Kapasite’de olduğu gibi R1 ve R2 ayıraçları kullanılarak ölçülmüştür. R1 ayıracında sülfürik asit tamponu bulunmakta ve 300 μL kullanılmaktadır. Standart olarak hidrojen peroksit kullanılmış ve örnek/blank/standart çözeltilerinden 45 μL eklenerek 30 sn sonra absorbansları okunmuştur (A1). Okunan değer kaydedildikten sonra R2 ayıracından 15 μL ilave edilmiş (R2 ayıracı içeriği: substrat solüsyonu, sülfürik asit, demir iyonları ve O-dianisidin) ve oda ısısında 10 dk’lık inkübasyonun ardından 530 nm’de optik dansiteler kaydedilmiştir (A2). Kullanılan birime ulaşmak için ($\mu\text{mol/L}$) yapılması gereken hesaplama aşağıda verilmiştir.

$$A2 - A1 = \Delta\text{Abs (Standart/örnek)}$$
$$(\Delta\text{Abs örnek} / \Delta\text{Abs Standart}) \times 10 \text{ (standartın konsantrasyonu)}$$

2.2.15. Dokuların Histopatolojik incelenmesi

Ötenazi sonrası hayvanlardan alınan pankreas dokuları %10’luk tamponlu formalin solüsyonunda 24-48 saat boyunca tespit edilmiştir. Tespit sonrası formalinin uzaklaştırılması için dokular 4-6 saat boyunca çeşme suyunda yıkanmıştır. Doku takip cihazında (Epredia STP 120) dehidrasyon işlemi dereceli alkol serileri (%50(x1), %70(x1), %80(x1), %96(x1), absolü alkol(x2)); saydamlaştırma işlemi ksilol (x2), emdirme işlemi parafin (x2) ile yapılmıştır. Rutin doku takibinden sonra dokular parafine bloklanmıştır (Epredia, HistoStar). Parafin bloklardan 5 μm kalınlığında kesitler alınmıştır (Epredia HM 355S). Parafin kesitler Hematoksilen&Eozin (H&E) boyası (Luna, 1968) ile boyanmış (Leica Autostainer XL) ve entellan ile kapatılmıştır (Leica CV5030). Hazırlanan preparatlar kameralı ışık mikroskopunda (Olympus BX51-DP71) değerlendirilmiş olup, histopatolojik bulgular için 0: Yok, 1: Hafif, 2: Orta, 3: Şiddetli olmak üzere semi-kantitatif derecelendirme yapılmıştır (Luna, 1968).

2.2.16. Nitrik Oksit Analizinin Yapılması

Hazır kit (Elabsience®Texas, ABD) ile kolorimetrik yöntemle spektrofotometre de ölçülmüştür. Kit içinde yer alan standart çözelti, blank ve örneklerin üzerine R1 ve R2 ayıraçları ilave edilerek her aşamada örnekler vortexlenmiş ve 15 dk oda ısında inkübe edilmiştir. Daha sonra 3100 g'de 10 dk santrifüj edilmiş ve supernatant kısımlar toplanmıştır. Supernatantların üzerine en son kromojenik ayıraç ilave edilmiş ve 20 dk'lık inkübasyona bırakılmıştır. Reaksiyon tamamlandıktan sonra spektrofotometrede 550 nm ile ölçüm yapılmıştır. Optik dansiteler plazma veya serum örnekleri için $\mu\text{mol/L}$ birimine dokular içinse $\mu\text{mol/g}$ protein birimine çevrilir. Bu işlemler aşağıda verilmiştir.

$$\text{Serum / plazma için NO } (\mu\text{mol/L}) = \frac{\Delta A1}{\Delta A2} \times c \times f$$

$$\text{Doku için NO } (\mu\text{mol/g protein}) = \left(\frac{\Delta A1}{\Delta A2} \times c \times f \right) / C_{pr}$$

$$\Delta A1 = OD_{\text{örnek}} - OD_{\text{blank}}$$

$$\Delta A2 = OD_{\text{standart}} - OD_{\text{blank}}$$

$$c = \text{sodyum nitrit konsantrasyonu (40 } \mu\text{mol/L)}$$

$$f = \text{örneğin dilüsyon faktörü}$$

$$C_{pr} = \text{örnekteki protein konsantrasyonu}$$

2.2.17. İdrar Analizi

Kesim günü idrarları alınan hayvanların örnekleri test stribi ile glikoz, keton ve protein varlığı yönünden incelenmiştir. Sonuçlar semi kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Gruplar arasındaki farklar idrarda maddelerin bulunma şiddetine göre ifade edilmiştir. Glikoz, keton veya proteinin gruplardaki hiçbir hayvanda gözlenmemesi durumunda ND ile kodlanmış, bulunduğu durumlarda ise 1: çok hafif, 2: hafif, 3: orta, 4: şiddetli ve 5: çok şiddetli olarak sayılarla ifade edilmiştir (Free ve Free, 1972)

2.2.18. Oksidatif Stres İndeksinin (OSİ) Hesaplanması

Total antioksidan kapasitenin, total oksidan kapasiteye bölünmesinden elde edilen sonuç bize oksidatif stres indexini verir ancak, OSİ değerlerinin kendine ait birimi vardır ve arbitrary Unit olarak adlandırılır. (Harma ve ark., 2003; Kosecik ve ark., 2005 ve Yumru ve ark., 2009). Yapılan işlemler aşağıda verilmiştir.

$$\text{TOS } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ eşdeğeri/L}) / \text{TAS (Mmol Trolox eşdeğeri/L)} = \text{OSİ} \\ (\text{Arbitrary Unit (AU)})$$

2.2.19. İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin normal dağılım gösterip göstermediği ve varyansların homojenliği kontrol edilmiştir. Verilerin değerlendirilmesinin ardından Grup karşılaştırmaları Varyans Analizi ve Kruskal Wallis analizi yapılarak istatistiksel analizler gerçekleştirilmiştir. Gruplar arasında farklılıklar harflendirilerek gösterilmiştir. Bu analizler SPSS 25.00 paket programı ile yapılmıştır (Field, 2013).

Deney başlamadan önce ve deney sonlandırıldıktan sonra canlı ağırlık değişimleri grup içi olarak varyans analizi ile yapıldıktan sonra istatistiksel bakımdan anlamlı farklılıklar grafik üzerinde gösterilmiştir. Deney öncesi ve deney sonlandırılırken kan şekeri ölçümlerine ait sonuçlar ile TAS/TOS/OSİ, NO ve AR Excel programı ile grafik haline getirilerek karşılaştırmalar yapılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Karayemiş'in fenolik madde içeriği ve total antioksidan kapasitesi

Ekstraksiyon 10 günde bir tekrarlanmıştır ve her seferinde spektrofotometrik olarak total fenolik madde tayinleri yapılmıştır. Total Antioksidan kapasite ise 3 farklı ekstraksiyonun ortalamaları alınarak yapılmıştır. Analiz sonucunda ortalama konsantrasyon değerleri Çizelge 3.1'de verilmiştir.

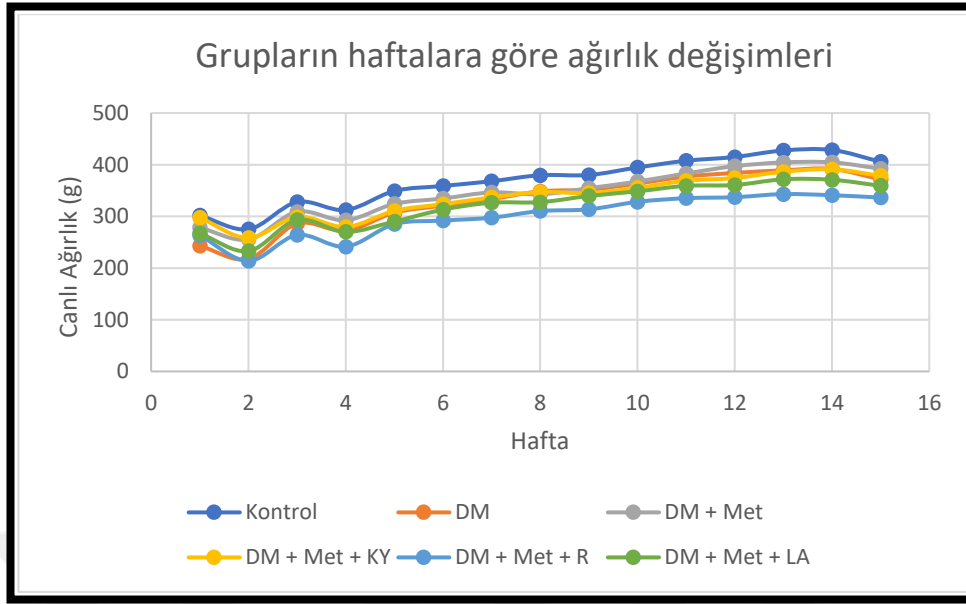
Çizelge 3.1. Karayemişin metanolik ekstraksiyonun fenolik madde içeriği (mg/L) ve antioksidan kapasitesi (mmol/L).

	n	Konsantrasyon	Min-max
Total fenolik madde	10	217,00 mg/L	94-355
Total antioksidan kapasite	3	1,77 mmol/L	1,33-2,06

Karayemiş'in fenolik içeriği 217 mg/L olarak bulunmuştur. Karayemiş'in gramında 2,17 mg gallik asit eşdeğeri fenolik madde belirlenmiştir. Hayvan başına 0,5 mL ekstraksiyon çözeltisi verilmiştir. Total antioksidan kapasitede ortalama TAS değeri mmol/L birimi ile bulunmuştur. Buna göre karayemiş'in antioksidan kapasitesi 1,77 mmol Trolox eşdeğeri/L çıkmıştır.

3.2. Canlı Ağırlık Ölçümü

Her hafta düzenli olarak tartılan deney gruplarının canlı ağırlık değişimleri incelenmiştir ve grafik olarak Şekil 3.1'de verilmiştir.

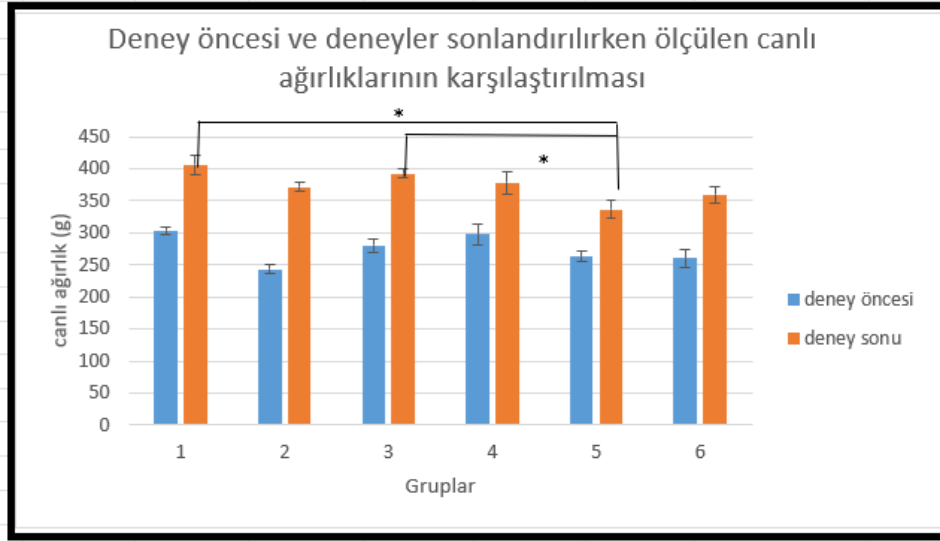


Şekil 3.1. Deney gruplarının haftalık ağırlık değişimleri (Kontrol: sağlıklı grup, DM: Diyabet oluşturulan ancak tedavi edilmeyen grup, DM + Met: Diyabet oluşturulan ve metformin uygulanan grup, DM + Met + KY: Diyabetli olup metformin ve karayemiş verilen grup, DM + Met + R: Diyabetik metformin ve rutin verilen grup, DM + Met + LA: Diyabet oluşturulan ve metformin ile lipoik asit ile tedavi uygulanan grup).

Grafik incelendiğinde her gruba ait hayvanların kilo alıp vermeleri aynı haftalarda benzer oranlarda olmuştur. Zaman ve büyüme faktörlerinin de dikkate alınması gerekir fakat genel olarak 2., 4. Haftalar ile kesim günü ağırlık ölçümlerinde bir azalma varken diğer haftalarda belirgin bir ağırlık artışı olmuştur. Kontrol grubunun canlı ağırlık artışı kesim gününe gelindiğinde ($M \pm SE$) sırasıyla $102,56 \pm 8,52$ g, diyabet grubunun ortalama $129,00 \pm 8,10$ g, diyabet + metformin grubunun ortalama $112,11 \pm 10,05$ g, diyabet + metformin + karayemiş grubunun ortalama $81,10 \pm 15,55$ g, diyabet + metformin + rutin grubunun ortalama $77,89 \pm 18,55$ g ve son olarak diyabet + metformin + lipoik asit grubunun canlı ağırlık artışı ortalama $97,86 \pm 8,12$ g olmuştur. Bu durumda 3 aylık tedavinin ardından en çok kilo alımı gösteren grup tip 2 diyabetes mellitus grubu iken en az kilo artışı gösteren grup ise tip 2 diyabet olup metformin ve karayemiş ekstraksiyonu uygulanan grup olmuştur. İstatistiksel olarak DM grubu ile DM + Met+ R ve DM grubu ile DM + Met + KY grubu arasında istatistiksel bakımdan anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p \leq 0,05$).

Canlı ağırlık değişimlerine ait grafik dışında deneye başlamadan önceki canlı ağırlıkları gruplar arasında bir anlamlılık olup olmadığına yönelik istatistiksel bakımdan değerlendirilmiştir. Deney grupları oluşturulurken hayvanlar birbirine yakın gramajda olacak şekilde özelliklerine dikkat edilmeksizin rastgele gruplandırılmışlardır ve ilk ölçümlere ait gruplar arasında istatistiksel bakımdan anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$). Deney grupları belirlenip henüz deneylere başlamadan önce canlı ağırlıklar ölçülmüş ve kontrol grubundan başlamak üzere sırasıyla canlı ağırlık ortalamaları ilk ölçüm için ($M \pm SE$) $295,50 \pm 6,61$ g (Kontrol); $249,25 \pm 6,91$ g (DM); $280,22 \pm 10,34$ g (DM+Met); $295,00 \pm 17,05$ g (DM+Met+KY); $261,11 \pm 8,09$ g (DM+Met+R) ve $265,25 \pm 13,89$ g (DM+Met+LA) olarak bulunmuştur.

Deneyler sonlandırılırken yapılan ağırlık ölçümlerinin de gruplar arasında bir farklılığı olup olmadığını belirtmek amacıyla sonuçlar varyans analizi ile yorumlanmıştır. Gruplar arasında anlamlı bir farklılık ($p \leq 0,05$) vardır ve kontrol grubundan başlayarak sırasıyla $405,78 \pm 15,17$ g; $371,60 \pm 7,60$ g; $392,33 \pm 6,88$ g; $378,70 \pm 17,41$ g; $336,44 \pm 14,45$ g ve $359,29 \pm 11,94$ g şeklinde ölçülmüştür. Kontrol grubu ile beşinci grup arasında ayrıca üçüncü grup ile yine beşinci grup arasında istatistiksel bakımdan anlamlı bir farklılık vardır ($p \leq 0,05$). Canlı ağırlıklar gruplar arasında incelendiğinde sağlıklı olan grup en yüksek ağırlık ortalamasına sahipken rutin flavonoidi uygulanan beşinci grup en düşük ağırlık ortalamasına sahip olmuştur. Ayrıca tedavi uygulanmayan diyabetli grubun ağırlığı beşinci ve altıncı gruptan daha yüksek üçüncü ve dördüncü gruptan ise daha düşük ölçülmüştür. İkinci, üçüncü ve dördüncü gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu farklılıkların gösterildiği grafik Şekil 3.2’de gösterilmiştir.



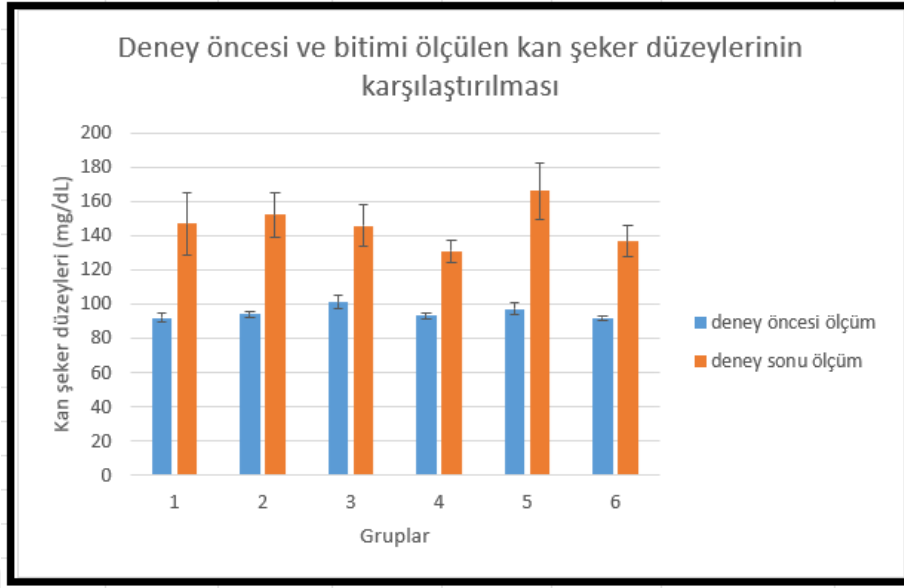
Şekil 3.2. Deney gruplarına ait canlı ağırlık karşılaştırması (deney öncesi $p>0,05$ iken deney sonlandırılırken $p\leq 0,05$ ve Kontrol grubu – DM + Met + R grubu ile, DM + Met grubu ile DM + Met + R grubu arasında anlamlılık vardır).

3.3. Açlık Kan Glukoz Ölçümü

Accu Chek Glukometre ile deney öncesi ve kesim gününe kadar iki haftada bir ölçülen kan glukoz değerlerine ait sonuçlar deney başlamadan önce ve deneyler sonlandırılırken olmak üzere gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Her iki sonuçta da istatistiksel bakımdan gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0,05$).

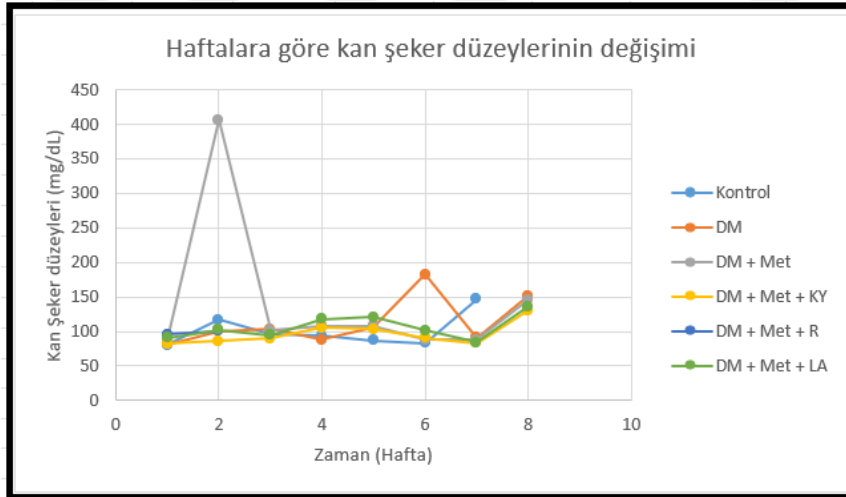
Veriler incelendiğinde sırasıyla deney öncesi değerleri yine kontrol grubundan başlamak üzere sırasıyla $92,11 \pm 2,47$ mg/dL; $94,00 \pm 1,96$ mg/dL; $101,20 \pm 4,19$ mg/dL; $93,40 \pm 1,81$ mg/dL; $97,30 \pm 3,35$ mg/dL ve $92,00 \pm 1,41$ mg/dL bulunmuştur.

Deney bitiminde ise ortalama kan şeker düzeyleri kontrol grubunda $147,00 \pm 18,37$ mg/dL; DM grubunda $152,00 \pm 12,76$ mg/dL; DM + Met grubunda $145,80 \pm 12,41$ mg/dL; DM + Met + KY grubunda $130,80 \pm 6,88$ mg/dL; DM + Met + R grubunda $165,89 \pm 16,30$ mg/dL ve DM + Met + LA grubunda $136,71 \pm 9,02$ mg/dL bulunmuştur. Buna ilişkin grafik Şekil 3.3’de verilmiştir.



Şekil 3.3. Deney gruplarına ait kan şeker düzeyi karşılaştırması. (deney öncesi ve sonunda $p>0,05$).

Deneylere başladıktan sonra her iki haftada bir düzenli olarak kuyruk veninden glukometre ile ölçülen kan şeker düzeylerinin değişimlerine ait grafik Şekil 3.4’de verilmiştir.



Şekil 3.4. Deney gruplarının haftalık kan şeker düzeyi değişimleri.

İki haftada bir glukometre ile ölçülen kan şeker düzeylerinden deney öncesi, uygulamalara başladıktan sonraki 6. hafta kan şekeri değerleri ve deney bitiminde alınan şeker ölçümleri ilk değerlendirme açısından yüzde olarak karşılaştırılmıştır. Çizelge 3.2’de kan şekerlerinin yüzde olarak ilk değerlendirilmesi verilmiştir.

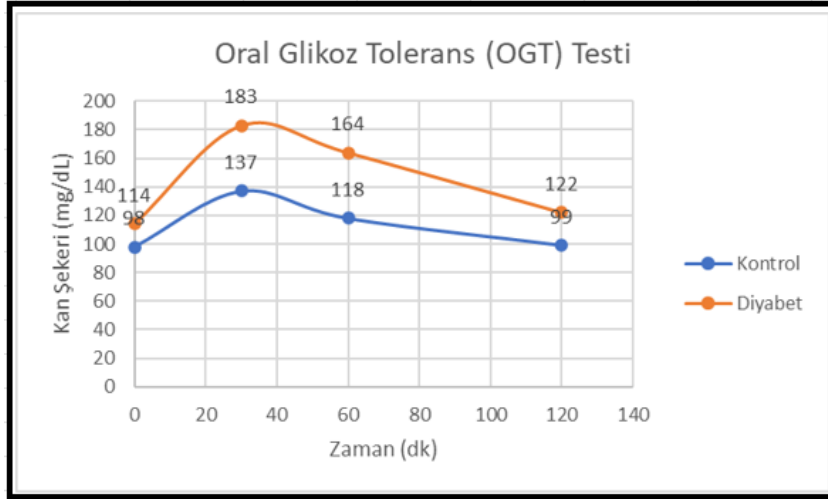
Çizelge 3.2. Deney gruplarının kan şeker düzeylerinin normal, insulin direnci ve diyabet yönünden değerlendirilmesi (%).

Kan Şeker Düzeyi	deney öncesi	uygulamanın 6. haftası	deney bitimi
80-110 mg/dL Normal (%)	93	60	14
110-126 mg/dL İnsulin direnci (%)	7	25	22
>126 mg/dL Diyabet (%)	0	15	64

Glukometre ile ölçülen değerler dışında hayvanlardan kalpten alınan kan örnekleri serumlarında otoanalizörlerde glikoz kiti ile kan şekeri ölçülmüştür. Serum glikoz sonuçlarının da istatistiksel analizi gerçekleştirilmiş olup gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0,05$). İlk grubun glikoz değeri $198,22 \pm 10,61$ mg/dL; ikinci grubun $228,30 \pm 17,14$ mg/dL; üçüncü grubun $198,67 \pm 14,32$ mg/dL; dördüncü grubun glikoz düzeyi $187,70 \pm 14,93$ mg/dL; beşinci grubun $241,11 \pm 46,79$ mg/dL ve altıncı grubun $188,86 \pm 19,86$ mg/dL bulunmuştur.

3.4. Oral Glikoz Tolerans Testi

İnsuline bağımlı olmayan diyabetin tip 1 diyabetten en önemli farkı oluşan insulin direncidir ve açlık kan şekeri ölçümündense OGT testi her zaman tip 2 diyabette birincil önceliktir. Bu teste tabii olan hayvanların 2 saat sonraki kan şekerlerinin normal seviyelere dönmesi beklenmektedir ve özellikle 126 mg/dL kan şeker seviyesinin üzerinde kalanlar diyabetik kabul edilmektedir. Kan glikoz düzeylerinin 110-126 mg/dL aralığında kaldığında insülin direncinden bahsedilebilmektedir (Wang ve ark., 2018). Şekil 3.5’da OGTT uygulanan gruplar arası kan şekerlerinin nasıl değiştiğini karşılaştıran grafik verilmiştir.



Şekil 3.5. Oral Glukoz Tolerans Testi (Kontrol: sağlıklı hayvanlardan oluşmaktadır, DM ise tip 2 diyabet oluşturulmuş hayvanları göstermektedir).

Uygulamalara başlamadan önce, Anestezi altında kalp içi kan alınıp serum glukoz düzeyleri ölçülmüştür. Sonuçlar, kontrol grubunda 108 mg/dL, DM grubunda ise sırasıyla 123 mg/dL, 131 mg/dL, 199 mg/dL, 326, 202 mg/dL ve 215 mg/dL bulunmuştur. Serum glukoz düzeyleri otoanalizörde sağlıklı hayvanda normal diğer hayvanlarda yüksek düzeyde çıkınca hayvanlar diyabetik kabul edilerek metformin ve doğal ürünlerin uygulanmasına başlanmıştır.

3.5. Serum Biyokimya Analizi

Sonuçlara göre Alkalen Fosfataz aktivitesi (ALP; $p \leq 0,05$) ve Kalsiyum (Ca; $p \leq 0,05$) düzeylerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. Kalsiyum değerlerinde kontrol grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır. Kontrol grubunda Ca değeri daha düşükken diğer gruplar daha yüksek ve birbirlerine yakındır. Çıkan sonuçlar kontrol grubundan lipoik asit verilen gruba doğru sırasıyla $6,47 \pm 1,16$ mg/dL, $9,24 \pm 0,35$ mg/dL, $9,69 \pm 0,30$ mg/dL, $9,78 \pm 0,40$ mg/dL, $9,27 \pm 0,22$ mg/dL ve $9,46 \pm 0,43$ mg/dL çıkmıştır.

Bir diğ er istatistiksel bakımdan anlamlı farklılık veren parametre ALP aktivitesi olmuştur ve sonuçlarda ilk dört grup arasında bir fark yoktur, en düşük ALP değ erine sahip grup DM'li tedavi görmeyen ikinci grup iken en yüksek ALP değ erine sahip grup DM'li metformin ve rutin flavonoidi verilen grup olmuştur. Rutin flavonoidi verilen grubun son grup hariç tüm gruplarla istatistiksel olarak anlamlı bir farkı vardır ve oldukça yükselmiştir. Sonuçlar kontrol grubundan başlayarak sırasıyla $110,67 \pm 22,10$ mg/dL, $79,60 \pm 10,12$ mg/dL, $97,22 \pm 12,80$ mg/dL, $105,30 \pm 15,35$ mg/dL, $358,20 \pm 121,41$ mg/dL ve son olarak $156,43 \pm 25,35$ mg/dL çıkmıştır.

GGT aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamış olup sonuçlar kontrol grubunda $0,89 \pm 0,26$ mg/dL; DM grubunda $0,90 \pm 0,43$ mg/dL; DM + Met grubunda $1,56 \pm 0,50$ mg/dL; DM + Met + KY grubunda $0,50 \pm 0,17$ mg/dL; DM + Met + R grubunda $0,56 \pm 0,38$ mg/dL; DM + Met + LA grubunda ise $0,86 \pm 0,40$ mg/dL çıkmıştır.

Üre değ erlerinde istatistiksel bakımdan gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Kontrol grubuna ait sonuçlarda $51,33 \pm 2,73$ mg/dL iken DM grubunda $56,30 \pm 3,80$ mg/dL çıkmıştır. DM + Met grubunda $51,89 \pm 3,37$ mg/dL; DM + Met +KY grubunda $65,50 \pm 6,94$ mg/dL çıkmıştır, DM + Met + R grubunda $69,44 \pm 10,78$ bulunmuştur ve son olarak DM + Met + LA grubunda $55,57 \pm 2,96$ mg/dL bulunmuştur. En yüksek ortalamaya sahip grup rutin verilen grup iken en düşük ortalamaya sahip olan grup kontrol grubu olmuştur ($p>0,05$).

Toplam Protein değ erlerinde yine gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Kontrol grubundan başlayarak sonuçlar $6,24 \pm 0,33$ g/dL, $5,30 \pm 0,18$ g/dL, $5,39 \pm 0,36$ g/dL, $4,67 \pm 0,48$ g/dL, $4,88 \pm 0,34$ g/dL ve $5,51 \pm 0,45$ g/dL bulunmuştur. En yüksek toplam protein değ erine sahip grup kontrol grubu iken en düşük değ er karayemiş verilen dördüncü grupta bulunmuştur.

Kreatinin sonuçlarına ait istatistiksel sonuçlarda kontrol grubunun kreatinin düzeyi $2,05 \pm 0,08$ mg/dL iken DM grubu $2,07 \pm 0,11$ mg/dL'dir. DM + Met grubunda

1,97 $\pm$ 0,08 mg/dL bulunan değerler, DM + Met + KY grubunda 2,22 $\pm$ 0,16 mg/dL olarak bulunmuştur. Rutin flavonoidi verilen beşinci grupta sonuçlar 2,41 $\pm$ 0,09 mg/dL ve son olarak lipoik asit uygulanan grupta 2,14 $\pm$ 0,10 mg/dL olarak bulunmuştur. İstatistiksel değerlendirme de gruplar arasında anlamlılık bulunamamıştır ancak en yüksek kreatinin değeri rutin flavonoidi verilen gruba aitken en düşük kreatinin düzeyi metforminin tek başına ilaç olarak uygulandığı grupta bulunmuştur (p>0,05).

BUN yani kan üre azotu değerlerinde ise ilk grupta sonuçlar 23,99 $\pm$ 1,28 mg/dL, ikinci grupta 26,31 $\pm$ 1,77 mg/dL, üçüncü grupta 24,25 $\pm$ 1,58, dördüncü grupta 30,61 $\pm$ 3,24 mg/dL, beşinci grupta 32,45 $\pm$ 5,04 mg/dL ve son olarak altıncı grupta 25,97 $\pm$ 1,38 mg/dL olarak bulunmuştur. Yine istatistiksel olarak anlamlılık teşkil etmemektedir ve en yüksek BUN değeri beşinci gruba aittir. En düşük konsantrasyon ise kontrol grubunda çıkmıştır (p>0,05).

Fosfor, kalsiyum ile olan kemik ve böbrek metabolizmasındaki rolünden dolayı önemli bir parametredir ve kontrol grubunda sonuçlar 6,70 $\pm$ 0,26 mg/dL çıkmıştır. DM grubu olarak adlandırılan ikinci grupta bulunan değer 7,05 $\pm$ 0,39 mg/dL ile ikinci en yüksek değerdir. DM + Met grubunda ise fosfor konsantrasyonu 5,79 $\pm$ 0,73 mg/dL'dir. Karayemiş uygulanan grupta sonuçlar 5,66 $\pm$ 0,47 mg/dL çıkmıştır ve ikinci en düşük fosfor değeridir. Rutin flavonoidi uygulanan grupta en düşük fosfor konsantrasyonu çıkmıştır ve sonuç 4,09 $\pm$ 0,98 mg/dL'dir. Son grup olan lipoik asit grubunda ise en yüksek fosfor değeri çıkmıştır ve 8,70 $\pm$ 2,40 mg/dL bulunmuştur. İstatistiğe göre anlamlılık söz konusu değildir (p>0,05).

Karaciğer fonksiyon testlerinde önemli bir parametre olan ALT'ye ilişkin sonuçlar kontrol grubunda 64,78 $\pm$ 5,91 mg/dL, DM grubunda 64,60 $\pm$ 11,23 mg/dL, DM + Met grubunda 55,67 $\pm$ 3,48 mg/dL, DM + Met + KY grubunda 56,20 $\pm$ 10,09 mg/dL, DM + Met + R grubunda 69,11 $\pm$ 14,67 mg/dL ve son olarak DM + Met + LA grubunda 82,29 $\pm$ 20,53 mg/dL bulunmuştur. Yine istatistiksel bakımdan anlamlı bir

farklılık çıkmamışsa da en yüksek ALT değeri lipoik asit verilen grupta iken en düşük ALT düzeyi metformin verilen grupta olmuştur ($p>0,05$).

AST yine karaciğer fonksiyon testlerine ait önemli bir parametredir fakat istatistiksel bakımdan gruplar arasında anlamlılık bulunamamıştır. Veriler incelendiğinde sağlıklı kontrolleri içeren birinci grupta $158,22 \pm 25,15$ mg/dL bulunmuştur. Hasta kontrolleri içeren ikinci grupta ise sonuçlar $196,30 \pm 36,89$ mg/dL ile en yüksek ortalamayı oluşturmaktadır. DM + Met grubunda $173,44 \pm 28,08$ mg/dL çıkmıştır ve karayemiş grubu olan dördüncü grupta sonuçlar $151,00 \pm 23,03$ mg/dL ile en düşük konsantrasyonda çıkmıştır. Rutin uygulanan grupta sonuçlar $163,22 \pm 29,09$ iken lipoik asit uygulanan grupta $185,86 \pm 39,65$ mg/dL bulunmuştur ($p>0,05$).

Plazma proteinleri içinde önemli bir parametre olan albümin değerleri ilk grupta $3,11 \pm 0,13$ g/dL, ikinci grupta $2,71 \pm 0,10$ g/dL, üçüncü grupta $2,90 \pm 0,15$ g/dL, dördüncü grupta $2,58 \pm 0,23$ g/dL, beşinci grupta $2,63 \pm 0,16$ g/dL ve son grupta ise $2,96 \pm 0,19$ g/dL bulunmuştur. İstatistiksel bakımdan anlamlılık teşkil etmemektedir ve en yüksek albümin değeri kontrol grubunda iken en düşük albümin konsantrasyonu karayemiş grubundadır ($p>0,05$).

Toplam Bilirubin değerleri en yüksek kontrol ve en düşük diyabet grubunda bulunmuştur. Sonuçlar istatistiksel bakımdan anlamlı bir farklılık oluşturmamaktadır. Ayrıntılı olarak sonuçlar incelendiğinde kontrol grubunda $0,06 \pm 0,04$ mg/dL, DM grubunda $0,01 \pm 0,01$ mg/dL, DM + Met grubunda $0,04 \pm 0,02$ mg/dL, DM + Met + KY grubunda $0,05 \pm 0,02$ mg/dL, DM + Met + R grubunda $0,04 \pm 0,02$ mg/dL ve DM + Met + LA grubunda $0,03 \pm 0,02$ mg/dL bulunmuştur ($p>0,05$). Çizelge 3.3’de serum biyokimya sonuçları $M \pm SE$ ve p değerleri ile verilmiştir.

Çizelge 3.3. Serum Biyokimya sonuçları

	Kontrol (M ± SE)	DM (M ± SE)	DM + Met (M ± SE)	DM + Met + KY (M ± SE)	DM + Met + R (M ± SE)	DM + Met + LA (M ± SE)	p
Gli mg/dL	198,22±10,61	228,30±17,14	198,67±14,32	187,70±14,93	241,11±46,79	188,86±19,86	0,722
GGT mg/dL	0,89 ± 0,26	0,90 ± 0,43	1,56 ± 0,50	0,50 ± 0,17	0,56 ± 0,38	0,86 ± 0,40	0,401
T.Bil mg/dL	0,06 ± 0,04	0,01 ± 0,01	0,04 ± 0,02	0,05 ± 0,02	0,04 ± 0,02	0,03 ± 0,02	0,510
BUN mg/dL	23,99 ± 1,27	26,31 ± 1,77	24,25 ± 1,58	30,61 ± 3,24	32,45 ± 5,04	25,97 ± 1,38	0,433
Üre mg/dL	51,33 ± 2,73	56,30 ± 3,80	51,89 ± 3,37	65,50 ± 6,94	69,44 ± 10,78	55,57 ± 2,96	0,433
Krea mg/dL	2,05 ± 0,08	2,07 ± 0,11	1,97 ± 0,08	2,22 ± 0,16	2,41 ± 0,09	2,14 ± 0,10	0,093
T. Prot g/dL	6,24 ± 0,33	5,30 ± 0,18	5,39 ± 0,36	4,67 ± 0,48	4,88 ± 0,34	5,51 ± 0,45	0,086
Alb g/dL	3,11 ± 0,13	2,71 ± 0,09	2,90 ± 0,15	2,58 ± 0,23	2,63 ± 0,16	2,96 ± 0,19	0,276
ALT mg/dL	64,78 ± 5,91	64,60 ± 11,23	55,67 ± 3,48	56,20 ± 10,09	69,11 ± 14,67	82,29 ± 20,53	0,792
AST mg/dL	158,22±25,15	196,30±36,89	173,44±28,08	151,00±23,03	163,22±29,09	185,86±39,65	0,878
ALP mg/dL	110,67±22,09 ^b	79,60±10,12 ^b	97,22±12,80 ^b	105,30±15,35 ^b	358,20±121,41 ^a	156,43±25,35 ^{ab}	0,020
Ca mg/dL	6,47 ± 1,16 ^b	9,24 ± 0,36 ^a	9,69 ± 0,30 ^a	9,78 ± 0,41 ^a	9,27 ± 0,22 ^a	9,46 ± 0,43 ^a	0,017
P mg/dL	6,70 ± 0,26	7,05 ± 0,39	5,79 ± 0,73	5,66 ± 0,47	4,09 ± 0,98	8,70 ± 2,40	0,065

3.6. Lipit Profili

Toplam Kolesterol sonuçlarında istatistiksel bakımdan anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ancak en yüksek konsantrasyon metformin verilen grupta iken en düşük konsantrasyon karayemiş uygulanan grupta bulunmuştur. Sonuçlar sırasıyla kontrol grubundan başlamak üzere $45,00 \pm 6,19$ mg/dL, $55,90 \pm 4,22$ mg/dL, $54,22 \pm 5,09$ mg/dL, $41,40 \pm 1,89$ mg/dL, $44,89 \pm 3,49$ mg/dL ve son olarak $48,00 \pm 3,90$ mg/dL olarak bulunmuştur ($p>0,05$).

Trigliserit değerleri sırasıyla kontrol grubunda $61,22 \pm 9,87$ mg/dL, DM grubunda $70,00 \pm 7,57$ mg/dL, metformin uygulanan grupta $92,11 \pm 9,55$ mg/dL,

karayemiş uygulanan grupta $79,30 \pm 7,27$ mg/dL, rutin verilen grupta $83,56 \pm 11,38$ mg/dL ve lipoik asit uygulanan grupta $89,86 \pm 8,27$ mg/dL olarak bulunmuştur. İstatistiksel bakımdan anlamlılık yoktur fakat en yüksek trigliserit konsantrasyonu yine metformin verilen grupta iken en düşük trigliserit konsantrasyonu DM grubunda çıkmıştır ($p>0,05$).

İyi kolesterol olarakta adlandırılan HDL kolesterol sonuçlarında istatistiksel bakımdan anlamlılık yoktur. En yüksek HDL düzeyine sahip olan grup DM grubu iken en düşük konsantrasyon görülen grup karayemiş grubudur. İlk gruba ait sonuçlar $19,40 \pm 1,58$ mg/dL'dir ve ikinci gruba ait konsantrasyon $22,69 \pm 1,92$ mg/dL'dir. Üçüncü grupta HDL düzeyi $19,74 \pm 1,15$ mg/dL, dördüncü grupta $18,07 \pm 0,85$ mg/dL, beşinci grupta $19,14 \pm 1,92$ mg/dL ve son grupta $19,79 \pm 1,85$ mg/dL olarak bulunmuştur ($p>0,05$).

LDL ise kötü kolesterol olarak bilinir ve ateroskleroza sebep olmaktadır. En yüksek LDL değeri DM grubunda ve en düşük karayemiş grubunda bulunmuştur. İstatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur. Sonuçlar ilk grupta $13,20 \pm 4,13$ mg/dL, ikinci grupta $19,21 \pm 3,60$ mg/dL, üçüncü grupta $16,06 \pm 4,73$ mg/dL, dördüncü grupta $7,47 \pm 1,45$ mg/dL, beşinci grupta $9,03 \pm 1,18$ mg/dL ve son olarak altıncı grupta $10,23 \pm 2,71$ mg/dL olarak bulunmuştur ($p>0,05$). Lipit ptofillerine ait ortalama $\pm$ standart hata ve p değerleri Çizelge 3.4'de verilmiştir.

Çizelge 3.4.Lipit değerlerine ait sonuçlar

	T.Kolesterol (mg/dL) (M $\pm$ SE)	Trigliserit (mg/dL) (M $\pm$ SE)	HDL (mg/dL) (M $\pm$ SE)	LDL (mg/dL) (M $\pm$ SE)
Kontrol	45,00 $\pm$ 6,19	61,22 $\pm$ 9,87	19,40 $\pm$ 1,58	13,20 $\pm$ 4,13
DM	55,90 $\pm$ 4,22	70,22 $\pm$ 7,57	22,69 $\pm$ 1,92	19,21 $\pm$ 3,60
DM + Met	54,22 $\pm$ 5,09	92,11 $\pm$ 9,55	19,74 $\pm$ 1,15	16,06 $\pm$ 4,73
DM + Met + KY	41,40 $\pm$ 1,89	79,30 $\pm$ 7,26	18,07 $\pm$ 0,85	7,47 $\pm$ 1,44
DM + Met + R	44,89 $\pm$ 3,49	83,56 $\pm$ 11,38	19,14 $\pm$ 1,92	9,03 $\pm$ 1,18
DM + Met + LA	48,00 $\pm$ 3,90	89,86 $\pm$ 8,26	19,79 $\pm$ 1,84	10,23 $\pm$ 2,71
p değerleri	0,117	0,160	0,396	0,094

3.7. Antioksidan Analizler

Seruloplazmin dışında diğer antioksidan analizlerde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Çizelge 3.5’da antioksidan analizlerin $M \pm SE$ ve p değerleri verilmiştir.

Çizelge 3.5. Antioksidan analizlerin sonuçları

	PON (U/mL) (M $\pm$ SE)	GPx (U/mg protein) (M $\pm$ SE)	SOD (U/mg protein) (M $\pm$ SE)	Seruloplazmin (U/mL) (M $\pm$ SE)
Kontrol	330,67 $\pm$ 30,13	0,0030 $\pm$ 0,0002	0,0106 $\pm$ 0,0006	19,87 $\pm$ 1,13 ^{ab}
DM	434,64 $\pm$ 29,18	0,0034 $\pm$ 0,0003	0,0010 $\pm$ 0,0015	22,89 $\pm$ 2,85 ^a
DM + Met	489,94 $\pm$ 63,29	0,0035 $\pm$ 0,0004	0,0107 $\pm$ 0,0010	15,27 $\pm$ 2,46 ^{abc}
DM + Met + KY	444,30 $\pm$ 55,83	0,0046 $\pm$ 0,0007	0,0142 $\pm$ 0,0020	15,70 $\pm$ 1,00 ^{bc}
DM + Met + R	547,85 $\pm$ 67,88	0,0040 $\pm$ 0,0005	0,0125 $\pm$ 0,0017	14,31 $\pm$ 0,73 ^c
DM + Met + LA	553,05 $\pm$ 98,71	0,0033 $\pm$ 0,0005	0,0106 $\pm$ 0,0012	15,20 $\pm$ 1,66 ^{bc}
p değerleri	0,128	0,381	0,295	0,009

3.7.1. Paraoksonaz Analizi

Paraoksonaz (PON) özellikle HDL ile ilişkili olan bir antioksidan enzimdir ve yapılan istatistik çalışmalarının sonucunda gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Sonuçlarda anlamlılık bulunmamaktadır ancak en düşük PON değeri kontrol grubuna aittir ve 330,67 $\pm$ 30,13 U/mL bulunmuştur en yüksek sonuç ise rutin ve lipoik asit verilen beşinci ve altıncı gruba aittir (547,85 $\pm$ 67,88; 553,05 $\pm$ 98,70 U/mL). DM grubunda 434,64 $\pm$ 29,18 U/mL, DM + Met grubunda 489,94 $\pm$ 63,29 U/mL ve DM + Met +KY grubunda 444,30 $\pm$ 55,83 U/mL bulunmuştur (p>0,05).

3.7.2. Seruloplazmin Analizi

Seruloplazmin taşıyıcı görev gören bir antioksidan maddedir ve genelde bakırın çoğu seruloplazmine bağlı halde bulunur. Antioksidan görevi olduğu için

diyabette önemlidir ve istatistiksel sonuçlara göre gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmuştur. Kontrol grubu ($19,87 \pm 1,13$ U/mL) ile rutin grubu ($14,31 \pm 0,73$ U/mL) arasında ve DM'li grubun ($22,89 \pm 2,85$ U/mL) ise hem rutin ($14,31 \pm 0,73$ U/mL) verilen grup hem karayemiş ($15,70 \pm 1,00$ U/mL) hem de alfa lipoik asit ($15,20 \pm 1,66$ U/mL) verilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkı vardır. Tek başına metformin ($15,27 \pm 2,47$ U/mL) verilen grubun diğer hiçbir grup ile arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. En yüksek seruloplazmin değeri ikinci grup olan hasta hayvanlardan oluşan ve tedavi uygulanmayan grupta bulunurken, en düşük değer ise rutin flavonoidinin metformin ile kombine olarak uygulandığı beşinci grupta bulunmuştur ($p \leq 0,05$).

3.7.3. Glutasyon Peroksidaz Analizi

Yine önemli bir antioksidan enzim görevi gören ve bu yüzden diyabette önemli sayılabilecek glutasyon peroksidaz analizlerinin sonuçlarında istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Sonuçlarda en yüksek GPx düzeyi karayemiş verilen dördüncü gruba aittir ve $0,0046 \pm 0,0007$ U/mg protein bulunmuştur. En düşük değer ise kontrol grubuna aittir ve $0,0030 \pm 0,0002$ U/mg proteindir. DM grubu ($0,0034 \pm 0,0003$ U/mg protein), DM + Met grubu ($0,0035 \pm 0,0004$ U/mg protein), DM + Met + LA grubu ($0,0033 \pm 0,0005$ U/mg protein) ve DM + Met + R grubunda ise sonuç $0,0040 \pm 0,0005$ U/mg protein çıkmıştır.

3.7.4. Süperoksit Dismutaz Analizi

Antioksidan ailesinin önemli bir üyesi olan süperoksit dismutaz (SOD) enzimi sonuçlarına göre istatistiksel bakımdan anlamlı bir fark bulunamamıştır. İstatistiksel bakımdan anlamlılık olmamasına karşın DM grubu olan ikinci grupta ($0,0010 \pm 0,0015$ U/mg protein) sonuçlar en düşük ve karayemiş grubunda ($0,0142 \pm 0,0020$ U/mg protein) en yüksek çıkmıştır. Kontrol grubu, DM+ Met grubu ve DM + Met + LA grubu birbirilerine çok yakın çıkmışlardır ve sırasıyla $0,0106 \pm 0,0006$ U/mg protein;

0,0107 $\pm$ 0,0010 U/mg protein ve 0,0106 $\pm$ 0,0012 U/mg protein olarak hesaplanmıştır. Karayemiş grubu kadar olmasa da yine de diğer gruplara göre yüksek düzeyde SOD içeren grup ise beşinci grup olmuştur ve sonuçlar 0,0125 $\pm$ 0,0017 U/mg protein çıkmıştır (p>0,05).

3.8. HbA1c ve Fruktozamin Analizi

Diyabet komplikasyonlarının şekillenmesinden sorumlu olan oksidan etkisi bulunan HbA1c yüzdesi ve Fruktozamin değerleri ölçülmüş olup istatistiksel bakımdan herhangi bir fark bulunamamıştır. Fruktozamin sonuçları son iki haftalık ortalama kan şeker seviyeleri hakkında bilgi verirken, HbA1c yüzdesi son 3 aylık kan şeker düzeyi ortalamasını vermektedir, dolayısıyla HbA1c yüzdesi diyabet tanısında ilk sırada gelmektedir.

Fruktozamin konsantrasyonları ilk grupta 278,00 $\pm$ 13,90 μ mol/L, ikinci grupta 234,90 $\pm$ 7,48 μ mol/L, üçüncü grupta 240,56 $\pm$ 14,74 μ mol/L, dördüncü grupta 258,70 $\pm$ 20,92 μ mol/L, beşinci grupta 277,67 $\pm$ 11,22 μ mol/L ve son grupta 247,71 $\pm$ 22,53 μ mol/L olarak bulunmuştur. İstatistiksel bakımdan anlamlılık yoktur ancak yine de değerlendirilecek olursa en yüksek değer kontrol grubuna aittir ve en düşük değer metformin uygulanan gruba aittir (p>0,05).

HbA1c yüzdesinde en yüksek yüzde kontrol ve rutin verilen grupta iken en düşük yüzde DM grubuna aittir. Çıkan sonuçlar kontrol grubunda %6,34 $\pm$ 0,24; DM grubunda %5,60 $\pm$ 0,13; DM + Met grubunda %5,70 $\pm$ 0,25; DM + Met + KY grubunda %6,11 $\pm$ 0,34; DM + Met + R grubunda %6,33 $\pm$ 0,19 ve DM + Met + LA grubunda %5,82 $\pm$ 0,38 bulunmuştur. Yine istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (p>0,05). Çizelge 3.6’da ortalama $\pm$ std hata ve p değerleri verilmiştir.

Çizelge 3.6. Fruktozamin ve HbA1c sonuçları.

	Fruktozamin (μmol/L) (M ± SE)	p	HbA1c (%) (M ± SE)	p
Kontrol	278,00 ± 13,90	0,236	6,34 ± 0,24	0,195
DM	234,90 ± 7,48		5,60 ± 0,13	
DM + Met	240,56 ± 14,74		5,70 ± 0,25	
DM + Met + KY	258,70 ± 20,92		6,11 ± 0,34	
DM + Met + R	277,67 ± 11,22		6,33 ± 0,19	
DM + Met + LA	247,71 ± 22,53		5,82 ± 0,38	

3.9. Rat İnsulin Analizi

Örneklerin çoğu blankten düşük çıktığı için değerlendirilememiştir ve istatistiksel olarak değerlendirmeye alınamamıştır. Yinede sonuçlar çıktığı şekilde tablolastırılarak çizelge 3.7’de gösterilmiştir.

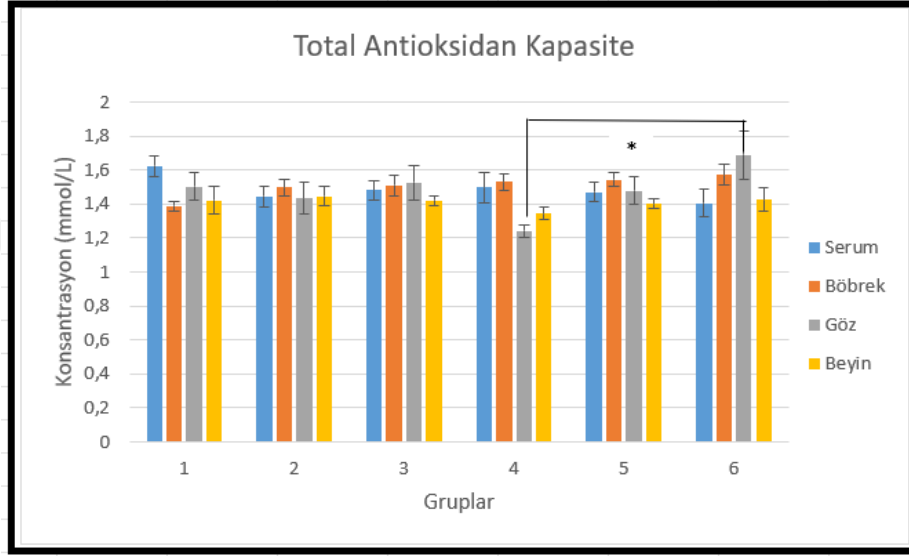
Çizelge 3.7. Deney gruplarının serum insulin konsantrasyonları (ng/mL; ND: tespit edilemedi)

İnsulin (ng/mL)	Kontrol	DM	DM + Met	DM + Met + KY	DM + Met + R	DM + Met + LA
1	ND	ND	0,231	ND	ND	ND
2	ND	ND	ND	ND	0,288	0,362
3	0,207	0,355	ND	ND	ND	0,337
4	ND	0,306	ND	ND	0,330	0,228
5	ND	0,217	ND	0,221	0,309	0,228
6	ND	ND	0,207	0,217	ND	0,207
7	ND	ND	ND	0,327	ND	0,313
8	ND	ND	ND	0,330	ND	
9	ND	ND	0,231	0,260	0,330	
10		0,224		ND		

Deney sonunda 60 hayvandan 54 adet hayvan kalmıştır ve Kontrol grubunda başlayarak kalan hayvan sayıları sırasıyla 9, 10, 9, 10, 9, 7 adettir. Hayvanların çoğunda insulin değerleri hesaplanmayacak düzeylerde çıktığı için her hayvanın sonucu ayrı ayrı tablolastırılmıştır.

3.10. Total Antioksidan Kapasitesi

Doku ve kan serum örneklerinin TAS bulguları her bir doku kendi içinde gruplar arası farklılıklar yönünden analiz edilmiştir. Ayrıca bir de grupların kendi içinde farklı dokulardaki bulguları karşılaştırılmıştır ve grafik olarak verilmiştir. Şekil 3.6'da Grup içi dokuların karşılaştırılmasına ait grafik verilmiştir.



Şekil 3.6. Dokuların TAS yönünden karşılaştırılması (*göz $p < 0,05$ DM + Met + KY grubu ile DM + Met + LA grubu arasında anlamlı farklılık vardır).

3.10.1. Serum Total Antioksidan Kapasitesi

Gruplar arası plazma TAS bulgularının mmol/L birimi cinsinden Trolox eşdeğeri verilmiştir. Buna göre istatistiksel bakımdan gruplar arası anlamlı bir farklılık yoktur ancak yine de en yüksek TAS değeri kontrol grubunda ($1,62 \pm 0,06$ mmol/L) ve en düşük ise metformin ve lipoik asit kombinasyonu verilen grupta ($1,41 \pm 0,08$ mmol/L) bulunmuştur. Diğer gruplarda çıkan sonuçlar ise sırasıyla DM grubunda $1,44 \pm 0,06$ mmol/L, DM + Met grubunda $1,48 \pm 0,06$ mmol/L, DM + Met + KY grubunda $1,50 \pm 0,09$ mmol/L ve DM + Met + R grubunda ise $1,47 \pm 0,06$ mmol/L Trolox eşdeğeri olarak sonuçlar kaydedilmiştir.

3.10.2. Göz dokusu Total Antioksidan Kapasitesi

Göze ait TAS verilerinde istatistiksel bakımdan anlamlı bir farklılık olduğu görülmüştür ve bu anlamlılıklar karayemiş ve alfa lipoik asit verilen gruplar arasındadır. En düşük TAS ortalaması karayemiş grubuna aittir ve $1,24 \pm 0,04$ mmol/L çıkmıştır. En yüksek değer ise lipoik asit verilen gruba aittir ve $1,69 \pm 0,14$ mmol/L bulunmuştur. Diğer gruplara ait bulgular ise Kontrol grubunda $1,50 \pm 0,08$ mmol/L, DM grubunda $1,43 \pm 0,09$ mmol/L, DM+ Met grubunda $1,52 \pm 0,10$ mmol/L ve son olarak DM + Met + R grubunda $1,48 \pm 0,08$ mmol/L bulunmuştur.

3.10.3. Beyin dokusu Total Antioksidan Kapasitesi

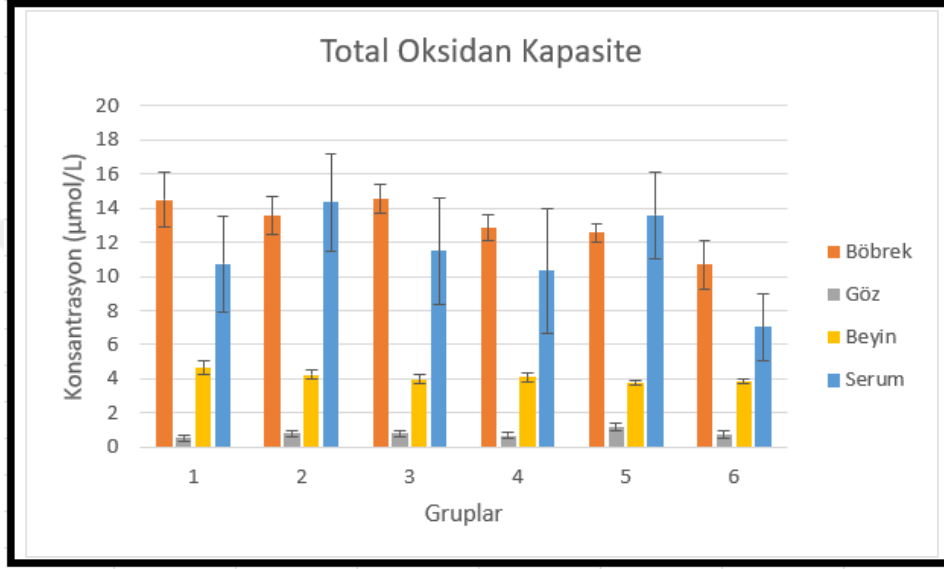
Beyindeki TAS verileri istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığını söylemektedir ancak kontrol grubu, metformin grubu ve lipoik asit grubuna ait ortalamalar aynı bulunmuştur ($1,42 \pm 0,08$; $1,42 \pm 0,03$; $1,42 \pm 0,07$ mmol/L). En düşük TAS değeri beyinde karayemiş grubundadır ve $1,35 \pm 0,04$ mmol/L olarak bulunmuştur. En yüksek TAS değeri ise diyabet grubunda $1,45 \pm 0,06$ mmol/L olarak bulunmuştur. Rutin verilen grupta ise sonuç $1,40 \pm 0,03$ mmol/L çıkmıştır.

3.10.4. Böbrek dokusu Total Antioksidan Kapasitesi

Böbrek dokusuna ait yapılan TAS analizi sonucunda istatistiksel bakımdan anlamlı bir farklılığın olmadığı görülmüştür ancak buna rağmen en yüksek TAS değeri böbrekte lipoik asit verilen grupta ($1,57 \pm 0,06$ mmol/L) görülmüştür. En düşük değer ise kontrol grubunda ($1,39 \pm 0,03$ mmol/L) bulunmuştur. Diğer gruplara ait sonuçlar ise sırasıyla DM grubu $1,50 \pm 0,05$ mmol/L, DM + Met grubu $1,51 \pm 0,06$ mmol/L, DM + Met + KY $1,53 \pm 0,05$ mmol/L ve DM + Met + R grubu $1,54 \pm 0,04$ mmol/L şeklindedir.

3.11. Total Oksidan Kapasitesi (TOS)

Doku ve kan serum örneklerinin TOS bulguları her bir doku kendi içinde gruplar arası farklılıklar yönünden analiz edilmiştir. Şekil 3.7’de Grup içi dokuların karşılaştırılmasına ait grafik verilmiştir.



Şekil 3.7. Dokuların TOS yönünden karşılaştırılması ($p>0,05$).

3.11.1. Serum Total Oksidan Kapasitesi

Serumlara ait TOS verileri istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir farklılık vermemiştir ve sonuçlar kontrol grubundan başlayarak sırasıyla $10,72 \pm 2,82$ $\mu\text{mol/L}$, $14,34 \pm 2,84$ $\mu\text{mol/L}$, $11,50 \pm 3,13$ $\mu\text{mol/L}$, $10,35 \pm 3,66$ $\mu\text{mol/L}$, $12,69 \pm 2,52$ $\mu\text{mol/L}$ ve son olarak $7,02 \pm 2,00$ $\mu\text{mol/L}$ çıkmıştır. En yüksek TOS konsantrasyonu DM grubuna aittir ve en düşük konsantrasyon ise lipoik asit grubuna aittir ($p>0,05$).

3.11.2. Göz dokusu Total Oksidan Kapasitesi

Gözde de sonuçlar istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir farklılık vermemiştir fakat en yüksek TOS konsantrasyonu rutin flavonoidi verilen grupta iken en düşük TOS konsantrasyonu kontrol grubunda çıkmıştır. Kontrol grubunda ort $\pm$ std hata değerleri $0,53 \pm 0,16$ $\mu\text{mol/L}$, DM grubunda $0,77 \pm 0,20$ $\mu\text{mol/L}$, DM + Met grubunda $0,79 \pm 0,17$ $\mu\text{mol/L}$, karayemiş grubunda $0,68 \pm 0,15$ $\mu\text{mol/L}$, rutin flavonoidi verilen grupta $1,16 \pm 0,21$ $\mu\text{mol/L}$ ve lipoik asit grubunda $0,71 \pm 0,25$ $\mu\text{mol/L}$ olarak bulunmuştur ($p>0,05$).

3.11.3. Beyin dokusu Total Oksidan Kapasitesi

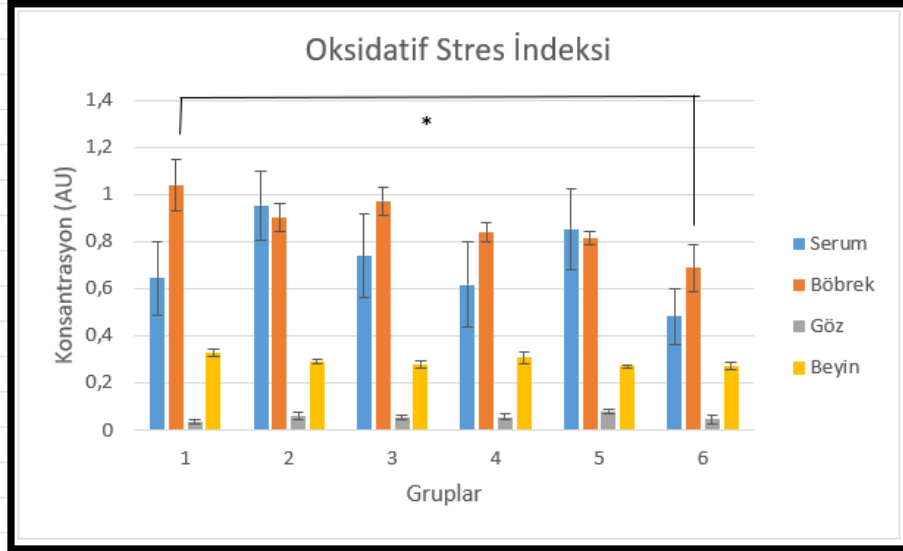
Beyin dokusunda en yüksek konsantrasyon kontrol grubunda çıkarken en düşük konsantrasyon rutin flavonoidi verilen grupta çıkmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır. İlk gruba ait sonuçlar $4,65 \pm 0,37$ $\mu\text{mol/L}$, ikinci grubun sonuçları $4,24 \pm 0,25$ $\mu\text{mol/L}$, üçüncü grubun $3,97 \pm 0,27$ $\mu\text{mol/L}$, dördüncü grubun $4,08 \pm 0,26$ $\mu\text{mol/L}$, beşinci grubun $3,77 \pm 0,13$ $\mu\text{mol/L}$ ve altıncı grubun değeri $3,85 \pm 0,16$ $\mu\text{mol/L}$ bulunmuştur ($p>0,05$).

3.11.4. Böbrek dokusu Total Oksidan Kapasitesi

TOS değerleri böbreklerde de istatistiksel bakımdan anlamlı bir fark vermemiştir. En yüksek konsantrasyonlar diyabet olan ve metformin verilen gruptadır, en düşük değerler ise lipoik asit verilen grupta bulunmuştur. Kontrol grubunda sonuçlar $14,50 \pm 1,60$ $\mu\text{mol/L}$, DM grubunda $13,54 \pm 1,12$ $\mu\text{mol/L}$, DM + Met grubunda $14,56 \pm 0,88$ $\mu\text{mol/L}$, DM + Met + KY grubunda $12,85 \pm 0,77$ $\mu\text{mol/L}$, DM + Met + R grubunda $12,57 \pm 0,51$ $\mu\text{mol/L}$ ve son olarak DM + Met + LA grubunda $10,71 \pm 1,43$ $\mu\text{mol/L}$ olarak bulunmuştur ($p>0,05$).

3.12. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)

Doku ve kan serum örneklerinin OSİ bulguları her bir doku kendi içinde gruplar arası farklılıklar yönünden analiz edilmiştir. Şekil 3.8’de Grup içi dokuların karşılaştırılmasına ait grafik verilmiştir.



Şekil 3.8. Dokuların OSİ yönünden karşılaştırılması (*böbrek $p<0,05$ Kontrol grubu ile DM + Met + LA grubu arasında anlamlı farklılık vardır).

3.12.1. Serum Oksidatif Stres İndeksi

Serum OSİ değerlerinde istatistiksel bakımdan anlamlı bir fark bulunamamıştır. En yüksek oksidatif stres indeksi diyabet grubunda iken en düşük olan lipoik asit grubunda bulunmuştur. Kontrol grubunda oksidatif stres indeksi $0,64 \pm 0,16$ AU, DM grubunda $0,95 \pm 0,15$ AU, DM + Met grubunda $0,74 \pm 0,18$ AU, DM + Met + KY grubunda $0,62 \pm 0,18$ AU, DM + Met + R grubunda $0,86 \pm 0,17$ AU ve son olarak DM + Met + LA grubunda $0,48 \pm 0,12$ AU bulunmuştur ($p>0,05$).

3.12.2. Böbrek Oksidatif Stres İndeksi

Böbrek OSİ değerinde istatistiksel bakımdan kontrol grubu ile lipoik asit grubu arasında anlamlı bir farklılık vardır. Kontrol grubundaki oksidatif stres indeksi en yüksek değerde iken lipoik asit verilen grupta oksidatif stres indeksi en düşük değerde bulunmuştur. Kontrol grubu olan ilk grupta böbrek OSİ $1,05 \pm 0,11$ AU'dir. İkinci grupta $0,90 \pm 0,06$ AU, üçüncü grupta $0,97 \pm 0,06$ AU, dördüncü grupta $0,84 \pm 0,04$ AU, beşinci grupta $0,82 \pm 0,03$ AU ve altıncı grup olan lipoik asit grubunda $0,69 \pm 0,10$ AU bulunmuştur ($p \leq 0,05$).

3.12.3. Göz Oksidatif Stres İndeksi

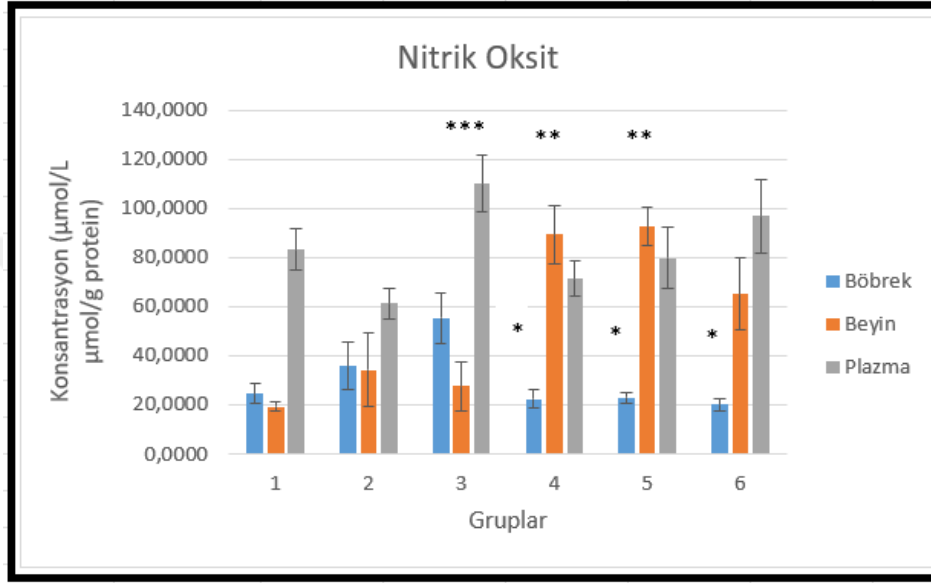
Oksidatif stres indeksi göz dokusunda en yüksek rutin flavonoidi verilen grupta bulunurken en düşük kontrol grubunda bulunmuştur. İstatistiksel bakımdan gruplar arasında anlamlı farklılıklar yoktur. Kontrol grubunun oksidatif stres indeksi $0,03 \pm 0,01$ AU, DM grubunda $0,06 \pm 0,02$ AU, DM + Met grubunda $0,05 \pm 0,01$ AU, DM + Met + KY grubunda $0,06 \pm 0,01$ AU, DM + Met + R grubunda $0,08 \pm 0,01$ AU ve son grupta da $0,05 \pm 0,02$ AU olarak bulunmuştur ($p > 0,05$).

3.12.4. Beyin Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)

Sonuçlar istatistiksel olarak anlamlılık ifade etmemektedir ancak veriler sırasıyla kontrol grubundan başlayarak $0,33 \pm 0,02$ AU, $0,29 \pm 0,01$ AU, $0,28 \pm 0,02$ AU, $0,31 \pm 0,03$ AU, $0,27 \pm 0,01$ AU ve $0,27 \pm 0,02$ AU bulunmuştur. Beyinde oksidatif stres indeksi en yüksek kontrol grubunda iken en düşük rutin grubu ile lipoik asit grubunda bulunmuştur ($p > 0,05$).

3.13. Nitrik Oksit Analizi

Doku ve kan plazma örneklerinin NO bulguları her bir doku kendi içinde gruplar arası farklılıklar yönünden analiz edilmiştir. Şekil 3.9'de Gruplar arası dokuların karşılaştırılmasına ait grafik verilmiştir.



Şekil 3.9. Dokuların NO yönünden karşılaştırılması (* $p < 0,05$ ve DM + Met grubu ile işaretli gruplar arasında istatistiksel fark vardır; ** $p < 0,01$ ve kontrol, DM ve DM + Met ile işaretli gruplar arasında istatistiksel olarak fark vardır; *** $p < 0,05$ ve DM grubu ile işaretli grup arasında istatistiksel olarak fark vardır).

3.13.1. Plazma Nitrik Oksit Analizi

Plazma da NO değerleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ve DM ile DM + Met grubu arasında anlamlı bir fark vardır. En düşük konsantrasyona sahip grup diyabet grubu iken en yüksek NO konsantrasyonuna sahip grup metformin uygulanan grup olmuştur. Kontrol grubunun sonucu $83,18 \pm 8,51$ µmol/L'dir, DM grubunun $61,27 \pm 6,26$ µmol/L, DM + Met grubunun $110,22 \pm 11,44$ µmol/L, DM + Met + KY grubunun $71,47 \pm 7,18$ µmol/L, DM + Met + R grubunun $79,78 \pm 12,39$ µmol/L ve son olarak DM + Met + LA grubunun konsantrasyonu $96,80 \pm 14,89$ µmol/L bulunmuştur ($p \leq 0,05$).

3.13.2. Beyin Nitrik Oksit Analizi

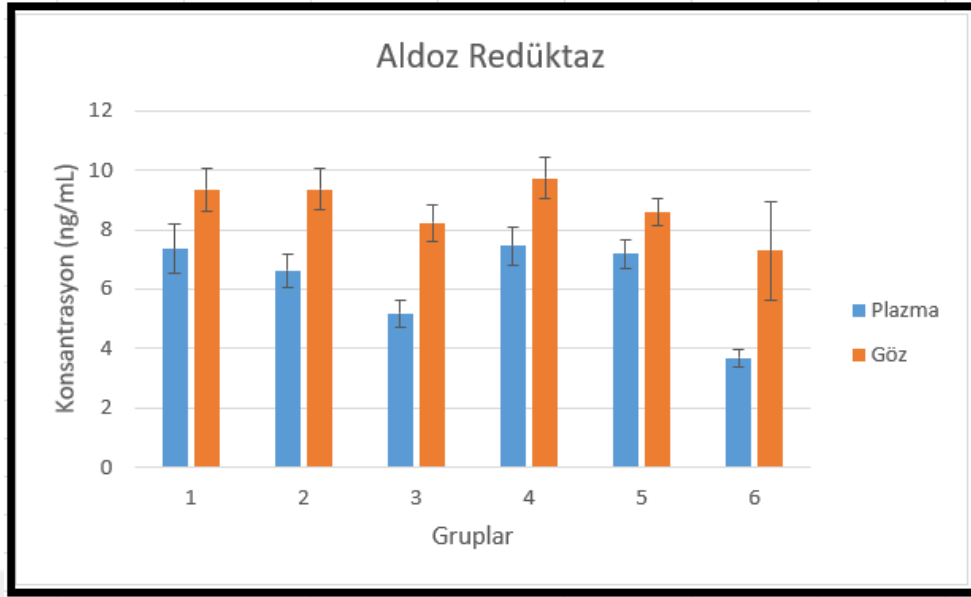
Beyinde NO konsantrasyonları en düşük kontrol ve en yüksek rutin flavonoidi verilen grupta bulunmuştur. İstatistiksel bakımdan ilk grup ile dördüncü grup, ilk grup ile beşinci grup, ikinci grup ile dördüncü grup, ikinci grup ile beşinci grup, üçüncü grup ile dördüncü grup ve son olarak üçüncü grup ile beşinci grup arasında istatistiksel bakımdan anlamlı bir farklılık vardır. Çıkan sonuçlar kontrol grubundan başlayarak sırasıyla $19,53 \pm 1,90$ $\mu\text{mol/g}$ protein, $34,07 \pm 15,01$ $\mu\text{mol/g}$ protein, $27,63 \pm 9,98$ $\mu\text{mol/g}$ protein, $89,53 \pm 11,91$ $\mu\text{mol/g}$ protein, $92,67 \pm 7,67$ $\mu\text{mol/g}$ protein ve son olarak $65,05 \pm 14,70$ $\mu\text{mol/g}$ protein olarak bulunmuştur ($p \leq 0,05$).

3.13.3. Böbrek Nitrik Oksit Analizi

Yine istatistiksel olarak bazı gruplar arasında anlamlı farklılıklar vardır ve farklılıklar metformin uygulanan grup ile kombinasyon grupları arasında bulunmuştur. İlk gruba ait konsantrasyon ort $\pm$ std hata olarak $32,74 \pm 4,31$ $\mu\text{mol/g}$ protein, ikinci grupta $35,73 \pm 9,71$ $\mu\text{mol/g}$ protein, üçüncü grupta $55,41 \pm 10,24$ $\mu\text{mol/g}$ protein, dördüncü grupta $22,40 \pm 3,74$ $\mu\text{mol/g}$ protein, beşinci grupta $22,89 \pm 1,99$ $\mu\text{mol/g}$ protein ve son grupta $20,00 \pm 2,29$ $\mu\text{mol/g}$ protein olarak bulunmuştur (* $p \leq 0,05$).

3.14. Rat Aldoz Redüktaz Analizi

Doku ve kan plazma örneklerinin AR bulguları her bir doku kendi içinde gruplar arası farklılıklar yönünden analiz edilmiştir. Şekil 3.10’de Grup içi dokuların karşılaştırılmasına ait grafik verilmiştir.



Şekil 3.10. Dokuların AR yönünden karşılaştırılması ($p>0,05$).

3.14.1. Göz dokusu Aldoz Redüktaz Analizi

Göz dokusunda AR aktivitesine ait sonuçların gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık yoktur ancak en yüksek konsantrasyonda AR aktivitesi $7,46 \pm 0,64$ ng/mL ile karayemiş verilen grup iken, en düşük aktivite $3,68 \pm 0,29$ ng/mL ile lipoik asit verilen gruptur. AR aktivitesi kontrol grubunda $7,36 \pm 0,85$ ng/mL, DM grubunda $6,61 \pm 0,57$ ng/mL bulunmuştur. DM + Met grubunda $5,17 \pm 0,46$ ng/mL; DM + Met + R grubunda ise $7,18 \pm 0,49$ ng/mL AR aktivitesi vardır ($p>0,05$).

3.14.2. Plazma Aldoz Redüktaz Analizi

Plazmada en yüksek aktivite karayemiş verilen grupta bulunurken en düşük aktivite lipoik asit grubunda bulunmaktadır. Sonuçlarda istatistiksel bakımdan anlamlı bir farklılık yoktur ve kontrol grubunda $9,34 \pm 0,75$ ng/mL, DM grubunda $3,34 \pm 0,69$ ng/mL, DM + Met grubunda $8,24 \pm 0,61$ ng/mL, DM + Met + KY grubunda $9,74 \pm 0,69$ ng/mL, DM + Met + R grubunda $8,59 \pm 0,46$ ng/mL ve son olarak DM + Met + LA grubunda $7,29 \pm 1,68$ ng/mL AR aktivitesi vardır ($p>0,05$).

3.15. Pankreasın Histopatolojik Bulguları

Tip 2 diyabetes mellitusda pankreas langerhans adacıklarında yer alan beta hücrelerinden insulin salınmaya devam etmekte ancak pankreasda dejeneratif değişiklikler tip 1 diyabette olduğu kadar şiddetli olmamaktadır. İnsulin salınımına karşı bir direnç geliştiği için insulin salınımı azalmıştır ancak tamamen bitmemiştir. Hematoksilen eozin ile boyanan pankreas kesitleri mikroskop altında langerhans adacıklarında atrofi, dejeneratif değişiklikler ve diğer bulgular yönünden incelenmiştir. Atrofi ve dejeneratif değişiklikler 1’den 3’e kadar hafif, orta ve şiddetli anlamında derecelendirilmiştir.

Sağlıklı kontrol grubuna ait ratların hiçbirinde dejeneratif ve atrofik değişimler görülmemiştir. İkinci grup olan DM grubunda ise Langerhans adacıklarında çoğunlukla hafif derecede dejeneratif değişiklikler ve atrofi dikkati çekmiştir (9/10). Bununla birlikte interlobuler bölgede yer yer hemoraji (3/10) ve çoğunlukla lenfositlerden oluşan mononükleer hücre infiltrasyonları (1/10) gözlenmiştir. Benzer yangısal hücre infiltrasyonlarına intralobüler alanda (1/10) ve çevre yağ dokuda da (1/10) rastlanmış olup kimi duktuslarda vakuolasyon belirgin şekilde gözlenmiştir (1/10). Çizelge 3.4’de pankreastaki histopatolojik bulguların semi kantitatif derecelendirilmesi verilmiştir.

Çizelge 3.8. Pankreastaki histopatolojik bulguların semi kantitatif derecelendirilmesi.

Gruplar (n)	Langerhans adacıklarında dejeneratif değişiklikler	Langerhans adacıklarında atrofi
Kontrol (n:9)	0	0
DM (n:10)	0-2	0-1
DM+Met (n:9)	0-2	0-1
DM+:Met+KY (n:10)	1-3	0-2
DM+Met+R (n:9)	0-3	1-2
DM+Met+LA (n:7)	1-3	0-1

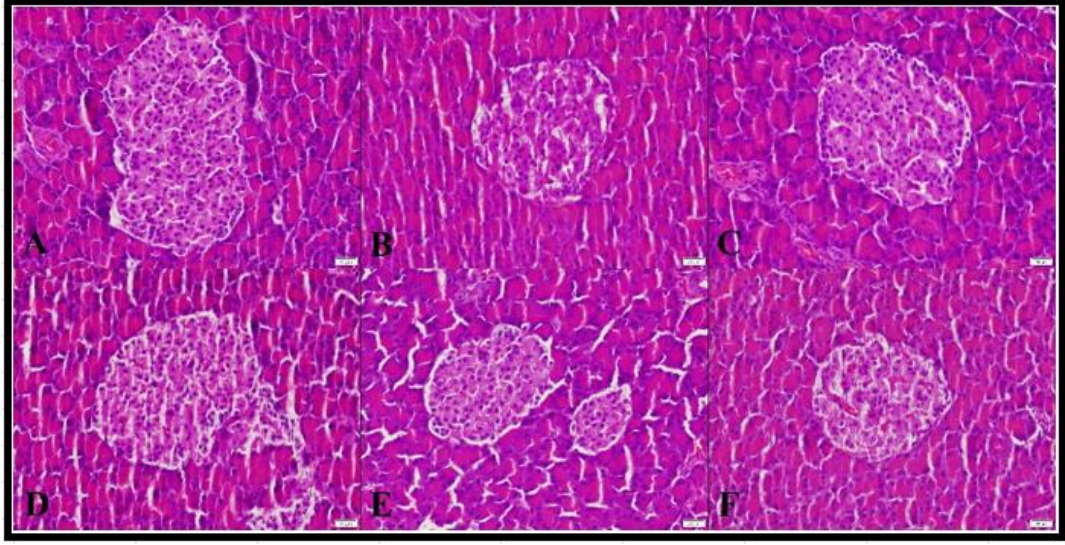
Metformin kullanılan diyabetik gruplarda Langerhans adacıklarında çoğunlukla hafif derecede dejeneratif değişiklikler ve atrofi gözlenmiştir (5/9). Birer hayvanda geniş nekroz alanları, interlobular alanda mononükleer hücre

infiltrasyonları, fibrozis ve hemoraji fark edilmiştir. Ayrıca bir hayvanda özellikle ekzokrin bölümde, multifokal alanlar halinde yağ vakuollerine de rastlanmıştır.

Metformin ve karayemiş uygulanan grupta Langerhans adacıklarında çoğunlukla hafif derecede dejeneratif değişiklikler (10/10) ve atrofi (9/10) fark edilmiş olup genel tablo diğer gruplara oranla daha iyidir.

Metformin ve rutin flavonoidi kombinasyonu uygulanan beşinci gruba ait hayvanlarda Langerhans adacıklarında değişen derecelerde dejeneratif değişiklikler (8/9) ve atrofi (9/9) mevcuttu. Sadece bir hayvanda interlobuler alanda şiddetli hemoraji gözlenmiş olup bu hayvanda sakrifikasyondan 4 gün önce gözde katarakt tespit edilmiştir. Genel anlamda en şiddetli bulgular bu grupta gözlenmiştir.

Son grup olan metformin ve lipoik asit uygulanan Langerhans adacıklarında değişen derecelerde dejeneratif değişiklikler (7/7) ile birlikte hafif derecede atrofi (6/7) dikkati çekmiştir. Ayrıca iki hayvanda özellikle interlobuler alanda yer yer mononükleer hücre infiltrasyonlarına da rastlanmıştır. Şekil 3.11'da gruplar arası histopatolojik karşılaştırmalar verilmiştir.



Şekil 3.11. Gruplar arası karşılaştırmalı histopatolojik bulgular, H&E, Bar: 20 µm. A. Langerhans adacığının histolojik görünümü, kontrol grubu. B. Langerhans adacığında dejeneratif değişiklikler ve atrofi, DM grubu. C. Langerhans adacığında hafif derecede dejeneratif değişiklikler, DM+Met grubu. D. Langerhans adacığında hafif derecede dejeneratif değişiklikler ve atrofi, DM+Met+KY grubu. E. Langerhans adacıklarında hafif derecede atrofi, DM+Met+R grubu. F. Langerhans adacığında orta derecede dejeneratif değişiklikler, DM+Met+LA grubu.

3.16. İdrar analizi

Diyabet grubundaki hayvanlar, idrarlarını tutamadıkları için örnek sayılarında kayıplar meydana gelmiştir. Nitel ölçümler gerçekleştirildiği için istatistiksel bakımdan analiz mümkün olmamıştır ancak idrardan glikoz, keton ve protein maddelerinin atılım şiddetleri 1’den 5’e kadar numaralandırılmıştır. Çizelge 3.5’de idrarda bu maddelerin bulunma şiddetleri verilmiştir.

Çizelge 3.9. İdrarın glikoz, keton ve protein yönünden değerlendirilmesi (ND: tespit edilemedi)

İdrar	Kontrol	DM	DM + Met	DM + Met + KY	DM + Met + R	DM + Met + LA
Glukoz	ND	1	1	1	1	ND
Keton	ND	1	2	1	2	2
Protein	3	4	4	3	4	3

Kontrol grubunda glikoz ve keton tespit edilemezken protein atılımı olmuştur. Ratlarda protein atılımı fizyolojik bir durum olarak kabul edilmektedir. Diyabetli grupta hayvan sayısının az olması sonuçları etkilemiş olsa da ortalama olarak glikoz ve keton atılımı 1. Derece iken protein atılımının şiddeti 4’e çıkmıştır. DM + Met grubunda glikoz bir, keton iki ve protein 4.derece şiddette atılmıştır. DM + Met + KY

glikoz ve keton bir protein 3. Şiddettedir. Beşinci grup olan metformin ve rutin verilen grupta ise glikoz ve keton sonuçları birinci derece iken protein 4. Derece şiddettedir. Son gruba ilişkin glikoz atılımı tespit edilemezken keton 2 ve protein 3. Derece şiddettedir.



4. TARTIŞMA

Demir ve ark. (2017)'nın, Trabzon bölgesinde yetişen karayemişlere ait yaptıkları çalışmada insan kanser hücrelerine uygulanmak üzere karayemişler kurutularak toz haline getirilip DMSO'da ekstrakte edilmiştir ve fenolik madde tayini yapılmıştır. Buradaki sonuçlara göre ise gallik asit eşdeğeri olarak karayemişin gram başına 33,7 mg fenolik madde içerdiği bulunmuştur. Bu çalışmada ise karayemişin fenolik madde içeriği 2,17 mg/g gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak bulunmuştur. Arada bu kadar çok farkın olmasının birçok nedeni olabilir. Bunlardan biri Karadeniz bölgesinin batı, orta ve doğu bölümündeki iklim koşullarının birebir aynı olmaması ve buna bağlı olarak yıl içinde aldığı yağış miktarı ve toprak yapısının farklılığı sayılabilmektedir. Bir diğer neden ise ekstraksiyon yönteminin etkinliği olabilir.

Yine başka bir çalışmada yapılan fenolik madde analizinde 100 g karayemişin kuru ağırlığına karşılık metanolik ekstraksiyonda 1,094 mg gallik asit eşdeğeri fenolik madde bulunmuştur (Yaylacı-Karahalil ve Şahin, 2011). Bu çalışmada ise diğer çalışmaya göre daha düşük toplam fenolik madde bulunmuştur. Bunun sebebi ise yapılan analizin ortam şartları veya karayemişin hasatı, o yılki hava koşulları gibi çeşitli sebeplerden olabilmektedir. Kılmanoğlu (2010)'nın yaptığı tez çalışmasında bulduğu toplam fenolik madde içeriği 412,25 mg/100 g GAE cinsinden bulunmuştur ve çalışma sonuçlarının yaklaşık iki katına denktir. Her iki çalışmada da metanolik ekstraksiyon yapılmış olsa da karayemişlerin hasat edildiği dönem ve o yılki iklim koşulları içeriklerin değişmesine yol açmış olabilir.

Zhang ve ark. (2003)'nın farklı dozlarda STZ ve yüksek yağlı diyet uygulaması ile oluşturdukları diyabet modelleri ile ilgili yaptıkları bir çalışmada 2 ay içindeki ağırlık değişimleri çalışmaya dahil edilmiştir ve sonuçlar göstermiştir ki yüksek yağlı diyet ile beslemede gelişen tip 2 diyabette kilo alımı çok fazla olurken düşük dozda (15 mg/kg) STZ verilen ratlarda kilo almanın kontrol grubuna yakın olduğu görülmüştür. Bu çalışmada tip 2 diyabet oluşturmada STZ ve NA kullanılmıştır ancak

hasta hayvanlar ile kontrol grubu arasında istatistiksel bakımdan anlamlı bir fark bulunmamıştır ve kilo alımları birbirine yakın olmuştur dolayısıyla bu çalışma ile anılan çalışma kontrol grubu ve diyabetik ratlar açısından uyumluluk göstermektedir.

Doğu (2014)'nın tez çalışmasında yaptığı araştırmada kontrol grubu ile diyabetik grup arasında canlı ağırlık bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmüş olup bu çalışmada azalma olsa da istatistiksel bakımdan anlamlı değildir. Ayrıca yine aynı çalışmaya ait metformin verilen diyabetik ratlar ile diyabetik gruplar arasında kilo bakımından bir artış gözlense de istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamış, bu çalışmada buna uyum göstermiştir. Karayemiş ve metformini kombine kullanan grup ile diyabetik grup arasında gözlenen vücut ağırlığı değişimi ise anılan çalışmada istatistiksel bakımdan anlamlı olmayan bir artış şeklinde gözlenmiştir, vücut ağırlık artışlarına ilişkin her iki tezde karşılaştırıldığında sonuçlar birbiriyle uyumluluk göstermektedir.

Deney süresince düzenli olarak glukometre ile ölçülen kan glikoz düzeyleri yapılan tip 2 diyabet çalışmalarında en yüksek diyabetik grupta (≥ 126 mg/dL) en düşük kontrol grubunda ve tedavi edilen gruplarda ise yine normal veya diyabetik gruba göre daha az bulunmuştur (Owolabi ve ark., 2011). Ancak bu çalışmada sonuçlar hem istatistiksel bakımdan anlamlı bir fark bulunmamış hem de en yüksek kan glikoz düzeyi diyabet + metformin + rutin flavonoidi kullanılan 5. grupta görülmüştür. Bu durumda metformin ve doğal ürün kombinasyonunun kullanımının her zaman kan şekerini düşürmediği anlaşılmaktadır. Yapılan araştırmalar sonucunda rat tip 2 diyabet modellerinde açlık kan glikozu ölçümlerinin düşük olduğu ve tip 2 diyabette tokluk kan şeker düzeyinin ölçülmesi gerektiği bildirilmiştir (Joost ve ark., 2012).

King ve Austin (2017)'in belirttiği şekilde nikotinamid ve streptozotosin kombinasyonu ile tip 2 diyabet oluşturulmuş ratlarda kan şeker seviyeleri kontrol grubuna oldukça yakın veya biraz yükselmiş olarak bulunmaktadır. Xiao ve ark. (2013)'nın yaptıkları çalışmada ise anestezide ksilazin kullanımının kan glikoz

düzeylerini arttırdığı ve insulini azalttığı ortaya konulmuştur. Bu durumda kontrol grubu dahil tüm gruplardaki özellikle deneyin sonlandırıldığı gün kan glikoz seviyelerindeki artış ksilazin kullanımına bağlı olabilir. Diğer gruplara ait kan glikoz düzeylerinin daha önce belirtildiği gibi kontrol grubuna çok uzak çıkmamış olması King ve Austin (2017)'in bulguları ile uyum göstermektedir.

McNeill (1999), ratlarda oluşturulan tip 2 diyabetin başlangıcında ölçülen insulin seviyelerinde anlamlı bir artışın olduğunu ancak ilerleyen zamanda insulin seviyesinin aniden azaldığını bu yüzden de deney sonunda insulinin iyi bir biyobelirteç olmaktan çıktığını yapılan araştırmalar sonucunda bildirmiştir. Tip 2 diyabette belli bir dönem hem insulin hem kan şeker düzeyleri hem de kilo bakımından bir artış şekillenmektedir. Daha sonra kan şeker seviyeleri ve kilo sabitlenmekte ancak insulin ani bir şekilde azalmaktadır. İnsulin seviyesinin ölçülebilmesi için idrarda glikoz varlığının yoğun şekilde görülmesi gerekmektedir. Bu durumda yapılan çalışma ile McNeill (1999)'in bildirdiği sonuçlar karşılaştırıldığında sonuçlar birbiriyle uyumluluk göstermiştir. Bu çalışmada insulin seviyeleri ölçülemediği için istatistiksel olarak yorumlanamamış olup idrar glikozu yönünden de sonuçlar paralel seyretmiştir.

Sakul ve ark. (2021)'nin yaptıkları bir çalışmada doğal ürün olan Scarzonanın farklı türlerinden rutin flavanoidi HPLC ile izole edilmiştir, ayrıca rutin kendisi de bir gruba verilmiştir. Buna göre kan şekeri düzeyleri ürünler verildikten sonra, 1., 2., 3. ve 4. saatteki ölçümleri yapılmıştır. Kontrol grubuna göre rutin grubu karşılaştırıldığında rutin grubunun her saat başında şeker düzeylerinin azaldığı görülmüştür. Yapılan çalışmalar karşılaştırıldığında rutin tek başına kan şeker düzeyini düşürme etkisinin olduğu ancak metformin ile kombine kullanımında olmadığı görülmüştür. Bu durumun prooksidan etki veya metforminin yan etkilerini arttırmasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Ancak anılan çalışmaya ilişkin sonuçlar tip 1 diyabet oluşturulan ratlarda görülmüştür. Bu durumda iki çalışmanın farklı sonuçlar vermesi diyabet şekilleri ile ilgili olabilir.

Kan şeker düzeyleri özellikle bireysel farklılık ve stres faktörlerinden etkilenebileceği için grup ortalamaları da etkilenmektedir. Hoseini ve ark. (2009)'nın yaptıkları çalışmada doğal ürünün farklı dozlarda ve farklı çözenlerde ekstraksiyonu sonucu kan şeker düzeylerini etkilemeleri ve kısa süreli ile uzun süreli etkisini ortaya koydukları araştırmada uzun süreli etkisinin daha iyi sonuç verdiğini görmüşlerdir. Bu çalışmadaki uzun süreli etki sonrasında metformin ve rutin verilen beşinci grup hariç diğer tedavi gruplarının kontrol grubuna yakın sonuçlar verdiği gözlenmiştir.

Lipit profillerine bakıldığında Shukla ve ark. (2012)'nin yaptıkları çalışmada HDL düzeyleri doğal ürün kullanımında artarken LDL, trigliserit ve kolesterol seviyeleri düşmüştür ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada ise lipit profilinin hiçbir parametresinde istatistiksel olarak bir fark görülmemiştir. Değerler genel olarak kontrol, diyabetik ve tedavi uygulanan gruplarda birbirine yakın çıkmıştır. Her iki çalışmada da tip 2 diyabet oluşturulmuştur ancak dozlar da farklılıklar vardır. Bir başka çalışmada yine tip 2 diyabet bu çalışma ile aynı dozda olacak şekilde oluşturulmuştur ve tedavi süreci 6 hafta sürmüştür ardından lipit profili çıkarılmıştır. Metformin verilen diyabetik grup ile bu çalışmaya ait sonuçlar farklıdır (Satheesh ve Pari, 2008). Laboratuvar şartları, bireysel farklılıklar, STZ ve NA dozu, uygulanan tedavi işlemleri gibi birçok değişik koşullardan dolayı farklılıklar gözlenebilir.

AST değerleri yapılan bir araştırmada bu çalışmadaki sonuçlara benzer çıkmıştır, tek fark diğer çalışmanın gruplar arasında istatistiksel bakımdan anlamlılık göstermesi iken bu çalışmada istatistiksel bakımdan fark yoktur. Sonuçların benzer olmasındaki en önemli sebep kontrol grubuna ait AST değerlerinin düşük diyabetik grubun en yüksek ve tedavi uygulanan gruplarda ise giderek değerin düşüyor olmasıdır. Buna karşın ALT, ALP, Kreatinin, BUN ve GGT değerleri Wen ve ark. (2019)'nın çalışmasında AST gibi iken bu tez çalışmasında ALP değerleri istatistiksel bakımdan anlamlı ancak anılan çalışmadaki sonuçlara göre çok daha farklıdır. Aynı şekilde diğer parametrelerde de aynı çalışmada istatistiksel bakımdan anlamlı bir fark bulunmuştur ancak yapılan tez çalışmasında bu durum geçerli değildir. Laboratuvar

şartları, bireysel farklılıklar, STZ ve NA dozu, uygulanan tedavi işlemleri gibi birçok değişik koşullardan dolayı farklılıklar gözlenebilir.

Singh ve ark. (2022)'na ait bir çalışmada *S. italica* bitkisinin farklı genotipleri ile tip 2 diyabet oluşturulan hayvanlara tedavi uygulanmıştır ve bazı antioksidan enzimler, serum biyokimya parametreleri ve histopatolojik incelemelere yer verilmiştir. Bu çalışmaya göre ALP değerleri en yüksek glibenclamide ile tedavi edilen grupta en düşük ise diyabetli kontrol grubunda bulunmuştur. Aynı şekilde bu çalışmada da ALP değerleri en düşük diyabetik kontrol grubunda en yüksek ise alfa lipoik asit ve metformin kombinasyonunun uygulandığı grupta bulunmuştur. Bunun yanında ALT değerleri Singh ve ark. (2022)'nin çalışmasında en yüksek glibenclamide grubuna aitken doğal ürünlerde farklı genotipler farklı sonuçlar vermiştir ancak diyabet grubu kontrol grubundan daha düşük konsantrasyonda çıkmıştır. Bu çalışmada ise istatistiksel bakımdan anlamlı bir farklılık yoktur ve sonuçlar oldukça birbirine yakındır. Özellikle diyabet ve kontrol grubu birbirine çok yakınken karayemiş + metformin grubu ile yalnızca metformin verilen grup birbirine çok yakın çıkmıştır ve en yüksek ALT değerine sahip olan grup ise lipoik asit verilen grup olmuştur ($82,29 \pm 54,33$ mg/dL). AST değerlerinde ise sonuçlar ALT'ye benzer bulunmuş ve bu çalışmada yine anlamlılık olmasa da en yüksek diyabet grubunda ve hemen arkasından lipoik asit grubunda görülmüştür. En düşük AST değerine sahip grup ise karayemiş ve metformin kombinasyonu uygulanan grup olmuştur onun hemen arkasından ise kontrol grubu ($158,22 \pm 75,44$ mg/dL) ikinci en düşük konsantrasyonda seyretmiştir. Glibenclamide'in yan etkilerinden biri olan karaciğer yetmezliği kaynaklı ALT, AST ve ALP değerlerinde yükselme olmuş olabilir. Bu çalışmada kullanılan metforminin ise karaciğeri koruyucu etkisi olduğu bilinmekte bu yüzden de karaciğer enzimlerinde yükselme söz konusu olmamış olabilir.

Toplam Bilirubin değerleri Singh ve ark. (2022)'nin yaptıkları çalışmada bu çalışmaya göre oldukça yüksek seyretmiştir ancak istatistiksel bakımdan bir anlamlılık olmaması ve diyabetik grubun sağlıklı gruba göre daha düşük olması gibi sonuçlar bakımından benzerlik göstermektedir. Toplam Protein ve Albumin yönünden değerlendirmede ise yine istatistiksel bakımdan anlamlılık yoktur ve toplam proteinde

kontrol grubu ile diyabet grubunun sonuçları birbirine çok yakın çıkmıştır. Albüminde ise kontrol grubunun konsantrasyonu DM grubuna kıyasla biraz daha yüksek seyretmiştir. Glibenclamide verilen grup ise hem toplam protein hem albüminde en yüksek seyreden konsantrasyonlarda olmuştur. Bu çalışmada en yüksek konsantrasyon seviyesi her iki parametrede de kontrol grubunda olmuştur en düşük ise her ikisinde de karayemiş verilen grup ile rutin verilen grupta olmuştur. Metformin uygulanan gruplarda albümin konsantrasyonu sağlıklı kontrollerden düşük ancak DM grubundan yüksektir toplam proteinde ise DM grubuna çok yakın seyretmektedir.

Yine Singh ve ark. (2022)'na ait çalışmada üre ve kreatinin düzeylerine de bakılmıştır ve üre konsantrasyonları kontrol ve DM grubunda birbirine oldukça yakın ve düşük çıkmıştır. Glibenclamide uygulanan grupta üre düzeyleri daha yüksek seviyede seyretmiştir. Kreatinin sonuçları 0'a yakın bulunmuştur ve istatistiksel olarak farklılık yoktur. Bu çalışmada ise üre konsantrasyonları en düşük kontrol ve DM + metformin grubuna aittir. Bu iki gruba yakın olan ancak biraz daha yüksek düzeylerde seyreden DM grubu ve metformin + lipoik asit grubu ve en yüksek üre düzeyleri ise karayemiş ve metformin kombinasyonu ile rutin ve metformin kombinasyonunun uygulandığı gruplarda görülmüştür. Kreatinin düzeyi ise yapılan bu çalışmada daha yüksek konsantrasyonlarda bulunmuştur ancak kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında en düşük kreatinin konsantrasyonu metformin verilen grupta ardından da kontrol ve diyabetik grupta bulunmuştur. Kombinasyonların uygulandığı gruplarda sonuçlar daha yüksek seyretmiştir.

Alqasim ve ark. (2017)'nin yaptıkları bir çalışmada daha yüksek dozda NA kullanarak yine tip 2 diyabet oluşturulmuş ve açlık kan glikozu, HbA1c ve Fruktozamin değerleri karşılaştırılmıştır. Özellikle diyabetik gruplar ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılıklar gözlenmiştir ancak HbA1c yüzdeleri %6,5'u aşmamıştır. Bu çalışma ile karşılaştırıldığında benzer bir sonuca varılmıştır ancak bu tez çalışmasında istatistiksel bakımdan anlamlı bir fark bulunamadığı için sonuçlar birebir karşılaştırılamamaktadır. HbA1c yüzdesi 3 aylık ortalama kan glikoz değerini verdiği için çalışmanın süresi parametrede meydana gelebilecek net değişimleri

etkilemiş olabilir. Fruktozamin değerlerinin birbirine yakın olmaması ise yine aynı nedenlerden kaynaklanıyor olabilir. Fruktozamin 2 haftalık ortalama kan glikoz seviyeleri hakkında bilgi vermektedir ancak stres faktöründen etkilenen biyokimyasal değerler sağlıklı hayvanlarında kan değerlerine yansımış olabilir. Yine bireysel faktörler oldukça etkilidir çünkü kimi hayvanlar stresten çok çabuk etkilenirken hasta olsalar dahi kimileri daha az etkilenebilmektedir,

Sadi ve ark. (2012)'nın yaptıkları bir çalışmada diyabetik ratların böbrek dokularında antioksidan enzimler çalışılmıştır ve Kontrol grubu ile diyabetik grup arasında SOD aktivitesi bakımından anlamlı bir farklılık yokken, alfa lipoik asit ve vitamin C kombinasyonu tedavi amaçlı kullanılan gruplarda ise SOD'un aktivitesini böbreklerde arttırdığı bulunmuştur. Bu çalışmada ise serum SOD aktivitesi için istatistiksel bakımdan gruplar arasında anlamlılık yoktur ancak en düşük SOD aktivitesi diyabetli gruplarda ($0,00993 \pm 0,004574$ U/mg protein) iken en yüksek aktivite metformin ve karayemiş kombinasyonunun uygulandığı grupta ($0,01415 \pm 0,006439$ U/mg protein) saptanmıştır. Bu bağlamda SOD aktivitesinin saptandığı dokular farklı olsa da sonuçlar benzer bulunmuştur.

Alloxan ile diyabet oluşturulan başka bir çalışmada *Cyperus rotundus* ekstraktlarının serum biyokimya parametreleri üzerine etkisi incelenmiştir ve Toplam protein ile albümin değerleri kontrol grubunda sırasıyla $6,9 \pm 0,65$ g/dL ve $4,2 \pm$ g/dL iken diyabet kontrol grubunda sırasıyla $4,6 \pm 0,78$ g/dL ve $2,1 \pm 0,09$ g/dL çıkmıştır. Glibenclamide verilen grupta sırasıyla $6,2 \pm 0,71$ g/dL ve $3,7 \pm 0,38$ g/dL çıkmıştır. İki farklı dozda doğal ürün verilen gruplarda ise sonuçlar glibenclamide verilen gruba yakın çıkmıştır. Bu çalışmada ise toplam protein ve albümin konsantrasyonları kontrol grubunda sırasıyla $6,24 \pm 1,00$ g/dL ve $3,11 \pm 0,40$ g/dL iken diyabetli kontrol grubunda $5,30 \pm 0,56$ g/dL ve $2,71 \pm 0,30$ g/dL çıkmıştır. Kontrol ve diyabetik gruplar her iki çalışma için karşılaştırılırsa sonuçlar uyumludur ancak alloxan ile diyabet oluşturulan çalışmada protein ve albümin sonuçlarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık varken bu çalışmada anlamlılık söz konusu değildir. Metformin verilen gruplar diğer çalışmada glibenclamide verilen gruptan farklı olarak diyabetli gruplara

yakın sonuçlar vermiştir. Bu durum tedavinin albümin ve toplam protein yönünden etkili olmadığını göstermektedir (Al-Awar ve Alqabbani, 2021).

STZ (65 mg/kg) ve NA (230 mg/kg) ile tip 2 diyabet oluşturulan 2018 yılına ait bir çalışmada sağlıklı ve diyabetik rat gruplarının çeşitli dokularını histopatolojik olarak incelemişlerdir ve pankreas dokusunda diyabetik hayvanlarda farklı derecelerde atrofik alanlar ve mononükleer hücre infiltrasyonları ile dejeneratif/nekrotik değişikliklerle karşılaşmışlardır. Ekzokrin pankreasta nekrotik değişimler pankreas sınırlarında bozunmalar, asiner hücreler ve langerhans adacıklarının boyutunda küçülmeler gibi bulgulara rastlamışlardır (Raval ve ark., 2018). Benzer bulgulara bu çalışmada da rastlanmıştır.

Singh ve ark. (2022)'na ait çalışmada düşük doz STZ ve yüksek yağlı diyet ile besleme yapılan ratlarda glibenclamide grubu ve doğal ürün grubu oluşturulmuştur. Diyabetli gruplarda hem ekzokrin hem de endokrin pankreas bölgelerinde vakuolizasyon ve langerhans adacıklarında dejeneratif değişiklikler görülmüştür. Bu çalışmada da diyabet oluşturulan gruplarda buna benzer değişikliklere rastlanılmıştır.

Yapılan bir çalışmada yüksek yağlı diyet ile diyabet oluşturulan ratlara D-limonene ekstraktları farklı dozlarda verilmiştir ve lens dokusundan AR inhibisyonuna bakılmıştır. Sonuçlara göre en düşük AR aktivitesi kontrol grubunda, hemen sonrasında ise ekstraktların verildiği gruplarda görülmüştür. En yüksek AR aktivitesi ise diyabetik ratlarda görülmüştür. Bu çalışmada ise AR aktivitesine ELISA ile bakılmıştır ve sonuçlarda istatistiksel bakımdan anlamlı bir farklılık görülmemiştir ancak diyabet ve kontrol grubunda AR aktivitesi eşit gözlemlenmiştir ve en düşük konsantrasyon lipoik asit verilen grupta görülmüştür. En yüksek AR aktivitesi ise karayemiş verilen grupta görülmüştür. Sonuçlardaki farklılık, metformin ve doğal ürünlerin kombine kullanımından kaynaklı olabileceği gibi ölçüm yöntemlerindeki farklılıklardan da ileri gelebilir (Kumar ve ark., 2020).

STZ (45 mg/kg) ile diyabet oluşturulan ratlara timokinon uygulanarak karaciğer ve böbrek dokusunun TAS/TOS ve Oksidatif stres indeksleri hesaplanmıştır. Sonuçlara göre böbrekteki en yüksek TAS düzeyi timokinon uygulanan sağlıklı hayvanlarda iken en düşük diyabet grubundadır. TOS değerleri ise en yüksek diyabetli grupta bulunmuştur. Oksidatif stres indeksi en yüksek bulunan grup ise diyabetik olup timokinon ile tedavi edilen grup olmuştur (Usta ve ark., 2018). Bu çalışmada ise TAS değerlerinde istatistiksel bakımdan anlamlılık bulunmamakla birlikte genel olarak TAS düzeyleri daha yüksektir ve en yüksek lipoik asit verilen grupta görülmüştür. En düşük ise kontrol grubunda çıkmıştır. TOS değerlerinde ise en düşük lipoik asit grubunda ve en yüksek metformin verilen grupta olmuştur. Buna bağlı olarak böbrekteki oksidatif stres indeksi en yüksek olan grup kontrol grubudur en düşük ise lipoik asit grubudur ve bu farklılık istatistiksel bakımdan anlamlıdır. Bu durumda oksidatif stres indeksi bakımından lipoik asit metformin kombinasyonunun böbrek üzerine olumlu etkileri olduğu kanısına varılmıştır. Kontrol grubunda oksidatif stres indeksinin yüksek olmasının sebebi manipülasyon stresi ve kesim günü aç kalmış olmaları olabilir. Ayrıca uygulanan ksilazin ve ketamin anesteziklerinin kan glikoz düzeyini arttırıcı etkilerinden dolayı kontrol grubunun oksidatif stres indeksini ve total oksidan kapasitesini yükseltmiş olabilir.

Bir başka çalışmada tip 1 diyabet oluşturulan ratlarda NO üretimini görmek için immunohistokimyasal boyama tekniği ile böbrekteki nNOS ve eNOS konsantrasyonlarını incelemişler ve böbrek tubullerinde eNOS proteinlerinin ekspresyonuna belirgin şekilde rastlanamamıştır. Böbrekte nNOS seviyeleride tespit edilememiştir (Onozato ve ark., 2002). Bu araştırmada ise NO direkt olarak kolorimetrik yöntemle ölçülmüştür ve kontrol, diyabet ve metformin verilen grup arasında anlamlılık olmasada bu üç grubun diğer üç grup ile aralarında istatistiksel olarak farklılık bulunmuştur. Metformin verilen gruplarda NO düzeyi diğer doğal ürün verilenlere göre nerdeyse 2,5 katı bulunmuştur. DM ve kontrol grubunda yine diğer gruplardan yüksek ancak metformin grubundan düşük bulunmuştur. Diğer çalışmada anlamlı sonuçların bulunmamasının sebebi uygulanan tedavi süresi ile alakalı olabilir. Bu çalışmada ise kontrol ve DM grubu ile arada anlamlılık olmamasının sebebi kan şeker düzeylerinin de birbirinden çok uzak olmamasından olabilir

Daimon ve ark (2000) yaptıkları çalışmada seruloplazmin ile nitrik oksit düzeyleri arasında bir ilişki belirlemişlerdir. Artan seruloplazmin seviyelerinin nitrik oksit düzeylerini azalttıklarını bulmuşlardır. Yapılan bu çalışma ile diğer çalışma karşılaştırıldığında en yüksek seruloplazmin seviyesi DM grubunda olup bu durumda en düşük plazma nitrik oksit düzeyinin DM grubunda bulunması gerekmektedir. Sonuçlar bu bakımdan birbiriyle uyumluluk göstermektedir.

Ülger ve Çakıroğlu (2018), yaptıkları bir çalışmada STZ ile ratlarda diyabet oluşturduktan sonra soğan tozu (üçüncü gruba liyofilize halde, dördüncü gruba fırınlanmış halde) ve standart diyetlerle besleme yapmışlardır. Deneysel aşamalar tamamlandıktan sonra serum örnekleri ile TAS/TOS, PON-1 ve OSİ değerlerine bakılmıştır. Her iki çalışmada da kontrol grubuna ait TAS değerleri yüksek çıkmıştır. Liyofilize soğan tozunun fırınlanmış soğan tozuna göre daha iyi olduğu kanıtlanmıştır. Bu çalışmada ise metformin ve doğal ürün kombinasyonunun diyabetik gruplardan çok da büyük bir farklılığa neden olmadığına belirlenmiştir. TOS verileri karşılaştırılırsa; Ülger ve Çakıroğlu (2018)'nin çalışmasında fırınlanmış soğan tozunun tedavi uygulanmayan diyabet gruplarından daha yüksek TOS seviyelerinin olduğu görülmüştür, bu çalışmada ise en yüksek diyabet grubunda bulunmuştur. Fırınlanmış ürünlerin oksidatif strese neden olan bazı bileşikleri arttırdığı bilindiğinden sonuçlar her iki çalışma içinde beklenildiği gibi olmuştur denilebilir. Antioksidan bir enzim olan PON aktivitesi ise soğan tozu çalışmasında en yüksek kontrol ve en düşük diyabet grubunda bulunurken, bu çalışmada doğal ürün ve ilaç etkileşimlerinde en düşük kontrol ve en yüksek lipoik asit verilen grupta saptanmıştır. Bunun sebebi doğal ürünlerin yüksek antioksidan seviyelerine sahip olması nedeniyle olabilir. Oksidatif stres indeksinin hesaplanmasında ise en düşük indeks kontrol grubunda iken en yüksek diyabet ve fırınlanmış soğan tozu kullanılan grupta olmuştur. Bu çalışmada ise en yüksek oksidatif stres indeksi diyabet grubunda ve ona yakın sonuç veren rutin flavonoidi uygulanan grupta görülmüştür. Bunun sebebi ise rutin flavonoidi uygulanan grubun deney sonu glikoz düzeyleri diğer gruplara göre çok daha yüksek çıkmış olmasından kaynaklanabilir.

İnsanlarda yapılan bir çalışmada tip 2 DM ve sağlıklı kontrollerin seruloplazmin değerleri karşılaştırılmıştır ve istatistiksel bakımdan anlamlı bir fark elde edilmiştir. Kontrol grubunda seruloplazmin değerlerinin hastalardan daha yüksek olduğu bulunmuştur (Sarkar ve ark., 2010) ancak bizim çalışmamızda kontrol grubu daha düşük seruloplazmin değerlerine sahiptir. En yüksek ise diyabetli grupta bulunmuştur. İnsanlardaki diabetik sürecin uzunluğu buna bağlı organizmanın verdiği yanıt değişiklik göstermiş olabilir.

Fruktozamin ölçümleri albümine bağlı olduğu için ve albüminin ortalama yarı ömrü 2-3 haftalık bir süreci kapsadığından diyabetteki son 2-3 haftalık ortalama kan şekere seviyelerini göstermektedir. Ancak HbA1c yüzdesi ortalama 3 aylık kan şekere seviyelerini gösterdiği için diyabette daha güvenli bir biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada HbA1c ölçümleri fruktozamin üzerinden Veno ve deKoning (2017)'in belirlediği formüle göre hesaplandığı için HbA1c değerleri yalnızca % 78'lik bir doğruluk oranına sahiptir. Bu durumda HbA1c yüzdesine ait veriler yorumda bulunmak için yeterince güvenilir sonuçlar vermemektedir.

Nwakulite ve ark (2021)'nin yaptıkları bir çalışmada tip 2 diyabet oluşturulmuş ratlarda serum örneklerinden GpX analizi yapılmış olup sonuçlarda anlamlı farklılıklar bulunamamış ve değerler birbirine yakın çıkmıştır. Yapılan bu çalışmada da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamış olup, Gpx değerleri birbirlerine oldukça yakın çıkmıştır.

Cunningham ve ark (1995)'nin yaptıkları çalışmada sağlıklı insanlar ile tip 2 diyabetli insanların serum seruloplazmin değerleri ölçülmüş olup diyabetli insanlarda seruloplazmin seviyelerinin arttığını ortaya koymuşlardır. İnsanlarda olduğu gibi ratlarda da tip 2 DM oluşturulan gruba ait seruloplazmin değerleri diğer gruplara göre çok daha yüksek bulunmuş ve istatistiksel bakımdan da anlamlılık ifade etmiştir. Bunun dışında seruloplazmin ve LDL arasında bir ilişki bulunduğunu ortaya koyan bir çalışmada ise insanlarda LDL ve Seruloplazmin değerlerinin doğru orantılı olduğu ve artan seruloplazminin LDL'yi de arttırdığı bulunmuştur (Ehrenwald ve ark., 1994).

Yapılan bu çalışmada da yine ratlarda en yüksek LDL seviyeleri DM grubunda bulunmuştur ve iki çalışma birbiriyle uyumluluk göstermiştir.

Aldoz redüktaz özellikle diyabete bağlı katarakt gelişiminden sorumludur bu yüzden de en çok gözde AR seviyeleri ölçülmektedir. Yapılan bir çalışmada kullanılan özel sand sıçanlarında oluşturulmuş tip 2 diyabette lipoik asit'in göz AR seviyelerine olan etkisi incelenmiştir. Diyabetli grupta artış gösteren göz AR seviyeleri lipoik asit uygulanan gruplarda oldukça düşük seyretmiştir (Borenshtein ve ark., 2001). Bu çalışmada ise sadece diyabetik gruplara göre değil tüm gruplara göre lipoik asit uygulanan grupta göz AR aktivitesi düşmüştür.

Metforminin hidroksil radikallerini temizleme etkisi bulunurken hidrojen peroksit ve oksijen radikallerini temizleyemediği yapılan araştırmalar ile bulunmuştur (Khoury ve ark., 2004). Başka bir çalışmada ise metforminin katalaz ve SOD düzeylerini arttırdığı ancak Gpx'de etkisinin olmadığı veya düşürdüğü görülmüştür (Pavlovic ve ark., 2000). Memişoğulları ve ark. (2008)'nin yaptığı açıklama da ise metforminin LDL'nin hepatik yapılığını azalttığı ve karaciğeri koruyucu etkisi olduğu belirtilmiştir. Tüm bu sonuçlardan yola çıkılarak yapılan bu çalışmaya ilişkin antioksidan enzim ve LDL sonuçları diğer çalışmalara ilişkin ortaya atılan sonuçlar ile uyumluluk göstermektedir.

Liyana-Pathirana ve ark (2006) karayemişin antioksidan etkisi ile ilgili yaptıkları çalışmada, bu doğal ürünün iyi bir oksijen radikali temizleyici olduğunu ve LDL oksidasyonunu önlediğini bulmuşlardır. Başka bir araştırmada ise mangan içeriği yüksek doğal ürünler (karayemiş)'in SOD için iyi bir kofaktör kaynağı olduklarını bulmuşlardır (Harrison ve Hoare, 1980). Bu durumda her iki iddiaya göre de yapılan bu çalışmaya ilişkin sonuçlar paralellik göstermektedir. SOD seviyesi en yüksek olan grup karayemiş ve metformin kombinasyonunun uygulandığı grupta olmuş olup en düşük LDL seviyesi yine karayemiş ve metformin kombinasyonu verilen grupta görülmüştür.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Doğal ürünlerle ilgili çalışmalarda çok fazla ekstraksiyon yöntemleri ve içerik analizleri için ileri teknikler mevcuttur. Çalışmamızda seçilen metanol ekstraktı fenolik maddeler ve flavonoidlerin daha iyi ekstrakte edilebilmesi için iyi bir yöntem olarak belirlenmiştir ancak liyofilize doğal ürünlerin ekstraksiyona tabii tutulması ve GC-MS veya HPLC gibi ileri analiz teknikleri ile flavonoid içeriklerinin belirlenmesi çalışmada kullanılan doğal ürün içeriği hakkında çok daha fazla bilgi vermektedir. Karayemiş'in fenolik içeriği ve TAS verileri yanında radikal süpürücü etkisi ve flavonoid içeriği gibi antioksidan etkilerinde değerlendirilmesi daha ayrıntılı bilgi sunabilir. Karayemişin özellikle Türkiye'de doğal olarak yaygın bir şekilde yetişmesinden dolayı çalışmalar daha çok ülkemize aittir ancak yurtdışında da yetiştiği bölgeler mevcuttur ve o bölgeye ait karayemişlerin içerik analizleri belirlenerek iklim koşulları ve toprak yapısı açısından farklılıkların ele alınması daha iyi olabilir.

Tip 2 diyabetes mellitus modelini çalışmak için birçok farklı modeller mevcuttur. Özel rat modelleri dışında yağlı diyet ile besleme veya yenidoğanlara düşük doz STZ uygulaması gibi. Bu çalışmada kullanılan STZ ve NA kombinasyonunda ise yine birçok çalışmalar mevcuttur ve doz farklılıkları oldukça fazladır. Nikotinamid dozu arttıkça STZ'nin pankreasa hasar verme olasılığının da azaldığı düşünülmektedir. Bu çalışmada 110 mg/kg NA dozun 65 mg/kg STZ dozunun uygulanmasının ratlarda Tip 2 diyabet oluşturduğu OGTT ile ortaya konulmuştur.

Çalışmada oluşturulan Tip2 diyabet sonrası Pankreasın histopatolojik incelenmesinde kontrole göre diyabet gruplarında pankreatik hasarın oluşumu gözlenmiştir. Rutin, lipoik asit ve karayemiş gibi doğal ürünlerinin metforminle kullanıldığı diyabetik ratlarda gözlenilen daha yüksek pankreatik hasarın sebebi, metformine ilaveten doğal ürünlerin pankreas üzerine insulin salgısının indüklenmesine yönelik ilave etkileri sonucu olabilir. Pankreas adacıkları hematoxilen eosin boyama ile ayırt edilebilse de alfa ve beta hücrelerinin birbirinden

ayırt edilebilmesi için immunohistokimyasal boyamaların yapılması ve daha ileri tekniklere başvuru ile pankreasın insülin salgılamasının kontrol edilmesi önerilmektedir.

Serum biyokimyasal değerlerine ilişkin sonuçlarda ise genel olarak gruplar arasında anlamlı farklılığın olmaması tip 2 diyabet ve oluşturma dozuna bağlı olabileceği gibi deney süresinin yetersizliği, ilaç etkileşiminin devreye girmesi veya kan dokuya yansıyan sonuçların daha geç olmasıyla alakalı olabilir. Bununla birlikte ALP ve Ca değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olması diyabete bağlı olarak şekillenmiş olabilir. Ca değerleri normal sınırlar içerisinde olsa da diyabetli tüm gruplarda kontrole göre artmıştır ve Ca artışı insülin salgılamasını indüklediği için pankreas hasarı buna bağlı olarak gelişmiş olabilir. ALP değerleri ise rutin flavonoidi uygulanan grupta çok yükselmiştir, lipoik asit uygulanan grupta hafif bir yükselme vardır diğer gruplarda ise normal sınırlardadır. Karaciğer spesifik testlerin normal sınırlarda olması karaciğer kaynaklı ALP artışını elemekte ve diyabet veya ketoasidoza bağlı ALP artışını akla getirmektedir.

Antioksidan analizler genel olarak diğer çalışmalarla uyum göstermiş olsada seruloplazmin dışında istatistiksel olarak anlamlılık ifade etmemiştir. Uygulanan doğal ürünlerin prooksidan etkileri yönünden değerlendirilmesi önerilmektedir. Aldoz redüktaz'ın özellikle diyabetik retinopati ve nefropati gelişiminde birincil rolü olduğu bilinmektedir ancak bu çalışmada henüz bir komplikasyon şekillendiğine yönelik bir bulguya rastlanmamıştır. Lens ve böbrek dokularının immunohistokimyasal boyamasıyla aldoz redüktaz aktivitesinin belirlenmesi yeni çalışmalar için önerilmektedir. Ayrıca diyabetik yolaklar ile birlikte inflamatuvar yolaklar da görevli bazı önemli proteinlerin ele alınması diyabetin yorumlanması açısından ileri ki çalışmalar için önerilebilmektedir.

Her üç doğal ürünün de zengin fenolik madde ve flavonoid içeriği bilinmektedir ancak metformin ile olan etkileşimlerine yönelik çalışmalara rastlanmamıştır. Bu bakımdan bu tez çalışmasına ait sonuçlar rutin, lipoik asit ve karayemişin metforminle kombine uygulanmasına yönelik ilk verileri oluşturmaktadır.

Özellikle metformine göre, metforminin doğal ürünlerle kombinasyonunda pankreastaki hasarın yüksekliği, ilaç kullanımları sırasında doğal ürünlerinin birlikte kullanımının güvenilir olmadığının bir göstergesi olduğu ortaya konulmuştur.

İlaç kullanırken, o hastalığa iyi geldiği bilinen doğal ürünlerin kullanılmadan önce ilaç etkileşimlerinin bilinmesi veya doğal ürünün o ilacın yan etkilerini ortaya çıkarıp çıkarmayacağını bilmesi önemlidir.



ÖZET

Karayemiş, Lipoik Asit ve Rutin Flavonoidlerinin Metformin verilen Diyabetik Ratlarda Etkisi

Bu tezde amaç ilaç ve doğal ürün kombinasyonu arasındaki etkileşimleri keşfetmektir. Bu nedenle tip 2 diyabetes mellitusda yaygın olarak kullanılan metformin hipoglisemik etkisi bilinen bir ilaç olarak seçilmiştir ve ilaç etkileşimini görmek amacıyla da 3 farklı doğal ürün seçilmiştir, bunlar karayemiş ekstraksiyonu, rutin flavonoidi ve alfa lipoik asittir. Deneysel çalışmaya başlamadan önce hayvanlar 6 gruba ayrılmışlardır ve ilk grup hariç (sağlıklı kontrol) diğer gruplara STZ ve NA ile tip 2 diyabet oluşturulmuştur. İlaç ve doğal ürünler 12 haftalık süre boyunca oral olarak uygulanmıştır ve deney sonlandırıldığında hayvanlar sakrifiye edilerek kan ve dokuları alınmıştır. Serum Biyokimya, HbA1c ve Fruktozamin değerleri otoanalizörlerde, antioksidan enzimler ve TAS/TOS, Nitrik oksit belirtilen metotlarla, insulin ve aldoz redüktaz ise ELISA metoduyla ölçülmüştür. Ayrıca Histopatolojik inceleme ile pankreas diyabetik açıdan değerlendirilmiştir. Sonuçlar istatistiksel bakımdan incelendikten sonra farklı çalışmalar ile karşılaştırılmıştır ve özellikle kan şekere seviyelerinin diğer çalışmalara göre istatistiksel olarak anlamsız olduğu ve genelde gruplar arasında birbirine yakın seyrettiği görülmüştür ($p>0,05$). Kesim gününe ait canlı ağırlık değişimleri ile Kalsiyum, Seruloplazmin ve ALP değerlerinde istatistiksel bakımdan anlamlı farklılık bulunmuştur. Kan şekere seviyeleri en düşük olan grup metformin ve karayemiş kombinasyonu verilen grup olmuştur ve $130,80 \pm 21,75$ mg/dL çıkmıştır en yüksek seyrde olan ise rutin flavonoidi ve metformin verilen grup olmuştur ve $165,89 \pm 48,89$ mg/dL çıkmıştır. Antioksidan etkili enzimler ve bileşikler arasında bir tek seruloplazmin değerlerinde istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur ve en yüksek konsantrasyon diyabet grubunda en düşük ise diyabetli olup metformin ve rutin flavonoidi kullanılan grupta görülmüştür. Fruktozamin ve HbA1c değerlerinde istatistiksel bakımdan bir anlamlılık bulunmamıştır. Nitrik Oksitte hem beyin hem böbrek hem de plazma dokularında istatistiksel bakımdan anlamlılık bulunmuştur. Aldoz Redüktaza ilişkin sonuçlar istatistiksel olarak anlamlılık ifade etmemektedir. Total antioksidan kapasite ölçümünde göz dışında diğer dokularda anlamlılık bulunamamıştır ve total oksidan kapasite analizinde ise hiçbir dokuda anlamlılık çıkmamıştır. Serumda oksidatif stres indeksi en düşük kontrol ve karayemiş grubunda iken en yüksek diyabetli grupta bulunmuştur. İlaç ile doğal ürünlerin birbirlerinin etkilerini nasıl değiştirdiğini daha iyi ifade edebilmek için daha ayrıntılı araştırmalar yapmak gerekir. İlaç etkileşimlerine yönelik in vivo çalışmaları arttırmak ve ileri analiz yöntemlerini uygulayarak araştırmaların gerçekleşmesine yönelik çalışmalara daha çok destek verilmelidir. Diyabetik yolaklar daha ayrıntılı incelenmeli ve histopatolojik çalışmalar ve immun boyamalarla geliştirilmelidir.

Anahtar Sözcükler: *L. officinalis*, Alfa Lipoik Asit, Rutin, Metformin, Tip 2 Diyabet

SUMMARY

The effects of cherry laurel, lipoic acid and routine flavonoid on metformin-treated diabetic rats

The aim of this thesis is to discover the interactions between the combination of medicine and natural products. For this reason, metformin, which is widely used in type 2 diabetes mellitus, was selected, and 3 different natural products were selected to see the drug interaction, these are cherry laurel extraction, rutin flavonoid and alpha lipoic acid. Before starting the experimental study, the animals were divided into 6 groups, and with the exception of the first group (healthy control), type 2 diabetes was established in the other groups with STZ and NA. The drug and natural products were administered orally for a period of 12 weeks, and when the experiment was done, the animals were sacrificed and their blood and tissues were taken. Serum Biochemistry, HbA1c and Fructosamine values were measured by autoanalyzer, antioxidant enzymes and TAS/TOS, Nitric oxide were measured by the specified methods, insulin and aldose reductase were measured by the ELISA method. In addition, the pancreas tissue was also evaluated from a diabetic point of view by histopathological examination. After discovering the results statistically, they were compared with different studies and it was found that blood sugar levels in particular were statistically insignificant compared to other studies and generally remained close between groups ($p > 0.05$). Statistically significant differences were found in weight changes and Calcium, Ceruloplasmin and ALP values on the day of sacrifice. The group with the lowest blood sugar levels was the group given a combination of metformin and cherry laurel, and it was found 130.80 ± 21.75 mg/dL, while the group with the highest glucose level was the group given rutin flavonoids and metformin, and it was found 165.89 ± 48.89 mg/dL. Only ceruloplasmin values were found to be statistically significant among antioxidant-acting enzymes and compounds, and the highest concentration was observed in the diabetes group, and the lowest was observed in the diabetic group using metformin and routine flavonoids. There was no statistical significance in fructosamine and HbA1c values. Nitric Oxide was statistically significant in brain, kidney and plasma tissues. The results regarding Aldose Reductase are not statistically significant. In the measurement of total antioxidant capacity, no significance was found in other tissues except the eye, and in the analysis of total oxidant capacity, no significance was found in any tissue. The oxidative stress index in serum was the lowest in the control and cherry laurel group, while the highest was found in the diabetic group. More detailed research is needed to better express how drugs and natural products change the effects of each other. More support should be given to studies to increase in vivo studies on drug interactions and to carry out research by applying advanced analysis methods. Diabetic pathways should be examined in more detail and developed with histopathological studies and immunostaining.

Keywords: *L. officinalis*, alpha lipoic acid, rutin, metformin, type 2 diabetes

KAYNAKLAR

- ABDALI D, SAMSON SE, GROVER, AK (2015). How Effective Are Antioxidant Supplements İn Obesity And Diabetes. *Med Princ Pract*, **24**: 201–215.
- ABDUL-HAMID M, MOUSTAFA N, EL-NESR KA, ABUKHADRA AM (2020). Ameliorative effect of alpha lipoic acid and royal jelly against the side effects of cyclophosphamide in liver of albino rats. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, **9**: 28-41.
- ADACHI Y, HONI K, TAKAHASHI Y (1990). Serum GST activity in liver disease. *Clinica Chimica Acta*, **106**: 243-255.
- AKKUŞ İ (1995). Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Basım, Yayım ve Dağıtım, Konya.
- AL-AWAR M; ALQABBANI TY (2021). T. Anti-diabetic, Antioxidants, Anti-hepatorenal toxicity Activities of Cyperus rotundus Rhizome Extract in Alloxan-induced Diabetic Rats. *Preprints*, 2021120179 (doi: 10.20944/preprints202112.0179.v1).
- ALQASIM AA, NOURELDİN EEM, HAMMADİ SH, ESHEBA GE (2017). Effect of melatonin versus vitamin D as antioxidant and Hepatoprotective agents in STZ-induced diabetic rats. *J. of Diabetes Metabolic Disorders*, **16**: 41-49.
- ALTAN N, DİNÇEL AS, KOCA C (2006). Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Turk J Biochem*; **31**: 51–56.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (1998). Consensus Development Conference on Insulin Resistance. *Diabetes Care*, **21**:310–314.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (2021). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care J*, **44**: 15–33.
- ASKWITH T, ZENG W, EGGO MC, STEVENS MJ (2009). Oxidative stress and dysregulation of the taurine transporter in highglucoseexposed human Schwann cells: implications for pathogenesis of diabetic neuropathy. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **297**: 620–628.
- ASNAGHI V, GERHARDINGER C, HOEHN T, ADEBOJE A, LORENZI M (2003). A role for the polyol pathway in the early neuroretinal apoptosis and glial changes induced by diabetes in the rat. *Diabetes*, **52**: 506–511.
- AYDEMİR B, KARADAĞ SARI E (2009). Antioksidanlar ve Büyüme Faktörleri ile İlişkisi. *Kocatepe Veterinary Journal.*, **2**: 56-60.
- BARBOUR LA, MCCURDY CE, HERNANDEZ TL, KIRWAN JP, CATALANO PM, FRIEDMAN JE (2007). Cellular mechanisms for insulin resistance in normal pregnancy and gestational diabetes. *Diabetes Care*; **30**: 112-119.
- BASAGA HS (1990). Biochemical aspects of free radicals. *Biochem Cell Biol.* **68**: 989-998.
- BLISS M (1982). Triumph. In: Bliss M, editor. The discovery of insulin. Chicago: University of Chicago Press; 104–128.
- BLISS M (2007). A mysterious something. In: Bliss M, editor. The discovery of insulin. Chicago: University of Chicago Press; 84–103.

- BORENSHTEIN D., OFRI R, WERMAN M, STARK A, TRİTSCHLER HJ, MOELLER W, MADAR Z (2001). Cataract development in diabetic sand rats treated with α -lipoic acid and its γ -linolenic acid conjugate. *Diab Metab Res Rev*, **17**: 44-50.
- BOUCHÉ C, SERDY S, KAHN CR, GOLDFINE AB (2004). The cellular fate of glucose and its relevance in type 2 diabetes. *Endocrine Reviews*, **25**: 807-830.
- BOYLE SP, DOBSON VL, DUTHIE SJ, HINSELWOOD DC, KYLE JA, COLLINS AR (2000). Bioavailability and efficiency of rutin as an antioxidant: a human supplementation study. *Euro J Clin Nutr*, **54**: 778-782.
- BURAK M, ÇİMEN Y (1999). Flavonoidler ve Antioksidan Özellikleri. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, **19**: 296-304.
- BUSE MG (2006). Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **290**: 1-8.
- CHAIMUM-AOM N, CHOMKO S, TALUBMOOK C (2017). Toxicology and Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) of Thai Medicinal Plant Used for Diabetes control, *Phyllanthus acidus* L (EUPHORBIACEAE). *Pharmacogn J.*, **9**: 58-61.
- CHANDALIA HB, SRIDHAR GR, DAS AK, MADHU SV, MOHAN V, RAO PV (2014). RSSDI Textbook of Diabetes Mellitus. Third Ed. Jaypee Brother Medical Publishers. ISBN: 978-93-5152-090-0.
- CHEN G, GOEDEL DV (2002). Tnf-R1 Signaling: A Beautiful Pathway. *Science*, **296**: 1634-1635.
- CIGHETTI G, DUCA L, BORTONE L, SALA S, NAVA I, FIORELLI G, CAPPELLINI MD (2002). Oxidative Status and Malondialdehyde in β -thalassaemia Patients. *European Journal of Clinical Investigation*, **32**: 55- 60.
- COŞANSU G (2015). Diyabet: Küresel Bir Salgın Hastalık. *Okmeydanı Tıp Dergisi*, **31**: 1-6.
- CUBEDDU LX, HOFFMANN IS (2002). Insulin resistance and upper-normal glucose levels in hypertension: a review. *J Hum Hypertens*, **16**: 52-55.
- CUDWORTH AG, WOODROW JC (1975). HL-A System and Diabetes Mellitus. *Diabetes*, **24**: 345-349.
- CUNNINGHAM J, LEFFELL M, MEARKLE P, HARMATZ P (1995). Elevated plasma ceruloplasmin in insulin-dependent diabetes mellitus: evidence for increased oxidative stress as a variable complication. *Metabolism*, **44**: 996-999.
- CURZON G, VALLET L (1960). The Purification of Human Ceruloplasmin. *Biochem J*, **74**: 279-287.
- ÇAKATAY U (2006). Pro-oxidant actions of α -lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Med Hypotheses*, **66**: 110-117.
- ÇAYIR A, TURAN MI (2015). Diabetes Mellitusla İlişkili Kardiyak Bozukluklar, *Ankara Med J*, **15**: 231-234.
- ÇAYLAK E (2011). Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar. *Tıp Araştırmaları Dergisi*. **9**: 73-83.
- DAIMON M, SUGIYAMA K, SAITOH T, YAMAGUCHI H (2000). Increase in serum ceruloplasmin levels is correlated with a decrease of serum nitric oxide levels in type 2 diabetes. *Diabetes Care* **23**: 559-560.

- DAMLACI T, BAYKAL T (2009). *Laurocerasus Officinalis* Roem. Bitkisi Üzerinde Yapılan Biyolojik Aktivite Çalışmaları. Gazi Üniv Sağ Bil Ens Farmkg Abd Fitoter, Yüksek Lisans Tezi.
- DE HAAN JB, BLADIER C, GRIFFITHS P, KELNER M, O'SHEA RD, CHEUNG NS, BRONSON RT, SILVESTRO MJ, WILD S, ZHENG SS, BEART PM, HERTZOG PJ, KOLA I (1998). Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. *Journal of Biological Chemistry*, **273**: 22528- 22536.
- DEEDWANIA PC (2000). Mechanism of the deadly quartet. *Can J Cardiol*, **16**:17–20.
- DEFRONZO RA (1992). Pathogenesis of type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus: a balanced overview. *Diabetologia.*, **35**: 389-97.
- DEFRONZO RA (1997). Pathogenesis of type 2 diabetes metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diabetes Reviews*, **5**: 177-269.
- DEFRONZO RA (2011). Bromocriptine: a sympatholytic, D2-dopamine agonist for the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes care*, **34**: 94-789.
- DEMİR S, TURAN İ, DEMİR F, AYAZOĞLU DEMİR E, ALİYAZICIOĞLU Y (2017). Cytotoxic Effect of *Laurocerasus officinalis* Extract on Human Cancer Cell Lines. *Marmara Pharmaceutical Journal*, **21**: 121-126.
- DHANASEKARAN DN, REDDY EP (2008). Jnk Signaling In Apoptosis. *Oncogene*, **27**: 6245-6251.
- DOĞU İ (2014). Tip 2 diyabet oluşturulmuş sıçanlarda *Prunus laurocerasus* (karayemiş)' un oksidan-antioksidan sistemler üzerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı.
- DONAGHUE KC, CHİARELLİ F, TROTTA D, ALLGROVE J, DAHL-JORGENSEN K (2009). Microvascular and macrovascular complications associated with diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes*. **10**: 195–03.
- DRAGOVICUZELAC V; LEVAJ B; MRKİC V; BURSAC D; BORAS M (2007). The Content of Polyphenols and Carotenoids in Three Apricot Cultivars Depending on Stage of Maturity and Geographical Region. *Food Chemistry*, **102**: 966–975.
- DU X, MATSUMURA T, EDELSTEIN D, ROSSETTI L, ZSENGELLER Z, SZABO C, BROWNLEE M (2003). Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. *Journal of Clinical Investigation*, **112**: 1049-1057.
- DÜNDAR Y, ASLAN R (1999). Oksidan-Antioksidan Denge ve Korunmasında Vitaminlerin Rolü. *Hayvancılık Araştırma Dergisi*, **9**: 32-39.
- DYER DG, DUNN JA, THORPE SR, BAILIE KE, LYONS TJ, MCCANCE DR, BAYNES JW (1993). Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. *J Clin Invest*, **91**: 2463-2469.
- EHRENWALDE E, CHISOLM GM, FOX PL (1994) Intact Human Ceruloplasmin Oxidatively Modifies Low Density Lipoprotein. *J Clin Invest*, **93**:1493-1501.
- EREL O (2004). A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem*, **37**: 112-119.
- EREL O (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.*, **38**: 1103-1111.

- ERIKSSON J, FRANSSILA-KALLUNKI A, EKSTRAND A, SALORANTA C, WIDÉN E, SCHALIN C, GROOP L (1989). Early metabolic defects in persons at increased risk for non insulindependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*, **321**: 43-337.
- ESTERBAUER H, SCHAUR RJ, ZOLLNER H. (1991) Chemistry and biochemistry of 4 hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*, **11**: 81-128.
- FAKRUDDIN M (2019). Genetics of Type 2 Diabetes: A Review. *J Curr Adv Med Res*, **6**: 59-63.
- FELDMAN EC, NELSON RW (2004). Canine and Feline Endocrinology and Reproduction. 3rd ed. St. Louis, Missouri: *Elsevier*, 581–615.
- FIELD A (2013). Discovering Statistics Using Ibm Spss Statistics. 4th Ed., Sage Publication Ltd.
- FLANNICK J; FLOREZ JC (2016). Type 2 diabetes: Genetic data sharing to advance complex disease research. *Nat. Rev. Genet*, **17**: 535–549.
- FREE AH, FREE HM (1972). Urinalysis, Critical Discipline of Clinical Science. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci*, **3**: 481-531.
- FRIEDEWALD WT, LEVY RI, FREDRICKSON DS (1972). Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*, **18**:499- 502.
- GERICH JE (1988). Role of insulin resistance in the pathogenesis of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, **2**: 307-326.
- GHASEMI A, KHALIFI S, JEDI S (2014). Streptozotocin-nicotinamide-induced rat model of type 2 diabetes (Review). *Acta Physiologica Hungarica*, **101**: 408–420.
- GIACCO F, BROWNLEE M (2010). Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*, **107**: 1058-1070.
- GOLDSTEIN BJ (2002). Insulin resistance as the core defect in type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol*, **90**: 3–10.
- GORALSKA M, DACKOR R, HOLLEY B, MC GAHAN M (2003). Alpha lipoic acid changes iron uptake and storage in lens epiteial cells. *Exp Eye Res*, **76**: 241-248.
- GÖRGİŞEN G (2018). Role of Insulin Receptor Substrate 1 (IRS1) Proetin in Insulin Resistance. *Bozok Med J*, **8**: 114-121.
- GÖZÜKARA EM (2011). Biyokimya. Beşinci Baskı, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul.
- GRAF BA, AMEHO C, DOLNIKOWSKI GG, MİLBURY PE, CHEN CY, BLUMBERG J (2006). Rat gastrointestinal tissues metabolize quercetin. *J Nutr*, **136**: 39-44.
- GRANKVIST K, MARKLUND SL, TALJEDAL IB (1981). CuZn-Superoxide Dismutase, Mn Superoxide Dismutase, Catalase And Glutathione Peroxidase In Pancreatic Islets And Other Tissues In The Mouse. *Biochem J.*, **199**: 393-398.
- GUARDIA, T, ROTELLI AE, JUAREZ, AO, PELZER LE (2001). Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Farmaco*, **56**: 683-687.
- GULATİ K, GUHATHAKURTA S, JOSHI J, RAİ N, RAY A (2016). Cytokines and their Role in Health and Disease: A Brief Overview. *MOJ Immunol* **4**: 121-130.

- GUO H, LING W (2015). The Update Of Anthocyanins On Obesity And Type 2 Diabetes: Experimental Evidence And Clinical Perspectives. *Rev Endocr Metab Disord*, **16**: 1–13.
- GUPTA N, CHAUHAN RS, PRADHAN JK (2014). Rutin: A Bioactive Flavonoid. *Handbook Of Medicinal Plants And Their Bioactive Compounds*, 51-57. Kerala India: Res. Singhpost.
- GUTTERIDGE JMC (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*, **41**: 1819-1828.
- GUYTON AC, HALL JE (2006). *Textbook of Medical Physiology*. 11th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 840–976.
- HA H, KIM KH (1999). Pathogenesis of diabetic nephropathy: the role of oxidative stress and protein kinase C. *Diabetes Res Clin Pract*, **45**: 51-147.
- HALLIWELL B (1990). How to characterize a biological antioxidant. *Free radical research communications*, **9**: 1-32.
- HALLIWELL B, GUTTERIDGE JM (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3. Baski. New York, Oxford University Pres, 73-122.
- HAO H, SHAO Z, TANG D, LU Q, CHEN X, YIN X, WU J, CHEN H (2012). Preventive effects of rutin on the development of experimental diabetic nephropathy in rats. *Life Sciences*, **91**: 959–967.
- HAPPENS MC, CRAIG ME, CUSUMANO J, HING S, CHAN AK, HOWARD NJ, SILINK M, DONAGHUE KC (2006). Prevalence of diabetes complications in adolescents with type 2 compared with type 1 diabetes. *Diabetes Care*, **29**: 1300-1306.
- HARMA M, HARMA M, EREL O (2003). Increased oxidative stress in patients with hydatidiform mole. *Swiss Med Wkly*, **133**: 536-563.
- HARRIS ED (1992). Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **6**: 2675-2683.
- HARRIS MI (1993). Undiagnosed NIDDM: clinical and public health issues. *Diabetes Care* **16**: 642-652.
- HARRISON PM, HOARE RJ (1980). Metals in Biochemistry. *Chapman and Hall. London*, 17-19.
- HERMAN WH, TEUTSCH SM (1985). Diabetes and renal mortality in the United States. *Am J Public Health*, **75**: 1325-1326.
- HOLT RIG, COCKRAM CS, FLYVBJERG A, GOLDSTEIN BJ (2010). *Textbook of Diabetes*. 4th Ed. Wiley Blackwell Publication. ISBN: 9781405191814.
- HOSEINI HF, GOHARI AR, SAEIDNIA S, MAJD NS, HADJIAKHOONDI A (2009). The effect of Nasturtium officinale on Blood Glucose Level in Diabetic Rats. *Pharmacology online*, **3**: 866-871.
- HUME DZ, DROBATZ KJ, HESS RS (2006). Outcome of Dogs with Diabetic Ketoacidosis: 127 Dogs (1993–2003). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **20**: 547-555.
- HUSSEIN HK, ELNAGGAR MH, AL-ZAHRAANI NK (2012). Antioxidant role of folic acid against reproductive toxicity of cyhalothrin in male mice. *Glo Adv Res J Environ Sci Toxicol*. **1**: 66-71.

- HUXLEY R, BARZI F, WOODWARD M (2006). Excess risk of fatal coronary heart disease associated with diabetes in men and women: Meta-analysis of 37 prospective cohort studies. *BMJ*, **332**: 8-73.
- IŞIK S, DELİBAŞI T, BERKER D, AYDIN Y, GÜLER S (2009). Kalp Hastalıklarında Diyabet Yönetimi. *Anadolu Kardiyol Derg*; **9**: 47-238.
- İLGEN N, KOÇAK DY. (2019). Gestasyonel Diyabetin Tanısında Güncel Yaklaşım, Gebelere Yönelik Sağlıklı Yaşam Biçimi Davranışları ve Hemşirenin Rolü. *Ordu University Journal of Nursing Studies*, **2**: 181-193.
- JACOB, H.J., PETTERSSON, A., WILSON, D., MAO, Y., LERNMARK, A. AND LANDER, E.S. (1992) Genetic dissection of autoimmune type I diabetes in the BB rat. *Nature Genet.*, **2**: 56-60.
- JOHANSEN JS, HARRIS AK, RYCHLY DJ, ERGÜL A (2005). Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice. *Cardiovascular Diabetology*; **4**: 5-16.
- JOOST HG, AL-HASANI H, SCHÜRMANN A (2012) Animal Models in Diabetes Research. 1st Ed Germany. Humana Press Springer. ISBN: 978-1-62703-067-0.
- JOUSSEN AM, POULAKI V, LE ML, KOİZUMİ K, ESSER C, JANICKI H, SCHRAERMAYER U, KOCIOK N, FAUSER S, KIRCHHOF B, KERN TS, ADAMIS AP (2004). A central role for inflammation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Faseb J.*, **18**: 1450-1452.
- KABAYAMA K, SATO T, KITAMURA F, UEMURA S, KANG BW, IGARASHI Y, INOKUCHI J (2015). Tnf α Induced Insulin Resistance In Adipocytes As A Membrane Microdomain Disorder: Involvement Of Ganglioside Gm3. *Glycobiology*, **15**: 21–29.
- KAMALAKKANNAN N, MAINZEN-PRINCE PS (2006). Antihyperglycaemic And Antioxidant Effect Of Rutin, A Polyphenolic Flavonoid, In Streptozotocin-Induced Diabetic Wistar Rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, **98**: 97–103.
- KARABULUT H, GÜLAY MŞ (2016). Antioksidanlar. *Mae Vet Fak Derg*, **1**: 65-76.
- KARAFAKİOĞLU YS (2019). Effects of a lipoic acid on noise induced oxidative stress in rats. *Saudi Journal of Biological Sciences* **26**: 989–994.
- KARAGÜL H, ALTINTAŞ A, FİDANCI UR, SEL T (2000). Klinik Biyokimya, Birinci baskı, Türkiye. ISBN: 975-7774-42-1.
- KARAHALİL FY, ŞAHİN H (2011). Phenolic Composition And Antioxidant Capacity Of Cherry Laurel (*Laurocerasus Officinalis* Roem.) Sampled From Trabzon Region, Turkey. *African Journal Of Biotechnology*, **10**:16293-16299.
- KARAMAN Ö, ELGİN CEBE G (2016). Diyabet Ve Türkiye’de Antidiyabetik Olarak Kullanılan Bitkiler. *Ank Ecz Fak Derg*, **40**: 47-61.
- KARATAŞ E, UÇAR A (2018). Karayemiş’in Sağlık Üzerine Etkisi. *Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal Of Health Sciences)*, **27**: 70-75.
- KELEŞ Y (2015). Antosiyanin Pigmentlerin Biyokimyası ve Analizi. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, **8**: 19-25.

- KHOURI H, COLLIN F, BONNEFONT-ROUSSELOT D, LEGRAND A, JORE D, GARDES-ALBERT M (2004). Radical induced oxidation of metformin. *Eur J Biochem*, **271**: 4745–4752.
- KILINÇ K (2011). Protein glikasyonu. *Hacettepe Tıp Derg*, **42**: 95-104.
- KILMANOĞLU S (2010). Kızılçık ve karayemişin fenolik madde içeriği ve antimikrobiyel aktiviteleri üzerine bir çalışma. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı.
- KING A, AUSTIN A (2017). Animal Models of Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus. 2nd Edition (Ed Conn PM.) Academic Press Elsevier, 245-265.
- KITABCHI AE, FISHER JN, MURPHY MB, KALIN RC, WEIR GC (1994). Diabetic ketoacidosis and hyperglycemic, hyperosmolar non-ketotic state. In: Kahn CR, Weir GC, editors. Joslin's diabetes mellitus textbook. Philadelphia: Lea & Febiger; 753-760.
- KNAPEN MFCM, ZUSTERZEEL PLM, PETERS WHM, STEEGERS EAP (1999). Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction-A review. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*, **82**: 171-184.
- KOSECİK M, EREL O, SEVİNÇ E, SELEK S (2005). Increased oxidative stress in children exposed to passive smoking. *Int J Cardiol*, **100**: 61-64.
- KUMAR AN, ARUNA P, NAIDU JN, KUMAR R, SRIVASTAVA AK (2015). Review of Concepts and Controversies of Uric Acid as Antioxidant and Pro-Oxidant. *Archives Medical Review Journal*, **24**: 19-40.
- KUMAR MP, POORNIMA MAMIDALA E, AL-GHANIM K, AL-MISNED F, AHMED Z, MAHBOOB S (2020). Effects of D-Limonene on aldose reductase and protein glycation in diabetic rats. *Journal of King Saud University – Science*, **32**: 1953-19958.
- KURÇER Z, KARAOĞLU D (2012). Deneysel diyabet modellerinde alloksan ve streptozotosin kullanımı. *Türk Jem*, **16**: 34-40.
- KUWABARA T, COGAN D (1963). Retinal vascular patterns. *Arch Ophthalmol*. **69**: 24-114.
- LEE SJ, LEE SY, HA HJ, CHA SH, LEE SK, HUR SJ (2015). Rutin Attenuates Lipopolysaccharide-induced Nitric Oxide Production in Macrophage Cells. *Journal of Food and Nutrition Research*, **3**: 202-205.
- LEVIN ME (1993). Pathogenesis and Management of diabetic foot lesions. In: Levin ME, O'Neal LW, Bowker JH (Eds). The Diabetic Foot, 5th Edition. Mosby Yearbook: St. Louis.
- LIU F, CHEN G, HUO W, WANG C, LIU S, LI N, MAO S, HOU Y, LU Y, XIANG H (2019). Associations Between Long-Term Exposure To Ambient Air Pollution And Risk Of Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review And Metaanalysis. *Environmental Pollution*, **252**: 1235-1245.
- LIANG JF, AKAIKE T (2000). Inhibition of nitric oxide synthesis in primary cultured Mouse hepatocytes by α -lipoic acid. *Chem Biol Interact*; **124**: 53-60.
- LIYANA-PATHIRANA CM, SHAHIDI F, ALASALVAR C (2006). Antioxidant activity of cherry laurel fruit (*Laurocerasus officinalis* Roem.) and its concentrated juice. *Food Chemistry*, **99**: 121-128.
- LUNA LG (1968). Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology, 3rd Edit., LG Luna, Ed., Blakiston Division, McGraw-Hill, Newyork

- MACMURRAY AJ, MORALEJO DH, KWITEK AE, RUTLEDGE EA, YSERLOO BV, GOHLKE P, SPEROS SJ, SNYDER B, SCAEFER J, BIEG S, JIANG J, ETTINGER RA, FULLER J, DANIELS TL, PETTERSSON A, ORLEBEKE K, BIRREN B, JACOB HJ, LANDER ES, LERNMARK A (2002). Lymphopenia in the BB Rat Model of Type 1 Diabetes is due to a mutation in a novel Immune-Associated Nucleotide (Ia)-Related Gene. *Genome Research*, **12**: 1029-1039.
- MAKOM NDIFOSSAP IG, FRIGERIO F, CASIMIR M, NGUEGUIM TSOFAK F, DONGO E, KAMTCHOUING P, DIMO T, MAECHLER P (2010). Sclerocarya birrea (Anacardiaceae) stem-bark extract corrects glycaemia in diabetic rats and acts on beta-cells by enhancing glucose-stimulated insulin secretion. *J Endocrinol*, **205**: 79-86.
- MAMARI HHA (2021). Phenolic Compounds: Classification, Chemistry, and Updated Techniques of Analysis and Synthesis. In (Ed.), Phenolic Compounds, Chemistry, Synthesis, Diversity, Non-Conventional Industrial, Pharmaceutical and Therapeutic Applications. IntechOpen.
- MARRE M-MODE, BERNADET P, GALLOIS Y, SAVANGER F, THAM-TAM G, HALLAB M. (1994) Relationships between angiotensin I converting enzyme gene polymorphism, plasma levels, and diabetic renal complications. *Diabetes*, **43**: 8-384.
- MASIELLO P, BROCA C, GROSS R, ROYE M, MANTEGHETTI M, HILLAIRES-BUYS D, NOVELLI M, RIBES G. (1998) Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes*, **47**: 9-224.
- MATTHAEI S, STUMVOLL M, KELLERER M, HÄRING HU (2000). Pathophysiology and pharmacological treatment of insulin resistance. *Endocr Rev*, **21**: 585-618.
- MCFARLANE SI, BANERJI M, SOWERS JR (2001). Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab*, **86**: 713-718.
- MCNEILL JH (1999). Experimental Models of Diabetes. CRC Press, US. ISBN: 0-8493-1667-7.
- MEDVEI VC (1982). A History of Endocrinology. 1st Edition. MTP Press, USA. ISBN: 978-94-009 7306-7310.
- MEMİŞOĞULLARI R (2005). Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. *A.İ.B.Ü Düzce Tıp Fak Der*; **3**:30-39.
- MEMİŞOĞULLARI R, TÜRKELİ M, BAKAN E, AKÇAY F (2008). Effect of metformin or gliclazide on lipid peroxidation and antioxidant levels in patients with diabetes mellitus. *Turk J Med Sc*, **38**: 545-548.
- MENG M, MA XX, TIAN YL, JIANG Q, WANG LL, SHI R, DING L, PANG SG (2017). Metformin improves the glucose and lipid metabolism via influencing the level of serum total bile acids in rats with streptozotocin-induced type 2 diabetes mellitus. *Eur Rev For Med and Pharmacol Sci*, **21**: 2232-2237.
- MOGENSEN CE, KEANE WF, BENNETH PH, JERUMS G, PARVING HH, PASSA P, STEFFES MW, STRIKER GE, VIBERTI GC (1995). Prevention of diabetic renal disease with special reference to microalbuminuria. *Lancet*; **346**: 1080-1084.
- MOINI H, TIROSH O, PARK YC, CHO KJ, PACKER LR (2002). α -lipoic acid action on cell redox status, the insulin receptor, and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Arch Biochem Biophys*; **397**: 91-384.
- MOLITCH ME, DEFRONZO RA, FRANZ MJ, KEANE WF, MOGENSEN CE, PARVING HH (2003). American Diabetes Association. Diabetic nephropathy. *Diabetes Care*; **26**: 94-98.

- MOTTLEY C, MASON RP (2001). Sulfur-centered radical formation from the antioxidant dihydrolipoic acid. *J Biol Chem*; **276**: 83-42677.
- MURUGAN P, PARI L (2006). Effect of Tetrahydrocurcumin on Lipid Peroxidation and Lipids in Streptozotocin-Nicotinamide-Induced Diabetic Rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, **99**: 122-127.
- MYTILINEOU C, KRAMER BC, YABUT JA (2002). Glutathione depletion and oxidative stress. *Parkinsonism & related disorders*, **8**: 385-387.
- NAIK RG, BROOKS-WORRELL BM, PALMER JP (2009). Latent autoimmune diabetes in adults. *J Clin Endocrinol Metab.*, **94**: 44-4635.
- NARINS RG, RUDNICK MR, BASTL CP (1980). Lactic acidosis and the elevated anion gap (I). *Hosp Pract.*; **15**: 6-133.
- NELSON DL, COX MM (2016). Biyokimyanın ilkeleri. 5. Baskı. 1158s. Palme Yayıncılık.
- NISHIKAWA T, EDELSTEIN D, DU XL, YAMAGISHI S, MATSUMURA T, KANEDA Y, YOREK MA, BEEBE D, OATES PJ, HAMMES HP, GIARDINO I, BROWNLEE M (2000). Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature.*, **404**: 90-787.
- NORRIS JM, SCOTT FW (1996). A meta-analysis of infant diet and insulin-dependent diabetes mellitus: do biases play a role? *Epidemiology*, **7**: 87-92
- NWAKULITE A, OBEAGU EI, EZE R, UGOCHI VE, VINCENT CCN, OKAFOR CJ, CHUKWURAH EF, UNAEZE BC, AMAECHI CO, OKWUANASO CB, CHUKWUANI U, IFIONU BI (2021). Estimation of serum Glutathione Peroxidase in Streptozotocin Induced Diabetic Rat Treated with Bitter Leaf Extract. *British J of Pharmaceutical Res*, **33**: 200-206.
- ONozATO ML, TOJO A, GOTO A, FUJITA T, WILCOX CS (2002). Oxidative stress and nitric oxide synthase in rat diabetic nephropathy: Effects of ACEI and ARB. *Kidney Int.*, **61**: 186-194.
- ORLIDGE A, DAMORE PA (1987). Inhibition of capillary endothelial cell growth by pericytes and smooth muscle cells. *J Cell Biol*, **105**: 62-1455.
- OWOLABI OJ, AMAECHINA FC, OKORO M (2011). Effect of Ethanol Leaf Extract of *Newboulda laevis* on Blood Glucose Levels of Diabetic Rats. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, **10**: 249-254.
- ÖZKAN A, FIŞKIN K (2004). Serbest Oksijen Radikalleri, Karsinogenez ve Antioksidant Enzimler. *Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi*, **14**: 52-60.
- PARMAKSIZ İ (2011). Diyabet komplikasyonlarında ileri glikasyon son ürünleri. *Marmara Med. J*, **24**: 141-148.
- PAVLOVIC D, KOCIC R, KOCIC G, JEVTOVIC T, RADENKOVIC S, MIKIC D, STOJANOVIC M, DJORDJEVIC PB (2000). Effect of four-week metformin treatment on plasma and erythrocyte antioxidative defence enzymes in newly diagnosed obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes. Obesity and Metabolism*, **2**: 251-256.
- PEKCAN Z, ÇINAR M, GÜRKAN M, KUMANDAŞ A (2011). Ankara Keçilerinde Propofol ve İzofluran Anesteziinin Oksidatif Stres Üzerine Etkileri. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.* **6**: 217-222.

- PIJL H, OHASHI S, MATSUDA M, MIYAZAKI Y, MAHANKALI A, KUMAR V, PIPEK R, IOZZO P, LANCASTER JL, CINCOTTA AH, DEFRONZO RA (2000). Bromocriptine: a novel approach to the treatment of type 2 diabetes *Diabetes Care.*, **23**: 61-1154.
- POIRIER P, BOGATY P, GARNEAU C, MAROIS L, DUMESNIL JG (2001). Diastolic dysfunction in normotensive men with well-controlled type 2 diabetes: importance of maneuvers in echocardiographic screening for preclinical diabetic cardiomyopathy. *Diabetes Care*, **24**: 5-10.
- PORETSKY L (2017). Principles of Diabetes Mellitus. 3rd Edition. Springer, USA. ISBN: 978-3-319 18740-2.
- SATMAN İ (2010). Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalans Çalışması-II (TURDEP-II Çalışması).
- RAINS JL, JAIN SK (2011). Oxidative Stress, Insulin Signaling, And Diabetes. *Free Radic Biol Med.* **50**: 567-575.
- RAND JS, FLEEMAN LM, FARROW HA, APPLETON DJ, LEDERER R (2004). Canine and Feline Diabetes Mellitus: Nature or Nurture? *J Nutr*, **134**: 2072-2080.
- RAVAL JK, PRASAD MC, PARMAR HC, PATEL JM, VIHOL PD, PATEL JH (2018). Pathomorphological Changes in Type-2 Diabetes in Rat Model. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, **7**: 19-24.
- RAYNER BS, HUA S, SABARETNAM T, WITTING PK (2009). Nitric oxide stimulates myoglobin gene and protein expression in vascular smooth muscle. *Biochem J*, **423**: 169-177.
- ROCHE M, RONDEAU P, SINGH NR, TARNUS E, BOURDON E (2008). The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett*, **582**: 1783-1787.
- RODWELL VW, BENDER DA, BOTHAM KM, KENNELY PJ, WEIL PA (2018). Harper's Illustrated Biochemistry. 31st Edition. McGraw Hill Education, USA. ISBN: 978-1-25 983794-4.
- ROY S, SEN CK, TRITSCHLER HJ, PACKER L (1997). Modulation of cellular reducing equivalent homeostasis by α-lipoic acid. Mechanism and implications for diabetes and ischemic injury. *Biochem Pharmacol*; **53**: 9-393.
- SADI G, TÜTÜNCÜOĞLU E, CINGIR KÖKER Ş, ERYILMAZ N (2012). Changes in expression profiles of antioxidant enzymes in diabetic rat kidneys. *Diabetes/Metabolism Res and Rev*, **28**: 228-35.
- SAKUL AA, KURTUL E, ÖZBEK H, KIRMIZI Nİ, BAHTİYAR BC, İSCAN GS, BAHADIR AÇIKARA Ö (2021). Evaluation of Antidiabetic Activities of Scarzonera Species on Alloxan Induced Diabetic Mice. *Clin. and Exp. Health Sciences*, **11**: 74-80.
- SAMOLS E (1991). The History of the endocrine pancreas. The Endocrine Pancreas, 1-14. Ed E Samols, New York: Raven Press.
- SARKAR A, DASH BK, MUTTIGI MS, KEDAGE V, SHETTY JK, PRAKASH M (2010). Copper And Ceruloplasmin Levels in Relation to Total Thiols and GST in Type 2 Diabetes Mellitus Patients. *Indian J of Clin Biochem*, **25**: 74-76.
- SARMA AD, MALLICK AR, GHOSH AK (2010). Free radicals and their role in different clinical conditions: an overview. *Int J Pharma Sci Res.*, **1**: 185-192.

- SATHEESH MA, PARI L (2008). Effect of pterostilbene on lipids and lipid profiles in streptozotocin-nicotinamide induced type 2 diabetes mellitus. *J. Appl. Biomed.*, **6**: 31-37.
- SCALBERT A, MANACH C, MORAND C, REMESY C, JIMENEZ L (2005). Dietary Polyphenols and The Prevention of Diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr*; **45**: 287-306.
- SEN S, CHAKRABORTY R. (2011) The Role of Antioxidants in Human Health. American Chemical Society, Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention and Therapy. *Chapter, 1*: 1-37.
- SHAH S, IQBAL M, KARAM J, SALIFU M, MCFARLANE SI (2007). Oxidative Stress, Glucose Metabolism, And The Prevention Of Type 2 Diabetes: Pathophysiological Insights. *Antioxid. Redox Signal*, **9**: 911–929.
- SHARAD P (2003). Diabetic Foot: A Clinical Atlas. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd;.
- SHUKLA K, DIKSHIT P, TYAGI MK, SHUKLA R, GAMBHIR JK (2012). Ameliorative effect of Withania coagulans on dyslipidemia and oxidative stress in nicotanimde streptozotocin induced diabetes mellitus. *Food and Chemical Toxicology*, **50**: 3595-3599.
- SILVEIRA KCS, VIAU CM, COLARES JR, SAFFI J, MARRONI NP, PORAWSKI M (2015). Cirrhosis induces apoptosis in renal tissue through intracellular oxidative stress. *Arg Gastroenterol*, **52**: 65-71.
- SINGH D, LAWRENCE K, SINGH S, ERCİŞLİ S, CHOUDHARY R (2022). In-vivo hyperglycemic, antioxidant, histopathological changes, and simultaneous measurement of kaempferol verified by high-performance thin layer chromatography of Setaria italica in streptozotocin -induced diabetic rats. *Saudi J of Bio Sci*, **29**: 3772-3790.
- SINGH S, DHINGRA S, RAMDATH DD, VASDEV S, GILL V, SINGAL PK (2010). Risk factors preceding type 2 diabetes and cardiomyopathy. *J Cardiovasc Transl Res*; **3**: 96-580.
- SIPERSTEIN MD (1992). Diabetes ketoacisosis and hyperosmolar coma. *Endocrine and Metabolic. Clin North Am.*; **21**: 415-32.
- SPEAKMAN JR, WESTERTEP KR (2012). A mathematical model of weight loss under total starvation and implications of the genetic architecture of the modern obesity epidemic for the thrifty-gene hypothesis. *Dis Model Mech*, **6**: 236-251.
- STACPOOLE PW (1993). Lactic acidosis. *Endo Metab Clin North America*. **22**: 45-221.
- STIRBAN A, NEGREAN M, STRATMANN B, GAWLOWSKI T, HORSTMANN T, GOTTING C, KLEESIEK K, MUELLER-ROESEL M, KOSCHINSKY T, URIBARRI J, VLASSARA H, TSCHOEPE D (2006). Benfotiamine prevents macro- and microvascular endothelial dysfunction and oxidative stress following a meal rich in advanced glycation end products in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes Care*; **29**: 2064–2071.
- SUN W, OATES PJ, COUTCHER JB, GERHARDINGER C, LORENZI MA (2006). Selective aldose reductase inhibitor of a new structural class prevents or reverses early retinal abnormalities in experimental diabetic retinopathy. *Diabetes.*; **55**: 62-2757.
- SUN Y, OBERLEY LW, LI Y (1988). A simple method for clinical assay of superoxidedismutase. *Clinical Chemistry*, **34**: 497-500.
- TESTAR J (2018). Cytokines: Introduction Imperial College London, UK. Erişim Adresi: [<http://Bitesized.Immunology.Org/Receptors-And-Molecules/Cytokines/>]. (Erişim Tarihi: 29/12/2022).

- THE NATIONAL INSTITUTE OF DIABETES AND DIGESTIVE AND KIDNEY DISEASES (2022). US Department of health and human services. Erişim Adresi: [<http://diabetes.niddk.nih.gov/dm/pubs/control>]. Erişim Tarihi: 05/03/2022.
- TITLE LM, CUMMINGS PM, GIDDENS K, GENEST JJ, NASSAR BA (2000). Effect of Folic Acid and Antioxidant Vitamins on Endothelial Dysfunction in Patients With Coronary Artery Disease. *J Am Coll Cardiol.*; **36**: 758-765.
- TSUDO, T., HORIO, F., UCHIDA, K., AOKI, H., OSAWA, T., (2003) Dietary Cyanidin 3-O- β -D Glucoside- Rich Purple Corn Color Prevents Obesity And Ameliorates Hyperglycemia İn Mice. *J. Nutr.* **133**: 2125–2130.
- TUNÇTAN B. VE ABACIOĞLU N, (1998). Biyolojik örneklerde nitrik oksit ölçümü: Diazotizasyon yöntemi. *FABAD J. Pharm. Sci.* **23**: 161-170.
- TURNER RC, MILLNS H, NEIL HAW, STRATTON IM, MANLEY SE, MATTHEWS DR, HOLMAN RR (1998). Risk factors for coronary artery disease in non-insulin dependent diabetes mellitus: United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS: 23). *BMJ*, **316**: 8-823.
- UNITED KINGDOM PROSPECTIVE DIABETES STUDY (UKPDS) (1998). Intensive blood glucose control with sulfonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet*, **352**:837–853.
- USTA A, DEDE S, ÇETİN S (2018). Deneyisel Diyabetli Ratlarda Timokinon Uygulanmasının Doku Total Oksidan ve Antioksidan Düzeyine Etkisi. *Atatürk Üniv Vet Bil Derg*, **13**: 84-91.
- ÜLGER TG, ÇAKIROĞLU FP (2018). Effect of Allium Cepa on Paraoxonase 1 Activity and Oxidative Stress in Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *Journal Of Food And Nutrition Research*, **6**: 689-693.
- VENOS E, DEKONING L (2017). Endocrine Markers of Diabetes and Cardiovascular disease risk. Ed. Sadrzadeh H., Kline G. *Elsevier*, Chapter **6**: 251-299.
- VIA MA, CHANDRA H, ARAKİ T, POTENZA MV, SKAMAGAS M. (2010) Bromocriptine approved as the first medication to target dopamine activity to improve glycemic control in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab Syndr Obes.*, **3**: 8-43.
- VINCENT AM, RUSSELL JW, LOW P, FELDMAN EL. (2004) Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocrin reviews*; **25**:612–628. doi.org/10.1016/B978-0-12-803412-5.00006-9.
- WANG C, LI F, GUO J, LI C, XU D, WANG B (2018). Insulin resistance, blood glucose and inflammatory cytokinelevels are risk factors for cardiovascular events in diabeticpatients complicated with coronary heart disease. *Experimental and Therapeutic Medicine*, **15**: 1515 -1519.
- WARRAM JH, MARTIN BC, KROLEWSKI AS, SOELDNER JS, KAHN CR (1990). Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type 2 diabetes in the offsprings of diabetic parents. *Am Intern Med.*; **113**: 909-915.
- WEI PZ, SZETO CC (2019). Mitochondrial Dysfunction İn Diabetic Kidney Disease. *Clinica Chimica Acta*, **496**: 108-116.
- WEN W, LIN Y, TI Z (2019). Antidiabetic, Antihyperlipidemic, Antioxidant, Anti-inflammatory Activities of Ethanolic Seed Extract of *Annona reticulata* L. in Streptozotocin induced Diabetic Rats. *Front. Endocrinol*, **10**: 716. doi: 10.3389/fendo.2019.00716.

- WEYER C, BOGARDUS C, MOTT DM, PRATLEY RE (1999). The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest*, **104**: 94-787.
- XIAO YF, WANG B, DU F, BENZINO M, WANG YXJ (2013). Xylazine-induced reduction of tissue sensitivity to insulin leads to acute hyperglycemia in diabetic and normoglycemic monkeys. *BMC Anesthesiology*, **13**: 33-42.
- YARIM, GF, KAZAK F (2016). Metabolik Sendrom ve Bileşenlerinde Sitokin Yanıtı. *Harran Üniv Vet Fak Derg*, **5**: 90-99.
- YAYLACI KARAHALİL F, ŞAHİN H (2011). Phenolic composition and antioxidant capacity of Cherry laurel (*Laurocerasus officinalis* Roem.) sampled from Trabzon region, Turkey, *African Journal of Biotechnology*, **10**: 16293-16299.
- YUMRU M, SAVAS HA, KALENDEROĞLU A, BULUT M, ÇELİK H, EREL O (2009). Oxidative imbalance in bipolar disorder subtypes; a comparative study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, **33**: 1070-1074.
- ZHANG F, YE C, LI G, DING W, ZHOU W, ZHU H, CHEN G, LUO T, GUANG M, LIU Y, ZHANG D, ZHENG S, YANG J, GU Y, XIE X, LUO M (2003). The Rat Model of Type 2 Diabetic Mellitus and its Glycometabolism Characters. *Exp Anim*, **52**:401-407.

EKLER

Ek-1 Etik Kurul Kararı



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 03/03/2021
TOPLANTI NO : 2021-5
DOSYA NO : 2019-99
KARAR NO : 2021-5-29

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Tevhide SEL'in yaptığı; araştırmacı olarak Prof. Dr. Aymelek GÖNENÇ, Doç. Dr. Görkem KISMALI, Dr. Öğr. Üyesi Burcu Menekşe BALKAN ve Yeliz KAYA'nın katıldığı "Karayemiş, Lipoik Asit ve Rutin Flavonoidinin Metformin Verilen Diyabetik Ratlarda Etkisi" başlıklı araştırma projesinin içeriği Kurulumuzca incelenmiş olup, Kurulumuzun 24.07.2019 tarihli toplantısında alınan 2019-15-136 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Proje yürütücüsü tarafından Kurulumuza verilen 17.02.2021 tarih ve 10406 sayılı dilekçede, pandemi nedeniyle çalışmaya başlanamamasından ötürü proje süresinin bir (1) yıl uzatılması talep edilmektedir.

Söz konusu dilekçe Üniversite Senatosunun 12/2/2016 tarihli toplantısında 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi"nin 11 (5) maddesi kapsamında değerlendirilmiş olup, proje süresinin bir (1) yıl süre ile uzatılmasının uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.

Geçerlilik Süresi : 01/01/2020-01/01/2022

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof. Dr. M. Taner KARAOĞLU (Başkan)	Viroloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof. Dr. Tanju ÖZÇELİKAY (Başkan Vekili)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof. Dr. Emine DEMİREL YILMAZ (Üye)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Prof. Dr. Nuri YIĞIT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof. Dr. Fatin CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	

Prof. Dr. Mine KIRKAĞAÇ (Üye)	Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü	Ziraat Fakültesi	K	
Doç. Dr. Gülnur GÖLLÜ BAHADIR (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Doç. Dr. Halit KANCA (Üye)	Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Dr. Vet. Hek. Nigar YERLİKAYA (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	K	
Dr. Vet. Hek. Gürbüz ERTÜRK (Üye)	Active Veteriner Sağlık Merkezi	Serbest	E	
Uzm. Vet. Hek. Hüseyin DEDE (Üye)	Veteriner Hekimler Derneği	Serbest	E	
Uzm. Vet. Hek. Atilla IŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı	Tıp Fakültesi	E	
Fatma Aysun COŞKUN (Üye)	İktisat	Serbest	K	

ÖZGEÇMİŞ







