

T. C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**QUERCETİN UYGULANMIŞ DİYABETİK
SIÇANLARDA RENAL SİKLOOKSİJENAZ-2 VE
İNDÜKLENEBİLİR NİTRİK OKSİT SENTAZ
AKTİVİTELERİNİN DEĞİŞİMİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman

Prof. Dr. Necip İLHAN

Ecz. Tuba KAYA KARATAŞ

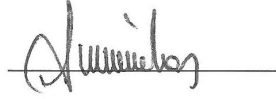
2012

ONAY SAYFASI

Doç. Dr. Oktay BURMA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.



Prof. Dr. Nevin İLHAN

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

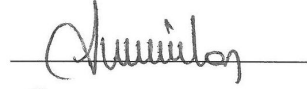
Prof. Dr. Necip İLHAN



Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Nevin İLHAN



Prof.Dr. Necip İLHAN



Prof. Dr. İhsan HALİFEOĞLU



Prof.Dr. İbrahim H. ÖZERCAN



Doç.Dr. Süleyman AYDIN



TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim sürecinde, eğitimime büyük katkıları olan başta tez danışmanım Prof. Dr. Necip İLHAN olmak üzere Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Nevin İLHAN ve Anabilim Dalımızın Değerli Öğretim Üyelerine; tez çalışmamın histopatolojik incelemelerini yapan ve değerlendiren Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İbrahim ÖZERCAN' a tezin deneysel aşamalarında yardımlarını esirgemeyen Veteriner Fakültesi Zootekni ve Hayvan Besleme Anabilim dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Kazım ŞAHİN'e,

Bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi olan ve hayatımın tüm aşamalarında sevgi ve desteklerini bir an bile eksik etmeyerek bana sabırlarını sunan sevgili anne ve babama,

Tez çalışmam esnasında her türlü desteğini esirgemeyen, varlığıyla güven veren, yol arkadaşım, sevgili eşim Dr. Ahmet KARATAŞ'a ve biricik oğlumuz Berkay'a

Teşekkür etmekten büyük mutluluk ve onur duyarım.

Tuba KAYA KARATAŞ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLO LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
KISALTMALAR LİSTESİ	viii
ÖZET	xi
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Diabetes Mellitus	3
1.1.1. Tanım	3
1.1.2. Epidemiyoloji	3
1.1.3. Tanı	4
1.1.3.1. Oral Glukoz Tolerans Testi	6
1.1.4. Diabetes Mellitus Sınıflaması	6
1.1.5. Diabetes Mellitus'un Komplikasyonları	7
1.2. Oksidatif Stres	7
1.2.1. Giriş	7
1.2.2. Diyabet ve Oksidatif Stres	8
1.2.2.1. Glukozun Otooksidasyonu ve Süperoksit Üretimi	10
1.2.2.2. Proteinlerin Glikolizasyonu ve İlerlemiş Glikolizasyon Son Ürünleri Oluşumu	10
1.2.2.3. Poliöl Yolu	11
1.3. İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz (iNOS)	11
1.4. Siklooksijenaz-2 (COX-2)	13
1.5. İnterlökin-6 (IL-6)	15
1.6. Quercetin	16
2. GEREÇ VE YÖNTEM	18
2.1. Deney Hayvanları	18
2.2. Deneysel Uygulamalar	18

2.3. Diyabet İndüksiyonu ve Quercetin Uygulaması	19
2.4. Kan ve Doku Örneklerinin Toplanması	20
2.5. Biyokimyasal Değerlendirme	20
2.5.1. Kan Glukoz Düzeyleri	20
2.5.2. Serum ve Doku İnterlökin-6 Düzeyleri	20
2.5.3. İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz ve Siklooksijenaz-2 Düzeyleri	21
2.5.3.1. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	21
2.5.3.2. Western Blot Analizleri	25
2.6. Histopatolojik Değerlendirme	29
2.7. İstatistiksel Analiz	29
3. BULGULAR	30
3.1. Kan Glukoz Düzeyleri	30
3.2. Biyokimyasal Değerlendirme	30
3.2.1. Doku iNOS ve COX-2 Düzeyleri	30
3.2.2. Serum IL-6 Düzeyleri	34
3.3. Histopatolojik Değerlendirme	35
4. TARTIŞMA	37
5. KAYNAKLAR	43
6. ÖZGEÇMİŞ	50

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Diabetes mellitus tanı kriterleri.	5
Tablo 2. Tip 2 Diabetes mellitus yüksek risk grupları.	5
Tablo 3. ADA (1997, 2004) ve WHO (1999) raporlarına göre bozulmuş glukoz metabolizma kriterleri.	6
Tablo 4. Diabetes mellitusun etiyolojik sınıflandırılması.	7
Tablo 5. Diyabetin akut ve kronik komplikasyonları.	9
Tablo 6. Besinlerin içerdiği quercetin miktarları.	17
Tablo 7. Deney hayvanlarının yem içeriği.	19
Tablo 8. SDS-PAGE için jellerin hazırlanma protokolü.	24
Tablo 9. Gruplarda başlangıç ve uygulama sonu kan glukoz değerlerinin değişimi.	30
Tablo 10. Serum İnterlökin 6 Düzeyleri ile Doku iNOS ve COX-2 düzeylerinin Gruplardaki Değişimi.	35

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Oksidatif stresin diyabetin komplikasyonlarının patogeneziindeki rolü.	12
Şekil 2. Araşidonik asit metabolizması.	15
Şekil 3. Quercetinin yapısal formülü.	16
Şekil 4. Western Blot yöntemi ile doku iNOS ve COX-2 ekspresyonu.	31
Şekil 5. Karaciğer doku COX-2 aktivitesinin relatif dansite olarak değişimi.	31
Şekil 6. Böbrek doku COX-2 aktivitesinin relatif dansite olarak değişimi.	32
Şekil 7. Aort doku COX-2 aktivitesinin relatif dansite olarak değişimi.	32
Şekil 8. Karaciğer doku iNOS aktivitesinin relatif dansite olarak değişimi.	33
Şekil 9. Böbrek doku iNOS aktivitesinin relatif dansite olarak değişimi.	33
Şekil 10. Aort doku iNOS aktivitesinin relatif dansite olarak değişimi.	34
Şekil 11. Ratların pankreas dokularında görülen histopatolojik değişimler.	35
Şekil 12. Ratların böbrek dokularında görülen histopatolojik değişimler.	36
Şekil 13. Ratların karaciğer dokularında görülen histopatolojik değişimler.	36
Şekil 14. Ratların aort dokularında görülen histopatolojik değişimler.	37

KISALTMALAR LİSTESİ

5-LOX	: 5-Lipooksijenaz
8-OHdG	: 8-Hidroksi Deoksiguanozin
ADA	: Amerikan Diyabet Birliği
AGEs	: İlerlemiş Glikolizasyon Son Ürünleri Oluşumu
APS	: Amonyum Persülfat
ATP	: Adenozin Trifosfat
BSA	: Sığır Serum Albumini
COX-2	: Siklooksijenaz-2
DAB	: Diaminobenzidin
DKA	: Diyabetik Ketoasidoz
DM	: Diabetes Mellitus
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FÜDAM	: Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi
FÜHADEK	: Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu
GDM	: Gestasyonel Diabetes Mellitus
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HHS	: Hiperosmolar Hiperglisemik Sendrom
HO⁻	: Hidroksil Radikali
IFG	: Bozulmuş Açlık Glukozu

IGT	: Bozulmuş Glukoz Toleransı
IL-1	: Interlökin - 1
IL-6	: Interlökin - 6
iNOS	: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentetaz
i.p	: İntraperitoneal
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NASH	: Nonalkolik Steatohepatit
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa Beta
NO⁻	: Nitrik Oksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
O₂⁻	: Süperoksit Anyonu
OGTT	: Oral Glukoz Tolerans Testi
ONOO⁻	: Peroksinitrit
PGE₂	: Prostaglandin E ₂
PGH₂	: Prostaglandin H ₂
PLA₂	: Fosfolipaz A ₂
PMSF	: Fenil Metil Sülfonil Florid
PNL	: Polimorf Nüveli Lökosit
ROO⁻	: Peroksil Radikali
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat

SDS-PAGE : Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi

STZ : Streptozosin

TEMED : N, N, N', N', -Tetrametil-Ethilendiamin

TURDEP : Türkiye Diyabet Epidemiyoloji Araştırması

TXA₂ : Tromboksan A₂

WHO : Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)

ÖZET

Diabetes mellitus (DM), mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlarla seyreden kronik metabolik bir hastalıktır. Quercetin (3,3', 4', 5, 7 pentahydroxyflavone) flavonoid türevi bir bileşik olup antioksidan, antiinflamatuvar ve antitümöral etkilere sahiptir. Çalışmanın amacı; Streptozosin (STZ) ile diyabet oluşturulan ratlarda quercetin tedavisi ile Siklooksijenaz-2 (COX-2) ve İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentetaz (iNOS) değişimlerinin diyabet ile olan ilişkisinin biyokimyasal ve histopatolojik olarak değerlendirilmesidir.

Çalışmaya 40 adet, 8-10 haftalık, Wistar Albino türü erkek ratlar alındı. Ratlar her grup eşit olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. **Grup I** (Kontrol Grubu: Sitrat Tamponu), **Grup II** (Sham Grubu: Sitrat Tamponu + Tween Çözeltisi), **Grup III** (Diyabet Grubu) ve **Grup IV** (Diyabet + Quercetin) olarak belirlendi. Grup I ve II'deki ratlara 0,1 mol/L Sitrat tamponu intraperitoneal olarak 3 gün uygulandıktan sonra Grup II ratlara % 0,2 Tween çözeltisi intraperitoneal olarak günde 2 kez 14 gün boyunca verildi. Grup III ve Grup IV'de bulunan ratlara, diyabet oluşturmak için 3 gün boyunca 40 mg/kg dozda STZ 0,1 mol/L sitrat tamponunda (pH: 4,5) çözülerek intraperitoneal olarak uygulandı. Ayrıca; Grup IV ratlara Quercetin 50 mg/ kg/ gün dozda % 0,2 tween çözeltisinde çözülerek aynı yol ile günde 2 kez 14 gün boyunca uygulanarak Quercetin'in koruyucu etkisi araştırıldı.

Grup I ratlar ile karşılaştırıldığında, Grup III ratlarda serum IL-6, doku COX-2 ve iNOS düzeylerinde artış saptandı. Histopatolojik değerlendirmelerde, Grup III'de rat karaciğer, böbrek, aort dokularında ılımlı inflamasyon görüldü. Quercetin tedavisinin serum IL-6, doku COX-2 ve iNOS düzeylerini azalttığı karaciğer, böbrek ve aort dokularında inflamasyonu baskıladığı bulundu.

Sonuç olarak; Quercetinin diyabet gelişimini ve komplikasyonlarını önleyebileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Diabetes mellitus, Quercetin, İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz, Siklooksijenaz-2.

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF EFFECTS QUERCETIN TREATMENT ON CYCLOOXYGENASE-2 AND INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE LEVELS AT EXPERIMENTAL DIABETIC RAT

Diabetes mellitus (DM) is a chronic metabolic disease characterized by microvascular and macrovascular complications. Quercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone) is a flavonoid that has antioxidant, antiinflammatory and antitumoral effects. This study aimed to determine biochemical and histopathological changes in cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) levels at the end of Quercetin treatment in the streptozotocin-induced diabetic rats.

In this study forty Wistar Albino male rats aged 8-10 weeks were used. The rats were randomized into four groups. **Group-I** as control group: citrate buffer, **Group-II** as sham group: citrate buffer +tween solution, **Group-III** as diabetic group and **Group-IV** as diabetic+quercetin group were assigned (n=10 in each group). After the intraperitoneally injection of 0,1 mol/L citrate buffer for 3 days to the **Group-I** and **Group-II** rats, % 0,2 tween solution was injected to sham group rats intraperitoneally twice a day for fourteen days.

Group-III and Group-IV rats were injected 40 mg/kg streptozotocin dissolved in 0,1 mol/L citrate buffer (pH: 4,5) intraperitoneally for 3 days and diabetes was induced in rats. The rats in Group-IV were given dose of 50 mg/ kg/ day Quercetin dissolved in % 0,2 tween solution intraperitoneally for 14 days twice a day and the protective effects of the Quercetin was investigated.

When the 3 groups were compared with control group (Group I) , in the diabetic group rats (Group-III) serum IL-6, tissue COX-2 and iNOS levels increased significantly. Histopathological analysis demonstrated mild inflammation in diabetic group rats (Group-III). Quercetin treatment decreased serum IL-6, tissue COX-2 and iNOS levels; it suppressed the inflammation in liver, kidney and aort tissues.

These results suggest that Quercetin might be useful in order to prevent development of diabetes and its complications.

Key words: Diabetes mellitus, Quercetin, Cyclooxygenase-2, Inducible Nitric Oxide Synthase.

1. GİRİŞ

Diabetes mellitus (DM) insülin eksikliği veya dokuların insüline duyarsızlığı sonucu organların uzun süre hiperglisemiye maruz kaldığı metabolik bir hastalıktır (1). Diabetes mellitus, günümüz insanının yaşam şartlarından dolayı tüm dünyada hızla yayılan, yüksek mortalite ve morbidite riski taşıyan bir hastalıktır.

Diabetes mellitus gelişiminde proinflamatuvar sitokinler ve oksidatif stresin önemli rol aldığı bilinmektedir (2). Oksidatif stresin diyabet etiyolojisinde ve ilerlemesinde rolü olduğu, deneysel olarak diyabet oluşturulan ratlarda ve diyabetik hastalarda serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonunun önemli derecede arttığı gözlenmiştir (3). Serbest radikaller; hücrelerin lipid, protein, deoksiribonükleik asit (DNA) ve karbonhidratlar gibi tüm önemli makro moleküllerine etki ederek yapılarının bozulmasına neden olur. Biyolojik sistemlerdeki reaktif oksijen türleri (ROS), nitrik oksit ($\text{NO}^\cdot$), hidroksil radikali ($\text{HO}^\cdot$), süperoksit anyonu ($\text{O}_2^\cdot$) peroksil radikali ($\text{ROO}^\cdot$) ve radikal olmayan hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi serbest radikaller oksidatif stresin en önemli nedenleri olarak bilinir (4).

İndüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) aslında makrofajlarda tanımlanmasına rağmen iskelet kası, yağ dokusu ve karaciğer gibi insüline duyarlı birçok dokuda sentez edilmektedir (5). Diyabet durumunda çeşitli organlarda görülen problemlerin çoğu bir reaktif oksijen türü olan iNOS ile ilişkilendirilmiştir. Diyabetik olgularda çeşitli organlarda iNOS düzeyinin arttığı ve insülin salgılayan hücrelerinin fonksiyonunun nitrik oksit tarafından baskılanabildiği rapor edilmiştir (6).

Siklooksijenaz-2(COX-2) enzimi, inflamasyondan sorumlu olan bir izoenzimdir. COX-2 sağlıklı hücrelerde normal şartlarda bulunmaz. COX-2, akut ve kronik inflamasyon gibi patolojik durumlarda önemli rolleri olan prostaglandinlerin sentezinden sorumludur (7, 8). Deneysel diyabetik rat modeli ile yapılan çalışmalarda diyabetik komplikasyon gelişiminde COX-2 enziminin rol aldığı görülmüştür (9).

İnterlökin 6 (IL-6); birçok biyolojik olaylarda etkili bir immün sistem mediatörüdür (10). IL-6'nın en iyi tanımlanan etkileri hepatositler ve B lenfositleri üzerine olup, akut faz yanıtına katkıda bulunan birçok plazma proteininin hepatositler tarafından sentezine neden olur (11). Proinflamatuvar sitokin olan IL-6, insülin sinyal yolları ile yarışma göstererek diyabetli hastalarda insülin direncine neden olmaktadır (12).

Quercetin (3,3',4',5,7 pentahydroxyflavone) daha çok sebze ve meyvelerde bulunan bir flavonoid türevidir (13). Antioksidan, antitumoral, antiinflamatuvar, antiallerjen, antiviral, antibakteriyel, antitrombotik, antihipertansif, antiaritmik ve antihumoral aktiviteler gibi farklı klinik etkileri bulunmaktadır (14). Anti-inflamatuvar etkisini ise IL-6 gibi pro-inflamatuvar sitokinleri, Fosfolipaz A₂ (PLA₂), Siklooksijenaz-2 (COX-2) ve 5-Lipooksijenaz (5-LOX) enzimlerini etkileyerek göstermektedir (15, 16).

Diyabet gibi birçok inflamatuvar hastalıkta, COX-2, iNOS, IL-6 gibi proinflamatuvar mediatörler inflamatuvar süreçte önemli rol almaktadır (9).

1.1. Diabetes Mellitus

1.1.1. Tanım

Diabetes mellitus (DM) insülin sekresyonu ve/veya insülinin etkisindeki bozukluklardan kaynaklanan karbonhidrat, lipid ve protein metabolizması bozuklukları ile hızlanmış aterosklerozla birlikte, mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar ile seyreden kronik metabolik bir hastalıktır (17).

Diabetes mellitus, anormal glukoz toleransı ile karakterize heterojen bir metabolizma bozukluğudur (18). Hiperglisemi, DM tanısı konulmadan uzun süre önce mevcut olabilir. Semptomlar çoğunlukla ağır değildir. Ağız kuruluğu, poliüri, görme bozukluğu, kilo kaybı ve polifaji gibi semptomlar görülebilir. Bazen hiçbir semptom görülmeyebilir. Ağır formları tedavi edilmediğinde stupor, koma, hatta ölüme neden olan ketoasidozis veya nonketotik hiperosmolar hiperglisemi ile kendini gösterebilir (19).

1.1.2. Epidemiyoloji

Diabetes mellitus'un tanınması, erken dönemde tanı konması ve tedavi programlarının belirlenmesi için hastalığın epidemiyolojik özelliklerinin bilinmesi önemlidir (17). Yeni bir konu olan diyabet epidemiyolojisi, ilk olarak 1979'da "National Diabetes Data Group" toplantısında ele alınmıştır. Daha sonra 1980'de, Dünya Sağlık Örgütü (WHO-World Health Organization), DM kriterleri ve sınıflandırmasının standardizasyonu toplantılarında diyabet epidemiyolojisi tartışılmıştır. Son 20 yılda diyabetin araştırma, bakım ve önlenmesi için epidemiyoloji çalışmaları oldukça hızlanmıştır. Günümüzde DM birçok gelişmiş ve gelişmekte olan ülkede epidemik bir hastalık olarak kabul edilmektedir. Günümüzde epidemiyolojiye genetik, çevresel, davranışsal, sosyoekonomik ve kültürel faktörlerin de etkili olduğu gösterilmiş olup bu durum özellikle Tip 2

DM prevelansında artışın sebepleri arasında gösterilmiştir. Dünyanın farklı bölgelerinde farklı oranlarda görülen DM'nin en yüksek prevelansı Amerika'da yaşayan Pima Kızılderilileri'nde olup % 55'tir. Grönland ve Alaska Eskimolarında ise DM prevelansının çok daha düşük olduğu saptanmıştır (20).

Ülkemizde yapılan en geniş çalışma Türkiye Diyabet Epidemiyoloji Araştırması (TURDEP) olup; TURDEP-II çalışması 2010 tarihinde 540 merkezde tamamlanmış, % 37'si erkek ve % 63'ü kadın 26.499 kişi üzerinde araştırma yapılmıştır. Bu çalışmada DM prevelansı türk erişkin toplumda % 13,7 olarak bulunmuştur (3). Gökçel ve arkadaşlarının Adana'da yaptığı çalışmada 1637 randomize seçilmiş, 20-79 yaş arası erişkin birey çalışmaya dahil edilmiştir. Erkeklerde DM prevelansı % 12,9 ve kadınlarda % 10,9 iken toplam prevelansı % 11,6 olarak bulunmuştur. Keleştimur ve arkadaşlarının Kayseri'de 30 yaş ve üzerindeki 1774 erişkinin 1452'sinde yapılan oral glukoz tolerans testi (OGTT) sonrasında % 4 DM, % 2,9 tanı konulmamış DM, % 9 IGT saptanmış olup toplam IGT % 15,9'dur (21).

1.1.3. Tanı

Diabetes mellitus tanısı konusunda oldukça sık değişiklikler olmuştur. Amerikan Diyabet Birliği (ADA) ve WHO uzmanları tarafından paneller yapılmıştır. En son gözden geçirilen ve uzlaşma sağlanan tanı kriterleri açıklanmıştır. ADA'nın 2004 ve WHO'nun 1999 yılı raporlarına göre DM'nin tanı kriterleri Tablo 1'deki gibidir (20, 22-24).

Tablo 1. Diabetes mellitus tanı kriterleri

1.	Klasik diyabet semptomları (poliüri, polidipsi ve açıklanamayan kilo kaybı) ile birlikte günün herhangi bir saatinde, son öğün zamanı dikkate alınmaksızın, plazma glukoz konsantrasyonunun ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L) olması
2.	En az 8 saatlik açlık sonrasında plazma glukoz düzeyinin ≥ 126 mg/dL (7,0 mmol/L) olması
3.	75 gr glukoz kullanılarak uygulanan olan Oral Glukoz Tolerans Testi (OGTT)'nin 2. saat glukoz düzeyinin ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L) olması

Eğer açlık kan şekeri 100-125 mg/dL aralığında ise kişide bozulmuş açlık glukozu (IFG), OGTT sonrası 2. saat kan şekeri düzeyi 140-199 mg/dL aralığında ise kişide bozulmuş glukoz toleransı (IGT) mevcuttur (23).

Üçüncü kriter olan OGTT'nin rutin olarak uygulanması önerilmez. Diyabet için yüksek risk taşıyan bireyler (Tablo 2), tanı amaçlı olarak OGTT ile değerlendirilmelidir (22, 25).

Tablo 2. Tip 2 Diabetes mellitus yüksek risk grupları

1.	Ailede diyabet öyküsü olması (anne-baba veya kardeşte Tip 2 DM)
2.	Obezite (Vücut Kitle İndeksi ≥ 27 kg/m ² , ideal vücut ağırlığından % 20 fazlalık)
3.	Yaş ≥ 45
4.	İrk, etnisite (Hispanik Amerikalılar, Pasifik adalılar, vs.)
5.	Gestasyonel diyabet veya makrozomi öyküsü (≥ 4 kg)
6.	Polikistik over sendromu
7.	Daha önce IFG veya IGT tanısı alanlar
8.	Hipertansiyon (Kan basıncı $\geq 140/90$ mmHg)
9.	HDL değeri 35 mg/dL'den az ve/veya trigliserid değeri 250 mg/dL'den fazla olanlar

Amerikan Diyabet Birliği, 2004 yılında açlık plazma glukoz düzeyinde bir değişiklik yaparak alt sınırı 100 mg/dL'ye indirmiştir (Tablo 3).

Tablo 3. ADA (1997, 2004) ve WHO (1999) raporlarına göre bozulmuş glukoz metabolizma kriterleri (23, 24).

		ADA (1997)	ADA (2004)	WHO (1999)
Diyabet	Açlık	≥ 126 mg/dL	≥ 126 mg/dL	≥ 126 mg/dL
	OGTT 2. saat	≥ 200 mg/dL	≥ 200 mg/dL	≥ 200 mg/dL
IFG	Açlık	110-125 mg/dL	100-125 mg/dL	110-125 mg/dL
	OGTT 2. saat			< 140 mg/dL
IGT	Açlık			< 126 mg/dL
	OGTT 2. saat	140-199 mg/dL	140-199 mg/dL	140-199 mg/dL

1.1.3.1. Oral Glukoz Tolerans Testi

Oral glukoz tolerans testi, sabah vaktinde, her zamanki fiziksel aktivite ve en az 3 günlük sıkı bir diyet (>150 gr günlük karbonhidrat) yaptıktan sonra yapılmalıdır. Hastalar test öncesi gece boyunca en az 10-16 saat aç kalmalıdır. Açlık kan örneği alındıktan sonra, hastalara 5 dakikalık süre içinde 75 gr glukoz, 300 ml su içinde eritilerek içirilir. Kan örnekleri testten önce (açlık) ve testin başlangıcından sonra ikinci saatte alınmalıdır. OGTT sonuçları Tablo 3’de verilen kriterlere göre yorumlanmalıdır (26).

1.1.4. Diabetes Mellitus Sınıflaması

Diyabetin spesifik etiyolojiyle tanımlanan formlarının artması üzerine 1997 yılında, ADA diyabetin klinik sınıflandırma kriterlerini düzenleyip WHO’ya bildirmiştir. Bu kriterler; 1999 yılında WHO tarafından bir rapor halinde açıklanmıştır. Yeni sınıflama etiyolojiye göre yapılmıştır. Bu sınıflama ile insüline bağımlı ve insüline bağımlı olmayan diyabet yerine Tip 1 ve Tip 2 diyabet terminolojisinin kullanılması tavsiye edilmiştir. Diyabet 4 ana klinik grup

olacak şekilde sınıflandırılmıştır. Bunlar; Tip 1 DM, Tip 2 DM, diğer spesifik diyabet tipleri ve gestasyonel DM (GDM)'dir (27, 28). ADA'nın 2004'te kabul ettiği DM'nin etiyolojik sınıflandırması Tablo 4'de gösterilmiştir (23).

Tablo 4. Diabetes mellitusun etiyolojik sınıflandırılması

I- Tip 1 Diyabet

a) İmmunolojik

b) İdiopatik

II- Tip 2 Diyabet

III- Diğer spesifik tipler

IV- Gestasyonel diyabet (GDM)

1.1.5. Diabetes Mellitus'un Komplikasyonları

Diyabet, akut ve kronik komplikasyonlarla seyreder. Uzun süreli diyabet kapilleri, arteriollerini yapan vasküler hücreleri ve bazal membranları etkileyerek tüm damarların yapısını bozar. Tüm mikrovasküler yapılar etkilenmesine karşın klinikte retina, renal glomerül ve büyük sinirlerdeki patolojiler ile ortaya çıkar (25). DM'nin akut ve kronik komplikasyonları gruplar halinde Tablo 5'de gösterilmiştir (29, 30).

1.2. Oksidatif Stres

1.2.1. Giriş

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge olduğu sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında azalma bu dengenin bozulmasına neden olur. "Oksidatif stres" olarak adlandırılan bu durum serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma

mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup, sonuçta doku hasarına yol açmaktadır (31).

Oksidatif stres, diyabetin etiyolojisinde önemli bir mekanizma olarak değerlendirilir. Serbest radikaller normal metabolik sürecin sonucu olarak vücutta üretilir ve sürekli olarak çevresel uyarılarla etkileşim halindedir. Antioksidanların çoğu canlı ortamda serbest radikal üretiminin olumsuz etkilerine karşı vücudu savunur (32).

Deneysel olarak diyabet oluşturulan ratlarda ve diyabetik hastalarda serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonun önemli derecede arttığı gözlenmiştir (33).

Ayrıca antioksidan kapasitede görülen değişikliklerin ve uzamış oksidatif stresin, diyabetin kronik komplikasyonlarının oluşması ile ilişkili olduğu saptanmıştır (9, 34).

1.2.2. Diyabet ve Oksidatif Stres

Diyabet ve diyabet komplikasyonlarının ROS ile olan ilişkisini gösteren çalışmalarda, nonenzimatik glikolizasyon, enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stres, sorbitol yol aktivitesi, hipoksi ve iskemi-reperfüzyon sonucu oluşan doku hasarının serbest radikal üretimini arttırdığı saptanmıştır (35).

Oksidatif strese duyarlı olduğu bilinen beta hücrelerinde gözlenen hasarın, hipergliseminin toksik etkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (36).

Tablo 5. Diyabetin akut ve kronik komplikasyonları

Akut Komplikasyonlar

1. Diyabetik ketoasidoz (DKA)
2. Hiperosmolar hiperglisemik sendrom (HHS)
3. Laktik asidoz
4. Hipoglisemi

Kronik Komplikasyonlar

1. Makrovasküler komplikasyonlar
 - a) Diyabetik kalp hastalığı
 - b) Periferik arter hastalığı
 - c) Serebrovasküler hastalık
 2. Mikrovasküler komplikasyonlar
 - a) Diyabetik nöropati
 - b) Diyabetik nefropati
 - c) Diyabetik retinopati
 3. Diğer komplikasyonlar
 - a) Diyabetik ayak
 - b) Diyabetik gastroenteropati
 - c) Genitoüriner bozukluklar
 - d) Eretil disfonksiyon
-

Oksidatif stres belirteci olarak değerlendirilen 8-hidroksi deoksiguanozin (8-OHdG) düzeylerinde, diyabet oluşturulan rat deney modellerinde artış olduğu saptanmıştır (37).

Hiperglisemi aracılı ROS üretimi başlıca üç mekanizma ile açıklanmaktadır (38).

1.2.2.1. Glukozun Otooksidasyonu ve Süperoksit Üretimi

Glukoz bir geçiş elementinin varlığında, reaktif ketoaldehitlere ve süperoksit anyonuna dönüştürülür. Reaksiyonlar zinciri, süperoksit radikalının hidrojen peroksit üzerinden hidroksil radikali oluşturmaya son bulur. Hücre içi glukoz oksidasyonu redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfatın (NADPH) açığa çıkmasına neden olur. Solunum zincirinde oksidatif fosforilasyon yolu ile adenosin trifosfat (ATP) üretimi için gerekli enerjiyi sağlamak üzere NADPH kullanılır. Solunum zincirindeki bu reaksiyon sırasında süperoksit radikali oluşur. Yüksek glukoz konsantrasyonu varlığında bu yolla süperoksit radikal üretimi fazlaşır. Mitokondri solunum zinciri başlıca hücre içi ROS üretim kaynağıdır. Normal solunum zinciri olayları sırasında sürekli olarak süperoksit radikali oluştuğu sanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda, diyabetteki patolojilerin birçoğunun artmış mitokondriyal ROS üretimi ile bağlantılı olduğu saptanmıştır (39, 40).

1.2.2.2. Proteinlerin Glikolizasyonu ve İlerlemiş Glikolizasyon Son Ürünleri Oluşumu (AGEs: Advanced glycation end-products)

Protein glikolizasyonu glukozun aldehid formuyla proteinlerin serbest amino grupları arasındaki kovalent bağlanmalar sonucu meydana gelir. Geçiş metallerinin varlığında (demir, bakır vs.) glikolizasyona uğramış proteinler moleküler oksijene bir elektron vererek serbest radikallerin oluşmasına neden olurlar. Daha sonraları bu olayın geçiş metallerinin yokluğunda da meydana gelebileceği gösterilmiştir. Proteinin yarı ömrünün 10 haftadan uzun olduğu durumlarda glikolizasyona uğramış proteinler geri dönüşümsüz modifikasyonlarla Maillard ürünlerini ya da AGEs'i oluştururlar. Glikolizasyona uğramış proteinler

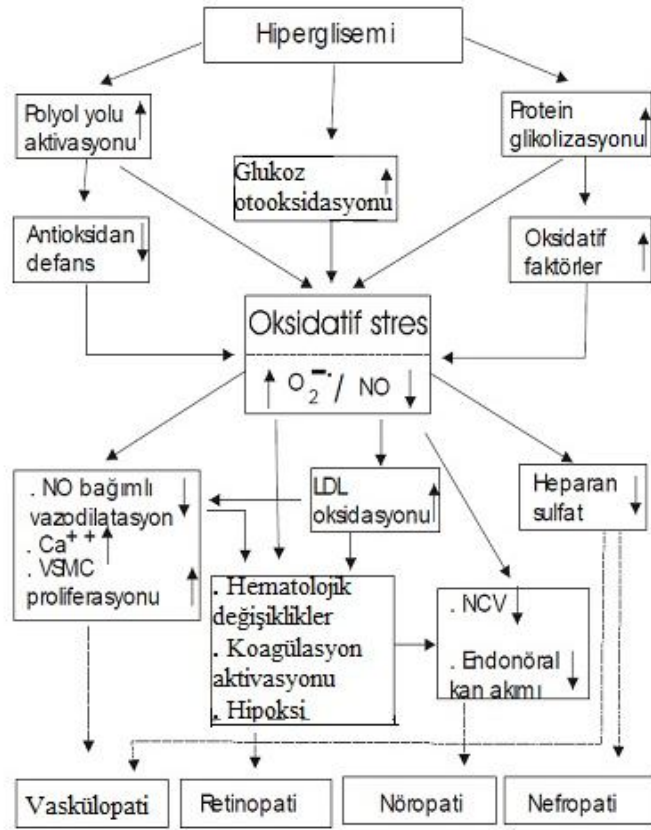
gibi, AGEs de serbest oksijen radikalleri oluşturabilirler. Ayrıca, ROS da AGEs'in oluşumunu hızlandırır (41).

1.2.2.3. Poliol Yolu

Yüksek glukoz konsantrasyonu, poliol yolu ile sorbitol üretimini artırır. Bu yoldaki aldoz redüktaz enzim aktivitesi için hücre içi NADPH kullanılır. NADPH okside glutatyonun redükte forma çevrilebilmesi ve NO sentezi için gereklidir. Bu nedenle sorbitol yolunun aktif olması ve sonuçta NADPH'nin yokluğu hücrenin antioksidan kapasitesinin sınırlandırılmasına yol açar (42). Oksidatif stresin diyabetin komplikasyonlarının patogeneziindeki rolü Şekil 1'de gösterilmiştir (43).

1.3. İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz (iNOS)

İndüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) özellikle makrofaj (monosit, nötrofil, hepatosit ve diğerleri) ve damar endotel hücrelerinde sentez edilmektedir. Bu hücreler spesifik sitokinlerin aktivasyonu ile nitrik oksit sentaz (NOS) indüksiyonuna ve nitrik oksit (NO) sentezine yol açmaktadır. Özellikle bakteri lipopolisakkaritleri ve interferon- γ veya yüksek konsantrasyonda lipopolisakkaritle uyarılan makrofajlar çok miktarda NO üreterek yabancı hücrelerde (bakteri, parazit, tümör hücresi) sitostatik ve/veya sitotoksik etki meydana getirirler. İndüksiyon sonrası NO sentezi saatlerce hatta günlerce devam edebilir. Ancak uzun süreli aşırı miktarda NO sentezi makrofaj ve diğer dokularda da harabiyete yol açar (44). NO'nin hasar oluşturucu etkisini, süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) anyonuyla reaksiyona girmesi sonucu oluşan peroksinitrit ($ONOO^{\cdot-}$) aracılığıyla yaptığı belirtilmiştir (45).



Şekil 1. Oksidatif stresin diyabetin komplikasyonlarının patogenezindeki rolü (R.J. Reiter'den modifiye edilmiştir). VSMC (Vascular Smooth Muscle Cell): vasküler düz kas hücresi, NCV(neuron conduction velocity): nöron iletim hızı

Peroksinitrit (ONOO^-) sitotoksik etkilerini lipid peroksidasyonu, protein denatürasyonu ve DNA hasarıyla oluşturmaktadır (46, 47). Reaktif nitrojen türlerinin fazla üretilmesi “nitrosatif stres” olarak tanımlanır. Nitrosatif stres, reaktif nitrojen metabolitlerinin fazla üretildiğinde ve nötralize edilemediğinde meydana gelir (48). Son yıllarda kardiovasküler sistem, sinir sistemi ve immün sistemde bulunabilen mesaj molekülü olarak nitrik oksit (NO) gibi ve nitrosatif stresi indükleyen bir tür olarak peroksinitrit (ONOO^-) gibi reaktif nitrojen türlerinin fizyolojik fonksiyonları üzerine yoğunlaşmıştır (49).

Memeli hücrelerin en küçük biyoaktif ürünlerinden biri olan nitrik oksit (NO), hemen hemen tüm hücreler tarafından üretilabilmektedir. NO, birçok

hücrede, nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi tarafından katalizlenir (50). NOS enzimi, L-arginin aminoasitini ve moleküler oksijeni kullanarak NO ve L-sitrulin oluşmasını sağlar. Bu tepkime kofaktör olarak, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) gerektirir. NO' in ortaya çıktıktan sonra birkaç saniyelik yarılanma ömrü vardır ve hızla hemoglobin ve süperoksit anyonu tarafından nötralize edilmektedir. Ya da yaklaşık on saniye içerisinde nitrit ve nitratlara dönüştürülür (51-53).

İndüklenebilir nitrik oksit sentaz sentezi Transkripsiyon faktör nükleer faktör kappa B (NF-κB) ile düzenlenmektedir (5). NF-κB aktivasyonu hücredeki immün ve inflamatuvar yanıtın amplifikasyonu ve düzenlenmesinde önemli rol oynar. NF-κB aktivasyonundaki artışı, inflamasyondaki sitokin ve diğer kemotaktik faktörlerin salınımındaki artış takip eder. Sitokinlerin büyük bir bölümü NF-κB yi aktive eder. Böylelikle ROS üretimini artırarak bir kısır döngü oluşturular (54, 55).

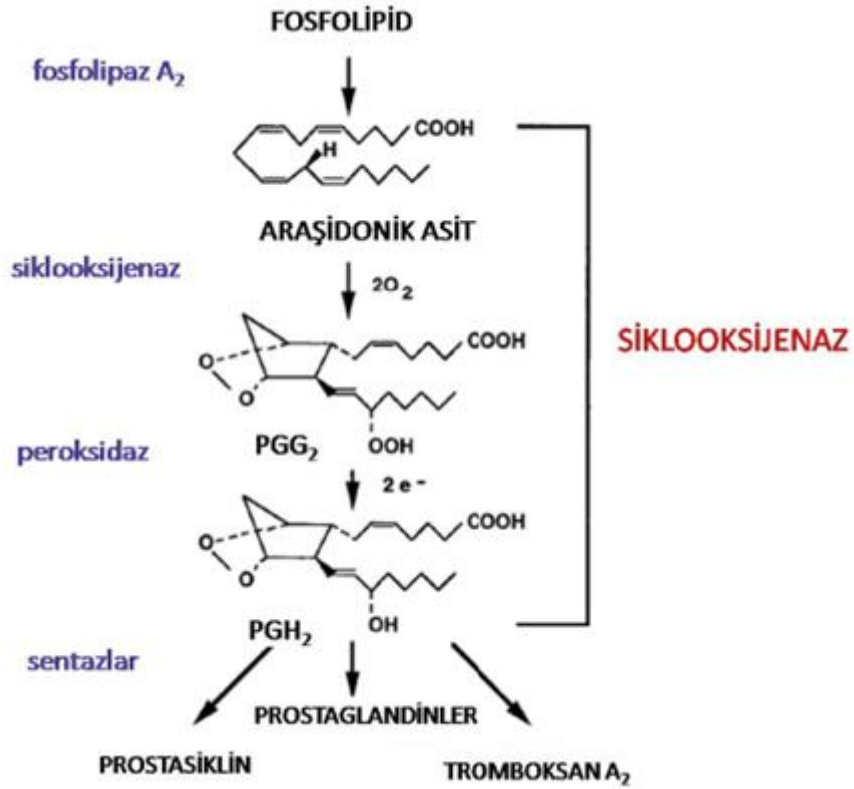
Yapılan çalışmalarda diyabetik olgularda iNOS düzeyinin arttığı saptanmıştır (56). iNOS salgılanmasındaki artış ile iskelet kas hücrelerinde insüline bağlı glukoz girişinde azalma olduğu görülmüştür (57). Obez diyabetik farelerde iNOS'un açlık hiperglisemisi ve karaciğer insülin direnci artışında rol aldığı saptanmıştır (5).

1.4. Siklooksijenaz-2 (COX-2)

Siklooksijenaz (COX) enzimleri hücre içerisinde araşidonik asitten eikosanoidlerin oluşumunda görevli enzimlerdir. COX-1 ve COX-2 olarak bilinen iki tip izoformu mevcuttur. Son zamanlarda COX-3 diye isimlendirilen bir üçüncü formu daha bulunmuşsa da henüz fonksiyonu üzerinde çalışmalar devam etmektedir (58). Bu enzimlerden COX-1 enzimi, normal koşullarda birçok dokuda

sentezlenmekte ve fizyolojik fonksiyonların sağlanmasında rol oynamaktadır (59). Mukozal hasarlanma, sinir stimülasyonu, inflamatuvar mediatörlerin salgılanması ve düz kas gerilmesinin COX-1 aktivitesini arttırarak prostanooidlerin sentezini arttırdığı bilinmektedir (60). Buna karşın COX-2 enziminin aktivitesi ise inflamasyon, çeşitli büyüme faktörleri ve tümör hücrelerinden salgılanan sitokinler ile uyarılmaktadır (8). Sentezi esas olarak İnterlökin I (IL-1) tarafından düzenlenmektedir (61). COX-2; inflamasyon, ateroskleroz, doku hasarı, anjiogenez ve tümör oluşumu dahil birçok patofizyolojik süreçte kritik rol oynayan indüklenabilir bir enzimdir (62). COX-2 araşidonik asitten prostaglandin H₂ (PGH₂) oluşumunu katalize eder. PGH₂'den spesifik enzimlerce biyolojik olarak aktif olan prostaglandinler ve tromboksan A₂ (TXA₂) sentez edilmektedir (63, 64). Araşidonik asit metabolizması Şekil 2'de gösterilmiştir (65). Temel olarak böbrekte sentez edilen COX-2, böbreğin fizyolojik ve hemodinamik düzenlenmesinde, renin salınımının uyarılmasında rol oynamaktadır (66, 67).

Deneyssel olarak oluşturulan diyabet modelinde renal COX-2 seviyelerinin arttığı görülmüştür. Yapılan çalışmalar ile diyabette renal COX-2 uyarılmasında oksidatif stresin önemli rol oynadığı görülmüştür (68). COX-2 inhibisyonu ile glomeruloskleroz gelişiminde azalma olduğu saptanmıştır (67). Ayrıca hipertansif diyabetik rat modelinde COX-2 inhibisyonu ile inflamatuvar PG'lerin sentezini ve aktivasyonunu engelleyerek renal hasar oluşumunda azalma olduğu saptanmıştır (69).



Şekil 2. Araşidonik asit metabolizması

1.5. İnterlökin-6 (IL-6)

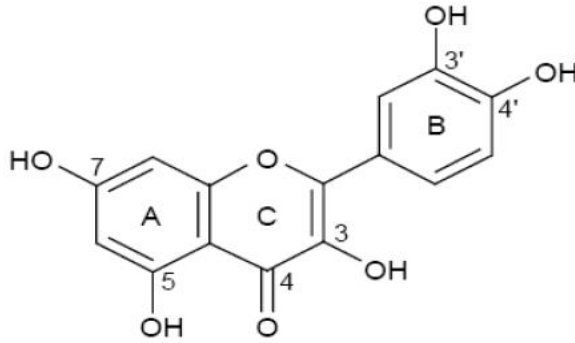
İnterlökin-6 çoğu hücre tipinde immün ve nonimmün sistem üzerine önemli etkileri olan pleiotropik bir sitokindir (70). IL-6 immünoregülatör etkisinin yanı sıra iskelet kas hücresi, adiposit, hepatosit, pankreatik ve nöroendokrin hücreleri etkileyerek glukoz metabolizmasını etkileyebilmektedir (71).

İnterlökin-6 insülin sinyal yolları ile yarışma göstererek tip 2 diyabetli hastalarda insülin direncine neden olabilmektedir (12, 72). Yapılan çoğu çalışmada IL-6'nın glukoz ile uyarılmış insülin sekresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (73-76). IL-6 etkisini; JAK/STAT (Janus kinase /signal transducers and activator of transcription) adı verilen reseptörü aracılığı ile göstermektedir (77). IL-6, hepatositlerde JAK/STAT yolu üzerinden STAT3 fosforilasyonu ile

SOCS3 (suppressors of cytokine signaling) transkripsiyonuna yol açarak insülin reseptör otofosforilasyonu ile insülin reseptör substrat tirozin fosforilasyonunu inhibe eder böylece glikoneogenezi azaltır, glukojenolizi artırır (71).

1.6. Quercetin

Quercetin daha çok sebze, meyve, fındık ve kırmızı şarapta bulunan polifenolik bir flavonoid türevidir (62). Besinlerin içerdiği quercetin miktarı Tablo 6' da gösterilmiştir. Yapısında 3,3',4' ve 5,7 pozisyonlarında –OH grubu bağlıdır. Yapısal formülü Şekil 3' te gösterilmiştir (78).



Şekil 3. Quercetin'in yapısal formülü

Quercetin, ROS ve RNT'i ortamdan uzaklaştırarak güçlü bir antioksidan etki göstermektedir. Lipopolisakkaritle uyarılmış sitokin üretimini inhibe eder. Nuclear faktör-kappa B (NF-kB) bağlı gen transkripsiyonunu inhibe edip COX-2 indüksiyonunu inhibe etmektedir. Böylece güçlü bir antiinflamatuvar kapasiteye sahiptir (79, 80). Quercetin, tirozin fosforilasyonu ile bağlantılı insülinomimetik bir ajan olarak kabul edilmektedir (81).

Tablo 6. Besinlerin içerdği quercetin miktarları

Besin	Quercetin İçeriği
Kapari	233 mg/100 g
Soğan	22.0 mg/100 g
Kakao tozu	20.0 mg/100 g
Kızılılık	14.0 mg/100 g
Mavi yemiş	7.4 mg/100 g
Elma	4.57 mg/100 g
Yeşil çay	2.69 mg/100g
Siyah çay	1.99 mg/100g
Ketçap	0.86 mg/100 g

Diyabet oluşumu sonrası verilen quercetin tedavisi ile kan glukoz düzeylerinde azalma, insulin düzeylerinde artış olduğu görülmüşür (82). Quercetin tüketimi ile pankreatik beta hücrelerinin oksidatif stresten korunduğu ve diyabet komplikasyonlarında azalma olduğu gösterilmiştir (83). Postprandial hiperglisemi DM ile ilişkili kardiyovasküler risk faktörü açısından bağımsız bir risk faktörüdür (84). Deneysel diyabet modeli ile yapılan bir çalışmada quercetin ile tedavi sonrası açlık ve postprandial hiperglisemi düzeylerinde azalma olduğu saptanmıştır (85).

Bu çalışmada streptozosin ile diyabet oluşturulan sıçanlarda bir flavonoid bileşiği olan quercetin'in antioksidan ve antiinflamatuvar etkilerinin mekanizmasının araştırılması ile COX-2 ve iNOS'un değişimlerinin diyabet ile ilişkisinin biyokimyasal ve histopatolojik değerlendirilmesinin yapılması amaçlanmıştır. Bu çalışma ile tedavi ajanı olarak quercetin'in etkinliğinin araştırılması ve diyabetin komplikasyonlarının önlenmesinde tedavi protokollerine sağlayacağı katkının önemli olacağı düşünülmektedir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmanın gerçekleşmesi için, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu (FÜHADEK) onayı alındı. Çalışma, standart deneysel hayvan çalışmaları etik kurallarına uygun olarak, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim dalında ve Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezinde (FÜDAM) yapıldı.

2.1. Deney Hayvanları

Deneylerde kullanılan Wistar albino cinsi ratlar, FÜDAM'dan alındı. Ratlar, % 55±5 nisbi nem bulunan, havalandırma sistemine sahip bir ortamda, özel olarak hazırlanmış ve her gün altları temizlenen kafeslerde beslendi. Ratların beslenmesinde, Elazığ Yem Fabrikası'ndan sağlanan pelet şeklindeki standart rat yemleri kullanıldı. Ratlara verilen yemin bileşiminde bulunan katkı maddeleri Tablo 7'de belirtilmiştir. Ratlara kafeslerde özel bölümlere yerleştirilmiş ve uç kısımlarında damlalık bulunan özel şişeler ile su verildi. Deney hayvanlarının bulundukları ortam sıcaklığı 22-24°C arasında sabit tutuldu ve hayvanlar 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlıkta bırakıldı. Ratların deneysel uygulama yapılacak safhaya kadar bakımlarına bu şekilde devam edildi.

2.2. Deneysel Uygulamalar

Deneysel çalışmada, ağırlıkları 250-350 gr olan, 8-10 haftalık, 40 adet Wistar albino erkek rat kullanıldı. Gruplar; Grup I (kontrol grubu: sitrat tamponu), Grup II (sham grubu: sitrat tamponu + tween çözeltisi), Grup III(diyabet grubu) ve Grup IV (diyabet + quercetin) olarak 4 grup şeklinde oluşturuldu (her grupta n:10).

Tablo 7. Deney hayvanlarının yem içeriği

Buğday (%)	15
Mısır (%)	10
Arpa (%)	27
Kepek (%)	8
Soya (%)	29,4
Balık Unu (%)	8
Tuz (%)	0,6
Kavimix VM 23-Z (%) *	0,2
Methionin (%)	0,2
DCP (%)**	1,6

* 1 gramında: 4800 IU A, 960 IU D₃, 12 mg E, 0,8 mg K₃, 0,8 mg B₁, 2,4 mg B₂, 1,2 mg B₆, 0,006 mg B₁₂ vitaminleri, 16 mg Nicotin amid, 3,2 mg Cal. D. Panth. 0,32 mg Folic acid, 0,02 mg D-Biotin, 50 mg Cholin Chloride, 20 mg Zinc Bacitracin, 32 mg Mn, 16 mg Fe, 24 mg Zn, 2 mg Cu, 0,8 mg I, 0,2 mg Co, 0,06 mg Se, 4 mg Antioksidan ve 200 mg Ca.

** % 18 fosfor, % 25 kalsiyum, % 0,2 flor'dan oluşur.

2.3. Diyabet İndüksiyonu ve Quercetin Uygulaması

Kontrol grubu dışındaki diğer gruplara diyabet oluşturmak için 26 gauge'lık insülin enjektörüyle 40 mg/kg dozda Streptozosin (Zanosar, Pharmacia, France) 0,1 mol/L sitrat tamponunda çözülerek intraperitoneal (i.p) olarak uygulandı. Kontrol grubunun tümüne 0,1 mol/L sitrat tamponu i.p olarak 3 gün uygulandıktan sonra kontrol grubu eşit 2 gruba ayrılarak 2. Kontrol grubuna Diyabet+Quercetin grubunun kontrolünü sağlamak amacıyla % 0,2 tween çözeltisi intraperitoneal olarak günde 2 kez 14 gün boyunca verildi. Diyabet+Quercetin grubundaki ratlara quercetin 50 mg/ kg/ gün dozda % 0,2 tween çözeltisinde çözülerek i.p olarak günde 2 kez 14 gün boyunca uygulandı. Bu sürede ratların vücut ağırlıkları ve kuyruk veninden kan alınarak glukoz düzeyleri takip edildi. 72 saat sonra, glukometre cihazındaki ölçümü sonucu açlık kan glukozu >250 mg/dl'yi geçen ratlar diyabetik olarak kabul edildi. Kan şekeri

ölçümü Glucostix (Myles, Eckhart, IN) ile yapıldı. Ratların açlık kan glukoz düzeylerini saptamak için kan örnekleri, 8-10 saatlik açlık sonrasında sabah 9-10 arasında alındı.

2.4. Kan ve Doku Örneklerinin Toplanması

Tüm ratlar diyabet gelişiminden 14 gün sonra, dekapitasyon ile sakrifiye edilerek çalışma sonlandırıldı. Ratların gövde kan örnekleri alındı ve renal korteks, aort, karaciğer ve pankreas dokuları daha sonraki histopatolojik analizler için eksize edildi. Doku örnekleri, 1:10 (w/v) oranında homojenizasyon solusyonunda (10mM Tris- HCl (pH=7.4), 0.1 mM NaCl, 0.1mM fenil metil sülfonil florid (PMSF), 5µM soybean (bir tripsin inhibitörü olarak)) cam bir homojenizatör yardımıyla soğuk ortamda homojenize edildi. Homojenatlar soğutmalı santrifüjde +4 °C'de 60 dakika süreyle 60.000 x g'de santrifüj edildi. Süpernatantlar eppendorf tüplere alınarak SDS-PAGE ve Western blot analizleri için analizleri yapılmaya kadar -70 °C'de saklandı (86). Alınan kan örnekleri 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve serumlar çalışılacağı güne kadar -20°C'de saklandı.

2.5. Biyokimyasal Değerlendirme

Çalışmada; kullanılan parametrelerin düzeyleri aşağıda belirtilen yöntemlerle tayin edildi.

2.5.1. Kan Glukoz Düzeyleri

Kan glukoz düzeyleri çalışma süresince glukometre (Glucostix (Myles, Eckhart, IN) ile ölçüldü.

2.5.2. Serum İnterlökin-6 Düzeyleri

Serum IL-6 düzeyleri uygun ticari kitler (Uscn Life Science Inc., China, Katalog No: E90079Ra) kullanılarak enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) yöntemi ile kit içeriğine uygun olarak tayin edildi. IL-6 kitinin;

Deteksiyon Limiti: 15.6-1,000 pg/mL,

Sensitivitesi; 6.1 pg/mL,

Presizyonu; İnterassay: CV<10% ; İnterassay: CV<12%' dir.

2.5.3. İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz ve Siklooksijenaz-2

Düzeyleri

Doku örnekleri uygun yöntemler ile homojenize edilerek iNOS, COX-2 düzeyleri Western Blotting yöntemi ile değerlendirildi.

2.5.3.1. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

SDS-PAGE elektroforez jel sisteminde akrilamid monomerlerinden yararlanılır. Amonyum persülfat (APS) gibi bir serbest radikal ile TEMED gibi stabilizatörü sağlayıcı ortamda akrilamid monomerleri uzun zincirler oluşturacak şekilde polimerleşmekte ve daha sonra oluşan bu uzun zincirler arasında yanal bağlantılar oluşarak jel meydana gelmektedir. SDS-PAGE analizinde; jelin yapısında yer alan sodyum dodesil sülfat (SDS), deterjanının bulunması ile proteinler kendilerini oluşturan monomer alt birimlerine ayrılmaktadır. Böylece protein agregasyonu önlenmektedir. SDS moleküllerine bağlanan denatüre polipeptidler negatif yük kazanırlar. SDS bağlantılı polipeptid kompleksleri, molekül ağırlıklarına bağlı olarak jel içerisinde hareket ederler. Hareket eden moleküllerin ağırlıkları; aynı jel üzerinde bulunan bir standartla karşılaştırılarak tespit edilir. Mutasyon geçirme veya çeşitli olumsuz çevre faktörleri sonucunda canlı organizmanın bir kısım proteinlerinden normale göre parça kopması veya parça ilavesi ya da bazı proteinlerin yeterince sentezlenmemesi gibi özellikler bu jel sisteminde tespit edilmeye çalışılır (86).

Protein moleküllerinin hareketi güç kaynağından gelen elektrik akımına göre negatif (-) kutuptan pozitif (+) kutuba doğru olur. İncelenecek protein

molekülleri şayet 0–43 kDa aralığına tekabül ediyorsa akrilamidin konsantrasyonu %15, 40 kDa'dan yukarı ise akrilamidin konsantrasyonu %10 veya daha aşağı düşürülür. Diğer bir ifade ile molekülün ağırlığı arttıkça akrilamidin konsantrasyonu düşürülür. Akrilamid konsantrasyonunun artışı jel içerisindeki ara boşlukların daha sık olmasına sebep olmaktadır. Dolayısıyla protein moleküllerinin hareket hızı da azalmaktadır (87).

SDS-PAGE Jel hazırlanmasında kullanılan çözeltiler aşağıda verilmiş olup, çözeltilerin hazırlanma protokolü Tablo 8'de belirtilmiştir.

Kullanılan çözeltiler

- 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)
- 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)
- % 10 Sodyum dodesilsülfat çözeltisi (SDS)
- %30 Akrilamid/Bisakrilamid çözeltisi
- %10 Amonyum persülfat çözeltisi (APS)
- N, N, N', N', -tetrametil-etilendiamin (TEMED)
- Gliserin
- 2-β-merkapttoethanol
- %0,05 Bromofenol blue çözeltisi
- Boyama çözeltisi (Stain solusyon/100 mL):
 - %0.1 Coomassie blue R-250;
 - %45 Metanol;
 - %10 Glasiyal asetik asit;
 - %45 Distile su
- Boya çıkarma çözeltisi (Destain solusyon/100mL):

%45 Metanol;

%10 Glasiyal asetik asit;

%45 Distile su

- Tank solusyonu (Running buffer, pH 8.3):

Tris base 9.0 g;

Glisin 43.0 g;

Distile su 600 ml

SDS-PAGE Analizleri

Jel oluşturmak için uygun bir pozisyonda tutturulan iki cam arasına yerleştirilmek üzere 10 ml' lik ayırma jel solusyonu hazırlandı. Hazırlanan bu jel solusyonu iyice karıştırıldı ve uygun bir otomatik pipet yardımıyla belirli kısımlardan sıkıştırılarak kaset haline getirilen iki cam levha arasına aktarıldı. İki cam levha arasına jel ilave edilirken st kısımda tarak dişlerinin yüksekliği kadar ($\approx 1\text{cm}$) bir boşluk bırakıldı. Hazırlanan kaset şeklindeki bu iki cam levha arasındaki jel yaklaşık olarak 30 dakika oda sıcaklığında bekletilerek aralarındaki akrilamid monomerlerinin polimerleşmesi sağlandı. Daha sonra iki cam levhanın st kısmına örnek sayısına uygun sayıda dişe sahip tarak yerleştirildi.

Tarak dişlerinin aradolgu maddesi olarak ifade edilen yükleme jeli 10 ml kadar hazırlandı. Hazırlanan bu jel solusyonu iyice karıştırıldı ve uygun bir otomatik pipet yardımıyla, jel kasetine yerleştirilmiş olan tarak dişleri arasındaki boşluklar dolduruldu. Bu dolgu iki camın en st seviyesine kadar tamamlandı. Yükleme jeli çok çabuk polimerize olduğundan işlemlerin kısa sürede yapılmasına dikkat edildi. 25–30 dakika oda sıcaklığında bekletilerek polimerleşme sağlandı. Tarak, polimerleşmesi tamamlanan jelden çıkarıldı.

Tablo 8. SDS-PAGE için jellerin hazırlanma protokolü

Separating (ayırma) jelinin hazırlanması (%12)		Miktar
Distile su		3.35 mL
1,5 M Tris-HCl (pH 8.8)		2.5 mL
% 10 SDS		100 µL
Akrilamid /Bis (%30)		4.0 mL
Amonyum persülfat (%10)		50 µL
TEMED		5 µL
Toplam		10.0 mL
Stacking jelin hazırlanması (%4)		Miktar
Distile su		6.1 mL
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)		2.5 mL
SDS (%10)		100 µL
Akrilamid-Bis (%30)		1.3 mL
Amonyum persüfat (%10)		50 µL
TEMED		10 µL
Toplam		10.0 mL
Örnek solusyonların hazırlanması	Miktar	Son konsantrasyon
1 M Tris-HCl (pH6.8)	1.25 mL	0.125 M
% 10 SDS	1.6 mL	%4
%0.05 bromofenol blue	0.2 mL	%0.002
Gliserol	0.8 mL	% 20
2-β-merkaptoethanol	0.4 mL	%10
Distile su	3.75 mL	-
Toplam	8.0 mL	-

Bu işlem sırasında jel de meydana gelen ve örneklerin bırakılacağı yuvaların bozulmamasına dikkat edildi. Cam levhalardan oluşan kaset elektroforez tankına yerleştirildi. Protein çözücü solusyonu; 0,125 M Tris (pH

6.8), %2'lik SDS, %0.002 oranında Bromofenol mavisi, %20'lik gliserol, %10'luk merkapttoethanol şeklinde hazırlandı. Yaklaşık olarak 150 µl olarak alınan her bir protein örneğine eşit oranda çözücü solusyondan ilave edildi ve iyice karıştırıldı. Tarak dişinin genişliğine bağlı olarak, hazırladığımız karışımdan 10–20 µl kadar transfer edildi. Tank içerisine yeterli miktarda tank solusyonu ilave edildi.

Güç kaynağından önce düşük bir voltajla (150 V) akım elektroforeze verildi. 5–10 dakika sonra voltaj değeri yükseltildi (180–200 V). Çıplak gözle izlenilebilen mavi boya bandı jelin alt kısmına gelince elektroforez cihazı kapatıldı.

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra kaseti oluşturan iki cam birbirinden ayrılarak aradaki jel çıkarıldı. Protein bantlarının görünür hale gelebilmesi için bu jel % 1.25'lik Coomassie blue boya ortamına alındı. Burada en az yarım saat en çok bir gece boyunca oda sıcaklığında bekletildi.

Boya solusyonundan alınan jel boyayı giderici solusyon (destaining solution) ortamına alındı. Arasına çalkalanarak protein bantlarının dışındaki boya maddesi uzaklaştırıldı. Boya giderici solusyonda 5'er dakika bekletildi ve solusyon döküldü. Jel tekrar boya giderici ortama alındı ve bu işlem 2–3 kez tekrarlandı. Böylece jel üzerinde bulunan protein bantlarının dışındaki boya giderilmiş olundu.

2.5.3.2. Western Blot Analizleri

Western blot prosedürü; elektroforez işlemiyle poliakrilamid jelde göç ettirilen proteinlerin, nitroselüloz membrana transferi ve membrandaki proteinlerin immünolojik metotlarla gösterilmesidir. Bu amaçla hedef dokularımız

olan karaciğer, böbrek ve aort dokularının her biri için ayrı ayrı olmak üzere Western Blotlama yapıldı. Her doku gruplar arası miktarlar eşit olacak şekilde örneklenerek; buz içerisinde, doku miktarının altı katı homojenizasyon tamponu kullanılarak, cam ve metal homojenizatörler ile homojenize edildi (88).

Blotlama yapılmadan önce çalışılan örneklerdeki proteinler elektriksel ortamda poliakrilamid jel üzerinde göç ettirilmektedir. Proteinlerin elektroforezleri SDS-PAGE’de gerçekleştirilmektedir. Western blot tekniği, elektroforez işlemini takip eden 4 aşamada gerçekleştirilir. Bunlar; jeldeki proteinlerin nitroselüloz membrana aktarımı (blotlama), spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için nitroselüloz membranda protein bağlanmamış bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplanması (bloklama), özgül antikorlarla tepkime ve en son aşamada ise proteinlerin görüntülenme aşamalarıdır. Nitroselüloz membrana transfer sırasında jel ile nitroselüloz membran karşı karşıya getirilmekte ve bunlar filtre kağıtları arasına yerleştirilmektedir. Jelin büyüklüğü ile orantılı olarak belirli bir süre elektrik akımı uygulanıp proteinlerin transferi sağlanmaktadır. Nitroselüloz membranın özgül olmayan proteinlerle bloklanmasında albumin tercih edilmektedir. Spesifik antikorlar olarak monoklonal ya da poliklonal antikorlar kullanılabilir. Monoklonal antikorların kullanımı, yalnızca tek bir epitopa özgül olmaları ve çok güçlü immünokimyasal köprüler oluşturmalarından dolayı avantaj sağlamaktadır. Bu nedenle, monoklonal antikorlar antijene spesifik bir bağlanma gösterir. Ancak, çalışılan proteinler arasında benzer epitop bölgeleri bulunmakta ise çapraz reaksiyonlar sonucunda yalancı pozitiflikler ortaya çıkabilmektedir. Poliklonal antikorların kullanılması durumunda aynı nedenden dolayı şekillenen yalancı pozitiflik ihtimalinin daha fazla olduğu bilinmektedir. Ancak çalışılan antikor; molekül ağırlığı bilinen bir

antikor olup uygun bir markerla ağırlık sırası belirlendiğinde poliklonal antikor kullanımı daha avantajlı bir seçim olmaktadır. Western blotta monoklonal antikorların kullanımının en önemli dezavantajı, SDS-PAGE ve blotlama esnasında polipeptid yapılarıdaki epitopların ortadan kaldırılmasıdır. Belirlenmeye çalışılan epitopun ortadan kaldırılması durumunda ise monoklonal antikor-epitop bağlanması şekillenemez. Bu nedenden dolayı monoklonal antikor kullanıldığında, poliklonal antikorla çalışılmasına kıyasla, yalancı negatiflik ihtimali artmaktadır. Özgül antikorlarda raportör madde olarak genellikle radyoaktif izotoplar veya enzimler kullanılmaktadır. Enzim olarak alkalen fosfataz ve peroksidaz enzimleri tercih edilmektedir. Bu enzimlerin substratları ve kromojen maddeleri birbirinden farklıdır. Son yıllarda enzimle işaretlemeye, testin duyarlılığını arttırmak amacıyla peroksidazla işaretli avidin biyotin sisteminin kullanımı yaygınlaşmıştır. Kullanılan kromojenlerin en önemli özelliği çözünmeyen renkli ürünler oluşturmalarıdır. Jeldeki proteinlerin nitroselüloz membrana (Schleicher and Schuell, Inc., USA), aktarımı (blotlama): SDS-PAGE tamamlandıktan sonra poliakrilamid jel blotlanmak üzere alındı. Nitroselüloz membrana transferin gerçekleştirilmesi için poliakrilamid jel ile nitroselüloz membran yüzeyleri arasında boşluk kalmayacak biçimde karşı karşıya getirildi ve bunlar filtre kâğıtlarıyla sarılmış bir şekilde blotlama düzeneğine yerleştirilerek tampon solusyonuyla doyuruldu. Soğutulmuş tampon solusyonuyla doldurulmuş tanka yerleştirilen düzenek için 90 dakika boyunca 250 mA elektrik akımı uygulandı. Bu şekilde proteinlerin nitroselüloz membran yüzeyine transferi sağlanmış oldu.

Spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için nitroselüloz membranda protein bağlanmamış bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplanması (bloklama) işlemi

bittikten sonra petri kutularına alınan nitroselüloz membranlar tampon solusyonla [$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.025 M), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (0.075 M), NaCl (1.45 M)], çalkalayıcı üzerinde 3 kez 5 dakika olacak şekilde yıkandı. Spesifik olmayan bağlanmalar, 100 mM NaCl , 20 mM Na_2HPO_4 , 20 mM NaH_2PO_4 (pH: 7.2) tamponunda % 1'lik taze sığır serum albumini (BSA) ile 37 °C'de 60 dakikalık inkübasyonla bloklandı.

Özgül antikorlarla tepkime: Primer antikör olarak poliklonal Anti-Cox 2 (siklooksijenaz 2) ve Anti-iNOS (NOS2) antikorları kullanıldı. Primer antikorlar % 0.05 oranında Tween-20 bulanan tamponda 1:1000 oranında hazırlanarak kullanıldı. Nitroselüloz membranlar Anti-Cox 2 (siklooksijenaz 2) ve Anti-INOS (NOS2) antikorları ile +4 °C'de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Daha sonraki safhada nitroselüloz membranlar 5 kez 5 dakika tampon solüsyonuyla yıkandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra nitroselüloz membranlar % 0.05 oranında Tween-20 bulanan tamponda 1:1000 oranında hazırlanan, peroksidazla konjuge edilmiş goat-anti-rabbit immünoglobulinle 37 °C'de 90 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. Sonraki aşamada nitroselüloz membranlar 5 kez 5 dakika tampon solusyonuyla yıkandı.

Bantların görüntülenmesi: Bantların görüntülenmesi için 1 M Tris (pH: 7.4) tamponunda % 0.03–0.05 oranında hazırlanmış diaminobenzidin (DAB) solusyonu kullanıldı. DAB'la reaksiyon sonucu nitroselüloz membranlar üzerindeki bantlar kısa bir süre sonra görünür hale geldi. 5–10 dakikalık bir reaksiyon süresi sonunda DAB'la renklendirilen bantlar net olarak görüldükten sonra nitroselüloz membranlar iyice yıkandı. Nitroselüloz membranlar iyice kurutulduktan sonra, bantların relatif yoğunlukları analiz edilmek üzere alındı. Bantların relatif yoğunlukları Image Analyses System (Image J; National Institute

of Health, Bethesda, USA) yazılım programı kullanılarak analiz edildi. Çalışmanın sonuçlarının değerlendirilmesinde β -aktin standart olarak kullanıldı.

2.6. Histopatolojik Değerlendirme

Alınan doku örnekleri formol tesbitinden sonra parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan 4 μ m kalınlığında elde edilen kesitler Hematoksilen-Eosin ile boyanarak Olympus BX-51 marka ışık mikroskopunda patoloji uzmanınca incelenerek pankreas, böbrek, karaciğer ve aort dokularındaki histopatolojik değişiklikler değerlendirildi.

2.7. İstatistiksel Analiz

Çalışmanın sonuçlarının değerlendirilmesi amacı ile SPSS 15.0 İstatistik programı uygulandı. Elde edilen veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak belirlendi. Elde edilen verilerin istatistiksel anlamlılık düzeyleri Mann-Whitney U testi ve ANOVA testi ile belirlendi. $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Kan Glukoz Düzeyleri

Grupların kan glukoz düzeyleri karşılaştırıldığında Grup III ve Grup IV'ün kan glukoz değerleri, uygulamalar sonucunda başlangıca göre daha yüksek olarak bulunmuştur. ($p<0.001$). Grup I ve Grup II ile karşılaştırıldığında, Grup III ve Grup IV' teki kan glukoz düzeylerindeki değişimlerin istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gösterdiği bulunmuştur. ($p<0.001$) (Tablo 9).

Tablo 9. Gruplarda başlangıç ve uygulama sonu kan glukoz değerlerinin değişimi

	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV
	(n:10)	(n:10)	(n:10)	(n:10)
Başlangıç	83,90±6,30	81,20±8,50	82,30±8,20	82,90±5,80
Kan glukozu (mg/dL)				
Deney sonu	85,60±7,20	84,20±9,20	313,10±24,70 ^{a,b,c}	295,40±35,60 ^{a,b,c}
Kan glukozu (mg/dL)				

^aGrup I ile karşılaştırıldığında: $p<0.001$

^bGrup II ile karşılaştırıldığında: $p<0.001$

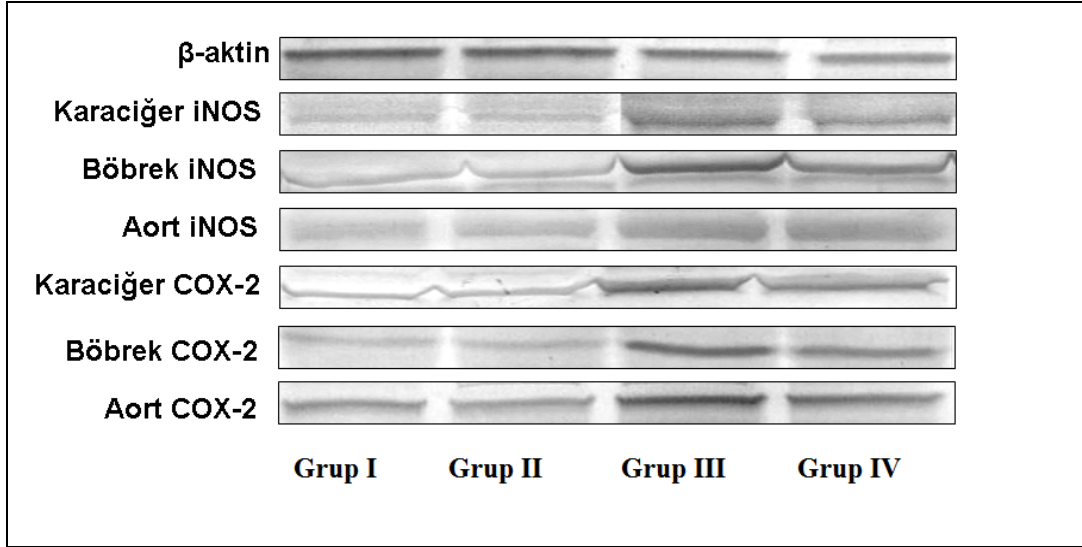
^c Aynı grupta ölçümler arası karşılaştırıldığında: $p<0.001$

3.2. Biyokimyasal Değerlendirme

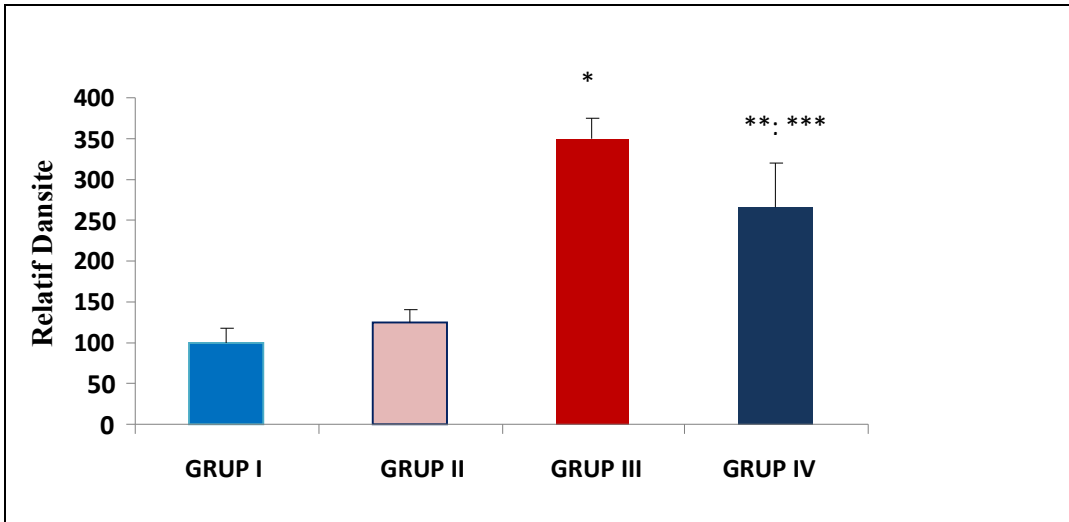
3.2.1. Doku iNOS ve COX-2 Düzeyleri

Farklı doku örneklerindeki COX-2 düzeylerinin gruplara bağlı olarak değişimi incelendiğinde; karaciğer ve böbrek doku örneklerinin COX-2 düzeylerinin Grup I ve Grup II 'de anlamlı bir farklılık göstermediği (Şekil 4-6) ancak aort COX-2 düzeylerinin Grup II'de Grup I'e göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdiği bulunmuştur ($p<0.05$) (Şekil 4,7). Grup I ile Grup II; karaciğer, böbrek, aort iNOS düzeyleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$), (Şekil 4, 8-10). Grup III, Grup IV; karaciğer, böbrek, aort COX-2 ve iNOS düzeyleri Grup I ile karşılaştırıldığında anlamlı

olarak yüksek saptanmıştır (her ikisi için $p<0.05$), (Şekil 4, 5-10) Grup IV karaciğer, böbrek, aort COX-2 düzeyleri ve Grup IV karaciğer, böbrek iNOS düzeyleri Grup III ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmüştür ($p<0.05$), (Şekil 4, 5-10). Grup III ve Grup IV aort iNOS düzeyleri arasında ise anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Şekil 4, 10).

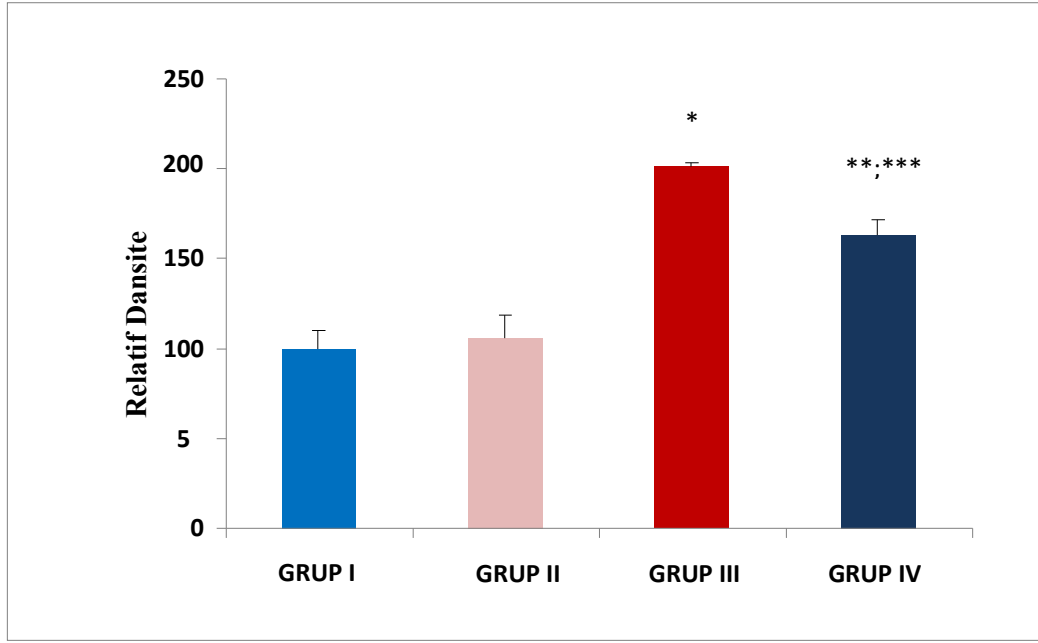


Şekil 4. Western Blot yöntemi ile doku iNOS ve COX-2 ekspresyonu



Şekil 5. Karaciğer doku COX-2 aktivitesinin relatif dansite olarak değişimi

* $p<0.05$; Grup I ile karşılaştırıldığında
 ** $p<0.05$; Grup I ile karşılaştırıldığında
 *** $p<0.05$; Grup III ile karşılaştırıldığında

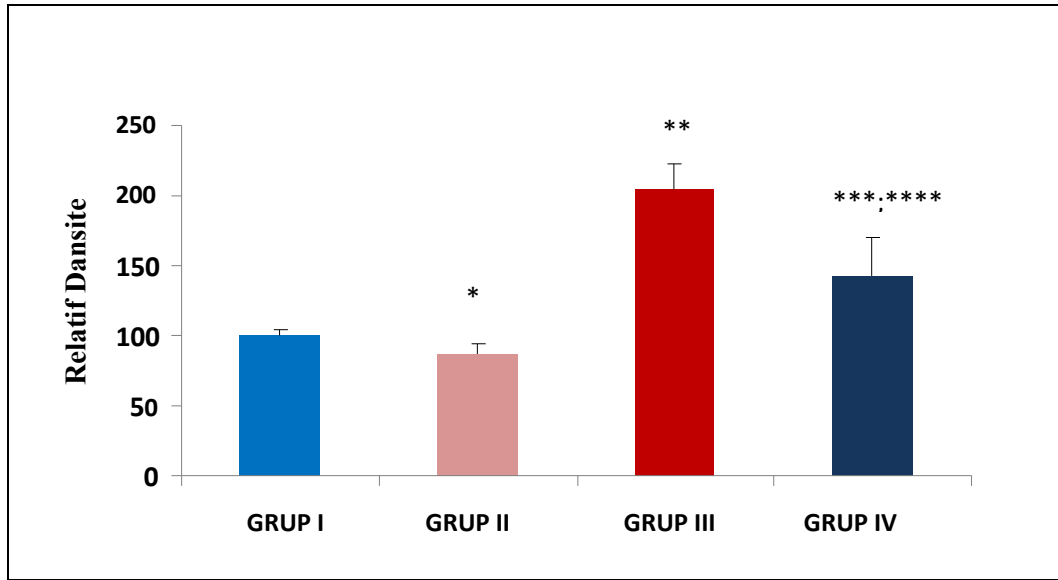


Şekil 6. Böbrek doku COX-2 aktivitesinin relatif dansite olarak değişimi

* $p < 0.05$; Grup I ile karşılaştırıldığında

** $p < 0.05$; Grup I ile karşılaştırıldığında

*** $p < 0.05$; Grup III ile karşılaştırıldığında



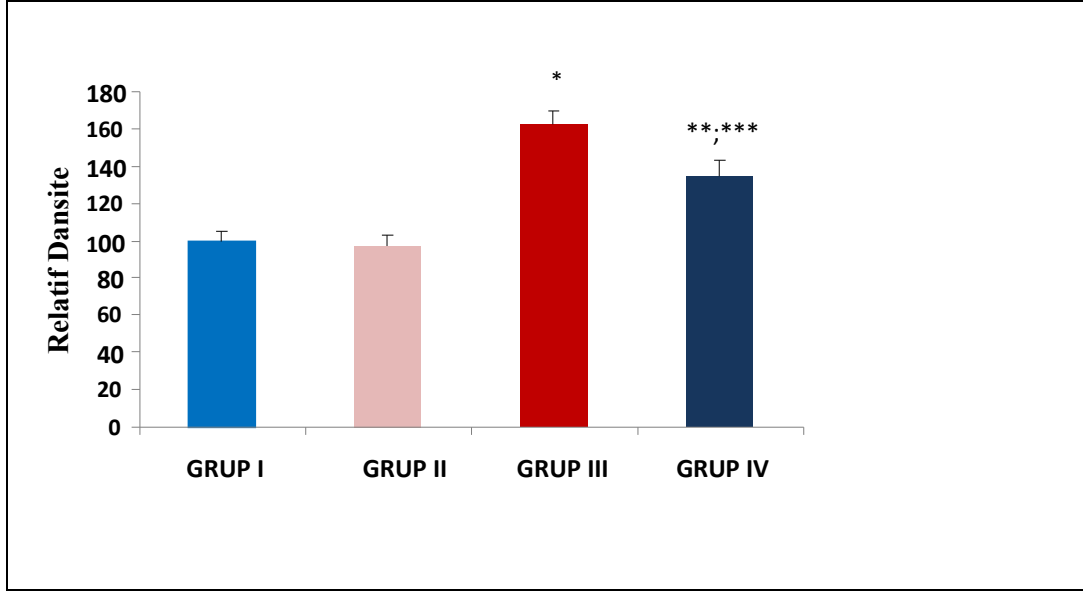
Şekil 7. Aort doku COX-2 aktivitesinin relatif dansite olarak değişimi

* $p < 0.05$; Grup I ile karşılaştırıldığında

** $p < 0.05$; Grup I ile karşılaştırıldığında

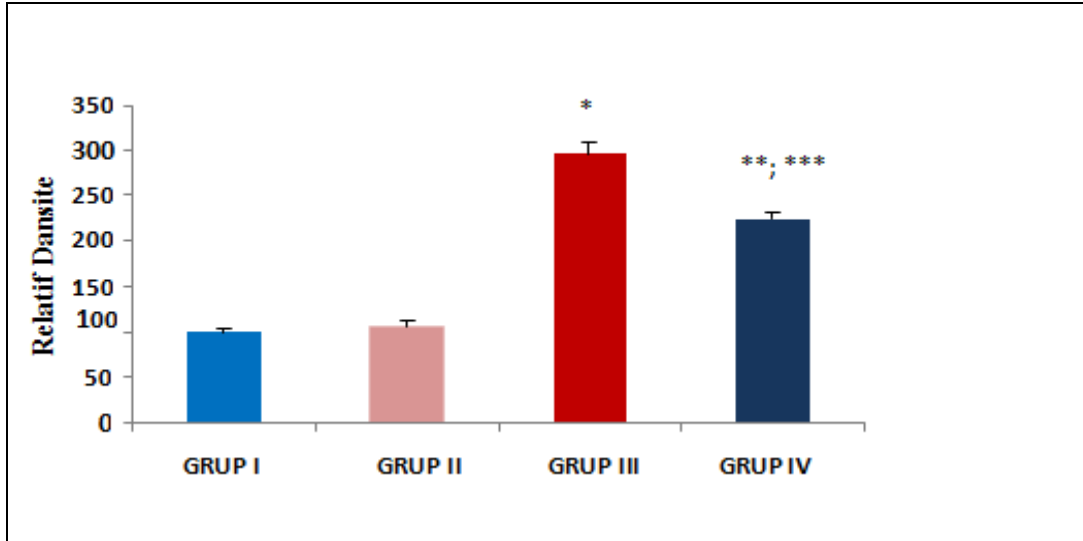
*** $p < 0.05$; Grup I ile karşılaştırıldığında

**** $p < 0.05$; Grup III ile karşılaştırıldığında



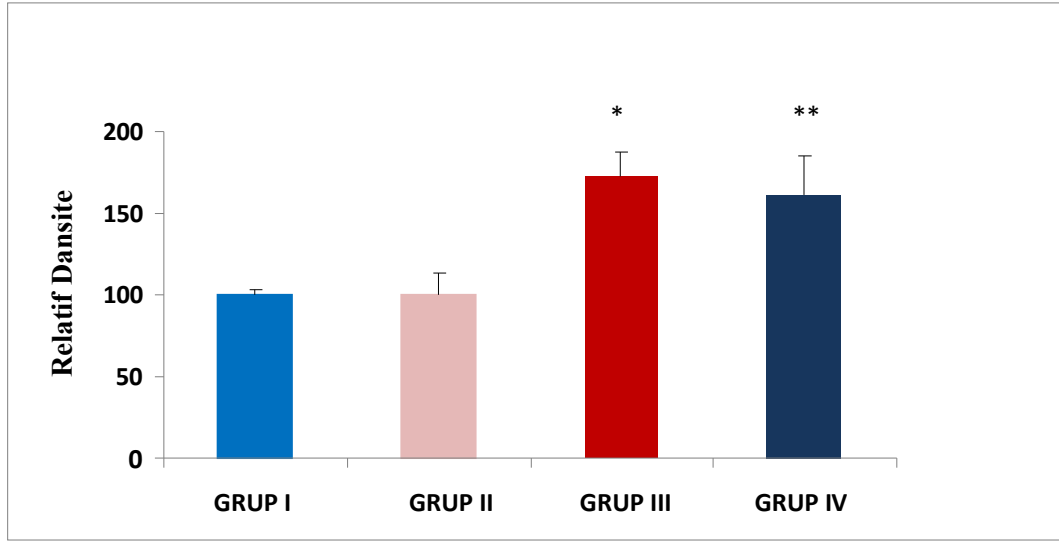
Şekil 8. Karaciğer doku iNOS aktivitesinin relatif dansite olarak değişimi

- * p< 0,05 Grup I ile karşılaştırıldığında
- ** p< 0,05 Grup I ile karşılaştırıldığında
- ***p<0.05 Grup III ile karşılaştırıldığında



Şekil 9. Böbrek doku iNOS aktivitesinin relatif dansite olarak değişimi

- * p< 0,05 Grup I ile karşılaştırıldığında
- ** p< 0,05 Grup I ile karşılaştırıldığında
- ***p<0.05 Grup III ile karşılaştırıldığında



Şekil 10. Aort doku iNOS aktivitesinin relatif dansite olarak değişimi

* $p < 0,05$ Grup I ile karşılaştırıldığında

** $p < 0,05$ Grup I ile karşılaştırıldığında

3.2.2. Serum IL-6 Düzeyleri

Grup III serum IL-6 düzeyleri; Grup I ve Grup II ile karşılaştırıldığında istatistiksel yönden anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (sırasıyla $p < 0.05$, $p < 0.01$). Grup IV serum IL-6 düzeyleri; Grup III ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış olarak bulunmuştur ($p < 0.05$) (Tablo 10). Ayrıca serum IL-6 düzeylerindeki değişimlerden doku COX-2 ve iNOS aktiviteleri etkilenmiştir.

Tablo 10. Serum İnterlökin-6 Düzeyleri ile Doku iNOS ve COX-2 Düzeylerinin Gruplardaki Değişimi

	Grup I (n:10)	Grup II (n:10)	Grup III (n:10)	Grup IV (n:10)
Karaciğer COX-2	14.52± 2.72	18.09±2.47	50.99±3.63 ^{a,b}	38.61±8.05 ^{a,b,d}
Karaciğer iNOS	36.81±1.90	35.80±2.19	59.83±2.66 ^{a,b}	49.62±3.25 ^{a,b,d}
Böbrek COX-2	40.08±3.98	42.41±4.97	80.49±1.03 ^{a,b}	65.33±3.55 ^{a,b,d}
Böbrek iNOS	25.48±0.80	26.86±1.77	75.32±3.08 ^{a,b}	57.29±1.77 ^{a,b,d}
Aort COX-2	41.23±1.98	36.13±2.67 ^a	84.17±7.63 ^{a,b}	58.93±11.02 ^{a,b,d}
Aort iNOS	25.80±0.87	25.78±3.55	44.45±4.03 ^{a,b}	41.65±6.26 ^{a,b}
IL-6 (pg/mL)	8.31±7.25	5.87±3.39	27.60±14.00 ^{a,c}	9.10±4.19 ^d

IL-6 düzeyleri gruplar arasında karşılaştırıldığında;

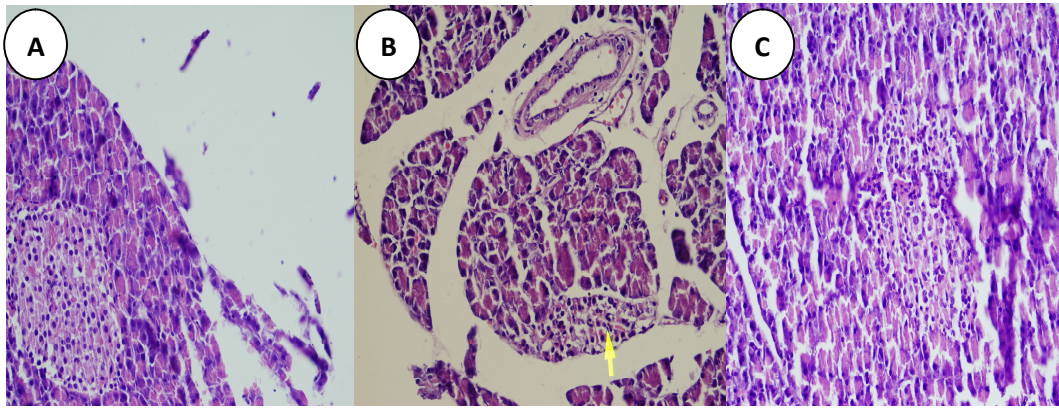
Grup I ile karşılaştırıldığında: ^ap<0.05

Grup II ile karşılaştırıldığında: ^bp<0.05, ^cp<0.01

Grup III ile karşılaştırıldığında: ^dp<0.05

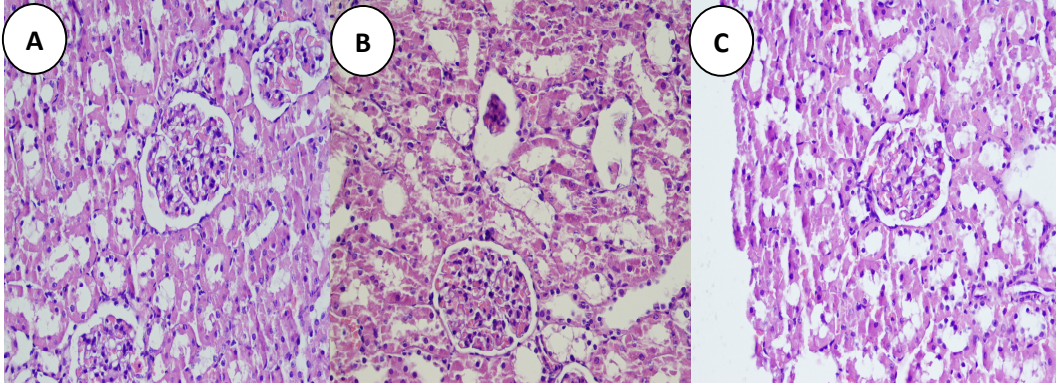
3.3. Histopatolojik Değerlendirme

Grup III ratlarda pankreas adacıklarında küçülme, eosinofilik stoplazmalı hücrelerde piknoz, hiperkromazi ve polimorf nüveli lökosit (PNL) infiltrasyonu görülürken; Grup IV ratların pankreas adacıklarında hidropik dejenerasyon görülmüştür (Şekil 11).



Şekil 11. Ratların pankreas dokularında görülen histopatolojik değişimler (H&E X200). (A: KONTROL, B: GRUP III; C: GRUP IV)

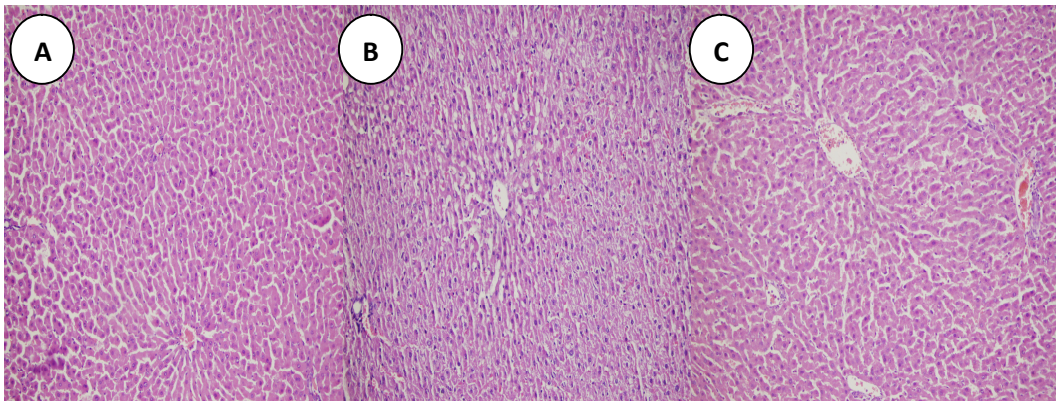
Grup III ratlarda glomerullerde mezangial hücrelerde artış, Polimorf nüveli lökositler (PNL) ve bazal membran kalınlaşması ve tubul epitelinde nekroz saptanırken, Grup IV ratların glomerüllerinde PNL infiltrasyonu, bazal membran kalınlaşması ve tubul epitelinde nekrozda ılımlı bir azalma görülmüştür (Şekil 12).



Şekil 12. Ratların böbrek dokularında görülen histopatolojik değişimler (H&E X200).

(A: KONTROL, B: GRUP III; C: GRUP IV)

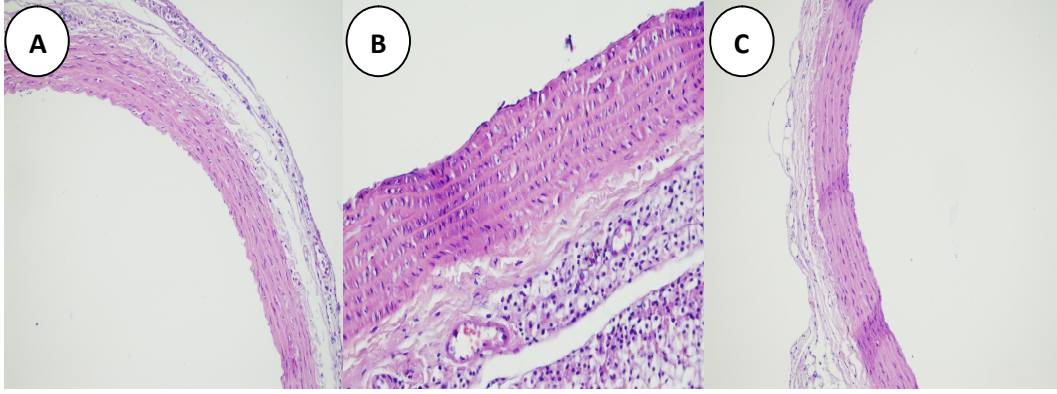
Grup III ratlarda karaciğerde hepatositlerde hidropik dejenerasyon ve portal alanlarda seyrek iltihabi filtrasyon görülürken, Grup IV ratlarda bu bulgular izlenmedi (Şekil 13).



Şekil 13. Ratların karaciğer dokularında görülen histopatolojik değişimler (H&E X200).

(A: KONTROL, B: GRUP III; C: GRUP IV)

Damar endotelinin histopatolojik incelenmesi sonucu Grup III ratlarda aort endotelinde görülen düzensizlik tedavi grubunda azalmış olarak izlendi (Şekil 14).



Şekil 14. Ratların aort dokularında görülen histopatolojik değişimler.(H&E X200).

(A: KONTROL, B: GRUP III; C: GRUP IV)

Grup II (Sham Grubu) ratların pankreas, böbrek, karaciğer ve aort dokularındaki yapısal değişiklikler Grup I ile benzerlik gösterdiğinden, Grup II ratların mikroskopik değerlendirilmesi şekillerde gösterilmedi.

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada STZ ile oluşturulmuş olan deneysel diyabet modelinde, karaciğer, böbrek ve aort dokularının iNOS ve COX-2 düzeyleri, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, serum IL-6 düzeyleri incelenmiştir. Quercetin'in antioksidan ve antiinflamatuvar etkilerinin mekanizmasının araştırılması ile COX-2 ve iNOS aktivitelerindeki değişimlerin diyabet ile ilişkisinin biyokimyasal ve histopatolojik değerlendirilmesinin yapılması amaçlanmıştır. Tedavi grubunda karaciğer, böbrek, aort iNOS ve COX-2 düzeyleri, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, serum IL-6 düzeylerinde azalma belirlendi. Bu bulgular, quercetin'in antiinflamatuvar ve antioksidan etkisi ile oksidatif stresi azaltarak ve inflamatuvar yolları etkileyerek diyabet gelişimini ve komplikasyonlarını azaltıcı etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Diyabetes mellitus; insülin sekresyonu ve/veya insülinin etkisindeki bozukluklardan kaynaklanan, hiperglisemi ile karakterize karbonhidrat, lipid ve protein metabolizması bozuklukları ve hızlanmış aterosklerozla birlikte, mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlarla seyreden kronik metabolik bir hastalıktır (17). Uluslararası Diyabet Federasyonu verilerine göre 2000 yılında 150 milyon olarak hesaplanan diyabetik hasta sayısının 2010 yılında 220 milyona, 2025 yılında ise 300 milyona yükseleceği öngörülmektedir (89, 90).

Son yıllarda oksidatif stresin; DM, obezite, kanser, yaşlanma, inflamasyon, nörodejeneratif hastalıklar, hipertansiyon, apoptozis, kardiyovasküler hastalıklar ve kalp yetmezliği gibi hastalıkların patogenezinde rolü olduğu ile ilgili çalışmalar yapılmıştır (91). Deneysel olarak diyabet oluşturulan ratlarda ve diyabetik hastalarda serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonunun önemli

derecede arttığı ve oksidatif stresin diyabet etiyolojisinde ve ilerlemesinde rolü olduğu bildirilmiştir (33)

COX-2 ve iNOS diyabet komplikasyonların gelişiminde inflamasyon ve oksidatif strese yol açan anahtar enzimler olarak bilinmektedir. COX-2 indüklenebilir bir enzimdir. Uyarıldığı anda dramatik bir şekilde inflamasyon artışına yol açmaktadır. COX-2 ve oluşan PG-E2, diyabet patogeneze ve komplikasyon gelişimine neden olmaktadır. COX-2 aracılı endotelial disfonksiyon ve düz kas hipersensitivitesi diyabetik vasküler komplikasyon gelişiminden kısmen sorumludur. Yine benzer şekilde iNOS indüklenebilir bir enzim olup aşırı miktarda NO üretimine neden olmaktadır. NO, bir serbest radikaldir ve diyabet ile ilişkili vasküler komplikasyon gelişimine neden olmaktadır (92). Quilley ve ark.(68) deneysel diyabet modelinde renal COX-2 seviyelerinde artış olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda da diyabetik rat gruplarında COX-2 seviyelerinde artış saptandı.

Yüksek glukoz miktarları, COX-2 ekspresyonunda artışa yol açarak oksidatif stresi indükler ve böylece vasküler komplikasyonlara neden olabilmektedir (93, 94). Yapılan bir çalışmada, diyabetik rat böbreklerinde COX-2' nin renal vazokonstrüktör etkide artış sağladığı görülmüştür (95). Deneysel diyabet modelinde, COX-2 inhibitörü ile yapılan bir çalışmada proteinüri ve glomerüler hasarda azalma olduğu saptanmıştır (96). Deneysel diyabet modelinde COX-2 inhibisyonunun, intramyokardiyal oksidatif stresi azaltarak sol ventrikül disfonksiyonuna karşı koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir (97). Yine yapılan başka bir çalışmada COX-2 inhibisyonunun, diyabetik nöropati gelişimine karşı koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (98). Çalışmamızda quercetin verilen ratlarda karaciğer, böbrek ve aort dokularında COX-2 seviyelerinin azaldığı

saptanmıştır. COX-2 seviyelerinin quercetin tedavisi ile azalması diyabetik komplikasyonlarının önlenmesi açısından önemli bir tedavi ajanı olabileceğini düşündürmektedir.

Di Naso ve ark.(99) yaptıkları deneysel diyabet modelinde iNOS düzeylerinde artış olduğunu göstermişlerdir. Fujimoto ve ark.(5) deneysel diyabet modelinde iNOS inhibisyonu ile açlık hiperglisemisi ve insülin direncinde düzelme olduğunu göstermişlerdir. Diyabetik retinopatik rat modeli ile yapılan bir çalışmada iNOS inhibisyonu ile diyabetik retinopati progresyonunda azalma olduğu görülmüştür (100). Diyabetik ratlarda kalp hücrelerinde iNOS ekspresyonunda artış olduğu saptanmıştır. Yapılan bir çalışmada iNOS inhibisyonu ile kardiyak fonksiyonlarda düzelme olduğu görülmüştür (101). Çalışmamızda diyabet oluşturulan ratlarda karaciğer, böbrek ve aort iNOS seviyelerinde artış, quercetin verilen ratlarda ise iNOS seviyelerinde azalma saptandı. Bu sonuç quercetin oksidatif strese önemli rolü olan ve diyabetik komplikasyonların gelişimine katkıda bulunan iNOS seviyelerini azaltarak diyabetik komplikasyonları önleyebileceğini düşündürmektedir.

IL-6 farklı biyolojik etkilere sahip olan bir sitokindir (102). Yapılan çalışmalarda Tip 2 DM' li hastalarda IL-6 seviyesinin yüksek olduğu görülmüştür (103). Ayrıca IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin DNA hasarına neden olarak bunun sonucunda daha fazla NO üretimine neden olduğu görülmüştür (104). Yapılan bir çalışmada oral antidiyabetik ajan olan sitagliptin tedavisi ile pankreatik hücrelerde IL-6 düzeyinde azalma olduğu saptanmıştır (105). Çalışmamızda diyabetik ratlarda IL-6 seviyesinde artış görülürken, quercetin verilen ratlarda IL-6 seviyelerinde azalma olduğu saptandı.

Nonalkolik steatohepatit (NASH), kronik viral hepatit, hemokromatozis, alkolik karaciğer hastalığı ve siroz gibi karaciğer hastalığı bulunanlarda Tip 2 DM prevalansı yüksek olarak görülmektedir. Tip 2 DM ve karaciğer hasarının şiddeti arasında patogenik bir ilişki olduğu ileri sürülmektedir. Bu durum insülin direnci, reaktif oksijen türleri, proinflamatuvar sitokin artışı gibi mekanizmalarla açıklanmaktadır (106). Panchal ve ark.(107) yaptıkları deneysel bir çalışmada quercetin tedavisi ile NASH semptomlarında azalma olduğunu göstermişlerdir. Granado-Serrano ve ark.(108) quercetin tedavisi ile karaciğer hücrelerinde inflamasyonun azaldığını göstermişlerdir. Çalışmamızda quercetin tedavisi ile karaciğerde inflamatuvar hücre infiltrasyonunda ılımlı derecede azalma saptandı.

Diyabet nefropatisi terimi, diyabetes mellitus'ta böbrekte oluşan bozuklukların tamamını ifade eder. Nefropati büyük ve küçük damarlardaki patoloji sonucu oluşur. Diyabetes mellitus'taki patolojik değişiklikler, intrarenal ve ekstrarenal arterlerin ateroskleroza ve glomerüler kapiller yumağındaki mikroanjiyopati sonucu oluşur. Özellikle batı ülkelerinde, terminal böbrek yetmezliğinin esas nedeni diyabetik nefropatidir (109). Quercetin tedavisi ile rat böbrek dokusunda lökosit infiltrasyonu ve doku hasarının azaldığı bilinmektedir. Liu ve ark.(110) yaptıkları deneysel bir çalışmada quercetin tedavisinin oksidatif stresi azaltarak böbrek hasarına karşı koruyucu etkisinin olduğunu göstermişlerdir. Lai ve ark. (111) yaptıkları deneysel diyabet modelinde quercetin tedavisi ile renal fonksiyonlarda düzelme olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda quercetin tedavisi verilen grupta böbrek dokusunda lökosit hücre infiltrasyonunda ve doku hasarında azalma olduğu saptandı.

Diyabetik komplikasyonların çoğuna, endotel disfonksiyonuna yol açan yüksek serum glukoz seviyeleri ve ROS neden olmaktadır (112). ROS endotel

disfonksiyon, hücre birikimi ve inflamasyona yol açarak hiperplazi ve hipertrofiye neden olabilmektedir. Ayrıca matriks metalloproteinaz gibi enzimleri indükleyerek ateroskleroz patogenezinde katkıda bulunmaktadır (113). Vasküler komplikasyonların DM’de morbidite ve mortalitenin önemli nedenlerinden biri olduğu bilinmektedir. Oksidatif stresin vasküler hasarla ilişkili olduğu görülmüştür (114). Çalışmamızda, quercetin tedavisi ile aort dokusunda inflamatuvar değişikliklerde azalma olduğu görüldü. Bu sonuç, quercetin’in antioksidan etkisi ile ROS oluşumunu önleyerek ve glisemik kontrolü sağlayarak vasküler komplikasyonları azaltabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, quercetin STZ ile oluşturulan deneysel diyabet modelinde diyabet patogenezinde önemli rol oynayan yolları inhibe etmektedir. Quercetin’in, inflamasyon ve oksidatif strese anahtar enzimler olan COX-2 ve iNOS’ u, proinflamatuvar sitokin olan IL-6’ yı azaltarak diyabet gelişimi ve komplikasyonlarının önlenmesinde destek sağladığı görülmüştür.

5. KAYNAKLAR

1. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. National Diabetes Data Group. *Diabetes*. 1979; 28(12): 1039-1057.
2. Esser N, Paquot N, Scheen AJ. [Type 2 diabetes and anti-inflammatory agents: new therapeutic prospects?]. *Revue medicale suisse*. 2011; 7(306): 1614-1618.
3. Satman I. Population-based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: results of the turkish diabetes epidemiology study (TURDEP-II). [http://www.turkendokrin.org/files/file/TURDEP-II 2011.pdf](http://www.turkendokrin.org/files/file/TURDEP-II%2011.pdf)10.08.2012.
4. Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *The American journal of medicine*. 2000; 109(1): 33-44.
5. Fujimoto M, Shimizu N, Kunii K, Martyn JA, Ueki K, Kaneki M. A role for iNOS in fasting hyperglycemia and impaired insulin signaling in the liver of obese diabetic mice. *Diabetes*. 2005; 54(5): 1340-1348.
6. Liu F, Xia M, Xu A. Expression of VEGF, iNOS, and eNOS is increased in cochlea of diabetic rat. *Acta oto-laryngologica*. 2008; 128(11): 1178-1186.
7. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 1998; 38: 97-120.
8. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annual review of biochemistry*. 2000; 69: 145-182.
9. Van Dam PS, Van Asbeck BS, Erkelens DW, Marx JJ, Gispen WH, Bravenboer B. The role of oxidative stress in neuropathy and other diabetic complications. *Diabetes/metabolism reviews*. 1995; 11(3): 181-192.
10. Rigano R, Profumo E, Teggi A, Siracusano A. Production of IL-5 and IL-6 by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with *Echinococcus granulosus* infection. *Clinical and experimental immunology*. 1996; 105(3): 456-459.
11. Abbas AK, Lichtman AH, Poper JS. *Cytokines. Cellular and Molecular Immunology* Philadelphia: WB Saunders Company. 1994: 240-261.
12. Tilg H, Moschen AR. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. *Mol Med*. 2008; 14(3-4): 222-231.
13. Warren CA, Paulhill KJ, Davidson LA, Lupton JR, Taddeo SS, Hong MY, et al. Quercetin may suppress rat aberrant crypt foci formation by suppressing inflammatory mediators that influence proliferation and apoptosis. *The Journal of nutrition*. 2009; 139(1): 101-105.
14. Formica JV, Regelson W. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 1995; 33(12): 1061-1080.
15. Bhaskar S, Shalini V, Helen A. Quercetin regulates oxidized LDL induced inflammatory changes in human PBMCs by modulating the TLR-NF-kappaB signaling pathway. *Immunobiology*. 2011; 216(3): 367-373.

16. Giuliani C, Noguchi Y, Harii N, Napolitano G, Tatone D, Bucci I, et al. The flavonoid quercetin regulates growth and gene expression in rat FRTL-5 thyroid cells. *Endocrinology*. 2008; 149(1): 84-92.
17. Yenigün M. Her Yönüyle Diabetes Mellitus. 2. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2001; 1: 51-62.
18. Molitch ME. Diabetes Mellitus. Walker HK, Hall WD, Hurst JW (editors). *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. 3rd edition. Boston: Butterworths; 1990. Chapter 136.
19. Kahn CR, Weir GC, King GL, Jacobson AM, Moses AC, Smith RJ. *Joslin's Diabetes Mellitus*. Fourteenth edition. Lippincott Williams and Wilkins, Boston. 2005; 331-338.
20. Arslan M. Diabetes mellitusta tanı ve sınıflandırma. İliçin G, Biberoglu K, Süleymanlar G, Ünal S (editörler). *İç Hastalıkları*. 2. Baskı, Ankara: Öncü Basımevi, 2005; 2279-2295.
21. Kelestimur F, Cetin M, Pasaoglu H, Coksevim B, Cetinkaya F, Unluhizarci K, et al. The prevalence and identification of risk factors for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in Kayseri, central Anatolia, Turkey. *Acta diabetologica*. 1999; 36 (1-2): 85-91.
22. Yöner A, Özata M. Diabetes mellitus tanısı, sınıflaması, klinik özellikler. *Endokrinoloji Metabolizma ve Diyabet*. 1. Baskı, İstanbul: Medikal Yayıncılık, 2006; 275-283.
23. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*. 2004; 27 Suppl 1: S5-S10.
24. World Health Organization: Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: Report of a WHO Consultation. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Geneva: World Health Organization, 1999.
25. Altuntaş Y. Diabetes mellitus'un tanımı, tanısı ve sınıflaması. Yenigün M (editör). *Her yönüyle diabetes mellitus*. 2. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2001; 51-62.
26. Kahn CR, Weir GC, King GL, Jacobson AM, Moses AC, Smith RJ. *Joslin's Diabetes Mellitus*. Fourteenth edition. Boston: Lippincott Williams and Wilkins, 2005; 331-338.
27. Bennett PH, Knowler WC. Definition, diagnosis, and classification of diabetes mellitus and glucose homeostasis. Khan CR, Weir GC, King GL, Jacobson AM, Moses AC, Smith RJ (editors). *Joslin's Diabetes Mellitus*. 14th ed. Boston: Lippincott William and Wilkins, 2005; 333-339.
28. Başkal N. Diabetes mellitus'un sınıflandırılması. Erdoğan G (editör). *Koloğlu Endokrinoloji temel ve klinik*. 2. Baskı, Ankara: MN Medical & Nobel, 2005; 342-348.
29. Başkal N. Diabetes mellitusta akut metabolik dekompanseasyonlar. İliçin G, Biberoglu K, Süleymanlar G, Ünal S (editörler). *İç Hastalıkları*. 2. Baskı, Ankara: Öncü Basımevi, 2005; 2311-2321.
30. Gedik O. Diabetes mellitus'un komplikasyonları. Erdoğan G (editör). *Koloğlu Endokrinoloji temel ve klinik*. 2. Baskı, Ankara: MN Medical & Nobel, 2005; 367-383.

31. Serafini M, Del Rio D. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the Total Antioxidant Capacity the right tool? Redox report : communications in free radical research. 2004; 9(3): 145-152.
32. Birrell AM, Heffernan SJ, Ansselin AD, McLennan S, Church DK, Gillin AG, et al. Functional and structural abnormalities in the nerves of type I diabetic baboons: aminoguanidine treatment does not improve nerve function. Diabetologia. 2000; 43(1): 110-116.
33. Pitkanen OM, Martin JM, Hallman M, Akerblom HK, Sariola H, Andersson SM. Free radical activity during development of insulin-dependent diabetes mellitus in the rat. Life sciences. 1992; 50 (5): 335-339.
34. Bukan N, Sancak B, Yavuz O, Koca C, Tutkun F, Ozcelikay TA, Altan N. Lipid peroxidation and scavenging enzyme levels in the liver of streptozotocin-induced diabetes rats. Indian J Biochem Biophys 2003; 40: 447-450.
35. Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. Diabetes. 1999; 48(1): 1-9.
36. Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Poitout V. Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. Diabetes. 2004; 53 Suppl 1: S119-124.
37. Ihara Y, Toyokuni S, Uchida K, Odaka H, Tanaka T, Ikeda H, et al. Hyperglycemia causes oxidative stress in pancreatic beta-cells of GK rats, a model of type 2 diabetes. Diabetes. 1999; 48(4): 927-932.
38. Bonnefont-Rousselot D. Glucose and reactive oxygen species. Current opinion in clinical nutrition and metabolic care. 2002; 5(5): 561-568.
39. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature. 2001; 414(6865): 813-820.
40. Green K, Brand MD, Murphy MP. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. Diabetes. 2004; 53 Suppl 1: S110-118.
41. Bonnefont-Rousselot D, Bastard JP, Jaudon MC, Delattre J. Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance. Diabetes & metabolism. 2000; 26 (3): 163-176.
42. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB, 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. Journal of biochemical and molecular toxicology. 2003; 17(1): 24-38.
43. Daloğlu AG. Deneysel Diyabet Oluşturulmuş Ratlarda E Vitamini ve Kafeik Asit Fenetil Ester'in (Cape) Antioksidan Etkilerinin Karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi, Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Bölümü, 2003.
44. Türköz Y, Özerol E. Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi 1997; (4): 453-461.
45. Takahashi T. Pathophysiological significance of neuronal nitric oxide synthase in the gastrointestinal tract. Journal of gastroenterology. 2003; 38(5): 421-430.
46. Cuzzocrea S, McDonald MC, Mazzon E, Dugo L, Lepore V, Fonti MT, et al. Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, reduces dinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. European journal of pharmacology. 2000; 406(1): 127-137.

47. Zingarelli B, Cuzzocrea S, Szabo C, Salzman AL. Mercaptoethylguanidine, a combined inhibitor of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenger, reduces trinitrobenzene sulfonic acid-induced colonic damage in rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1998; 287(3): 1048-1055.
48. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2007; 39(1): 44-84.
49. Nagano T. Bioimaging probes for reactive oxygen species and reactive nitrogen species. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*. 2009; 45(2): 111-124.
50. Pautz A, Art J, Hahn S, Nowag S, Voss C, Kleinert H. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric oxide : biology and chemistry/ official journal of the Nitric Oxide Society*. 2010; 23(2): 75-93.
51. Nathan C, Xie QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *The Journal of biological chemistry*. 1994; 269(19): 13725-13728.
52. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *The Biochemical journal*. 2001; 357(Pt 3): 593-615.
53. Marletta MA. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell*. 1994; 78(6): 927-930.
54. Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annual review of cell biology*. 1994; 10: 405-455.
55. Ho E, Bray TM. Antioxidants, NFkappaB activation, and diabetogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1999; 222(3): 205-213.
56. Spitaler MM, Graier WF. Vascular targets of redox signalling in diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2002; 45(4): 476-494.
57. Bedard S, Marcotte B, Marette A. Cytokines modulate glucose transport in skeletal muscle by inducing the expression of inducible nitric oxide synthase. *The Biochemical journal*. 1997; 325 (Pt 2): 487-493.
58. Warner TD, Mitchell JA. Cyclooxygenase-3 (COX-3): filling in the gaps toward a COX continuum? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002; 99(21): 13371-13373.
59. Mungan MU, Gurel D, Canda AE, Tuna B, Yorukoglu K, Kirkali Z. Expression of COX-2 in normal and pyelonephritic kidney, renal intraepithelial neoplasia, and renal cell carcinoma. *European urology*. 2006; 50(1): 92-97.
60. Kotnik P, Nielsen J, Kwon TH, Krzysnik C, Frokiaer J, Nielsen S. Altered expression of COX-1, COX-2, and mPGES in rats with nephrogenic and central diabetes insipidus. *American journal of physiology Renal physiology*. 2005; 288(5): 1053-1068.
61. Sorli CH, Zhang HJ, Armstrong MB, Rajotte RV, Maclouf J, Robertson RP. Basal expression of cyclooxygenase-2 and nuclear factor-interleukin 6 are dominant and coordinately regulated by interleukin 1 in the pancreatic islet. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America. 1998; 95(4): 1788-1793.
62. Xiao X, Shi D, Liu L, Wang J, Xie X, Kang T, et al. Quercetin suppresses cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis through inactivation of P300 signaling. *PloS one*. 2011; 6(8): 22934.
 63. Stachowska E, Dolegowska B, Dziedziejko V, Rybicka M, Kaczmarczyk M, Bober J, et al. Prostaglandin E2 (PGE2) and thromboxane A2 (TXA2) synthesis is regulated by conjugated linoleic acids (CLA) in human macrophages. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*. 2009; 60(1): 77-85.
 64. Kajita S, Ruebel KH, Casey MB, Nakamura N, Lloyd RV. Role of COX-2, thromboxane A2 synthase, and prostaglandin I2 synthase in papillary thyroid carcinoma growth. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2005; 18 (2): 221-227.
 65. Yar AS. Streptozosin İle Oluşturulmuş Diyabetli Sıçanlarda Resveratrol Kullanımı Sonucunda Siklooksijenaz-(COX-1) Ve Siklooksijenaz -2 (COX-2) Genlerinin Ekspresyonlarının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ankara: Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Bölümü, 2008
 66. Wang JL, Cheng HF, Harris RC. Cyclooxygenase-2 inhibition decreases renin content and lowers blood pressure in a model of renovascular hypertension. *Hypertension*. 1999; 34(1): 96-101.
 67. Komers R, Lindsley JN, Oyama TT, Anderson S. Cyclo-oxygenase-2 inhibition attenuates the progression of nephropathy in uninephrectomized diabetic rats. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2007; 34(1-2): 36-41.
 68. Quilley J, Santos M, Pedraza P. Renal protective effect of chronic inhibition of COX-2 with SC-58236 in streptozotocin-diabetic rats. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2011; 300(6): 2316-2322.
 69. Cheng HF, Wang CJ, Moeckel GW, Zhang MZ, McKanna JA, Harris RC. Cyclooxygenase-2 inhibitor blocks expression of mediators of renal injury in a model of diabetes and hypertension. *Kidney international*. 2002; 62(3): 929-939.
 70. Kamimura D, Ishihara K, Hirano T. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*. 2003; 149: 1-38.
 71. Kristiansen OP, Mandrup-Poulsen T. Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent? *Diabetes*. 2005; 54 Suppl 2: S114-124.
 72. Ategbo JM, Grissa O, Yessoufou A, Hichami A, Dramane KL, Moutairou K, et al. Modulation of adipokines and cytokines in gestational diabetes and macrosomia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2006; 91(10): 4137-4143.

73. Southern C, Schulster D, Green IC. Inhibition of insulin secretion from rat islets of Langerhans by interleukin-6. An effect distinct from that of interleukin-1. The Biochemical journal. 1990; 272(1): 243-245.
74. Sandler S, Bendtzen K, Eizirik DL, Welsh M. Interleukin-6 affects insulin secretion and glucose metabolism of rat pancreatic islets in vitro. Endocrinology. 1990; 126(2): 1288-1294.
75. Eizirik DL, Sandler S, Welsh N, Cetkovic-Cvrlje M, Nieman A, Geller DA, et al. Cytokines suppress human islet function irrespective of their effects on nitric oxide generation. The Journal of clinical investigation. 1994; 93(5): 1968-1974.
76. Wadt KA, Larsen CM, Andersen HU, Nielsen K, Karlsen AE, Mandrup-Poulsen T. Ciliary neurotrophic factor potentiates the beta-cell inhibitory effect of IL-1beta in rat pancreatic islets associated with increased nitric oxide synthesis and increased expression of inducible nitric oxide synthase. Diabetes. 1998; 47(10): 1602-1608.
77. Watanabe S, Mu W, Kahn A, Jing N, Li JH, Lan HY, et al. Role of JAK/STAT pathway in IL-6-induced activation of vascular smooth muscle cells. American journal of nephrology. 2004; 24(4): 387-392.
78. Larson AJ, Symons JD, Jalili T. Quercetin: A Treatment for Hypertension?-A Review of Efficacy and Mechanisms. Pharmaceuticals. 2010; 3: 237-250.
79. Cao X, Liu M, Tuo J, Shen D, Chan CC. The effects of quercetin in cultured human RPE cells under oxidative stress and in Ccl2/Cx3cr1 double deficient mice. Experimental eye research. 2010; 91(1): 15-25.
80. Nieman DC, Henson DA, Davis JM, Angela Murphy E, Jenkins DP, Gross SJ, et al. Quercetin's influence on exercise-induced changes in plasma cytokines and muscle and leukocyte cytokine mRNA. J Appl Physiol. 2007; 103(5): 1728-1735.
81. Shisheva A, Shechter Y. Quercetin selectively inhibits insulin receptor function in vitro and the bioresponses of insulin and insulinomimetic agents in rat adipocytes. Biochemistry. 1992; 31(34): 8059-8063.
82. Kanter M, Altan MF, Donmez S, Ocakci A, Kartal ME. The effects of quercetin on bone minerals, biomechanical behavior, and structure in streptozotocin-induced diabetic rats. Cell biochemistry and function. 2007; 25(6): 747-752.
83. Coskun O, Kanter M, Korkmaz A, Oter S. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society. 2005; 51(2): 117-123.
84. Ceriello A. Postprandial hyperglycemia and diabetes complications: is it time to treat? Diabetes. 2005; 54(1): 1-7.
85. Kim JH, Kang MJ, Choi HN, Jeong SM, Lee YM, Kim JI. Quercetin attenuates fasting and postprandial hyperglycemia in animal models of diabetes mellitus. Nutrition research and practice. 2011; 5(2): 107-111.

86. Ulu R, Dogukan A, Tuzcu M, Gencoglu H, Ulas M, Ilhan N, et al. Regulation of renal organic anion and cation transporters by thymoquinone in cisplatin induced kidney injury. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2012; 50(5): 1675-1679.
87. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259): 680-685.
88. Dogukan A, Tuzcu M, Agca CA, Gencoglu H, Sahin N, Onderci M, et al. A tomato lycopene complex protects the kidney from cisplatin-induced injury via affecting oxidative stress as well as Bax, Bcl-2, and HSPs expression. *Nutrition and cancer*. 2011; 63(3): 427-434.
89. Yılmaz MT. Diabetes mellitus'un tanı kriterleri ve sınıflaması. Yılmaz MT, Bahçeci M, Büyükbeşe MA (editörler). *Diabetes Mellitus'un Modern Tedavisi*. 1.Baskı, İstanbul: Özlem Grafik Matbaacılık, 2003: 1-9.
90. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes care*. 1998; 21(9): 1414-1431.
91. Pitocco D, Zaccardi F, Di Stasio E, Romitelli F, Santini SA, Zuppi C, et al. Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes. *The review of diabetic studies : RDS*. 2010; 7(1): 15-25.
92. Li Y, Qi J, Liu K, Li B, Wang H, Jia J. Peroxynitrite-induced nitration of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase promotes their binding in diabetic angiopathy. *Mol Med*. 2010; 16(9-10): 335-342.
93. Sharpe PC, Liu WH, Yue KK, McMaster D, Catherwood MA, McGinty AM, et al. Glucose-induced oxidative stress in vascular contractile cells: comparison of aortic smooth muscle cells and retinal pericytes. *Diabetes*. 1998; 47(5): 801-809.
94. Cosentino F, Eto M, De Paolis P, van der Loo B, Bachschmid M, Ullrich V, et al. High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species. *Circulation*. 2003; 107(7): 1017-1023.
95. Quilley J, Chen YJ. Role of COX-2 in the enhanced vasoconstrictor effect of arachidonic acid in the diabetic rat kidney. *Hypertension*. 2003; 42(4): 837-843.
96. Cheng H, Fan X, Moeckel GW, Harris RC. Podocyte COX-2 exacerbates diabetic nephropathy by increasing podocyte (pro)renin receptor expression. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2011; 22(7): 1240-1251.
97. Kellogg AP, Converso K, Wiggin T, Stevens M, Pop-Busui R. Effects of cyclooxygenase-2 gene inactivation on cardiac autonomic and left ventricular function in experimental diabetes. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2009; 296 (2): 453-461.
98. Kellogg AP, Cheng HT, Pop-Busui R. Cyclooxygenase-2 pathway as a potential therapeutic target in diabetic peripheral neuropathy. *Current drug targets*. 2008;

99. Di Naso FC, Rodrigues G, Dias AS, Porawski M, Fillmann H, Marroni NP. Hepatic nitrosative stress in experimental diabetes. *Journal of diabetes and its complications*. 2012.
100. Mishra A, Newman EA. Inhibition of inducible nitric oxide synthase reverses the loss of functional hyperemia in diabetic retinopathy. *Glia*. 2010; 58(16): 1996-2004.
101. Nagareddy PR, Soliman H, Lin G, Rajput PS, Kumar U, McNeill JH, et al. Selective inhibition of protein kinase C beta(2) attenuates inducible nitric oxide synthase-mediated cardiovascular abnormalities in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*. 2009; 58 (10): 2355-2364.
102. Pan H, Xu X, Hao X, Chen Y. Changes of myogenic reactive oxygen species and interleukin-6 in contracting skeletal muscle cells. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2012; 2012: 145418.
103. Guzel S, Seven A, Kocaoglu A, Ilk B, Guzel EC, Saracoglu GV, et al. Osteoprotegerin, leptin and IL-6: Association with silent myocardial ischemia in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes & vascular disease research : official journal of the International Society of Diabetes and Vascular Disease*. 2012.
104. Nihayet M, Mehmet R, Halil A, Engin G. Tip II Diyabetes Mellituslu Hastalarda Serum TNF-a, IL-1p, IL-2R, IL-6,IL-8 Nitrit, Nitrat ve 24 Saatlik İdrar Nitrit, Nitrat Seviyeleri. *C. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi* 2001; 23: 149-154.
105. Dobrian AD, Ma Q, Lindsay JW, Leone KA, Ma K, Coben J, et al. Dipeptidyl peptidase IV inhibitor sitagliptin reduces local inflammation in adipose tissue and in pancreatic islets of obese mice. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2011; 300(2): 410-421.
106. Hsieh PS, Hsieh YJ. Impact of liver diseases on the development of type 2 diabetes mellitus. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2011; 17(48): 5240-5245.
107. Panchal SK, Poudyal H, Brown L. Quercetin ameliorates cardiovascular, hepatic, and metabolic changes in diet-induced metabolic syndrome in rats. *The Journal of nutrition*. 2012; 142(6): 1026-1032.
108. Granado-Serrano AB, Martin MA, Bravo L, Goya L, Ramos S. Quercetin Attenuates TNF-Induced Inflammation in Hepatic Cells by Inhibiting the NF-kappaB Pathway. *Nutrition and cancer*. 2012; 64(4): 588-598.
109. Wieland DM, Kotzka J, Goldstain BJ. Tip 2 diyabetin patogenezi. Tip 2 Diyabet. Goldstain BJ, Wieland DM (editors). Akman AC (çevirmen) s. 13-25. 1. Baskı, İstanbul: And Danışmanlık Yayıncılık, 2004.
110. Liu CM, Ma JQ, Sun YZ. Quercetin protects the rat kidney against oxidative stress-mediated DNA damage and apoptosis induced by lead. *Environmental toxicology and pharmacology*. 2010; 30(3): 264-271.
111. Lai PB, Zhang L, Yang LY. Quercetin ameliorates diabetic nephropathy by reducing the expressions of transforming growth factor-beta1 and connective tissue growth factor in streptozotocin-induced diabetic rats. *Renal failure*. 2012; 34(1): 83-87.

- 112.** Ikubo N, Saito M, Tsounapi P, Dimitriadis F, Ohmasa F, Inoue S, et al. Protective effect of taurine on diabetic rat endothelial dysfunction. *Biomed Res.* 2011; 32(3): 187-193.
- 113.** Cannizzo B, Lujan A, Estrella N, Lembo C, Cruzado M, Castro C. Insulin resistance promotes early atherosclerosis via increased proinflammatory proteins and oxidative stress in fructose-fed ApoE-KO mice. *Experimental diabetes research.* 2012; 2012: 941304
- 114.** Xiang M, Wang J, Zhang Y, Ling J, Xu X. Attenuation of aortic injury by ursolic acid through RAGE-Nox-NFkappaB pathway in streptozocin-induced diabetic rats. *Archives of pharmacal research.* 2012; 35(5): 877-886.

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Elazığ'da doğdum. İlk ve Orta öğrenimimi Elazığ'da, lise eğitimimi Ankara Fen Lisesi'nde tamamladım. 2000 yılında Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde öğrenimime başladım ve 2004 yılında bu fakülteden mezun oldum. 2010 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım.