



**T.C.  
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ  
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DİYABETİK SIÇANLARDA  
RESVERATROLÜN  
ANTİENFLAMATUAR, ANTİOKSİDAN VE  
HOMEOSTATİK ETKİSİ**

**FATİH HACIMUSTAFAOĞLU**

**TEZ DANIŞMANI  
DOÇ. DR. FATİH ÖZÇELİK**

**TIBBİ BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI  
TIBBİ BİYOKİMYA DOKTORA PROGRAMI**

**DOKTORA TEZİ  
EKİM/2021**

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlanma fırsatı bulduğum, Uluslararası Tıp Fakültesi Dekanı ve Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Fatih GÜLTEKİN hocama, tez danışmanım ve tezimin ortaya çıkmasında büyük katkısı olan değerli hocam Sayın Doç. Dr. Fatih ÖZÇELİK'e, doktora eğitimim boyunca sahip olduğu bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan değerli hocalarım Prof. Dr. Macit KOLDAŞ, Prof. Dr. Ebru KALE, Doç. Dr. Alev KURAL, Doç. Dr. Halime Hanım PENÇE, Dr. Öğr. Üyesi Eray Metin GÜLER ve şu anda Sakarya Eğitim ve Araştırma Hastanesinde çalışan Uzm. Dr. Mehmet Zahit ÇIRACI'ya, birlikte öğrenim yapma imkânı bulduğum Arş. Gör. Sibel KURAŞ'a teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında bana destek olan ve eğitim hayatım boyunca her türlü fedakârlığı gösteren aileme sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Fatih HACIMUSTAFAOĞLU

## İÇİNDEKİLER

|                                                                           |      |
|---------------------------------------------------------------------------|------|
| TEŞEKKÜR.....                                                             | iv   |
| İÇİNDEKİLER .....                                                         | v    |
| TABLolar LİSTESİ .....                                                    | vii  |
| ŞEKİLLER LİSTESİ.....                                                     | viii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR.....                                              | ix   |
| ÖZET.....                                                                 | xii  |
| ABSTRACT.....                                                             | xiv  |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ .....                                                    | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER.....                                                    | 3    |
| 2.1. DİABETES MELLİTUS.....                                               | 3    |
| 2.1.1. Diabetes Mellitus'un Epidemiyolojisi .....                         | 3    |
| 2.1.2. Diabetes Mellitus'un Sınıflandırılması.....                        | 4    |
| 2.1.2.1 Tip 1 diyabet .....                                               | 4    |
| 2.1.2.2. Prediyabet ve tip 2 diyabet .....                                | 7    |
| 2.1.2.2. Gestasyonel diyabet .....                                        | 8    |
| 2.1.3. Diyabette Tedavi Yaklaşımları.....                                 | 8    |
| 2.1.8. Deneysel Diyabet Modeli .....                                      | 9    |
| 2.2. RESVERATROL.....                                                     | 10   |
| 2.2.1. Resveratrolün Kimyasal Bileşimi, Moleküler Yapısı ve Kaynağı ..... | 10   |
| 2.2.2. Resveratrolün Biyolojik Özellikleri.....                           | 11   |
| 2.3. DİYABETİN FİZYOPATOLOJİSİ İLE İLİŞKİLİ BİYOMOLEKÜLLER.....           | 14   |
| 2.3.1. Adrenomedullin.....                                                | 14   |
| 2.3.2. Sitokinler.....                                                    | 15   |
| 2.3.3. İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz.....                            | 16   |
| 2.3.4. Total Antioksidan ve Total Oksidan Kapasite .....                  | 17   |
| 2.3.5. Malondialdehit.....                                                | 17   |
| 2.3.6. Melatonin .....                                                    | 19   |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM.....                                                   | 21   |
| 3.2. ÇALIŞMA GRUPLARININ OLUŞTURULMASI.....                               | 22   |
| 3.3. DENEY HAYVANLARINDA KAN ALIMI VE SERUM ELDESİ.....                   | 25   |
| 3.4. KULLANILAN CİHAZ VE KİMYASALLAR.....                                 | 26   |
| 3.4.1. Kimyasallar .....                                                  | 26   |

|                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------|----|
| 3.4.2. Cihazlar .....                                          | 26 |
| 3.5. PARAMETRELERİN İNCELENMESİ .....                          | 27 |
| 3.5.1 İnterlökin-6 Test Prosedürü .....                        | 27 |
| 3.5.2. Tümör Nekroz Faktörü Alfa Test Prosedürü .....          | 27 |
| 3.5.3. İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz Test Prosedürü ..... | 29 |
| 3.5.4. Melatonin Test Prosedürü .....                          | 30 |
| 3.5.5. Malondialdehit Test Prosedürü .....                     | 30 |
| 3.5.6. İnterlökin-10 Test Prosedürü.....                       | 31 |
| 3.5.7. Mid-Regional Poadrenomedullin Test Prosedürü.....       | 32 |
| 3.5.8. Total Antioksidan ve Total Oksidan Kapasite .....       | 32 |
| 3.5. Verilerin İstatistiksel Analizi.....                      | 34 |
| 4. BULGULAR .....                                              | 36 |
| 4.1. ÇALIŞMADAKİ SIÇANLARIN ÖZELLİKLERİ .....                  | 36 |
| 4.2. DENEY GRUPLAR ARASINDAKİ KARŞILAŞTIRMALAR.....            | 36 |
| 5. TARTIŞMA .....                                              | 50 |
| 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....                                  | 60 |
| KAYNAKLAR .....                                                | 62 |
| EKLER .....                                                    | 68 |

## TABLÖLAR LİSTESİ

|                                                                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 2.1:</b> Diyabet tanı kriterlerinde kullanılan biyokimyasal parametreler.....                                                  | 4  |
| <b>Tablo 2.2:</b> Genel ve spesifik diabetes mellitus türleri .....                                                                     | 6  |
| <b>Tablo 2.3:</b> Bazı Besin kaynaklarında resveratrol içeriği .....                                                                    | 12 |
| <b>Tablo 2.4:</b> Resveratrolün antioksidan aktivitesi.....                                                                             | 14 |
| <b>Tablo 3.1:</b> IL-6 testi ELISA kiti performans verileri .....                                                                       | 27 |
| <b>Tablo 3.2:</b> TNF- $\alpha$ . testi ELISA kiti performans verileri .....                                                            | 28 |
| <b>Tablo 3.3:</b> IL-6 ve TNF- $\alpha$ test prosedür aşamaları.....                                                                    | 28 |
| <b>Tablo 3.4:</b> iNOS testi ELISA kiti performans verileri .....                                                                       | 29 |
| <b>Tablo 3.5:</b> Melatonin testi ELISA kiti performans verileri .....                                                                  | 30 |
| <b>Tablo 3.6:</b> MDA testi ELISA kiti performans verileri .....                                                                        | 31 |
| <b>Tablo 3.7:</b> IL-10 testi ELISA kiti performans verileri .....                                                                      | 31 |
| <b>Tablo 3.8:</b> MR-proADM testi ELISA kiti performans verileri.....                                                                   | 32 |
| <b>Tablo 3.9:</b> TAS ve TOS testleri ELISA kiti performans kriterleri.....                                                             | 33 |
| <b>Tablo 3.10:</b> iNOS, melatonin, MDA, IL-10, MR-proADM, TAS ve TOS testlerinin prosedür aşamaları.....                               | 33 |
| <b>Tablo 4.1:</b> Grupların serum IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , MR-proADM, İNOS ve melatonin düzeyleri açısından karşılaştırılması ..... | 40 |
| <b>Tablo 4.2:</b> Grupların oksidan/antioksidan parametreler açısından karşılaştırılması .....                                          | 42 |
| <b>Tablo 4.3:</b> Tüm sıçan grupları için verilerin korelasyon matrisi sonuçları.....                                                   | 44 |

## ŞEKİLLER LİSTESİ

|                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1: Resveratrolün biyosentezi.....                                                                          | 11 |
| Şekil 3.1: Deney sürecince deney hayvanlarının sağlık durumu kontrolü.....                                         | 22 |
| Şekil 3.2: Kimyasalların ve deney hayvanlarının tartımında kullanılan teraziler .....                              | 23 |
| Şekil 3.3: Deney hayvanlarına yapılacak işlem öncesi hazırlık .....                                                | 23 |
| Şekil 3.4: Deney hayvanlarına ketamin/ksilazin anestezisi uygulaması.....                                          | 24 |
| Şekil 3.5: Sıçanların karın boşluğuna girme işlemi .....                                                           | 24 |
| Şekil 3.6: Ötenazi öncesi intrakardiyak kan alımı uygulaması .....                                                 | 25 |
| Şekil 4.1: Sıçan gruplarına göre serum IL-6 düzeyleri .....                                                        | 37 |
| Şekil 4.2: Sıçan gruplarına göre serum IL-10 düzeyleri .....                                                       | 37 |
| Şekil 4.3: Sıçan gruplarına göre serum TNF- $\alpha$ düzeyleri .....                                               | 38 |
| Şekil 4.4: Sıçan gruplarına göre serum MR-proADM düzeyleri.....                                                    | 39 |
| Şekil 4.5: Sıçan gruplarına göre serum iNOS düzeyleri .....                                                        | 39 |
| Şekil 4.6: Sıçan gruplarına göre serum melatonin düzeyleri .....                                                   | 41 |
| Şekil 4.7: Sıçan gruplarına göre serum MDA düzeyleri.....                                                          | 42 |
| Şekil 4.8: Sıçan gruplarına göre serum total antioksidan kapasite (TAS) düzeyleri .....                            | 43 |
| Şekil 4.9: Sıçan gruplarına göre serum total oksidan kapasite (TOS) düzeyleri.....                                 | 43 |
| Şekil 4.10: Serum MR-proADM düzeylerinin TOS, TAS, MDA ve IL-6 düzeyleri arasındaki korelasyon grafiği.....        | 46 |
| Şekil 4.11: IL-6 düzeyleri ile MDA ve TOS düzeyleri arasında yapılan Spearman korelasyon analiz sonuç grafiği..... | 47 |
| Şekil 4.12: MDA ve TOS arasındaki Spearman korelasyon grafiği.....                                                 | 48 |
| Şekil 4.13: Spearman analizinde iNOS ile MDA, melatonin, TNF- $\alpha$ ve IL-6 arasında korelasyon grafiği.....    | 49 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

|               |                                                           |
|---------------|-----------------------------------------------------------|
| <b>ADM</b>    | : Adrenomedullin                                          |
| <b>AMPK</b>   | : 5'-Adenozin Monofosfat ile Aktive Edilmiş Protein Kinaz |
| <b>cAMP</b>   | : 3'5' Siklik Adenozin Monofosfat                         |
| <b>CGRP</b>   | : Kalsitonin Geni ile İlişkili Peptit                     |
| <b>COX-2</b>  | : Siklooksijenaz-2                                        |
| <b>CRP</b>    | : C-reaktif Protein                                       |
| <b>DM</b>     | : Diabetes Mellitus                                       |
| <b>DPP-4</b>  | : Dipeptidil Peptidaz-4                                   |
| <b>ELISA</b>  | : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay                       |
| <b>eNOS</b>   | : Endotelial NOS                                          |
| <b>FAS</b>    | : Yağ Asidi Sentazı                                       |
| <b>GAD</b>    | : Glutamik Asit Dekarboksilaz                             |
| <b>GADA</b>   | : Glutamik Asit Dekarboksilaza Karşı Antikorlar           |
| <b>GDM</b>    | : Gestasyonel Diyabet                                     |
| <b>GLP-1</b>  | : Glukagon Benzeri Peptid-1                               |
| <b>GSH-Px</b> | : Glutasyon Peroksidaz                                    |
| <b>GLUT</b>   | : Glukoz Taşıyıcısı                                       |
| <b>HO-1</b>   | : Hem Oksijenaz                                           |
| <b>IP</b>     | : İntraperitoneal                                         |
| <b>iNOS</b>   | : İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz                      |
| <b>IAA</b>    | : İnsülün Otoantikorları                                  |
| <b>IA-2</b>   | : Anti-Tirozin Fosfataz Antikoru                          |
| <b>IA-2b</b>  | : Anti-Fogrin Antikoru                                    |

|                                |                                                         |
|--------------------------------|---------------------------------------------------------|
| <b>ICA</b>                     | : Adacık Hücresi Otoantikorları                         |
| <b>IDF</b>                     | : Uluslararası Diyabet Federasyonu                      |
| <b>IFN-<math>\gamma</math></b> | : İnterferon-Gamma                                      |
| <b>IL</b>                      | : İnterlökin                                            |
| <b>IR</b>                      | : İnsülün Direnci                                       |
| <b>LDL</b>                     | : Düşük Yoğunluklu Lipoprotein                          |
| <b>MDA</b>                     | : Malondialdehit                                        |
| <b>MR-proADM</b>               | : Mid-Regional Proadrenomedullin                        |
| <b>NADPH</b>                   | : Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat                 |
| <b>NF-<math>\kappa</math>B</b> | : Nükleer Faktör Kappa B                                |
| <b>nNOS</b>                    | : Nöronal NOS                                           |
| <b>NO</b>                      | : Nitrik Oksit                                          |
| <b>NOS</b>                     | : Nitrik Oksit Sentaz                                   |
| <b>OGTT</b>                    | : Oral Glukoz Tolerans Testi                            |
| <b>TBA</b>                     | : Tiyobarbitürik Asit                                   |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | : Tümör Nekroz Faktörü Alfa                             |
| <b>TURDEP</b>                  | : Türkiye Diyabet Epidemiyoloji Çalışması               |
| <b>PARP-1</b>                  | : Poli (ADP-Riboz) Polimeraz-1                          |
| <b>PPAR<math>\gamma</math></b> | : Peroksizom Proliferatör ile Aktive Olan Reseptör Gama |
| <b>PEPCK</b>                   | : Fosfoenolpiruvat Karboksikinaz                        |
| <b>rDNA</b>                    | : Ribozomal DNA                                         |
| <b>ROS</b>                     | : Reaktif Oksijen Türleri                               |
| <b>SGLT-2</b>                  | : Sodyum Glukoz Ko-transporter-2                        |
| <b>SIRT</b>                    | : Sirtuin                                               |
| <b>Sir2</b>                    | : Sessiz Bilgi Düzenleyici 2                            |
| <b>SOD</b>                     | : Süperoksit Dismutaz                                   |

|              |                                |
|--------------|--------------------------------|
| <b>STZ</b>   | : Streptozosin                 |
| <b>TAS</b>   | : Toplam Antioksidan Kapasite  |
| <b>TOS</b>   | : Toplam Oksidan Kapasite      |
| <b>ZnT8</b>  | : Çinko Transporter Antikoru 8 |
| <b>4-HNE</b> | : 4-hidroksinonenal            |



# **DİYABETİK SIÇANLARDA RESVERATROLÜN ANTIENFLAMATUAR, ANTİOKSİDAN VE HOMEOSTATİK ETKİSİ**

## **ÖZET**

**Amaç:** Diyabet tedavisi için düşünülen resveratrol antikanser, antioksidan, antienflamatuar ve homeostatik özellikleri ile umut verici olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada resveratrolün diyabetik sıçanlarda kan mid-regional proadrenomedullin (MR-proADM), indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS), IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , total antioksidan kapasite (TAS), total oksidan kapasite (TOS), malondialdehit (MDA) ve melatonin üzerine etkileri araştırılmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışma için 21 adet erişkin erkek Wistar-Dawley albino sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar 7'şer adet olacak şekilde kontrol grubu (grup-I), streptozosin enjeksiyonu ile oluşturulan diyabetik grup (grup-II) ve resveratrol tedavisi uygulanan diyabetik grup (grup-III) olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Grup-III'e 21 gün boyunca 5 mg/kg/gün resveratrol intraperitoneal olarak uygulandı. 22. gün sıçanlardan intrakardiyak olarak alınan kanlarda glukoz, iNOS, melatonin, MR-proADM, IL-10, IL-6, TNF- $\alpha$ , TAS, TOS ve MDA düzeyleri ölçüldü.

**Bulgular:** Grup-II'nin IL-6 düzeyi grup-I ve III'den daha yüksek bulundu (sırasıyla  $98,3 \pm 44,0$ 'e karşı  $27,5 \pm 9,0$  ve  $49,1 \pm 30,1$  pg/mL;  $p < 0,05$ ). Grup-I'in IL-10 ve MDA düzeyleri grup-III'den farklı değil iken grup-II'den daha düşüktü ( $42,4 \pm 6,8$ 'e karşı  $73,5 \pm 40,7$  ve  $128,4 \pm 69,8$  pg/mL ve  $3,48 \pm 1,50$ 'e karşı  $5,10 \pm 2,47$  ve  $7,36 \pm 2,58$  nmol/mL;  $p < 0,05$ ). Grup-I'in MR-proADM düzeyleri grup-III'den farklı değil iken grup-II'den daha yüksekti ( $23,2 \pm 6,6$ 'e karşı  $16,9 \pm 5,0$  ve  $12,5 \pm 3,1$  ng/L,  $p < 0,05$ ). Grup-III'ün iNOS düzeylerinin grup-I'in düzeylerine düştüğü görüldü ( $0,80 \pm 0,55$  karşı  $1,44 \pm 0,96$  ng/mL,  $p > 0,05$ ).

**Sonuç:** Bu çalışma resveratrol tedavisinin diyabetik sıçanlarda MDA'yı azaltarak antioksidan ve IL-6, IL-10, MR-proADM ve iNOS'u etkileyerek antienflamatuar ve homeostatik etki yoluyla diyabetin neden olduğu olumsuzlukları azaltabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Diyabetik Sıçan, İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz, IL-10, Malondialdehit, Mid-Regional Poadrenomedullin, Resveratrol



# ANTIINFLAMMATORY, ANTIOXIDANT AND HOMEOSTATIC EFFECT OF RESVERATROL IN DIABETIC RATS

## ABSTRACT

**Aim:** Considered for the treatment of diabetes, resveratrol is thought to be promising with its anticancer, antioxidant, antiinflammatory and homeostatic properties. In this study, the effects of resveratrol on blood mid-regional proadrenomedullin (MR-proADM), inducible nitric oxide synthase (iNOS), IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , total antioxidant status (TAS), total oxidant status (TOS), malondialdehyde (MDA) and melatonin in diabetic rats were investigated.

**Materials and Methods:** For the study, 21 adult male Wistar-Dawley albino rats were used. The rats were divided into 3 groups as 7 each, control-group (group-I), diabetic group formed by streptozocin injection (group-II), and diabetic group treated with resveratrol (group-III). Group-III was administered 5 mg/kg/day resveratrol intraperitoneally for 21 days. Glucose, iNOS, melatonin, MR-proADM, IL-10, IL-6, TNF- $\alpha$ , TAS, TOS and MDA levels were measured in the blood taken intracardiac from rats on the 22<sup>nd</sup> day.

**Results:** IL-6 level of group-II was higher than group-I and III ( $98,3 \pm 44,0$  vs.  $27,5 \pm 9,0$  and  $49,1 \pm 30,1$  pg/mL,  $p < 0,05$ , respectively). While IL-10 and MDA levels of group-I were not different from group-III, they were lower than group-II ( $42,4 \pm 6,8$  vs  $73,5 \pm 40,7$  and  $128,4 \pm 69,8$  pg/mL;  $3,48 \pm 1,50$  vs  $5,10 \pm 2,47$  and  $7,36 \pm 2,58$  nmol/mL,  $p < 0,05$ ). While MR-proADM levels of group-I was not different from group-III, they were higher than group-II ( $23,2 \pm 6,6$  vs  $16,9 \pm 5,0$  and  $12,5 \pm 3,1$  ng/L,  $p < 0,05$ ). It was observed that the iNOS levels of group-III decreased to the levels of group-I ( $0,80 \pm 0,55$  vs  $1,44 \pm 0,96$  ng/mL,  $p > 0,05$ ).

**Conclusion:** Resveratrol treatment can reduce the adverse effects of diabetes through its antioxidant effect by reducing malondialdehyde and its antinflammatory and homeostatic effect by regulating IL-6, IL-10, MR-proADM and iNOS.

**Key Words:** Diabetic Rat, Inducible Nitric Oxide Synthase, IL-10, Malondialdehyde, Mid-Regional Proadrenomedullin, Resveratrol

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya genelinde en yaygın hastalıklardan biri olan diabetes mellitus (DM), hiperglisemi ile karakterize, pankreasın yeterince insülin üretemediği veya üretilen insülinin vücutta etkili olamadığı endokrin temelli kronik metabolik bir hastalıktır. Yüksek mortalite ve morbiditeye sahiptir. İnsidans ve prevalansı; yaşa, coğrafi yerleşkeye, mevsime, ırksal özelliklere göre değişiklik göstermektedir. Etiyolojisinde otoimmünite, genetik ve çevresel faktörler, edinilmiş hastalıklar ve yaşam tarzı yer almaktadır (1–4). DM hiperglisemiye bağlı olarak zamanla vücudun birçok organına zarar vererek kardiyovasküler hastalıklar, nefropati, nöropati ve retinopatiye (görme kaybına ve hatta körlüğe yol açan) neden olmaktadır. Ayrıca alzheimer ve depresyona neden olabilmektedir. Diyabet zamanla kromozomal/mitokondriyal DNA'nın zarar görmesine yol açtığından bazı kanser türleri için de predispozan faktördür. Bu hastalığın kesin bir tedavisi olmamakla birlikte, uygun diyabet yönetimi ve tedavisi sağlanırsa, ciddi komplikasyonların gelişmesi önlenabilir veya geciktirilebilir (1–3,5).

Dünya Sağlık Örgütü DM tedavisi için 400'den fazla bitkiyi listesine almıştır. Bir o kadar da kimyasal molekül bu amaçla kullanılmaktadır. Diyabet tedavisi için pek çok bitkisel ve kimyasal molekül mevcut olsa da, olumlu ve olumsuz etkinlikleri konusunda bilimsel çalışmalar devam etmektedir (6–8). Son yıllarda test edilen çeşitli bileşikler arasında, pleiotropik aktivitesi nedeniyle resveratrolün önemli bir bileşik olabileceği belirtilmektedir (9). Resveratrol (3,4',5-trihidroksistilben) doğal olarak oluşan bir polifenoldür. Esas olarak üzüm, yaban mersini ve yer fıstığının kabuğunda bulunur. Bu doğal bileşiğin *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla antikanser, antioksidan, antienflamatuar, antinosiseptif ve antiastmatik aktivite dahil olmak üzere çeşitli farmakolojik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Kardiyovasküler hastalıkları önlediği, iskemi-reperfüzyon kaynaklı karaciğer hasarını azalttığı, zarar görmüş mikro dolaşımı onardığı ve hepatositleri oksidan strese karşı koruduğu saptanmıştır (10–13).

DM'nin komplikasyonlarının önlenmesinde rolü olabileceği düşünülen vücudumuzun bilinen en potent ve doğal antioksidanı olan melatonin; pineal bez tarafından salgılanan bir nörohormondur. Melatonin immün hücre üretimi ve

fonksiyonunun modölatörü olmasının yanı sıra güçlü bir serbest radikal temizleyicidir (14,15). Fizyolojik olarak antioksidanların aktivitesini uyarırken (süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon redüktaz) mitokondrinin elektron taşıma zincirinin etkinliğini artırarak reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumunu azaltmakta ve ROS'ni etkisiz hale getirebilmektedir (16,17). Ayrıca bazı dokularda bir pro-oksidatif enzim olan nitrik oksit sentetazı inhibe ettiği bildirilmektedir (17,18). Melatoninin insülin salgılanması, kan glukozu ve karbonhidrat metabolizması üzerindeki etkisine dair tutarsız veriler bulunmakla birlikte (19–21) bazı çalışmalarda insülin benzeri bir etki sergilediği (21–23) ve interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), IL-2 ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF- $\alpha$ )'nın salgılanmasını uyardığı belirtilmektedir (14,15,24).

Diyabet yönetiminde resveratrol kullanımının hangi fizyolojik mekanizmalar üzerinden fayda gösterebileceği konusu güncelliğini halen korumaktadır. Özellikle multifonksiyonel rolleri bulunan adrenomedullin (ADM) ve nitrik oksidin (NO) bu fizyolojik mekanizmaları açıklamada önemli rollerinin olabileceği düşünülmektedir. ADM yerel bir otokrin ve/veya parakrin vazodilatör hormon görevi görebilmektedir. Vazodilatör ve kan basıncını düşürücü özelliklere sahiptir. Ayrıca ADM'nin çeşitli dokularda elektrolit ve sıvı homeostazının korunmasında önemli bir endokrin rolü olduğu tespit edilmiştir. Hipertansiyon, kronik böbrek yetmezliği ve diyabetik anjiyopatilerde vazokonstriktif faktörlerin ve ADM'nin seviyelerinin ve üretiminin arttığı, NO gibi diğer gevşetici maddelerin azaldığı belirtilmiştir (25). Birçok farklı biyokimyasal süreçte hücrel bir sinyal molekülü olarak görev yapan NO, insülin direnci (IR), obezite, karaciğer hastalıkları ve kardiyovasküler sistem hastalıkları dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların patogenezi ve ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir (26).

Yukarıdaki tüm bu bilgiler ışığında bu çalışmada, streptozosin (STZ) ile diyabet oluşturulan sıçanlarda resveratrolün enflamatuar/anti-enflamatuar (IL-6, IL-10 ve TNF- $\alpha$  üzerinden), antioksidan ve homeostatik etkileri (kan ADM'yi temsilen MR-proADM, iNOS ve melatonin üzerinden) karşılaştırmalı olarak araştırıldı.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. DİABETES MELLİTUS**

DM hiperglisemi ile karakterize edilen, pankreasın yeterince insülin üretmediğinde veya ürettiği insülini vücudun etkili bir şekilde kullanamadığında ortaya çıkan kronik ve metabolik bir hastalıktır. DM genetik, çevresel ve yaşam tarzı değişikliklerinin kompleks etkileşimi ile ortaya çıkar. İnsülin, kan dolaşımındaki glukozun vücut hücrelerine girmesini sağlayarak kan glukozunu düzenleyen hormondur. Ayrıca protein ve yağ metabolizması için de gereklidir. İnsülin eksikliği veya hücrelerin buna yanıt verememesi, klinik bir gösterge olan hiperglisemiye yol açar (2,3,27). Hiperglisemi ve uzun süreli metabolik bozukluklar zamanla vücudun birçok organına zarar verebilir. Bu durum özellikle kardiyovasküler hastalıklar, nöropati, nefropati ve retinopatiye (görme kaybına ve hatta körlüğe yol açar) neden olur (3,28). Günümüzde piyasada var olan DM tedavisine yönelik ilaçların güçlü yan etkileri vardır. Bu hastalığın kesin bir tedavisi olamamakla birlikte, uygun diyabet yönetimi sağlanırsa, metabolik anormallikler ve bu ciddi komplikasyonlar geciktirilebilir veya tamamen önlenabilir (9,28). DM tanı kriterleri Tablo 2.1'de verilmiştir.

#### **2.1.1. Diabetes Mellitus'un Epidemiyolojisi**

21. yüzyılın en önemli sağlık sorunlarından biri olarak gösterilen DM, dünyadaki her popülasyonda ve tüm bölgelerde bulunmakta olup endişe verici şekilde artmaktadır (3,29). Ülkemizde 1997-1998 yıllarında "Türkiye Diyabet Epidemiyoloji Çalışması" (TURDEP-I)'nda diyabet prevalansı %7,2 olarak saptanmış iken, 12 sene sonra 2010 yılında yapılan TURDEP-II çalışmasında diyabet prevalansının %90 artış ile %13,7'ye ulaştığını ve Türkiye'deki diyabet nüfusunun yaklaşık 6,5 milyon olduğunu hesaplamışlardır. Ayrıca bu hastaların yarısına yakınının (%45) diyabetli olduğunun farkında bile olmadığını bulmuşlardır (30).

**Tablo 2.1:** Diyabet tanı kriterlerinde kullanılan biyokimyasal parametreler (2)

|                                                                                      | <b>Diyabet</b> | <b>Prediyabet</b> | <b>Normal</b> |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----------------|-------------------|---------------|
| <b>Açlık plazma glukozu (mg/dL)</b>                                                  | ≥ 126          | 100-125           | <100          |
| <b>veya</b>                                                                          |                |                   |               |
| <b>OGTT 2. saat plazma glukozu (mg/dL)</b>                                           | ≥ 200          | 140-199           | <140          |
| <b>veya</b>                                                                          |                |                   |               |
| <b>HbA1c (%)</b>                                                                     | ≥ 6,5          | 5,7-6,4           | <5,7          |
| <b>veya</b>                                                                          |                |                   |               |
| <b>Klasik hiperglisemik krizin semptomları olan randomize plazma glukozu (mg/dL)</b> | ≥ 200          |                   |               |

OGTT: Oral Glukoz Tolerans Testi. Diyabet tanısında OGTT, 75 g oral glukoz alımı ile yapılmalıdır. Açlık plazma glukozu için en az 8 saat açlık gereklidir. Uluslararası standardize edilmiş yöntemlerle ölçüm yapıldığında, HbA1c tanı testi olarak kullanılabilir. Randomize plazma glukozu, gıda alımına bağlı olmaksızın günün herhangi bir saatinde ölçülebilir.

Uluslararası Diyabet Federasyonu tarafından yapılan son araştırmalarda 2019 yılında 463 milyon kişinin diyabet hastası olduğu tahmin ediliyor ve bu sayının gittikçe artarak 2030'da 578 milyona, 2045'te 700 milyona ulaşacağı tahmin ediliyor. Ayrıca 2019 verilerine göre yaşa göre ayarlanmış karşılaştırmalı diyabet prevalansında Türkiye %11,1 ile Avrupa Bölgesi'nde en yüksek prevalansa sahiptir (3). Dünya Sağlık Örgütü 2000 ve 2016 yılları arasında diyabetten kaynaklı erken ölümlerde %5'lik bir artış olduğunu ve 2019'da tahminen yaklaşık 1,5 milyon insanın ölümünün doğrudan diyabetle ilişkili olduğunu belirtmektedir (27).

### **2.1.2. Diabetes Mellitus'un Sınıflandırılması**

Sınıflandırma gerekli tedaviyi belirlemek için önemlidir. Ana DM kategorileri; tip 1 diyabet, tip 2 diyabet, gestasyonel diyabet ve diğer spesifik diyabet tipleri (Tablo 2.2) olarak sınıflandırılır. Bunlar arasında tip 1 ve tip 2 diyabet en sık görülen diyabet olmakla birlikte diyabetik hastaların büyük çoğunluğunu tip 2 diyabet oluşturmaktadır (2,29).

**2.1.2.1 Tip 1 diyabet:** Bu form pankreas beta hücrelerinin otoimmün yıkımından kaynaklanır (2). Dünya çapında tüm diyabetlilerin %5-10'unu oluşturmakta olup insidans ve prevalansı giderek artmaktadır (2,3). Pankreas beta hücreleri, bağışıklık sistemi tarafından aşamalı olarak ya kısmen ya da tamamen yok edilir. Bunun

sonucunda da vücut ya çok az insülin üretir ya da hiç üretmez (31). Bağışıklık sisteminin pankreas beta hücrelerine saldırmasının nedenleri tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak genetik, çevresel ve immünolojik faktörlerin bir kombinasyonunun sonucunda otoimmün reaksiyonun başlayabileceği düşünülmektedir. Ayrıca toksinler veya bazı diyet faktörlerinin de bu reaksiyonu başlatabileceği belirtilmektedir (3). Tip1 diyabet hastalarının çoğunda HLA-DR3 ve/veya DR4 pozitifdir ve bu hastalık HLA-DQA ve DQB genleriyle kuvvetli ilişki göstermektedir (2,32).

Glukoz vücudumuzun birincil enerji kaynağı olup fazlası karaciğerde glikojen olarak depolanır, enerjiye ihtiyaç duyulması halinde glukozla dönüştürülebilir. Sağlıklı kişilerde, glukoz homeostazı çeşitli hormonların etkileşimi ile 70 ila 100 mg/dL arasında tutulur. Pankreastaki langerhans adacıklarında beta hücreleri tarafından üretilen insülin ve alfa hücreleri tarafından üretilen glukagon, kan glukozunun bu sınırlar içinde stabil korunmasında önemli bir rol oynar. DM'nin oluşması sırasında bu hormonlar arasındaki etkileşim işlevsiz hale gelerek dolaşımda insülin neredeyse hiç bulunmaz ama buna karşın plazma glukagon seviyesi yüksektir ve bunun sonucunda katabolik bir süreç başlar. İnsülinojenik uyarılara pankreas beta hücresi ya yanıt veremez ya da yanıtı yetersiz kalır. Bunun sonucunda oluşan katabolik durumu geriye döndürmek, ketozu önlemek, hiperglukagonemiye azaltmak ve kan glukozunu düşürmek gerekir (33,34).

Hastaların çoğunluğunda klinik olarak diyabet tanısı konulmadan immünolojik belirteçler belirir ve pankreas beta hücreleri aşamalı olarak yıkılarak beta hücre kitlesi azalmaya başlar. Bu süreçte normal glukoz toleransı sürdürülmesine rağmen insülin sekresyonu giderek bozulur. Beta hücrelerinin çoğunun (yaklaşık %80'i) tahrip olması sonucunda diyabet belirginleşir. Beta hücresi yıkım hızı bireyler arasında farklılık gösterir ve genellikle bebekler ve çocuklarda hızlı yetişkinlerde yavaştır (3,32). Tip 1 diyabetli hastaların çoğunluğunda bir veya birçok yapıya karşı otoantikor oluştuğu saptanmıştır. Klinik kullanımdaki otoantikorlar adacık hücresi otoantikorları (ICA) ve glutamik asit dekarboksilaz (GAD), insülin, tirozin fosfatazlar (IA-2 ve IA-2b) ve çinko transporter 8 (ZnT8) karşı gelişen otoantikorlardır (2,35). tip 1 diyabetli hastaların

çok az bir kısmı otoantikor negatif olup bu hastalar insülin açısından yetersizdir ve diyabetik ketoasidoz riski altındadır (35).

**Tablo 2.2:** Genel ve spesifik diabetes mellitus türleri (2,3,29)

| <b>Diyabet Türü</b>                                  | <b>Açıklama</b>                                                                                                        |
|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Tip 1 diyabet</b>                                 | Beta hücre yıkımı (çoğunlukla otoimmün aracılı) nedeniyle mutlak insülin eksikliği                                     |
| <b>Tip 2 diyabet</b>                                 | Göreceli insülin eksikliği, insülin direnci ve/veya insülin sekresyonu kaybı                                           |
| <b>Gestasyonel diyabet</b>                           | Gebelik sırasında gelişerek, gebeliğin ikinci veya üçüncü trimesterinde teşhis edilir.                                 |
| <b>Diğer spesifik diyabet türleri:</b>               | Yaygın olmayan diyabet türleridir.                                                                                     |
| • <b>Monojenik diyabet</b>                           | Spesifik gen mutasyonlarına bağlı bazıları yenidoğan döneminde, bazıları ise erken yetişkinlik döneminde ortaya çıkar. |
| • <b>Pankreasın ekzokrin hastalıkları</b>            | Hiperglisemide pankreası etkileyen durumlar (travma, tümör, iltihaplanma vb.)                                          |
| • <b>Endokrin bozukluklar</b>                        | İnsülini antagonize eden hormonların aşırı salgılandığı hastalıklarda ortaya çıkar.                                    |
| • <b>İlaç veya kimyasal kaynaklı</b>                 | Bazı ilaçlar ve kimyasallar insülin sekresyonunu veya etkisini bozar, bazıları ise beta hücrelerini yok edebilir.      |
| • <b>Enfeksiyona bağlı diyabet</b>                   | Bazı virüsler doğrudan beta hücre yıkımı ile ilişkilendirilmiştir.                                                     |
| • <b>İmmün aracılı diyabetin spesifik formları</b>   | Nadir immün aracılı hastalıklarla ilişkili                                                                             |
| • <b>Diyabetle ilişkili diğer genetik sendromlar</b> | Birçok genetik bozukluk ve kromozomal anormallikler diyabet riskini artırır                                            |

İnsülin sekresyonunda yetersizlik kan glukoz düzeyini yükseltir ve bunun sonucunda zamanla karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında metabolik anormalliklere ve çeşitli diyabet komplikasyonlarına neden olmaktadır (2,36,37). Tip 1 diyabetli hastaların yaklaşık 1/3'ünde hayatı tehdit eden diyabetik ketoasidoz gelişir. Tip 1 diyabet çocuklukta sık görülmesine rağmen, her yaşta ortaya

çıkabilmektedir, ayrıca çocukluk çağında en sık görülen kronik hastalıklardan biridir (3). Korumak için günlük insülin enjeksiyonlarına ihtiyaç vardır. Tip 1 diyabetin tipik semptomları aşırı susuzluk, bulanık görme, yatak ıslatma, sık idrara çıkma, enerji eksikliği, yorgunluk, sürekli açlık ve ani kilo kaybıdır (3). Ayrıca bu hastalar addison hastalığı, hashimoto tiroiditi, graves hastalığı, vitiligo hastalığı, otoimmün hepatit, çölyak hastalığı, myastenia gravis ve pernisiyöz anemi gibi diğer otoimmün bozukluklara da eğilimlidir (2).

### **2.1.2.2. Prediyabet ve tip 2 diyabet**

2.1.2.2.a. Prediyabet: Prediyabet (orta derecede hiperglisemi) normal ve diyabetik seviyeler arasındaki kan şekeri seviyeleri (bozulmuş glukoz toleransı ve/veya bozulmuş açlık glukozu) ile tanımlanan diyabet için yüksek riskli bir durumdur. Her yıl prediyabetli kişilerin %5-10'u diyabete hastası olmaktadır. Prediyabetin prevalansı dünya çapında artmaktadır ve uzmanlar 2030 yılına kadar 470 milyondan fazla insanın prediyabet hastası olacağını tahmin etmektedir (38). Prediyabetik kişilerde gelecekte tip 2 diyabet ve diyabete bağlı komplikasyonların gelişme riski artar (38,39). Prediyabette herhangi bir glukoz değişiklikleri saptanmadan önce başlayan insülin direnci (IR) ve beta hücresi disfonksiyonu anormalliklerinin varlığı ile ilişkilidir. Prediyabetik bireyler sağlıklı yaşam tarzı ile diyabet riskini %40-70 oranında azaltabilirler (38).

2.1.2.2.b. Tip 2 diyabet: Bu diyabet formu yetersiz insülin salınımı veya insülin kullanımdaki bozukluklarından kaynaklanmakta olup, dünya çapında tüm diyabetlilerin % 90-95'ini oluşturan en yaygın diyabet türüdür (2). Diyabetin bu formunda genellikle vücut hücreleri insüline tam olarak yanıt veremediğinden (IR) ilk zamanlarda insülin üretimi artışıyla durum dengelenmeye çalışılır. Zaman geçtikçe pankreas beta hücreleri talebe yetişemez ve insülin üretimi yetersiz kalır. Tip 2 diyabet yaygın olarak yaşlılarda görünmesine rağmen çocuklarda ve genç yetişkinlerde de görülmektedir (3). Uygun olmayan beslenme, artan obezite seviyeleri ve fiziksel hareketsizlik tip 2 risk faktörleri arasındadır. Tip 2 diyabet, tip 1 diyabete benzer semptomlarla ortaya çıkabilir, ancak tip 2 diyabette hiperglisemi yavaş yavaş geliştiğinden genel olarak tip 2 diyabetin ortaya çıkışı tamamen klinik semptomsuz da olabilir. Bu da kesin başlangıç zamanı bilinmemesine ve uzun bir ön tanı dönemine neden olur (2,3). Tip 2 diyabetin nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte patogenezinde genetik yatkınlık ve çevresel tetikleyiciler yer almaktadır.

Ayrıca obezite ve artan yaş yanı sıra etnik köken ve aile geçmişi de güçlü tetikleyicilerdir. Bu hastalar sağlıklı bir hayat yaşayabilmeleri için eğitim, destek ve sağlıklı yaşam tarzlarının benimsemesi gerekir. Bu yaşam tarzı kan şekeri seviyelerini kontrol etmek için yeterli olmaz ise antidiyabetik ilaçlar ve insülin enjeksiyonları gerekli olabilir (3).

**2.1.2.2. Gestasyonel diyabet:** Gestasyonel diyabet (GDM) gebelikten önce açık bir şekilde anlaşılamayıp gebeliğin ikinci veya üçüncü trimesterinde teşhis edilen gebeliğin en yaygın tıbbi komplikasyonu olup prevalansı %1-20 arasında değişmektedir. GDM teşhisi konan kadınların durumu doğumdan sonra tipik olarak düzelsede, diyabete (prediyabet ve tip 2 diyabet) yatkındırlar (2,40,41). Gebeliğin erken döneminde hiperglisemisi olan kadınların yanı sıra, plasenta tarafından hormon TNF- $\alpha$ , plasental laktojen ve plasental growth hormonu) üretimine bağlı olarak IR gelişebilir. Ayrıca artan progesteron, östrojen ve kortizol de IR oluşumuna etki edebilir. Oluşan IR, annenin vücudunun insülin kullanmasını zorlaştırır. Periferik IR'yi telafi etmek için pankreas daha fazla insülin salgılanmak zorunda kalır. Ancak pankreas IR'nin metabolik stresine ayak uyduramaz ve diyabet gelişir. Ayrıca ileri yaş, egzersizin azalması, aşırı kilo alımı ve maternal yağ birikiminin artması GDM riskini artırır (2,41).

### 2.1.3. Diyabette Tedavi Yaklaşımları

Diyabet, önemli bir dünya sağlık sorunu olup dünya çapında prevalansı hızla artmaktadır. Bu hastalık insanların yaşam kalitesinin düşmesine ve ölüm oranının artmasına ayrıca sağlık sistemine olağanüstü bir yük binmesine neden olmaktadır (3,28). Dünyada diyabetli birçok insan var olmasına rağmen diyabet tedavisi hala yoğun bir sorun teşkil etmektedir. Tedavi edilmediği takdirde hiperglisemi ve uzun süreli metabolik bozukluklar sonucunda başta gözler, böbrekler, karaciğer, kardiyovasküler ve sinir sistemi olmak üzere tüm vücudun doku ve organlarında zarar vererek ciddi komplikasyonlara neden olur (28).

İnsülinin keşfedilmesinden (1920'lerin başından) bu yana, diyabetin farmakolojik tedavisinde (insülini, insülin sekretagoları, insülin duyarlılaştırıcılar, dipeptidil peptidaz-4 (DPP-4) inhibitörleri, bağırsak lipaz inhibitörü,  $\alpha$ -glukozidaz inhibitörleri, inkretin analogları ve biguanidler gibi geniş bir antidiyabetik ilaç yelpazesi) önemli gelişmeler olmuştur (36). Bunlar arasında geliştirilen eksojen

insülinin, endojen insülinin biyolojik etkilerini tam olarak taklit edemediğini ayrıca eksojen insülinin tedavisinin tutarsız glukoz düşürücü etkilere ve hipoglisemiye neden olabileceği belirtilmiştir (42). Ayrıca diyabette yaygın kullanılan diğer ilaçlar arasında metformin, sülfonilüreler, tiazolidindionlar, glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1) analogları, DPP-4 inhibitörleri ve sodyum glukoz ko-transporter-2 (SGLT-2) inhibitörleri vb. bulunur. Bu ilaçlar, glukozidaz aktivitesini inhibe ederek, peroksizom proliferatör ile aktive olan reseptör gama (PPAR $\gamma$ )'yı aktive ederek, 5'-adenozin monofosfat ile aktive edilmiş protein kinazı (AMPK) fosforile ederek veya DPP4'ü inhibe ederek vb. etkilerle kan glukoz konsantrasyonunu normoglisemik yapmaya çalışırlar (28). Bununla birlikte, birçok çalışmaya rağmen, şu anda kullanılan tedavilerde hipoglisemi, karaciğer ve böbrek toksisitesi, kalp sorunları, gastrointestinal problemler ve kilo artışı gibi sorunlara neden olan birçok yan etkisi vardır (28,36). Bu nedenle, daha iyi tedavi seçeneklerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla son yıllarda ilaçlar ve doğal bileşikler sürekli olarak test edilmektedir (36).

Günümüzde de modern ve yüksek teknolojiye sahip ilaçlar daha yaygın olarak kullanılmakla birlikte yan etkisi daha az olan bitkisel tedavi seçeneklerine yönelim hızlanmıştır. Dünya Sağlık Örgütü tıbbi amaçlar için kullanılan binlerce bitkiyi kayıt altına almıştır. Bunlar arasında diyabet tedavisi için 400'den fazla bitki bulunmaktadır. Bu sayıdan daha fazlası kimyasal molekül olarak geliştirilmiştir. Kan şekeri düzeyine azaltan bu tıbbi bitkiler arasında fenolik bileşikler, flavonoidler, kumarinler ve terpenoidler yer almaktadır. Pycnogenol, acarbose, voglibose ve miglitol antidiyabetik ilaçlar örneklerinden bazılarıdır (6). Bitkilerden ayırıştırma ve saflaştırma yöntemleriyle elde edilen aktif maddeler, birçok antidiyabetik mekanizma ( $\alpha$ -glukozidaz,  $\alpha$ -amilaz ve protein tirozin fosfataz 1B aktivitelerinin inhibisyonunu vb.) aracılığıyla çalıştığı bildirilmektedir. Ancak etkinlikleri ve yan etkileri konusunda tıbbi analiz ve değerlendirmeler devam etmektedir (6–8). Test edilen çeşitli bileşikler arasında, pleiotropik aktivitesi ile resveratrolün önemli bir seçenek olabileceği belirtilmiştir (9). Ancak diğer seçeneklerde olduğu gibi resveratrolün etki mekanizması hakkında yeterli bilgi yoktur.

#### **2.1.8. Deneysel Diyabet Modeli**

Diyabetin patogenezinin anlaşılması, bu hastalıktan korunmanın ve tedavi olanaklarının incelenmesi için deneysel diyabet hayvan modelleri kullanımı

yaygındır. Deneysel diyabet modeli oluşturmak için yaygın olarak pankreatik beta hücrelerine karşı spesifik toksisite gösteren STZ kullanılmaktadır. STZ yapısında bir glukoz molekülü içeren glukoz analogudur. Bu sayede glukoz taşıyıcı-2 (GLUT2) aracılığı ile pankreas beta hücrelerine girer. Burada toksik etki ederek, pankreas beta hücre hasarı ve kaybına neden olur. Bunun sonucunda da glukozla uyarılan insülin salınımını bloke eder ve böylece insülin eksikliği olan diyabeti indükler (36,43–45).

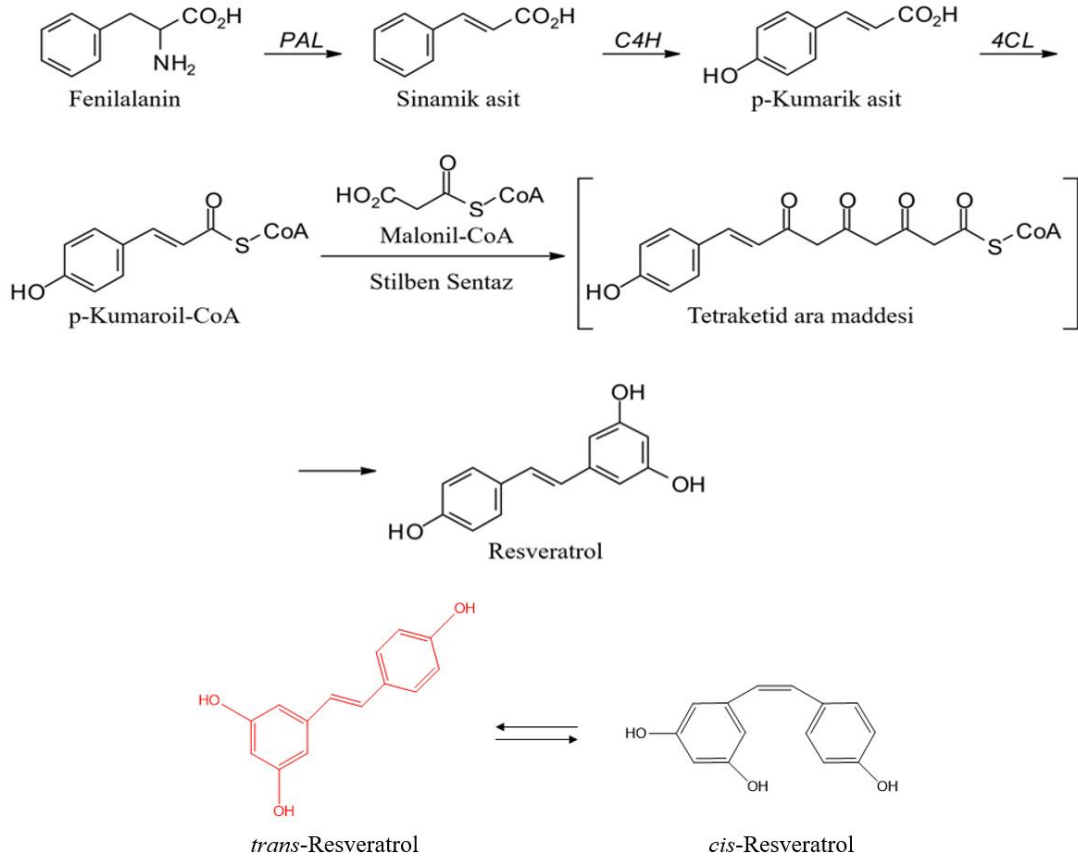
## 2.2. RESVERATROL

Bir bitkisel ürün olan resveratrol (3,4',5-trihidroksi-stilben) doğal olarak oluşan bir polifenoldür. Ayrıca resveratrol bir fitoaleksin olup enfeksiyonların ilerlemesini engelleme yetenekleri ile karakterize edilir. Resveratrol bitkilerde bir savunma mekanizması olarak mantarlar, rizobakteriler, UV ışınları, kimyasal maddeler ve genel olarak bitki için stres oluşturan faktörler gibi parazitlere ve diğer olumsuz koşullara karşı bir direnç mekanizması tarafından üretilir (46,47).

### 2.2.1. Resveratrolün Kimyasal Bileşimi, Moleküler Yapısı ve Kaynağı

Resveratrol bir çift stiren bağı ile birbirine bağlanan iki aromatik halkadan oluşur ve bu çift bağ sayesinde *cis*-(Z) ve *trans*-(E) olmak üzere iki izomerik formda (Şekil 2.1) bulunur. Bunlardan biyolojik olarak daha aktif ve kararlı formu *trans*-(E) olup güneş ışığına, yapay ışığa veya ultraviyole radyasyona (254 veya 366 nm) maruz kaldığında, *cis*-resveratrol'e dönüşür. Ayrıca etanol ve organik çözücüler içinde yüksek oranda çözünürken polar olmayan özellikleri nedeniyle suda daha az çözünür (48). Resveratrol küçük moleküler ağırlıklı (molekül ağırlığı 228,25 g/mol) ve polifenolik karakterde olup beyazımsı ve toz halindedir. Ayrıca kapalı formülü C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub> ve erime noktası 253-255 °C'dir. Bu fiziksel ve kimyasal özellikler resveratrole birçok biyolojik özellik kazandırır (47,49). Resveratrol sentezinden ana sorumlu enzimi stilben sentaz olup üç malonil-CoA molekülü ile bir p-kumaroil-CoA molekülünün reaksiyonunu katalizler (46). Şekil 2.1'de p-kumaroil-CoA molekülü ile ilişkili metabolik yollar göstermektedir.

Resveratrolün üzüm, yaban mersini, yer fıstığı ve antep fıstığında dahil olduğu 70'ten fazla bitki türünde bulunur. Resveratrol sadece bitki türlerinde bulunmaz, aynı zamanda kırmızı şarap gibi işlenmiş ürünlerde de bulunur. Bazı besin kaynaklarının resveratrol miktarları Tablo 2.3'te görüldüğü gibidir.



**Şekil 2.1:** Resveratrolün biyosentezi. PAL: Fenilalanin amonyak-liyaz; C4H: Sinamik asit 4-hidroksilaz; 4CL: 4-kumarat:CoA ligaz; STS: Stilben sentaz (48,50)

### 2.2.2. Resveratrolün Biyolojik Özellikleri

Resveratrol oral olarak alındığında, bağırsakta pasif difüzyonla veya integrinler gibi membran taşıyıcılarla kompleksler oluşturarak emilir (47). Resveratrolün az bir kısmı ileumdan emilirken büyük çoğunluğu jejunumdan emilir ve ayrıca bağırsaklara ulaşabilen resveratrol ve konjugatlarının yaklaşık %6'sı bağırsaklardan emilir (51). Resveratrol kan dolaşımında glukuronid veya sülfat formlarında ya da serbest formda bulunabilir. Serbest form, albümine ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) gibi lipoproteinlere bağlanabilir. Bu kompleksler, sırayla, albümin ve LDL için reseptörlere sahip olan hücresel zarlarda ayrışabilir, resveratrol serbest kalır ve hücrelere girmesine izin verir. Ayrıca resveratrol yağ asitleri ile etkileşime girebilir. Serbest trans-resveratrolün %90'ından fazlasının insan plazma lipoproteinlerine bağlandığı belirtilmektedir (47). Plazmadaki resveratrol ve metabolitlerin yarı ömrü yaklaşık 9,2

saat olup, resveratrolün hızla metabolize olması ve atılması nedeniyle zayıf biyoyararlanıma sahiptir (46,50). Bu durum resveratrolün etkinliğini azaltabilecek bir faktördür.

**Tablo 2.3:** Bazı besin kaynaklarının resveratrol içeriği (48,51,52)

| Bitki türü        | Miktar         |
|-------------------|----------------|
| Üzüm              | 0,16–3,54 µg/g |
| Kuru üzüm kabuğu  | ~ 24,06 µg/g   |
| Kırmızı üzüm suyu | ~ 0,5 mg/L     |
| Üzüm tohumu       | ~ 1 mg/g       |
| Beyaz üzüm suyu   | ~ 0,05 mg/L    |
| Kırmızı şarap     | 0,1–14,5 mg/L  |
| Beyaz şarap       | 0,1–2,1 mg/L   |
| Çilek (donmuş)    | ~ 3,75 µg/g    |
| Yer fıstığı       | 0,02–1,92 µg/g |
| Antep fıstığı     | 0,09–1,67 µg/g |
| Yaban mersini     | ~ 32 ng/g      |
| Kakao             | ~ 1,9 µg/g     |

Resveratrol pasif taşıma veya zar reseptörleri ile etkileşime girerek hücre zarından geçebilir. Bu da resveratrolün hücre dışı ve hücre içi moleküllerle etkileşime girebildiğini ve sinyal yollarını etkileyebildiğini göstermektedir (47). Bu doğal bileşiğin in vivo ve in vitro çalışmaları antikanser, antioksidan, antienflamatuar, antinosiseptif ve antiastmatik aktivite dahil olmak üzere çeşitli farmakolojik aktivitelere sahip olduğu belirtilmektedir. Ayrıca glokom, pankreatit ve osteoartritte etkili bir role sahip olduğu belirtilmektedir. Kardiyovasküler hastalıkları önler, iyileştirir ve mikro dolaşım bozukluklarını iyileştirir. Düşük dozlarda resveratrol, iskemi-reperfüzyon kaynaklı karaciğer hasarını azalttığı ve hepatositleri antioksidan savunma yetmezliğine karşı koruduğu bildirilmiştir (10–13,47).

Memelilerdeki Sir2 homologları sirtuinler olarak adlandırılır. Yedi üyeden Sirtuinler (SIRT1-7), NAD<sup>+</sup> bağımlı sınıf III histon deasetilazların bir üyesidir (53,54). SIRT hücre metabolizmasında yer alır ve DNA onarımı, mitokondri homeostazı, otofaji, enflamatuar yanıt, hücre döngüsü, apoptoz, oksidatif/antioksidatif denge ve yaşlanma gibi birçok hücresel süreçlerin düzenlenmesinde önemli oldukları görülmüştür. Ayrıca

metabolik sendromlar, nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar ve tümörjenez dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların metabolizmasında yer alarak, bu hastalıklara karşı koymada önemli bir rol oynar. Kalori kısıtlamasının SIRT1'i indükleyerek faydalı etkiler yaptığı düşünülmektedir. SIRT1; histon proteinleri H1, H3 ve H4'ün asetil-lizin kalıntılarının deasetilasyonu sağladığı gibi SIRT1 p53, Ku70, FoxOs, PGC1-a, PPAR- $\gamma$  ve NF- $\kappa$ B dahil olmak üzere histon olmayan substratları deasetile etmektedir. SIRT1, bu substratların asetilasyonu ve deasetilasyonu yoluyla proteinlerin transkripsiyonel ve enzimatik aktivitelerini değiştirerek hücresel yaşlanmanın ve organizma ömrünün düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Bu nedenle SIRT1, çeşitli stres koşulları altında hücre savunmasının anahtar bir düzenleyicisi olarak kabul edilmektedir (53,55). SIRT1 seviyesinin düşmesi NF-B'ye bağlı proenflamatuar mediatör salınımının artmasına neden olabilir. Bu durum SIRT1'in enflamatuar süreçte önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir (56). SIRT1 geni ekspresyonu yaşlanmayla birlikte azalır. Buna karşıt artan ekspresyonu ise yaşlanmayı baskılar. Bu sayede SIRT1 sinyal yolağını hedefleyen yeni ilaçlar gelecekte yaşlanmaya bağlı hastalıkları iyileştirmek ve ömrünü uzatmak için potansiyel bir tedavi ya da koruyucu bir ajan olarak düşünülmektedir (53,55). SIRT1, langerhans adacıklarının endokrin hücrelerinde eksprese edilebilir ve burada uncoupling protein 2'yi baskılayarak insülin sekresyonunun iyileştirilmesine ve pankreas beta hücrelerinin sitokin toksisitesinden korunmasına aracılık edebileceği belirtilmektedir (56). SIRT1'in diyabetin önlenmesi ve tedavisinde önemli terapötik potansiyele sahip olabileceği bildirilmiştir (12). Resveratrol SIRT1'e özgü bir aktivatör olup olmadığı halen tartışılmaktadır (12).

Resveratrol güçlü antioksidan özellik göstermekte olup katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerinin aktivitesini artırır ve ayrıca ROS üretiminde yer alan enzimlerin aktivitesini de azaltır (Tablo 2.4). Resveratrol peroksil, süperoksit ve hidroksil anyon radikallerini temizler, heme oksijenaz-1 (HO-1) aktivitesini artırarak pro-oksidan heme'yi biliverdin/bilirubin indirger ve bu sayede de oluşan bilirubin serbest radikalleri temizler ve bununla birlikte endojen antioksidanların seviyesini de artırır. Resveratrolün yüksek yağlı beslenen sıçanlarda LDL'nin oksidasyonunu azaltabileceği veya önleyebileceği ve ayrıca resveratrolün lipid peroksidasyonunu inhibe edebileceği belirtilmiştir (52).

**Tablo 2.4:** Resveratrolün antioksidan aktivitesi (52)

| Aktivite Artışı        | Aktivite Azalışı              |
|------------------------|-------------------------------|
| Katalaz                | NADPH oksidaz                 |
| SOD                    | Miyeloperoksidaz              |
| Glutasyon redüktaz     | Hipoksantin / ksantin oksidaz |
| GSH-Px                 |                               |
| Glutasyon-S-transferaz |                               |
| HO-1                   |                               |

SOD: Süperoksit dismutaz, GSH-Px: Glutasyon peroksidaz; HO-1: Hem oksijenaz, NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat.

Resveratrol hepatositler, adipositler ve iskelet kası tarafından glukoz alımının artması, hepatik glikojen sentezi ve insülin direncinin gecikmeli başlangıcı olmak üzere diyabetik semptomları iyileştirebileceği belirtilmektedir (46). Glukoz metabolizmasında anahtar rolü üstlenen insülin glukoz kullanımını arttıran yolları tetiklemektedir. İskelet kası hücrelerinin glukoz alımında bir düzenleyici protein GLUT4'tür. Diyabetik hayvanlarda GLUT4 ekspresyonu azaldığı saptanmıştır. Resveratrol, muhtemelen plazma membranındaki GLUT4 ekspresyonunu uyararak insülin yokluğunda glukoz alımını veya kullanımını hızlandırmaktadır. Resveratrol bunu glukoz alımı ile ilişkili PI3K/Akt veya AMPK/Akt'ye bağlı sinyal yollarının fosforilasyonunu güçlendirerek yapmaktadır. Ancak, kesin etki mekanizmaları belirsizliğini korumaktadır (57). Resveratrol diyabet ve diyabet komplikasyonlarının tedavisinde umut verici bir molekül olarak güncelliğini korumaktadır.

## **2.3. DİYABETİN FİZYOLOGİSİ İLE İLİŞKİLİ BİYOMOLEKÜLLER**

### **2.3.1. Adrenomedullin**

ADM, 1993 yılında Kitamura ve arkadaşları tarafından insan plateletlerindeki (trombositlerindeki) 3',5'-siklik adenosin monofosfat (cAMP)'ın yüksek aktivitesini izleyerek insan feokromasitomastan (adrenal tümörden) izole edilerek keşfedilmiştir. İnsan ADM'si, 52 amino asitten oluşan peptit olup karboksi ucunda bir aminlenmiş tirozin içerir ve ayrıca 16 ve 21. konumlarında bulunan sistein kalıntıları arasında bir molekül içi disülfid bağına sahiptir. Bu peptit adını adrenal medullada ve adrenal medulladan kaynaklanan feokromositoma dokusunda bol miktarda bulunmasından alır.

Yapısal olarak ADM, kalsitonin gen ile ilişkili peptit (CGRP) ve amilin 6-amino asit halkasını ve karboksi terminalinde amide edilmiş tirozini içermelerinden dolayı yapısal benzerlik göstermektedirler. Kalsitonin benzerliği diğerleri kadar yüksek olmasa da ADM/kalsitonin/CGRP/amilin aynı süper peptid ailesinin üyeleri olarak kabul edilebilir (58,59).

ADM'nin kesin rolü belirsiz olmakla birlikte yerel bir otokrin ve/veya parakrin vazoaaktif hormon gibi görev yapar, ayrıca çeşitli dokularda elektrolit ve sıvı homeostazının korunması kan basıncını düşürücü etkisi ve vazodilatör özelliklere sahiptir (25). ADM'nin yarı ömrünün (22 dakika) kısa olması nedeniyle daha yüksek stabiliteye sahip ADM'nin öncü molekülü olan MR-proADM vekil bir biyobelirteç olarak ölçülür. Bu sayede daha güvenilir ölçümler alınır (60). ADM'nin sağlıklı koşullarda plazma konsantrasyonu düşük iken kronik böbrek yetmezliği, hipertansiyon, miyokard enfarktüs, konjestif kalp yetmezliği ve sepsiste plazma konsantrasyonu dikkat çekici bir şekilde artar. Bu artış hastalığın şiddeti ile paralellik gösterebilir (25,60). Diyabetik anjiyopatilerde vazokonstriktif faktörlerin ve ADM'nin seviyelerinin ve üretiminin arttığını ve NO gibi diğer gevşetici maddelerin azaldığını belirtilmiştir. Diyabetik anjiyopatilerde NO gibi gevşetici maddelerin seviyesinin azalırken adrenomedullinin ve vazokonstriktif faktörlerin seviyesinin arttığı belirtilmiştir. Diyabetteki değişen ADM konsantrasyonunun tesadüfi bir olay mı yoksa diyabetin patogenezinde yer alan telafi edici bir mekanizma mı olduğu hala belirsizliğini korumaktadır (25).

### 2.3.2. Sitokinler

Sitokinler bağışıklık ve enflamasyonda görevli olup otokrin, parakrin ve endokrin şekilde etki ederek hücreler arası stres iletişiminin protein mediatörleridir. Sitokin ailesi birkaç yüz ayrı protein parçasından oluşmakla birlikte bu ailede 37 IL ve çok sayıda kemokin bulunmaktadır. Sitokinler hemen hemen tüm çekirdekli hücrelerde bulunmakta olup bağışıklık aracıları ve düzenleyicileri olarak işlev görürler. Sitokinlerin homeostatik özelliklere sahip olup olmadığı tartışılmakta olup, bazı sitokin seviyelerindeki değişim diyabet patogeneziyle ilişkilendirilmektedir. Sitokin seviyelerindeki bu değişim tedaviye yanıt ve prognoz hakkında bilgi verebilir (61,62). Diyabet üzerine yapılan çalışmalarda TNF- $\alpha$ 'nın karaciğerde glukoz alımını ve IL-6'nın ise glikojen sentezini azaltabileceği ayrıca her ikisinin de insülin reseptör

sinyalizasyonu bozabileceğini belirtilmektedir. Diyabet IL-4 ve IL-10 gibi antienflamatuar mediatörlerin üretimini azalması ve TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve IL-6 gibi proenflamatuar sitokinlerin anormal salgılanmasıyla ilişkili olduğu ayrıca resveratrol tedavisi ile bu durumun tersine dönebileceği belirtilmektedir (46,62).

### 2.3.3. İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz

NO, hemen hemen tüm dokularda bulunan birçok farklı biyokimyasal süreçte hücrel bir sinyal molekülü olarak görev yapan kısa ömürlü gaz halinde serbest bir radikaldir. Düşük NO seviyeleri (pikomolar ila nanomolar) hücre çoğalmasını ve hayatta kalması üzerine etki ederken, yüksek NO seviyeleri (mikromolar) ise nitrozatif ve oksidatif stresin artması yoluyla patolojik etkilere neden olduğu belirtilmektedir. NO, nitrik oksit sentaz (NOS) enzim ailesinin katalitik etkisiyle L-arjinin'inden sentez edilir. Bu sentezde kofaktör olarak nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) kullanılır. NOS enzim ailesinin üç izoformu tanımlanmış olup bunlar endotelial NOS (eNOS), nöronal NOS (nNOS) ve indüklenebilir NOS (iNOS)'tur (26,63). iNOS'tan türetilen NO'nun yara onarımı, kan basıncı regülasyonu, ve konak savunma mekanizmaları gibi çok sayıda fizyolojik olayda önemli rol oynar (64). Hem nNOS hem de eNOS, fizyolojik koşullar altında düşük NO seviyeleri eksprese ederken doğuştan gelen bağışıklık sisteminde görevli olan iNOS sadece patofizyolojik koşullar altında güçlü bir şekilde yukarı regüle edilir. Geçici NO üretimi, stres koşullarıyla başa çıkmak için metabolizmayı modüle edebilir. iNOS M1 makrofaj aktivasyonunu düzenler bununla birlikte başlıca etkilediği sitokinler TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , ve IFN- $\gamma$  olup ayrıca bağışıklık hücreleri üzerine önemli etkileri vardır (26,63–65). iNOS aktivasyonu, IR'nin potansiyel bir nedeni olarak gösterilmektedir. Ayrıca IR indükleyiciler de (obezite, yağ asitleri, yaşlanma, endotoksinler, proenflamatuar sitokinler vb.) iNOS'un yukarı regülesini arttırır (26,63,65). iNOS'un yukarı regüle olaması ile aşırı NO üretimi olur ve bu üretilen NO glukoz ve lipit metabolizması önemli bir rol oynayabileceği ve ayrıca obezite, diyabet, enflamasyon, enfeksiyon, neoplastik hastalıklar, karaciğer hastalıkları ve kardiyovasküler sistem hastalıkları dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların patogenezi ve ilerlemesinde rolü olduğu belirtilmektedir (26,63–65).

Diyabette beta hücre yıkımında sitokinlerin rolünün olabileceği belirtilmesine rağmen bu mekanizmalar net değildir. Sitokinlerin tip 1 diyabette etkin bir rol oynayarak pankreas beta hücrelerinin yıkımında görev aldığı belirtilmektedir. Pankreas

adacıklarında iNOS aracılığıyla NO üretimini IL-1 $\beta$  tek başına veya IFN- $\gamma$  ile birlikte yapabilir (56). Resveratrol iNOS, NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TGF- $\beta$ 1 ve siklooksijenaz-2 (COX-2) gibi çeşitli enflamatuvar biyobelirteçlerin aşağı regülasyonuna aracılık ederken IL-10 anti-enflamatuvarıda yukarı yönlü regüle edebilmektedir (46,49).

#### **2.3.4. Total Antioksidan ve Total Oksidan Kapasite**

Oksidatif stres, oksidan ve antioksidan içeriği arasındaki bir dengesizliği ifade eder. Oksidatif stres genellikle nispeten yüksek ROS konsantrasyonuna ve/veya ROS'a karşı antioksidan savunma sisteminde bir azalmaya maruz kaldıktan sonra ortaya çıkar. Böylece hücrelerin oksidan içeriği normal antioksidan nötürleştirme kapasitesini aşarak hücre organelleri, membran lipitleri, nükleer ve mitokondriyal DNA ve proteinler gibi makromoleküllerin oksidasyonuna neden olur. Daha sonra hücre ölümüne neden olur. Oksidatif stres doku hasarında temel bir rol oynadığı ayrıca hipertansiyon, diyabet, iskemik durumlar, kardiyovasküler hastalıklar, ateroskleroz, artrit, kanser, erken yaşlanma ve Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde önemli bir rol oynar (66–68).

Artmış oksidatif stresinin diyabetin oluşumundaki hücresel değişikliklere neden olabileceği belirtilmektedir. Diyabette çoklu metabolik yolların aktivasyonu, ROS'un oluşumunun artmasına neden olur. ROS'un oksidatif etkileri genellikle hem endojen hem de eksojen antioksidanlar tarafından kontrol edilir. Diyabette glukoz seviyesinin uzun süre yüksek kalması (hiperglisemik ortam) bir yandan serbest radikalleri beslerken, diğer yandan da endojen antioksidan savunma sistemini birçok yönden bozarak dengeyi oksidatif strese doğru kaydırır (69,70). Kumar ve arkadaşları STZ ile indüklenmiş diyabetli erkek sıçanları 2 hafta süresince 10 ve 20 mg/kg IP olarak resveratrol ile tedavi etmişlerdir. Çalışma sonucunda resveratrolün oksidatif stresi ve DNA parçalanmasını azaltarak diyabetik nöropatide koruyucu etki gösterdiğini belirtmişlerdir (71). Oksidatif stresin belirlenmesi için toplam antioksidan kapasite (TAS) ve toplam oksidan kapasite (TOS), sıklıkla kullanılan parametrelerdir.

#### **2.3.5. Malondialdehit**

Malondialdehit (MDA), hem lipit oksidasyonu hem de prostaglandin ve tromboksan sentezinin bir yan ürünü olarak üretilen oldukça toksik bir üründür. Diyabette konsantrasyonunun önemli ölçüde artabileceği belirtilmektedir. MDA,

proteinler ve fosfolipitlerle geri döndürülemez şekilde reaksiyona girerek yapılarını bozar (72).

Hücrel membranlar, organel membranları ve lipoproteinler gibi yüksek çoklu doymamış yağ asitleri özellikle "lipit peroksidasyonu" adı verilen ROS hasarına karşı hassastır (67,73). Lipit peroksidasyonu, serbest radikal (hidroksil radikalleri, oksil radikalleri ve peroksil radikalleri gibi) türlerinin lipitlerden elektron kopararak reaktif ara maddeler ürettiği ve bu reaktif ara maddelerinde farklı reaksiyonlara girerek hücre yıkımına neden olabileceği bir süreçtir (73,74). Lipit peroksidasyonu, hücre zarındaki doymamış yağ asitlerine zarar vererek zar geçirgenliğinde bir artışa yol açabilir ve bunun sonucunda apoptozu indükleyerek hücre ölümüne neden olur (68,73).

Hücre zarındaki okside olmuş doymamış yağ asitler birçok enflamatuvar hastalıkta önemli bir rol oynayabilir ve genellikle proenflamatuvar değişime aracılık edebilir (73). lipit peroksidasyonunu değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan biyobelirteç MDA'dır (68). MDA'nın özellikle proteinlere ve DNA'ya karşı yüksek reaktivite göstermesinden dolayı toksik özellik gösterir (72). Anormal derecede yüksek serbest radikal seviyeleri ve antioksidan savunma mekanizmalarının azalmasıyla oksidatif stres artarak karbonhidrat, lipit, protein ve nükleik asitlerin hasar görmesine ve lipit peroksidasyonunun artmasına neden olur. Bu durumun IR'nin ve DM'nin komplikasyonlarının gelişimini ilişkili olduğu belirtilmektedir (69,75).

Moridi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada STZ ile indüklenmiş diyabetli erkek sıçanları her grupta 8 sıçan olacak şekilde dört gruba ayırdılar. Bu gruplar 30 gün boyunca sırasıyla oral olarak 1, 5 ve 10 mg/kg olarak resveratrol ile ve resveratrol olmadan tedavi edildi. Resveratrol ile tedavi edilen diyabetli sıçanlarda, IR, böbrek dokusunda MDA ve plazma glukoz seviyeleri önemli ölçüde azaldığı ayrıca insülin ve antioksidan seviyelerinin önemli ölçüde arttığını tespit etmişlerdir (76). Gallou ve arkadaşları 57 tip 1 diyabetli hasta, 60 tip 2 diyabetli hasta ve 53 kontrolde plazma MDA düzeylerini karşılaştırdılar. Hem tip1 ve hem de tip2 diyabetik hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek olduğunu bulmuşlardır (77). Noberasco ve arkadaşları 67 diyabet (20 tip 1 ve 47 tip 2 diyabet) hastasında 40 sağlıklı kontrole kıyasla trigliseridler, açlık kan şekeri, HbA1c ve plazma MDA düzeylerini daha yüksek bulmuşlardır (78). Bunların aksine Reis ve arkadaşları tip 1 diyabetli ancak kronik komplikasyonları olmayan 42 hasta ve 24 sağlıklı birey arasındaki plazmadaki MDA seviyeleri benzer bulmuşlardır (79).

### 2.3.6. Melatonin

Vücudumuzun bilinen en potent antioksidanı olan melatonin ise pineal bez tarafından salgılanan bir nörohormondur. Melatonin immün hücre üretimi ve fonksiyonunun modülatörüdür. Melatoninin en etkin fonksiyonlarından biri de oldukça güçlü bir serbest radikal temizleyici olmasıdır ve bu etkinin yanı sıra süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi enzimleri aktive ederek dolaylı antioksidan aktivitede gösterir (14,15,24,68). Melatonin vücudun birçok biyolojik ve fizyolojik süreçlerinde yer alır, bunlardan başlıcaları sirkadiyen ritim, uyku, immün sistem düzenlenmesi, lipid peroksidasyonunu engellemesi, pro-oksidatif enzim eNOS'u inhibe etmesi, apoptozu uyararak kanseri engelleyebilmesi ayrıca mitokondrinin elektron taşıma zincirinin etkinliğini artırarak fazla ROS oluşumunu azaltması, fizyolojik antioksidanların aktivitesini uyarması ve bu antioksidanları oksidatif hasardan koruması olarak sıralanabilir (15–17,68). Melatoninin, STZ ile indüklenen diyabetik sıçanların böbrek dokusunda lipid peroksidasyonunu azalttığı ve mezenjiyal matrisin genişlemesini ve glomerüler bazal membran kalınlaşmasını inhibe ederek diyabetik nefropatiyi üzerine de olumlu etki gösterdiği bildirildi.

Melatonin vücudumuz da doğal olarak üretilen ve karanlıkta (veya gece) seviyesi artan bir hormondur. Geceleri insülin seviyesinin düşüken melatonin seviyesinin yüksek olması sanki aralarında ters bir ilişki olması gerektiğini düşündürür. Bu durum gece boyunca yemek yenmediğinden insüline çok az ihtiyaç duyulmasından da kaynaklı olabilir. Tip 2 diyabetli hastalarında insülin düzeylerinde yükselme ve melatonin düzeyinde bir azalma tespit edilmiştir. Pankreas beta hücreleri incelendiğinde melatonin reseptörleri MTNR1A ve MTNR1B bulunduğu ve tip 2 diyabet hastalarında MTNR1B geninin mRNA'sının adacıklarda aşırı eksprese edildiği belirtilmiştir. Bu hastaların melatonin etkilerine karşı daha hassas olabilecekleri belirtilmiştir. Ayrıca da Lyssenko ve ark. pankreas beta hücrelerinin hücre kültürü modelinde, melatoninin insülin salınımını baskıladığını belirtmişlerdir (16). Melatoninin insülin salgılanması, kan glukozu ve karbonhidrat metabolizması üzerindeki etkisine dair tutarsız veriler bulunmaktadır. Birçok rapor melatoninin glukoz kaynaklı insülin salgılanmasını azalttığını (19–21,80,81) ve kan şekeri düzeylerini artırdığını ileri sürmektedir (81–83). Bunların aksine bazı çalışmalarda melatonin veya diğer bazı pineal bileşiklerin, hipoglisemi ve artmış glukoz toleransının eşlik ettiği insülin benzeri bir etki sergilediği

belirtilmiştir (21–23,84). Bunlara ilave olarak melatonin uygulamasının, IFN- $\gamma$ , IL-2 ve TNF- $\alpha$ 'nın salgılanmasını uyardığı belirtilmektedir (14,15,24).



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. DENEYSEL YÖNTEM

Analitik prospektif araştırma türünde deneysel bir çalışma olarak planlanan çalışmada 250-350 gram ağırlığında ve 16-20 haftalık 21 Sprague-Dawley albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar deney hayvanları laboratuvarında ortam ısısının 20-22 °C ve nemin %55-60 olduğu havalandırması olan bir ortamda, 12 saatlik aydınlık/karanlık döngüleri olan bir odada tutuldular. Sıçanlar özel kafesler içinde standart pellet yem ve çeşme suyu ile beslendiler. Ayrıca her gün altları temizlendi. Çalışmamız için Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan onay alındı (Etik kurul no: 2021-08/11). Sıçanların seçimi rastgele olacak şekilde her grupta 7 sıçan olup, 3 ayrı gruba (grup-I, grup-II ve grup-III) ayrıldı. Sıçanlar 12 saat aç bırakıldı (pellet yemler alındı) ve sonra ağırlıkları tartılarak grup II ve III'e diyabet gelişmesi için taze hazırlanmış 0,5mL (0,1 M, pH 4,5) sodyum-sitrat tamponunda çözdürülmüş 60 mg/kg dozunda (hayvanın vücut ağırlığına göre kg başına 60 mg) STZ çözeltisi IP olarak tek doz uygulandı (85–87). STZ uygulamasından sonra deneklere pellet yem ve su vermeye başlandı. Çözücülere bağlı metabolik etkileri bertaraf edebilmek için diyabetik olmayan kontrol grubuna (grup-I) diyabetik gruplara (grup-II ve III) verilen miktar ile eşdeğer miktarda sodyum-sitrat tamponu uygulandı. STZ uygulamasından 48 saat sonra tüm sıçanların arka ayak dorsal veninden glukoz ölçümü için kan alındı. Glukometre ile kan glukoz düzeyleri ölçüldü. Kan glukoz değeri 200 mg/dL'nin üzerinde olan sıçanlarda diyabet gelişmiş olduğu kabul edildi (86) Zhu Wang ve arkadaşlarının sıçanların normal kan düzeylerini saptamak amacıyla yaptıkları çalışmada, açlık 135 mg/dL (7,5 mmol/L) ve tokluk 187 mg/dL (10,4 mmol/L) olarak bildirmişlerdir (88). Bu çalışma verileri baz alınarak kan glukoz düzeyi 135'in altında olan sıçanlar kontrol grubuna dahil edilmiştir. Kan glukoz düzeyi için plazma örnekleri kullanıldığında plazma/tam kan dönüşümü için 1,11 faktörü kullanıldı (89).

STZ ( $\geq 75\%$   $\alpha$ -anomer basis,  $\geq 98\%$  HPLC) Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA) firmasından temin edildi.

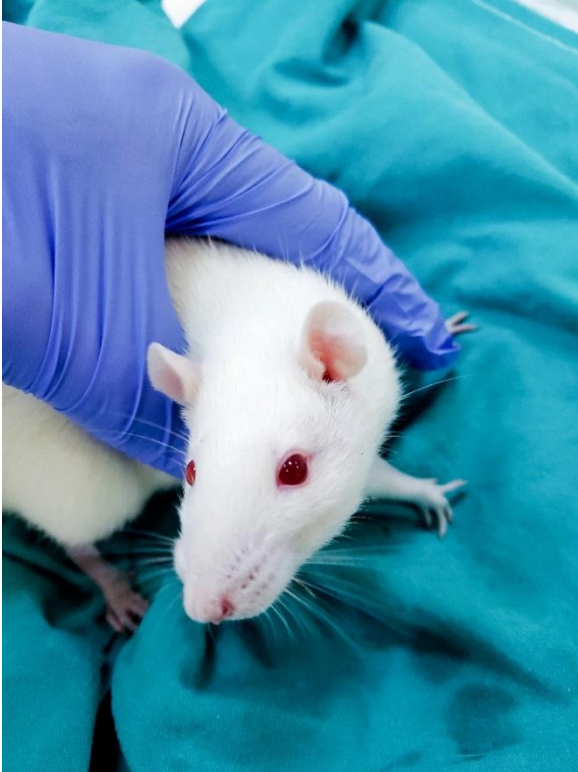
### 3.2. ÇALIŞMA GRUPLARININ OLUŞTURULMASI

Grup-I (Kontrol Grubu, n=7): Bu gruptaki hayvanlara bir kez 0,5 mL sodyum sitrat tamponu yanı sıra 21 gün boyunca 0,6 mL etanol çözeltisi (etanol-salin) IP olarak uygulandı. Buradaki amaç sırasıyla STZ ve resveratrolün içinde çözündüğü sodyum sitrat ve etanol çözeltilerine bağlı olası etkileri bertaraf etmektir.

Grup-II (Diyabet Grubu, Sham Grubu, n=7): Bu gruptaki hayvanlara deneysel diyabet oluşturulduktan sonra tedavi grubuna çözücü olarak verilen miktara eşdeğer etanol çözeltisi IP yolla uygulandı.

Grup-III (Resveratrol Tedavi Grubu, n=7): Diyabet oluştuktan sonra 21 gün süresince 5 mg/kg/gün resveratrol (Sigma, R5010,  $\geq 99\%$  HPLC, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) 0,6 mL etanol çözeltisi ile IP yolla uygulandı. Bu grup tedavi grubu olarak kabul edildi.

Tüm uygulamalar 21 gün boyunca her gün 18.00-19.00 saatleri arasında yapıldı. Deney süresince sıçanların hidrasyonu sık sık kontrol edildi.



**Şekil 3.1:** Deney sürecince deney hayvanlarının sağlık durumu kontrolü



**Şekil 3.2:** Kimyasalların ve deney hayvanlarının tartımında kullanılan teraziler



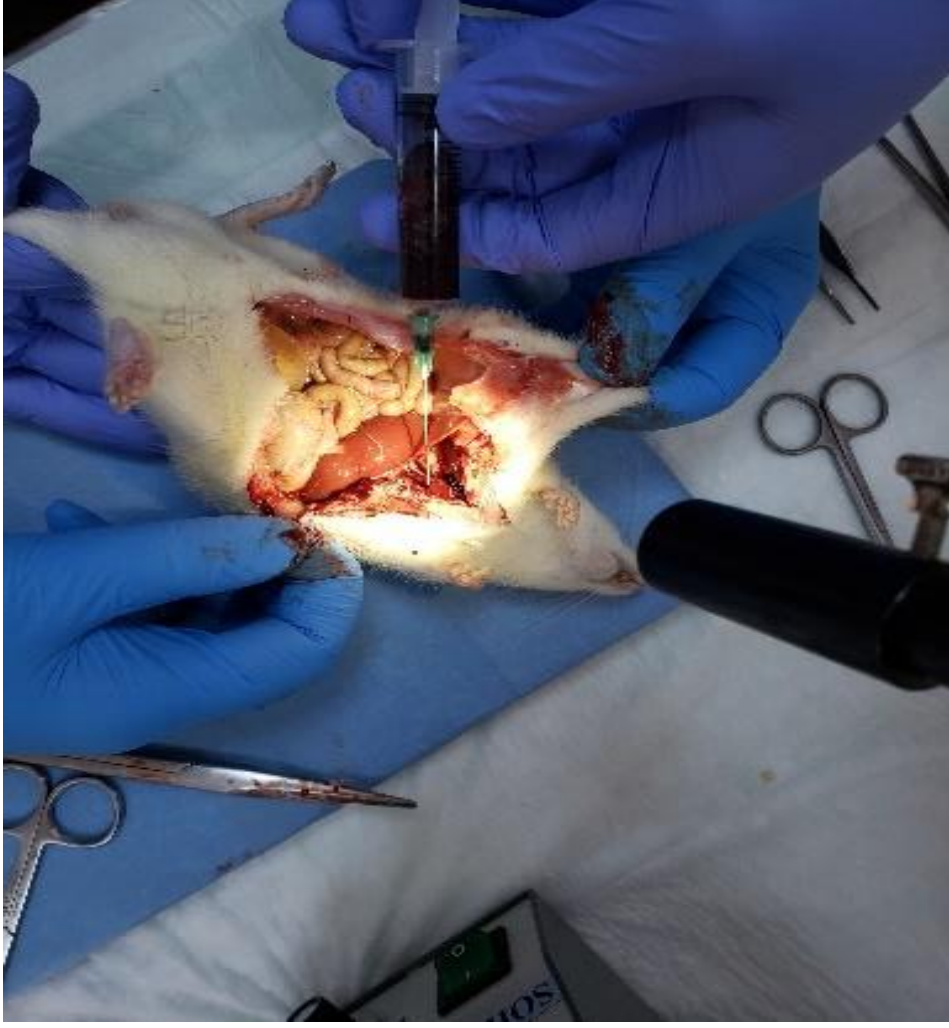
**Şekil 3.3:** Deney hayvanlarına yapılacak işlem öncesi hazırlık. Penset, cerrahi makaslar, kan alma tüpleri, enjektör, eldivenler, batikon ve steril spanç işlem için hazırda tutulması gerekli malzemelerdendir



**Şekil 3.4:** Deney hayvanlarına ketamin/ksilazin anestezisi uygulaması



**Şekil 3.5:** Sıçanların karın boşluğuna girme işlemi. Karın boşluğuna cerrahi makas kullanılarak orta hat kesisiyle girildi



**Şekil 3.6:** Ötenazi öncesi intrakardiyak kan alımı uygulaması

### **3.3. DENEY HAYVANLARINDA KAN ALIMI VE SERUM ELDESİ**

Anestezi öncesi cerrahi işlem için gerekli olan malzemeler hazırlandı (Şekil 3.3). Bütün sıçanlara 22. gün ketamin/ksilazin (80/10 mg/kg) anestezisi uygulandı (Şekil 3.4). Yeterli anestezi sağlanamadığında, başlangıç dozunun 1/3'ü idame dozu olarak tekrarlandı. Anestezi altında orta hat kesisiyle karın boşluğuna girildi (Şekil 3.5) ve ortalama 8 mL intrakardiyak kan alımını (Şekil 3.6) takiben servikal dislokasyon işlemi ile ötenazi uygulandı. Alınan kan serum tüplerine (BD SST™ II Advance Serum Separatör Tüp) aktarıldı. Kanlar serum tüplerine alındıktan sonra yavaşça 5-6 kez alt üst edilerek, pıhtılaşma için 30 dakika beklendi. Pıhtılaşma gerçekleşikten sonra serum tüpleri oda sıcaklığında (25 °C) 10 dakika 1300-2000 x g'de santrifüj yapıldı. Santrifüj işlemi yapıldıktan sonra elde edilen serumlar 0,5

mL'lik mikrosantrifüj tüplerine alikotlandı. Daha sonra -80 °C'deki derin dondurucuya konularak ölçüm gününe kadar saklandı.

Elde edilen serumlardan glukoz, iNOS, melatonin, MDA, MR-proADM, IL-10, IL-6, TNF- $\alpha$ , TAS ve TOS düzeyleri ölçüldü. iNOS, melatonin, MDA, MR-proADM, IL-10, IL-6, TNF- $\alpha$ , TAS ve TOS düzeyleri Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) yöntemi kullanılarak ölçüldü. Sıçan glukoz düzeyleri glukoz oksidaz (GOD) - peroksidaz (POD) yöntemi kullanılarak ölçüldü.

### **3.4. KULLANILAN CİHAZ VE KİMYASALLAR**

#### **3.4.1. Kimyasallar**

- STZ (Sigma, S0130, CAS No: 18883-66-4)
- Resveratrol (3,4',5-Trihidroksi-trans-stilben, Sigma, R5010, CAS No: 501-36-0)
- Sitrik asit monohidrat (Sigma-Aldrich, C1909, CAS No: 5949-29-1)
- Tri-sodyum sitrat dihidrat (İsolab, 969.046, CAS No: 6132-04-3)
- Etanol (Emsure, 100983, CAS No: 64-17-5)
- Ketamin (Vem ilaç, Ketax)
- Ksilazin (baVET, Basilazin)

#### **3.4.2. Cihazlar**

- Mikro ELISA yıkayıcı ve okuyucu (BioTek Instrument, Inc, USA)
- +4 °C buzdolabı (KW Apparecchi Scientifici, İtalya) ve -80 °C derin dondurucu (pHcbi, Japonya)
- Hassas terazi (Shimadzu, Filipinler), analitik terazi (Shimadzu, Filipinler), vortex (Daihan, Kore), manyetik karıştırıcı (Daihan, Kore), pH metre (Mettler Toledo, İsviçre) ve glukometre (IME-DC, Almanya).

### 3.5. PARAMETRELERİN İNCELENMESİ

#### 3.5.1 İnterlökin-6 Test Prosedürü

Sıçan serum IL-6 düzeyleri, çift antikorlu sandwich-ELISA yöntemi ile çalışan kitler (Elabscience Biotechnology Co. Ltd, Wuhan, China, katalog numarası: E-EL-R0015) kullanılarak analiz edildi.

Mikro ELISA plate kuyucukları daha önceden, sıçan IL-6 antikoruna kaplanmıştır. Kuyucuklara IL-6 bulunan numune eklenir. Kuyucuklarına konan numunelerdeki IL-6 bu spesifik antikor ile birleştirilmek üzere inkubasyona bırakılır. IL-6 antikoruna ve IL-6 birleşerek kompleks oluşturur. Daha sonra ortama avidin-HRP konjugatına özgü biyotinlenmiş bir saptama antikoruna konur. Avidin-Horseradish Peroxidase (Avidin-HRP) konjugatına özgü biyotinlenmiş bir saptama antikoruna kompleksteki IL-6 ile birleştirilir. Belirli bir inkubasyon süresinden sonra serbest bileşenler yıkanır. Ortama substrat solüsyonu eklenir. Yalnızca sıçan IL-6, biyotinlenmiş saptama antikoruna ve Avidin-HRP konjugatı içeren kuyucuklarda mavi renk oluşur. Enzim-substrat reaksiyonu stop çözeltisinin eklenmesiyle sona erdirilir ve renk sarıya döner. Sıçan IL-6 düzeyiyle orantılı olarak oluşan optik yoğunluk (OD), 450 nm  $\pm$  2 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. IL-6 testi performans kriterleri tablo Tablo 3.1’de verilmiştir.

**Tablo 3.1:** IL-6 testi ELISA kiti performans verileri

| Analit      | Ölçüm aralığı | Sensitivite | Intraassay % CV | Interassay %CV |
|-------------|---------------|-------------|-----------------|----------------|
| IL-6, pg/mL | 12,5-800      | 7,5         | < % 10          | < % 10         |

CV: Varyasyon Katsayısı, IL: İnterlökin ELISA: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay

#### 3.5.2. Tümör Nekroz Faktörü Alfa Test Prosedürü

Sıçan serum TNF- $\alpha$  düzeyleri, çift antikorlu sandwich-ELISA yöntemi ile çalışan kitler (Elabscience Biotechnology Co. Ltd, Wuhan, China, katalog numarası: E-EL-R0019)) kullanılarak analiz edildi.

Mikro ELISA plate kuyucukları daha önceden, sıçan TNF- $\alpha$  antikoruna kaplanmıştır. Kuyucuklara numune eklenir. Kuyucuklarına konan numunelerdeki TNF- $\alpha$  bu spesifik antikor ile birleştirilmek üzere inkubasyona bırakılır. TNF- $\alpha$  antikoruna ve

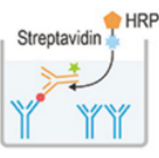
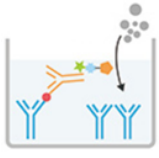
TNF- $\alpha$  birleşerek kompleks oluşturur. Daha sonra ortama avidin-HRP konjugatına özgü biyotinlenmiş bir saptama antikoru konur. Avidin-HRP konjugatına özgü biyotinlenmiş bir saptama antikoru kompleksteki TNF- $\alpha$ 'ya bağlanır. Belirli bir inkubasyon süresinden sonra serbest bileşenler yıkanır. Ortama substrat solüsyonu eklenir. Yalnızca sıçan TNF- $\alpha$ , biyotinlenmiş saptama antikoru ve Avidin-HRP konjugatı içeren kuyucuklarda mavi renk oluşur. Enzim-substrat reaksiyonu stop çözeltisinin eklenmesiyle sona erdirilir ve renk sarıya döner. Sıçan TNF- $\alpha$  düzeyiyle orantılı olarak oluşan optik yoğunluk (OD), 450 nm  $\pm$  2 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. TNF- $\alpha$  testi performans kriterleri tablo Tablo 3.2'de verilmiştir.

**Tablo 3.2:** TNF- $\alpha$ . testi ELISA kiti performans verileri

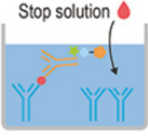
| Analit                | Ölçüm aralığı | Sensitivite | Intraassay<br>% CV | Interassay<br>%CV |
|-----------------------|---------------|-------------|--------------------|-------------------|
| TNF- $\alpha$ , pg/mL | 78,13-5000    | 46,88       | < % 10             | < % 10            |

CV: Varyasyon Katsayısı, TNF- $\alpha$ : Tümör Nekrozis Faktor Alfa

**Tablo 3.3:** IL-6 ve TNF- $\alpha$  test prosedür aşamaları

|                                                                                     |                                                                                                                                                                                                          |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | 1. Kuyucuklara 100 $\mu$ L standart veya numune eklendi. Plakanın üstü film ile örtülerek, 37 °C'de 90 dakika inkübe edildi.                                                                             |
|  | 2. Bütün kuyulardan sıvı aspire edildi, hemen ardından her kuyuya 100 $\mu$ L Biotinlenmiş Saptama Antikoru Ab solüsyonu eklendi. Plakanın üstü film ile kaplandı, 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi.     |
|  | 3. Solüsyonu her kuyudan aspire edildi. Her kuyucuğa 350 uL yıkama solüsyonu eklenerek yaklaşık 1,5 dakika beklendi. Sonrasında solüsyon her kuyudan aspire edildi. Bu yıkama adımını 3 kez tekrarlandı. |
|  | 4. 100 $\mu$ L HRP konjugat solüsyonu eklendi ve 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. 3. adımda gerçekleştirildiği gibi yıkama işlemini beş kez tekrarlandı.                                                |
|  | 5. 90 $\mu$ L substrat solüsyonu eklendi. Plakanın üstü film ile kapatılarak, ışıktan korunacak şekilde 37 °C'de 15 dakika inkübe edildi.                                                                |

**Tablo 3.3:** (devam)

|                                                                                   |                                                                                                                                                                               |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | 6. 50µL durdurma çözeltisi eklendi.                                                                                                                                           |
|  | 7. Durdurma solüsyonunu ekledikten sonra plaka hemen 450 nm'ye dalga boyuna ayarlanmış mikropilaka okuyucu kullanarak her kuyucuğun optik yoğunluğunu (OD değeri) belirlendi. |

Elabscience Biotechnology data sheet bilgilerinden hazırlanmıştır.

### 3.5.3. İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz Test Prosedürü

Sıçan serum iNOS düzeyleri, çift antikorlu sandwich-ELISA yöntemi ile çalışan kitler (Bioassay Technology Laboratory, Shanghai, China, katalog numarası: E0740Ra) kullanılarak analiz edildi.

ELISA plate kuyucukları daha önceden, sıçan iNOS antikoruna ile kaplanmış. Numunede bulunan iNOS, bu kuyucuklarda bulunan antikorlarla birleşmeye bırakılır. Yıkama işleminden sonra iNOS antikoruna ve iNOS kompleksi üzerine biyotinlenmiş iNOS antikoruna eklenir. Bu biyotinlenmiş iNOS antikoruna kompleks haldeki iNOS'a bağlanır. Daha sonra Streptavidin-HRP eklenir. Bu da biyotinlenmiş iNOS antikoruna bağlanır. İnkübasyondan sonra bağlanmamış Streptavidin-HRP bir yıkama basamağı ile uzaklaştırılır. Daha sonra substrat çözeltisi eklenir. Serum sıçan iNOS miktarı ile orantılı olarak renk değişimi oluşur. Reaksiyon, asidik stop çözeltisi ilave edilerek sona erdirilir. Serum sıçan iNOS düzeyi 450 nm'deki absorban ile pozitif korelasyon gösterir. iNOS testi performans kriterleri Tablo 3.4'de verilmiştir.

**Tablo 3.4:** iNOS testi ELISA kiti performans verileri

| Analit      | Ölçüm aralığı | Sensitivite | Intraassay<br>% CV | Interassay<br>%CV |
|-------------|---------------|-------------|--------------------|-------------------|
| iNOS, ng/mL | 0,5-200       | 0,28        | < % 8              | < % 10            |

CV: Varyasyon Katsayısı, iNOS: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz

#### 3.5.4. Melatonin Test Prosedürü

Sıçan serum melatonin düzeyleri, çift antikorlu sandwich-ELISA yöntemi ile çalışan kitler (Bioassay Technology Laboratory, Shanghai, China, katalog numarası: E0601Ra) kullanılarak analiz edildi.

ELISA plate kuyucukları daha önceden, sıçan melatonin antikoruna ile kaplanmıştır. Numunelerde bulunan melatonin, bu kuyucuklarda bulunan antikorlarla birleşmeye bırakılır. Yıkama işleminden sonra melatonin antikoruna ve melatonin kompleksi üzerine biyotinlenmiş melatonin antikoruna eklenir. Bu biyotinlenmiş melatonin antikoruna kompleks haldeki melatonine bağlanır. Daha sonra Streptavidin-HRP eklenir. Bu da biyotinlenmiş melatonin antikoruna bağlanır. İnkübasyondan sonra bağlanmamış Streptavidin-HRP bir yıkama basamağı ile uzaklaştırılır. Daha sonra substrat çözeltisi eklenir. Serum sıçan melatonin miktarı ile orantılı olarak renk değişimi oluşur. Reaksiyon, asidik stop çözeltisi ilave edilerek sona erdirilir. Serum sıçan melatonin düzeyi 450 nm'deki absorban ile pozitif korelasyon gösterir. melatonin testi performans kriterleri tablo Tablo 3.5’de verilmiştir.

**Tablo 3.5:** Melatonin testi ELISA kiti performans verileri

| Analit          | Ölçüm aralığı | Sensitivite | Intraassay<br>% CV | Interassay<br>%CV |
|-----------------|---------------|-------------|--------------------|-------------------|
| Melatonin, ng/L | 5-1000        | 2,5         | < % 8              | < % 10            |

CV: Varyasyon Katsayısı, melatonin

#### 3.5.5. Malondialdehit Test Prosedürü

Sıçan serum MDA düzeyleri, çift antikorlu sandwich-ELISA yöntemi ile çalışan kitler (Bioassay Technology Laboratory, Shanghai, China, katalog numarası: E0156Ra) kullanılarak analiz edildi.

ELISA plate kuyucukları daha önceden, sıçan MDA antikoruna ile kaplanmıştır. Numunelerde bulunan MDA, bu kuyucuklarda bulunan antikorlarla birleşmeye bırakılır. Yıkama işleminden sonra MDA antikoruna ve MDA kompleksi üzerine biyotinlenmiş MDA antikoruna eklenir. Bu biyotinlenmiş MDA antikoruna kompleks haldeki MDA’ya bağlanır. Daha sonra Streptavidin-HRP eklenir. Bu da biyotinlenmiş MDA antikoruna bağlanır. İnkübasyondan sonra bağlanmamış Streptavidin-HRP bir yıkama basamağı ile

uzaklaştırılır. Daha sonra substrat çözeltisi eklenir. Serum sıçan MDA miktarı ile orantılı olarak renk değişimi oluşur. Reaksiyon, asidik stop çözeltisi ilave edilerek sona erdirilir. Serum sıçan MDA düzeyi 450 nm'deki absorban ile pozitif korelasyon gösterir. MDA testi performans kriterleri Tablo 3.6'da verilmiştir.

**Tablo 3.6:** MDA testi ELISA kiti performans verileri

| Analit              | Ölçüm aralığı | Sensitivite | Intraassay<br>% CV | Interassay<br>%CV |
|---------------------|---------------|-------------|--------------------|-------------------|
| <b>MDA, nmol/mL</b> | 0,05-10       | 0,01        | < % 8              | < % 10            |

CV: Varyasyon Katsayısı, MDA: malondialdehit

### 3.5.6. İnterlökin-10 Test Prosedürü

Sıçan serum IL-10 düzeyleri, çift antikorlu sandwich-ELISA yöntemi ile çalışan kitler (Bioassay Technology Laboratory, Shanghai, China, katalog numarası: E0108Ra) kullanılarak analiz edildi.

ELISA plate kuyucukları daha önceden, sıçan IL-10 antikoruna ile kaplanmıştır. Numunelerde bulunan IL-10, bu kuyucuklarda bulunan antikorlarla birleşmeye bırakılır. Yıkama işleminden sonra IL-10 antikoruna ve IL-10 kompleksi üzerine biyotinlenmiş IL-10 antikoruna eklenir. Bu biyotinlenmiş IL-10 antikoruna kompleks haldeki IL-10'a bağlanır. Daha sonra Streptavidin-HRP eklenir. Bu da biyotinlenmiş IL-10 antikoruna bağlanır. İnkübasyondan sonra bağlanmamış Streptavidin-HRP bir yıkama basamağı ile uzaklaştırılır. Daha sonra substrat çözeltisi eklenir. Serum sıçan IL-10 miktarı ile orantılı olarak renk değişimi oluşur. Reaksiyon, asidik stop çözeltisi ilave edilerek sona erdirilir. Serum sıçan IL-10 düzeyi 450 nm'deki absorban ile pozitif korelasyon gösterir. IL-10 testi performans kriterleri Tablo 3.7 de verilmiştir.

**Tablo 3.7:** IL-10 testi ELISA kiti performans verileri

| Analit              | Ölçüm aralığı | Sensitivite | Intraassay<br>% CV | Interassay<br>%CV |
|---------------------|---------------|-------------|--------------------|-------------------|
| <b>IL-10, pg/mL</b> | 3-900         | 1,51        | < % 8              | < % 10            |

CV: Varyasyon Katsayısı, IL: İnterlökin

### 3.5.7. Mid-Regional Preadrenomedullin Test Prosedürü

Sıçan serum MR-proADM düzeyleri, çift antikorlu sandwich-ELISA yöntemi ile çalışan kitler (Bioassay Technology Laboratory, Shanghai, China, katalog numarası: E2428Ra) kullanılarak analiz edildi.

ELISA plate kuyucukları daha önceden, sıçan MR-proADM antikoruna ile kaplanmıştır. Numunelerde bulunan MR-proADM, bu kuyucuklarda bulunan antikorlarla birleşmeye bırakılır. Yıkama işleminden sonra MR-proADM antikoruna ve MR-proADM kompleksi üzerine biyotinlenmiş MR-proADM antikoruna eklenir. Bu biyotinlenmiş MR-proADM antikoruna kompleks haldeki MR-proADM'ye bağlanır. Daha sonra Streptavidin-HRP eklenir. Bu da biyotinlenmiş MR-proADM antikoruna bağlanır. İnkübasyondan sonra bağlanmamış Streptavidin-HRP bir yıkama basamağı ile uzaklaştırılır. Daha sonra substrat çözeltisi eklenir. Serum sıçan MR-proADM miktarı ile orantılı olarak renk değişimi oluşur. Reaksiyon, asidik stop çözeltisi ilave edilerek sona erdirilir. Serum sıçan MR-proADM düzeyi 450 nm'deki absorbans ile pozitif korelasyon gösterir. MR-proADM testi performans kriterleri Tablo 3.8'de verilmiştir.

**Tablo 3.8:** MR-proADM testi ELISA kiti performans verileri

| Analit          | Ölçüm aralığı | Sensitivite | Intraassay<br>% CV | Interassay<br>%CV |
|-----------------|---------------|-------------|--------------------|-------------------|
| MR-proADM, ng/L | 1-380         | 0,58        | < % 8              | < % 10            |

CV: Varyasyon Katsayısı, MR-proADM

### 3.5.8. Total Antioksidan ve Total Oksidan Kapasite

Sıçan serum TAS ve TOS düzeyleri, çift antikorlu sandwich-ELISA yöntemi ile çalışan kitler (Rat Serum TAS Bioassay Technology Laboratory, Shanghai, China, katalog numarası: E1710Ra ve Rat Serum TOS Bioassay Technology Laboratory, Shanghai, China, katalog numarası: E1512Ra) kullanılarak analiz edildi.

TAS/TOS monoklonal antikorları ile önceden kaplanmış olan kuyucuklara numune eklenir. Belli bir süre inkübe edildikten sonra monoklonal antikorlar numunedeki TAS/TOS ile birleşir. İnkübasyon ve yıkama işleminden sonra, biyotinlenmiş sıçan TAS/TOS antikoruna eklenir. Bu sıçan TAS veya TOS antikoruna immün kompleksteki TAS/TOS'a bağlanır. Daha sonra Streptavidin-HRP eklenir ve bu da biyotinlenmiş TAS/TOS antikoruna bağlanır. İnkübasyon ve yıkama işlemi sonrası

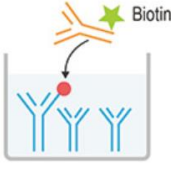
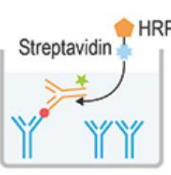
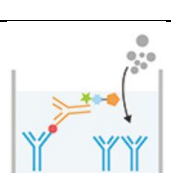
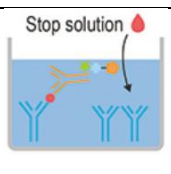
substrat çözeltisi eklenir. Sıçan TAS/TOS düzeyleri ile orantılı olarak renk gelişir. Reaksiyon, asidik stop çözeltisi ilave edilerek sona erdirilir. Absorbans, 450 nm'de ölçülür. Çözeltinin renk tonu 450 nm'de insan TAS/TOS düzeyleri ile pozitif korelasyon gösterir. TAS ve TOS performans kriterleri Tablo 3.9'da verilmiştir.

**Tablo 3.9:** TAS ve TOS testleri ELISA kiti performans kriterleri

| Analit    | Ölçüm aralığı | Sensitivite | Intraassay % CV | Interassay %CV |
|-----------|---------------|-------------|-----------------|----------------|
| TAS, U/mL | 0,02- 60      | 0,013       | < % 8           | < % 10         |
| TOS, U/mL | 0,02 - 60     | 0,013       | < % 8           | < % 10         |

CV: Varyasyon Katsayısı, TAS: Total Antioksidan Kapasite, TOS: Total Oksidan Kapasite

**Tablo 3.10:** iNOS, melatonin, MDA, IL-10, MR-proADM, TAS ve TOS testlerinin prosedür aşamaları

|                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|   | 1. Standart kuyucuklara 50µl standart ve numune kuyucuklarına 40 µl numune eklendi                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|  | 2. Numune kuyucuklarına 10 µl biyotinlenmiş anti-MDA/IL-10/MR-proADM/TAS/TOS antikoru eklendi.                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|  | 3. Numune kuyucuklarına ve standart kuyucuklara 50 µl streptavidin-HRP eklenerek iyice karıştırıldı. Plakanın üstü film ile örtülerek, 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi ve sonrasında tüm kuyucuklar aspire edildi. Her kuyucuğa 350 µL yıkama solüsyonu eklenerek yaklaşık 45 saniye beklendi. Sonrasında solüsyon her kuyudan aspire edildi. Bu yıkama adımını 5 kez tekrarlandı. |
|  | 4. Her kuyucuğa 50 µl substrat solüsyonu A eklendi ve ardından her kuyucuğa 50 µl substrate solüsyonu B eklendi. Plakanın üstü film ile örtülerek, 37 °C'de karanlıkta 10 dakika inkübe edildi.                                                                                                                                                                                     |
|  | 5. Her kuyuya 50µl durdurma solüsyonu eklenerek, mavi renk hemen sarıya dönüştü.                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |

**Tablo 3.10:** (devam)

|                                                                                   |                                                                                                                                                                                              |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | 6. Durdurma solüsyonunu ekledikten sonra plaka 10 dakika içinde 450 nm'ye dalga boyuna ayarlanmış bir mikropilaka okuyucu kullanarak her kuyucuğun optik yoğunluğunu (OD değeri) belirlendi. |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Elabscience Biotechnology data sheet bilgilerinden hazırlanmıştır.

### 3.5.9. Glucose Oksidaz (GOD) - Peroksidaz (POD) Yöntemi

Yöntem, kinetik bir yöntem olup test bir dakikalık süreyi kapsar. Dışarıdan ölçüm küvetine konan glukoz oksidaz enzimi serumdaki glukozu okside eder. Bu oksidasyon esnasında oluşan glukoz miktarıyla orantılı olarak hidrojen peroksit oluşur. Ortamda bulunan ikinci bir enzim (peroksidaz enzimi) varlığında hidrojen peroksit, 4-aminoantipirin ve fenol ile reaksiyona girerek (Trinder Reaksiyonu), kinoneimin denen renkli bir maddeyi oluşturur. Bu renkli kinoneimin molükülünün absorbanansı 520 nm 'de ölçülür. Bu yöntem Sağlık Bilimleri Üniversitesi Sultan 2. Abdülhamid Han Eğitim ve Araştırma Hastanesinde Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988 (CLIA) standartlarına uygun olarak rutin amaçla kullanılmaktadır.

### 3.5. Verilerin İstatistiksel Analizi

Deneyisel çalışmadan elde edilen tüm verilerin istatistiksel analizinde SPSS Statistics 25 IBM (Corp, Chicago, USA) Software ve Microsoft Excel 2010 Software kullanıldı. Normal dağılım gösteren ve grup sayısı 2'den fazla olan bağımsız grupların istatistiksel karşılaştırılması için One-way ANOVA testi kullanıldı. Anlamlı farklılık çıkması durumunda grupların kendi içine birbiriyle karşılaştırılması Tukey-Kramer Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılarak gerçekleştirildi. Verilerin normal dağılıma uygunluk göstermemesi durumunda ise 2'den fazla bağımsız grubun karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi ile yapıldı. Parametrik verilerin korelasyonel çalışmalarında Pearson korelasyon analizi kullanıldı. Nonparametrik veriler için ise Spearman korelasyon analizi kullanıldı. P değeri <0,05 bulunması durumunda gruplar aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. İki değişken arasındaki ilişkinin yönü ve gücüyle ilgilenirken korelasyon katsayısı sonucuna göre yorum yapıldı. 0,30-0,50 düşük, 0,50-0,70 orta,

0,70-0,90 yüksek, 0,90-1,00 çok yüksek pozitif veya negatif ilişki olduğu kabul edildi (90).



## 4. BULGULAR

### 4.1. ÇALIŞMADAKİ SIÇANLARIN ÖZELLİKLERİ

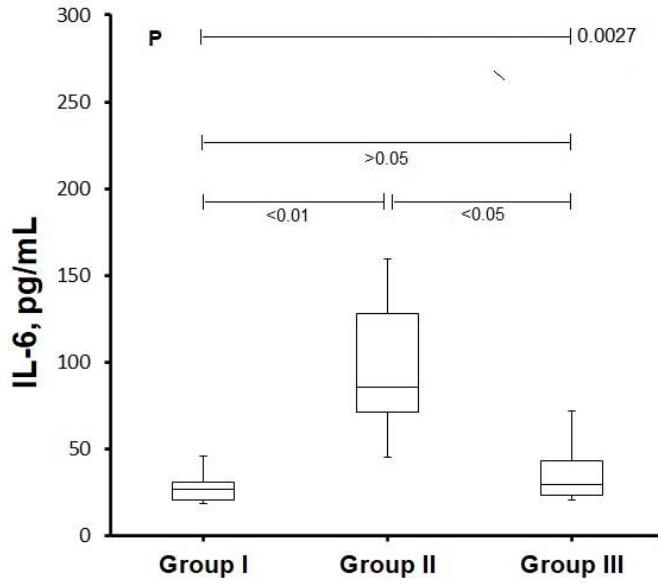
Çalışmada sıçan grupları (grup-I, grup-II ve grup-III)'nın yaş ortalamaları arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark yoktu (sırasıyla, 16-20, 17-20 ve 17-19 hafta;  $p>0,05$ ). Benzer şekilde çalışmadaki sıçan gruplarının ağırlıkları arasında da istatistiksel açıdan anlamlı fark yoktu (274-332, 271-320 ve 270-342 gr;  $p>0,05$ ).

### 4.2. DENEY GRUPLAR ARASINDAKİ KARŞILAŞTIRMALAR

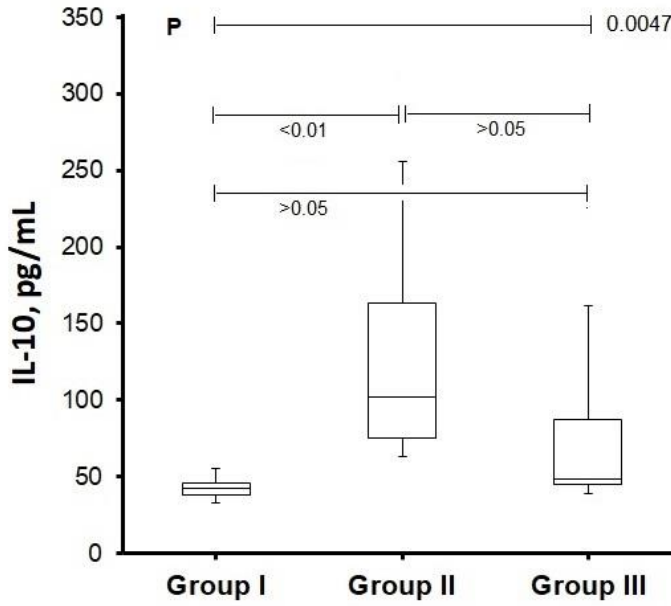
Deney gruplarının çalışma sonundaki serum ortalama glukoz düzeyleri; grup-I için  $104\pm18,1$  mg/dL, grup-II için  $312\pm32,6$  mg/dL ve grup-III için  $247\pm43,8$  mg/dL olarak saptandı (Tablo 4.1). Gruplar karşılaştırıldığında grup-I ve II arasındaki fark grup-I ve III arasındaki farktan daha yüksekti ( $p<0,05$ ).

Deney grupları IL-6 açısından değerlendirildiğinde grup-I'e kıyasla grup-II'nin IL-6 düzeyi yüksek bulundu (sırasıyla  $27,5\pm9,0$  karşı  $98,3\pm44,0$  pg/mL;  $p<0,01$ ) (Tablo 4.1). Grup-II'ye kıyasla resveratrol alan grup-III'teki diyabetik sıçanların IL-6 düzeyi ise daha düşüktü (sırasıyla  $98,3\pm44,0$  karşı  $49,1\pm30,1$  pg/mL;  $p<0,05$ ). Ayrıca Şekil 4.1'de de görüldüğü gibi grup-III'deki diyabetik sıçanların IL-6 düzeyi grup-I'den istatistiksel olarak farklı değildi ( $p>0,05$ ).

Deney grupları IL-10 açısından değerlendirildiğinde kontrol grubu olan grup-I'ya kıyasla grup-II'nin IL-10 düzeyleri çok daha yüksekti (sırasıyla  $42,4\pm6,8$  karşı  $128,4\pm69,8$  pg/mL;  $p<0,05$ ) (Tablo 4.1). Grup-II kıyasla 3 hafta boyunca resveratrol olan grup-III'deki diyabetik sıçanların IL-10 düzeyleri daha düşük bulunmasına rağmen aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (sırasıyla  $128,4\pm69,8$  karşı  $73,5\pm40,7$  pg/mL;  $p>0,05$ ) (Şekil 4.2). Ayrıca grup-I ile grup-III'teki diyabetik sıçanların IL-6 düzeyleri arasında istatistiksel olarak fark bulunmaması, dikkat çekiciydi ( $p>0,05$ ).



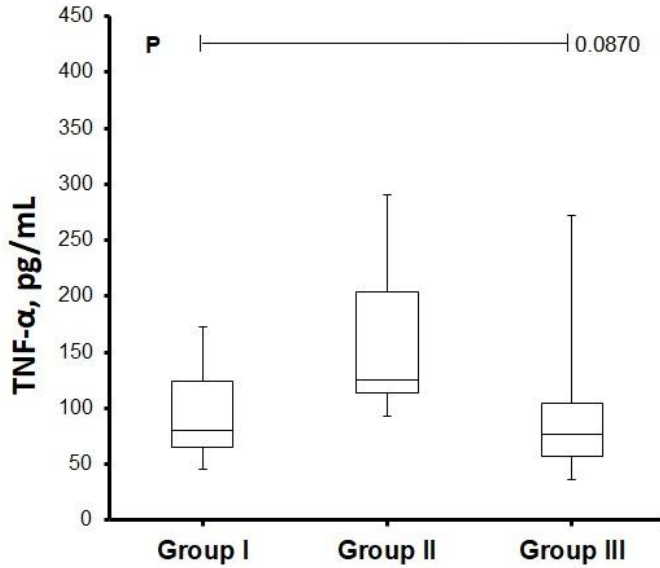
**Şekil 4.1:** Sıçan gruplarına göre serum IL-6 düzeyleri. Grup-II’de IL-6 düzeylerinde belirgin derecede yükseklik görülmektedir.



**Şekil 4.2:** Sıçan gruplarına göre serum IL-10 düzeyleri. Grup-II’de IL-10 düzeylerinde belirgin derecede yükseklik görülmektedir

TNF- $\alpha$  düzeyleri açısından grup-II lehine bir yükseklik gözlenirse de tüm gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi (sırasıyla  $96,6 \pm 44,7$ ,  $163,4 \pm 71,7$  ve  $101,4 \pm 73,8$  pg/mL;  $p > 0,05$ ) (Tablo 4.1) (Şekil 4.3). Ancak hayvan deneylerinde

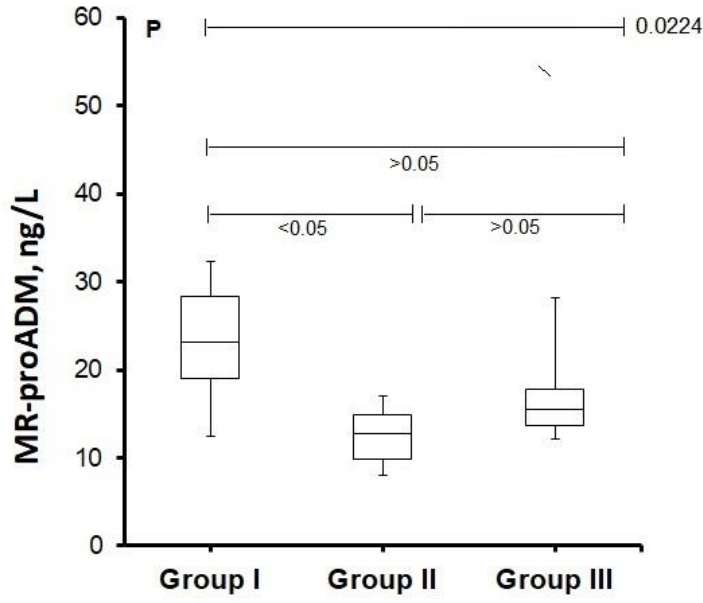
gruplardaki denk sayısı sınırlı tutulmak zorunluluğu olduğundan bu durumun daha geniş bir popülasyonla teyidinin uygun olacağını düşünülmektedir.



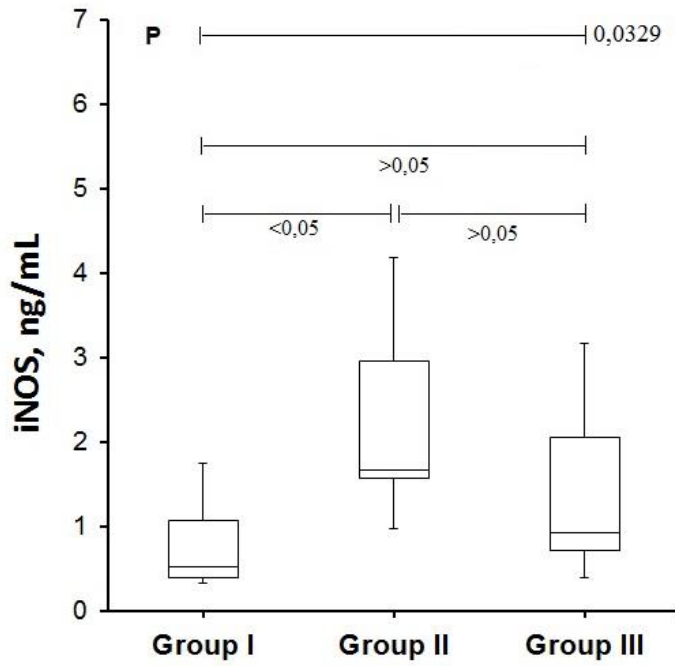
**Şekil 4.3:** Sıçan gruplarına göre serum TNF- $\alpha$  düzeyleri. Serum TNF- $\alpha$  düzeyleri açısından gruplar gözlenmedi

Deney grupları MR-proADM düzeyleri açısından değerlendirildiğinde grup-I'e kıyasla grup-II'nin MR-proADM düzeyleri daha düşüktü (sırasıyla  $23,2 \pm 6,6$  karşı  $12,5 \pm 3,1$  ng/L;  $p < 0,05$ ) (Tablo 4.1). Grup-II kıyasla 3 hafta boyunca resveratrol alan grup-III'deki diyabetik sıçanların MR-proADM düzeyleri daha yüksek bulunmasına rağmen aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (sırasıyla  $12,5 \pm 3,1$  karşı  $16,9 \pm 5,0$  pg/mL;  $p > 0,05$ ) (Şekil 4.4). Yine grup-I ve III arasında MR-proADM düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ( $p > 0,05$ ).

Deney grupları iNOS düzeyleri açısından değerlendirildiğinde grup-I'e kıyasla grup-II'nin iNOS düzeyleri daha yüksekti (sırasıyla  $0,80 \pm 0,55$  karşı  $2,27 \pm 1,12$  ng/mL;  $p < 0,05$ ) (Tablo 4.1). 3 hafta boyunca resveratrol alan grup-III'deki diyabetik sıçanların iNOS düzeyleri grup-II kıyasla daha düşük bulunmasına rağmen aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (sırasıyla  $1,44 \pm 0,96$  karşı  $2,27 \pm 1,12$  ng/mL;  $p > 0,05$ ) (Şekil 4.5). Yine grup-I ve III arasında iNOS düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ( $p > 0,05$ ).



Şekil 4.4: Sıçan gruplarına göre serum MR-proADM düzeyleri. Grup-II'nin MR-proADM düzeylerinde belirgin derecede azalma görülmektedir.



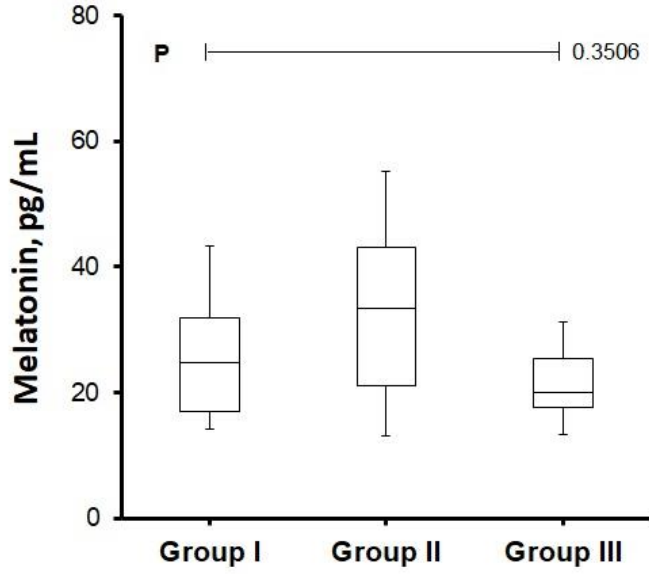
Şekil 4.5: Sıçan gruplarına göre serum iNOS düzeyleri. Grup-II'nin iNOS düzeylerinde belirgin derecede azalma görülmektedir

**Tablo 4.1:** Grupların serum IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , MR-proADM, iNOS ve melatonin düzeyleri açısından karşılaştırılması

|                  | Grup-I                              | Grup-II                       | Grup-III                     | p                   |
|------------------|-------------------------------------|-------------------------------|------------------------------|---------------------|
| n                | 7                                   | 7                             | 7                            | -                   |
| Glukoz, mg/dL    | 104±18.1<br>104(79-130)             | 312±32,6<br>312(265-362)      | 247±43,8<br>255(197-321)     | 0,0004 <sup>a</sup> |
|                  | P* (post-test) <0,001, <0,05, >0,05 |                               |                              |                     |
| IL-6, pg/mL      | 27,5±9,0<br>26,5(18,3-46,0)         | 98,3±44,0<br>85,3(44,9-159)   | 49,1±30,1<br>29,6(20,1-109)  | 0,0027 <sup>a</sup> |
|                  | P* (post-test) <0,01, >0,05, <0,05  |                               |                              |                     |
| IL-10, pg/mL     | 42,4±6,8<br>42,3(32,7-54,9)         | 128,4±69,8<br>102,1(63,3-256) | 73,5±40,7<br>48,5(39,2-162)  | 0,0047 <sup>a</sup> |
|                  | P* (post-test) <0,01, >0,05, >0,05  |                               |                              |                     |
| TNF-α, pg/mL     | 96,6±44,7<br>79,7(45,2-172,9)       | 163,4±71,7<br>125,6(92,4-290) | 101,4±73,8<br>77,1(36,2-273) | 0,0870 <sup>a</sup> |
|                  | P* (post-test) <0,05, >0,05, >0,05  |                               |                              |                     |
| MR-proADM, ng/L* | 23,2±6,6<br>23,2(12,5-32,3)         | 12,5±3,1<br>12,7(8,1-17,0)    | 16,9±5,0<br>15,5(12,1-28,1)  | 0,0224 <sup>a</sup> |
|                  | P* (post-test) <0,05, >0,05, >0,05  |                               |                              |                     |
| iNOS, ng/mL      | 0,80±0,55<br>0,53(0,33-1,75)        | 2,27±1,12<br>1,68(0,98-4,19)  | 1,44±0,96<br>0,94(0,40-3,18) | 0,0329 <sup>a</sup> |
|                  | P* (post-test) <0,05, >0,05, >0,05  |                               |                              |                     |
| Melatonin, pg/mL | 25,7±9,8<br>24,8(14,3-43,2)         | 32,9±14,2<br>33,4(13,1-55,3)  | 21,5±5,8<br>19,9(13,3-31,3)  | 0,3506 <sup>a</sup> |

<sup>a</sup> Kruskal-Wallis test (Nonparametrik ANOVA), P değeri yaklaşıktır (ki-kare dağılımından oluşur). \*Eğer p değeri <0,05 bulunur ise, gruplar arasındaki p değeri (sırasıyla, grup I-II, grup I-III ve grup II-III) post-test (Tukey Kramer Çoklu Karşılaştırma testi) kullanılarak tespit edilir. Nonparametrik veriler ortalama, standard sapma, ortanca ve minimum-maksimum olarak verilmiştir. IL: Interlökin, TNF- $\alpha$ : Tümör nekroz faktörü alfa, MR-proADM: Midregional-proadrenomedullin, iNOS: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz

Melatonin düzeyleri açısından grup-II lehine bir yükseklik gözlenirse de tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (sırasıyla 25,7 $\pm$ 9,8, 32,9 $\pm$ 14,2 ve 21,5 $\pm$ 5,8 pg/mL; p>0,05) (Tablo 4.1) (Şekil 4.6).



**Şekil 4.6:** Sıçan gruplarına göre serum melatonin düzeyleri. Serum melatonin düzeyleri açısından gruplar arasında fark gözlenmedi

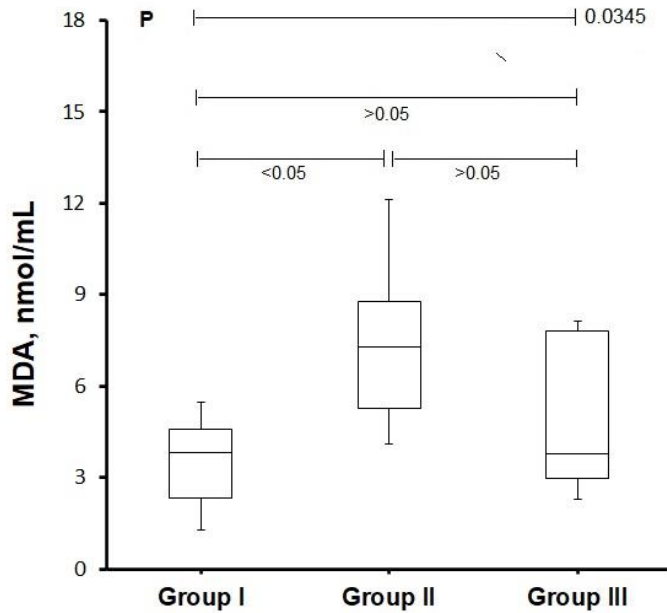
Deney grupları MDA düzeyleri açısından değerlendirildiğinde grup-I'e kıyasla grup-II'nin MDA düzeyleri daha yüksekti (sırasıyla  $3,48 \pm 1,50$  karşı  $7,36 \pm 2,58$  nmol/mL;  $p < 0,05$ ) (Tablo 4.2). Grup-II kıyasla 3 hafta boyunca resveratrol alan grup-III'deki diyabetik sıçanların MDA düzeyleri daha düşük bulunmasına rağmen aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (sırasıyla  $7,36 \pm 2,58$  karşı  $5,10 \pm 2,47$  ng/mL;  $p > 0,05$ ) (Şekil 4.7). Yine grup-I ve III arasında MDA düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ( $p > 0,05$ ).

Deney grupları TAS ve TOS düzeyleri açısından değerlendirildiğinde, gruplar arasında istatistiksel olarak fark yoktu ( $p > 0,05$ ) (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9).

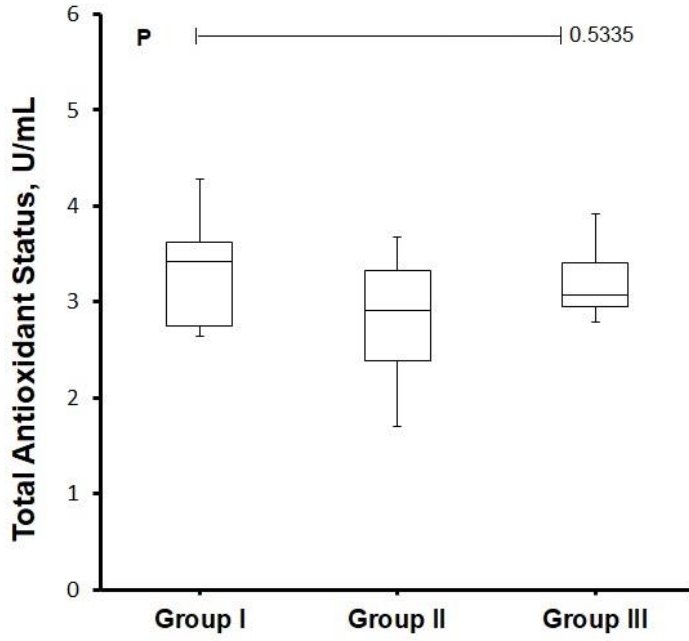
**Tablo 4.2:** Grupların oksidan/antioksidan parametreler açısından karşılaştırılması

|                     | Grup-I                             | Grup-II      | Grup-III    | p                   |
|---------------------|------------------------------------|--------------|-------------|---------------------|
| <b>n</b>            | 7                                  | 7            | 7           | -                   |
| <b>MDA, nmol/mL</b> | 3,48±1,50                          | 7,36±2,58    | 5,10±2,47   | 0,0345 <sup>a</sup> |
|                     | 3,81                               | 7,27         | 3,77        |                     |
|                     | (1,29-5,46)                        | (4,11-12,12) | (2,30-8,13) |                     |
|                     | p* (post-test) <0,05, >0,05, >0,05 |              |             |                     |
| <b>TAS, U/mL</b>    | 3,30±0,57                          | 2,81±0,69    | 3,21±0,37   | 0,5335 <sup>a</sup> |
|                     | 3,42                               | 2,90         | 3,08        |                     |
|                     | (2,65-4,29)                        | (1,70-3,68)  | (2,79-3,91) |                     |
| <b>TOS, U/mL</b>    | 1,81±0,77                          | 3,03±1,47    | 2,62±1,52   | 0,3410 <sup>a</sup> |
|                     | 1,57                               | 2,78         | 2,15        |                     |
|                     | (0,85-3,24)                        | (1,11-5,26)  | (0,71-5,15) |                     |

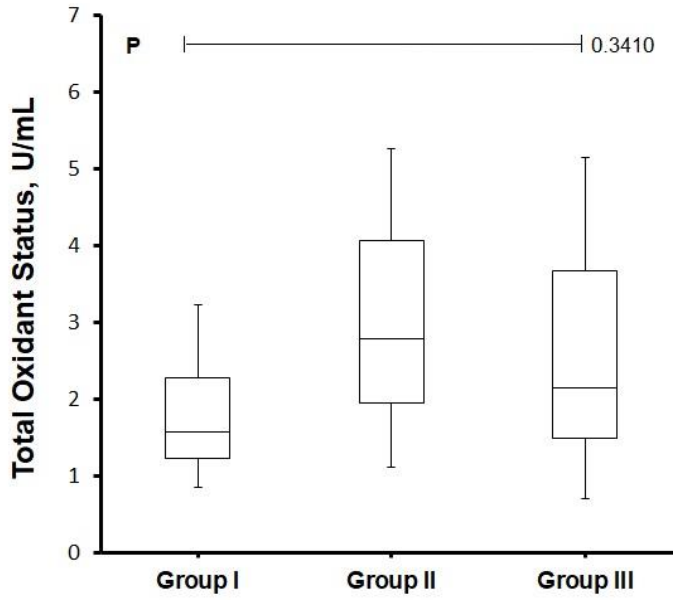
<sup>a</sup> Kruskal-Wallis test (Nonparametrik ANOVA), P değeri yaklaşıktır (ki kare dağılımından oluşur). \* Eğer p değeri <0,05 bulunur ise, gruplar arasındaki (sırasıyla, grup I-II, grup I- III ve grup II-III) p değeri post test (Tukey Kremer Çoklu Karşılaştırma testi) kullanılarak tespit edilir. Nonparametrik veriler ortalama, standard sapma, ortanca ve min-max olarak verilmiştir. MDA: Malondialdehit, TAS: Total Antioksidan Kapasite, TOS: Total Oksidan Kapasite



**Şekil 4.7:** Sıçan gruplarına göre serum MDA düzeyleri. Grup-II'nin MDA düzeylerinde belirgin derecede yükselme görülmektedir



**Şekil 4.8:** Sıçan gruplarına göre serum total antioksidan kapasite (TAS) düzeyleri. Serum TAS düzeyleri açısından gruplar arasında fark gözlenmedi



**Şekil 4.9:** Sıçan gruplarına göre serum total oksidan kapasite (TOS) düzeyleri. Serum TOS düzeyleri açısından gruplar arasında fark gözlenmedi

Korelasyon matrisi analiz sonuçlarına göre IL-6 düzeylerinin TNF- $\alpha$ , melatonin, MDA ve TOS düzeyleri ile düşük dereceden orta dereceye değişen doğru orantılı bir

korelasyon gösterirken MR-proADM ve TAS düzeyleri ile ters orantılı bir korelasyon gösterdiği saptandı (Tablo 4.3). MR-proADM düzeyleri TAS ile düşük derecede doğru orantılı korelasyon gösterirken MDA ve TOS düzeyleri ile sırasıyla yüksek ve orta derecede ters orantılı korelasyon göstermekteydi. Ayrıca iNOS düzeyleri IL-6 ve TNF- $\alpha$  ile doğru orantılı orta derecede bir korelasyon gösterirken melatonin ve MDA ile düşük derecede doğru orantılı bir korelasyon göstermekteydi. Denek sayısı toplamda 21 olduğundan pearson korelasyonlar parametrik olmayan Spearman korelasyon analizi ile tekrar değerlendirildiğinde, MR-proADM düzeylerinin TAS ile istatistiksel olarak önemsiz bir korelasyon gösterdiği saptandı (Spearman  $r = 0,2587$   $p=0,2575$ ) (Şekil 4.10). Yine MR-proADM düzeyleri IL-6, MDA ve TOS düzeyleri ile orta derecede istatistiksel olarak anlamlı ters orantılı korelasyonlar göstermekteydi (Spearman  $r = -0,4573$   $p=0,0371$ , Spearman  $r = -0,7013$   $p=0,0004$  ve Spearman  $r = -0,5521$   $p=0,0095$ ).

**Tablo 4.3:** Tüm sıçan grupları için verilerin korelasyon matrisi sonuçları

| n:21             | A:            | B:     | C:           | D:            | E:           | F:           | G:            | H:            | İ:            |
|------------------|---------------|--------|--------------|---------------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|
| A: IL-6          | 1,000         | 0,283  | <b>0,428</b> | <b>-0,507</b> | <b>0,569</b> | <b>0,345</b> | <b>0,683</b>  | <b>-0,396</b> | <b>0,625</b>  |
| B: IL-10         | 0,283         | 1,000  | 0,096        | -0,162        | 0,215        | 0,232        | -0,043        | 0,013         | -0,251        |
| C: TNF- $\alpha$ | <b>0,428</b>  | 0,096  | 1,000        | -0,200        | <b>0,665</b> | <b>0,314</b> | 0,142         | 0,222         | -0,024        |
| D: MR-proADM     | <b>-0,507</b> | -0,162 | -0,200       | 1,000         | -0,179       | -0,264       | <b>-0,710</b> | <b>0,323</b>  | <b>-0,599</b> |
| E: iNOS          | <b>0,569</b>  | 0,215  | <b>0,665</b> | -0,179        | 1,000        | <b>0,338</b> | <b>0,386</b>  | 0,034         | 0,250         |
| F: Melatonin     | <b>0,345</b>  | 0,232  | <b>0,314</b> | -0,264        | <b>0,338</b> | 1,000        | 0,109         | 0,111         | -0,007        |
| G: MDA           | <b>0,683</b>  | -0,043 | 0,142        | <b>-0,710</b> | <b>0,386</b> | 0,109        | 1,000         | <b>-0,554</b> | 0,860         |
| H: TAS           | <b>-0,396</b> | 0,013  | 0,222        | <b>0,323</b>  | 0,034        | 0,111        | <b>-0,554</b> | 1,000         | <b>-0,546</b> |
| İ: TOS           | <b>0,625</b>  | -0,251 | -0,024       | <b>-0,599</b> | 0,250        | -0,007       | <b>0,860</b>  | <b>-0,546</b> | 1,000         |

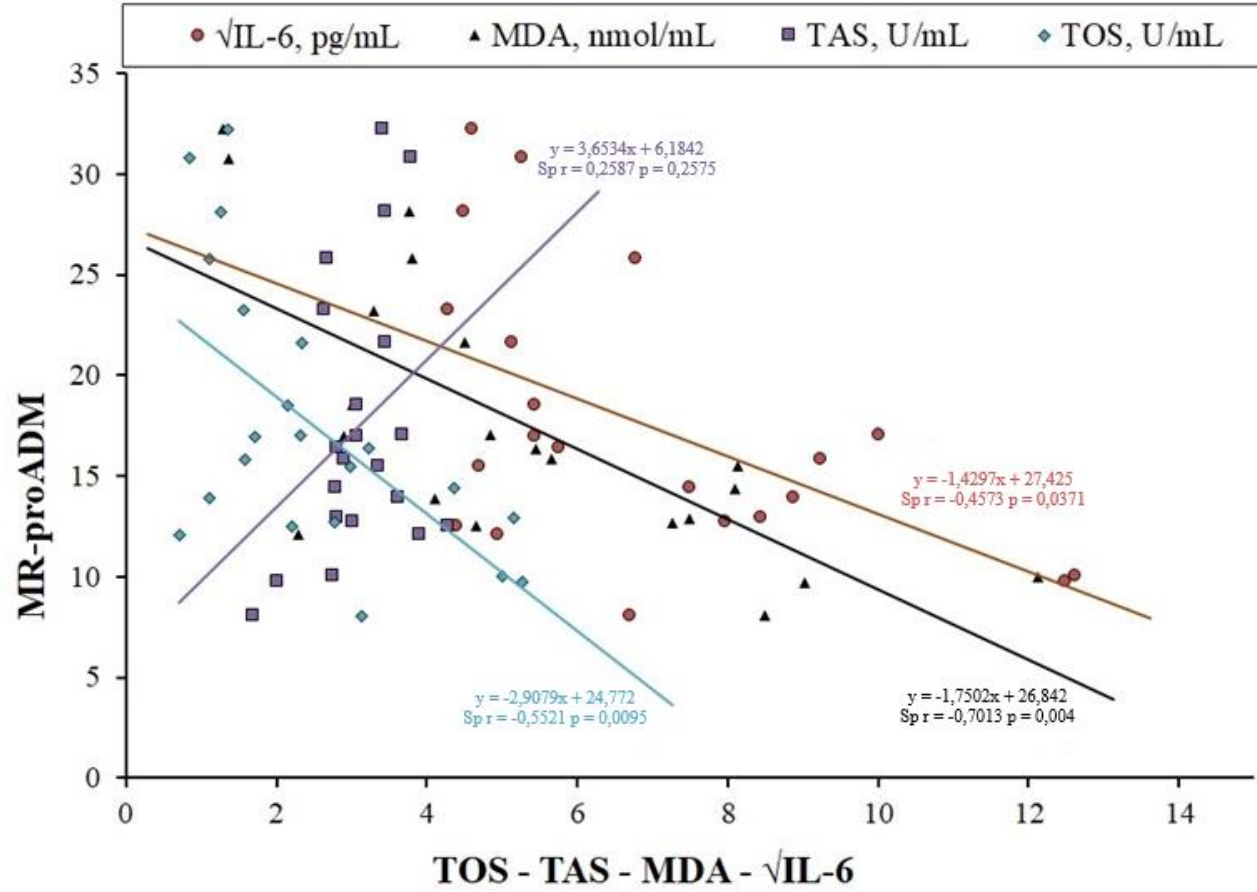
Korelasyon matrisi analizinde, Guass dağılımına sahip olduğu varsayımıyla Pearson r korelasyon analizi kullanılır. Bulunan korelasyon sonuçları, verilerin parametrik veya parametrik olmamasına göre tekrar değerlendirmeye tabi tutuldu.

Korelasyon matrisi analizinde saptanan anlamlı korelasyonlar nonparametrik veriler için Spearman korelasyon analizi ile tekrarlandığında, IL-6 düzeyleri ile MDA (Spearman  $r = 0,5969$   $p= 0,0043$ ) ve TOS (Spearman  $r = 0,4581$   $p=0,0368$ ) düzeyleri arasında istatistiksel olarak doğru orantılı anlamlı bir korelasyon vardı (Şekil 4.11).

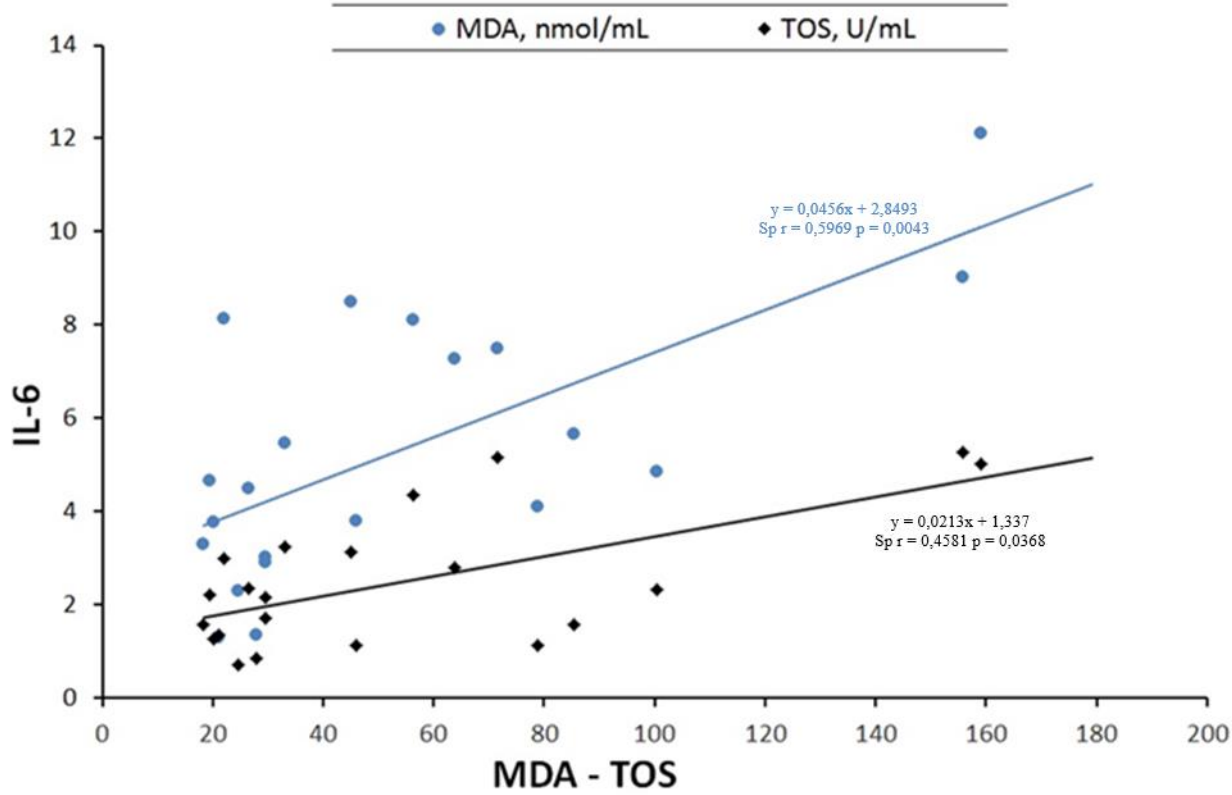
Oysa IL-6 düzeyleri ile TNF- $\alpha$ , TAS ve melatonin arasındaki korelasyonlar istatistiksel olarak önemsizdi (sırasıyla Spearman  $r = 0,4152$   $p = 0,0612$ , Spearman  $r = -0,3784$   $p = 0,0907$  ve Spearman  $r = 0,2775$   $p = 0,2233$ ). Ayrıca MDA ile TOS arasında saptanan yüksek derecedeki korelasyonun Spearman analizinde de devam ettiği saptandı (Spearman  $r = 0,8464$   $p < 0,001$ ) (Şekil 4.12).

Pearson korelasyon analizi ile saptanan anlamlı korelasyonlar Spearman korelasyon analizi ile tekrarlandığında, iNOS düzeyleri sadece TNF- $\alpha$  ile doğru orantılı orta derecede anlamlı bir korelasyon göstermekteydi (Spearman  $r = 0,558$   $p = 0,009$ ) (Şekil 4.13).

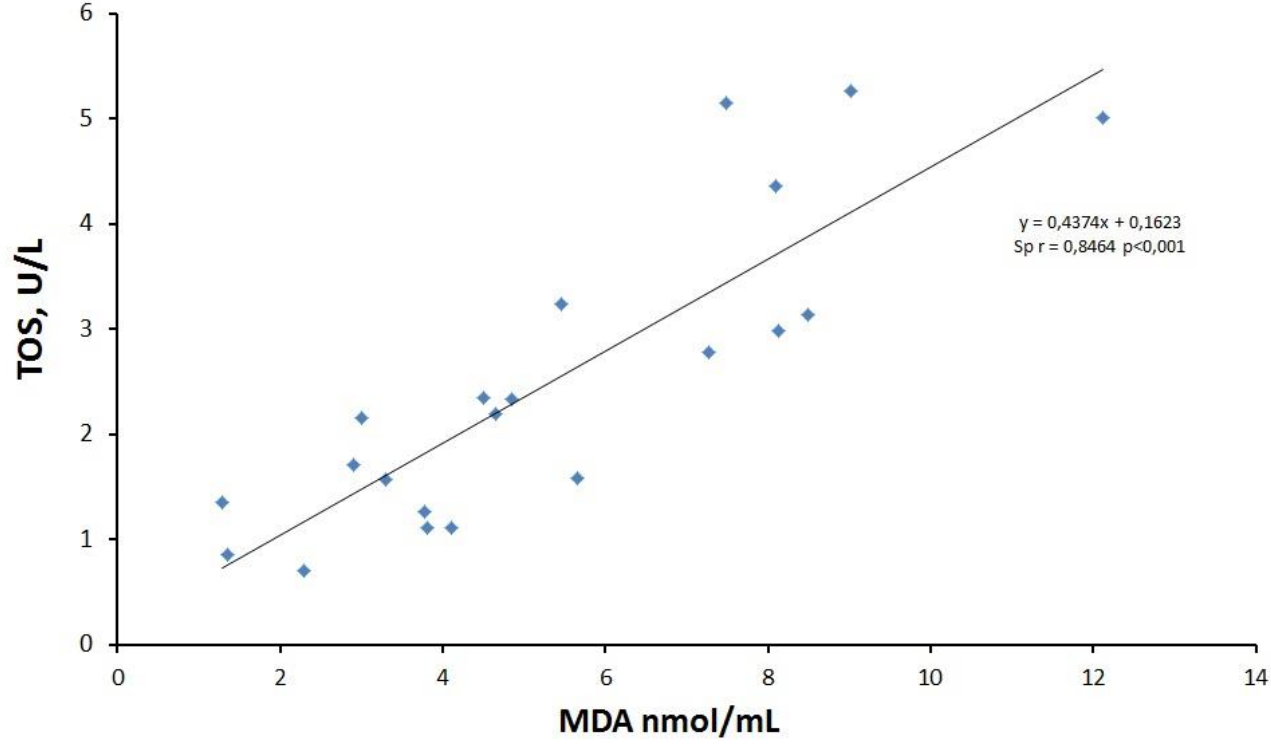




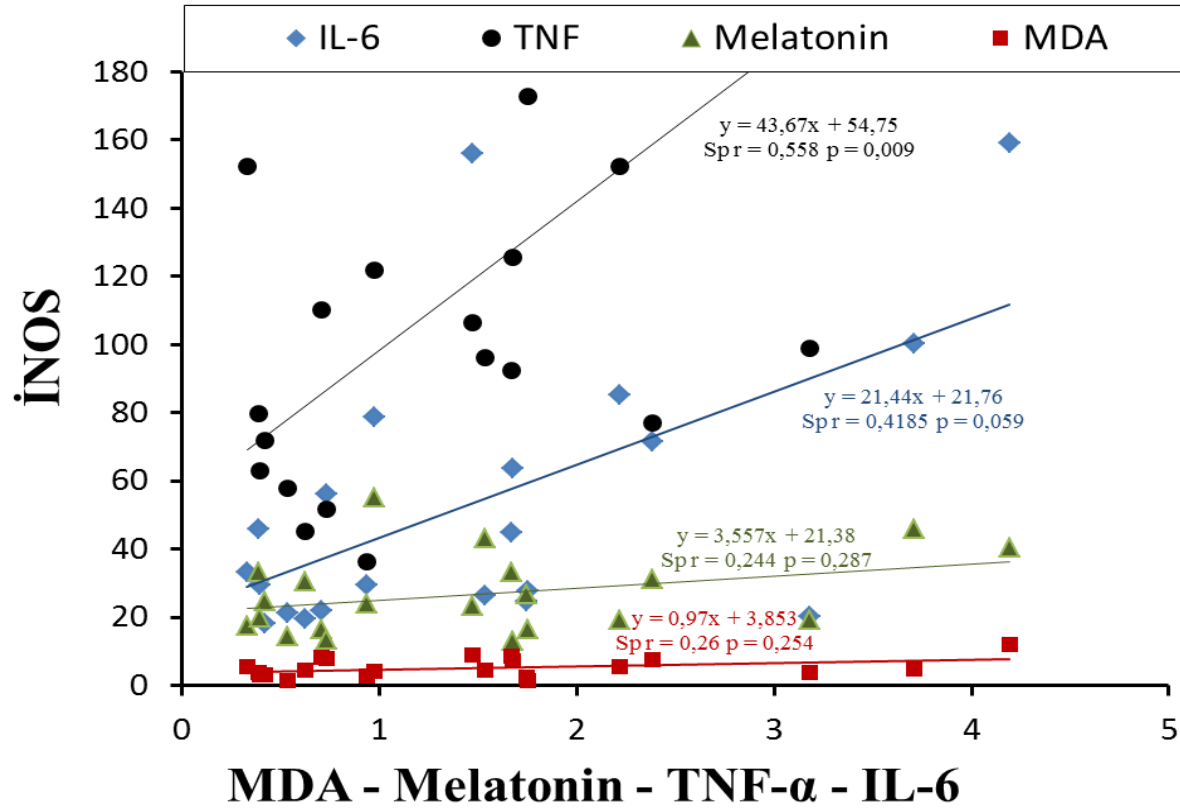
**Şekil 4.10:** Serum MR-proADM düzeylerinin TOS, TAS, MDA ve IL-6 düzeyleri arasındaki korelasyon grafiği. MR-proADM düzeylerinin TAS düzeyleriyle gösterdiği korelasyon ise istatistiksel olarak önemsizdir. MR-proADM ile IL-6, MDA ve TOS düzeyleri arasında istatistiksel olarak ters orantılı anlamlı korelasyonlar görülmektedir. Sp: Spearman



**Şekil 4.11:** IL-6 düzeyleri ile MDA ve TOS düzeyleri arasında yapılan Spearman korelasyon analiz sonuç grafiği. Grafikte IL-6 düzeyleri ile MDA ve TOS düzeyleri arasında istatistiksel olarak doğru orantılı anlamlı bir korelasyon olduğu görülmektedir



**Şekil 4.12:** MDA ve TOS arasındaki Spearman korelasyon grafiği. MDA ve TOS düzeyleri arasındaki yüksek derecedeki korelasyon görülmektedir



**Şekil 4.13:** Spearman analizinde iNOS ile MDA, melatonin, TNF- $\alpha$  ve IL-6 arasında korelasyon grafiği. iNOS ve TNF- $\alpha$  arasında orta derecede pozitif korelasyon görülmektedir. Ancak IL-6, MDA ve Melatonin ile iNOS arasında anlamlı bir korelasyon gözükmemektedir.

## 5. TARTIŞMA

DM, insülin sekresyonu veya insülin etkisindeki kusurlardan kaynaklanan oksidatif stresin indüklenmesi ve glukoz-lipit metabolizmasındaki bozulma ile ortaya çıkan hiperglisemi ile karakterize en ciddi metabolik bozukluktur. DM'nin morbidite ve mortalitesi özellikle göz, böbrek, sinir sistemi ve kalbin dahil olduğu vasküler yatağın uzun süreli hasarı ile ilişkilidir. Ayrıca birçok kanser tipi DM ile ilişkilendirilmiştir. Günümüzde yaşanan sosyal ve ekonomik gelişmeler beslenme alışkanlığında ve fiziksel aktivitelerde önemli değişikliklere neden olarak özellikle DM'nin yaygınlaşmasını hızlandırmıştır. Yine çevresel, gelişimsel ve genetik yatkınlıklar da DM'nin önemli faktörleri arasında yer almaktadır. Besinlerle sağlanan enerjinin tüketilememesi ile ortaya çıkan kronik dengesizlik, vücudumuzun homeostatik kapasitesini aşarak metabolik uyumu bozmaktadır. Bunun bir sonucu olarak ortaya çıkan obezite ve ona bağlı olarak diyabetik komplikasyonlar en sık ölüm sebebi olmuştur (29,91–94). Bu nedenle diyabetin ateroskleroz, nefropatik ve nöropatik hasar, hiperkoagülabilite, kardiyovasküler hastalık, hipertansiyon, hiperlipidemi, koroner arter hastalığı ve kanserleşme gibi etkileri ile mücadelede birçok sentetik ve bitkisel ilaç denenmiştir (6). Bu bitkisel ilaçlardan biri de resveratrol'dür. Son yıllarda resveratrol, diyabetin komplikasyonlarının önlenmesinde en gözde doğal bileşenlerden biri olarak görülmektedir. Ancak mevcut bilgiler resveratrolün antidiyabetik etkinliğini kesin olarak kanıtlamada yetersizdir. Ayrıca, resveratrolün biyoyararlanımı ve stabilitesi konusundaki tartışmalar devam etmektedir (94). Bu kontrollü hayvan deneyinde resveratrolün enflamatuvar, antioksidan/oksidan, homeostatik ve hormonal özellikleri olan birçok biyokimyasal molekülün kan düzeylerine etkisi araştırılarak, kesin metabolik kanıtlara ulaşılmaya çalışıldı.

Resveratrol tedavisinin, NF- $\kappa$ B aktivitesini baskıladığı ROS oluşumunu azalttığı ve TNF- $\alpha$  ve IL-6 düzeylerini düşürdüğü belirtilmiştir (12). Palsamy ve ark. diyabetik sıçanlara oral olarak 30 gün boyunca 5 mg/kg resveratrol verdiler. Çalışmanın sonucunda resveratrol tedavisinin kan glukozu, HbA1c, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, NF- $\kappa$ B seviyelerinde önemli bir düşüşe neden olduğunu, ayrıca hem plazma hem de pankreas dokularında lipit peroksit seviyelerinde kayda değer bir azalma olduğunu tespit

etmişlerdir. Sonuç olarak da resveratrolün hiperglisemiye azaltarak önemli antidiyabetik potansiyelinin olduğunu belirtmişlerdir (95). Bu araştırmacıların sonuçlarıyla uyumlu olacak şekilde yürüttüğümüz çalışmada da diyabetik sıçanlarda artmış olan IL-6 düzeyinin resveratrol kullanımı ile azaldığı tespit edildi. Burada muhtemel mekanizma diyabetin etkilerine bağlı gelişen yaygın enflamatuvar hasara bağlı yükselmiş olan IL-6'nın düzenli resveratrol uygulaması ile artmış olan diyabetik enflamatuvar yanıtın azalması olarak görüldü. Bilindiği gibi pre-enflamatuvar ve enflamatuvar bir pleiotropik sitokin olan IL-6, enflamasyon, yaralanma ve immunolojik patolojilerin ilk aşamalarında sentezlendikten sonra, dolaşım yoluyla karaciğere geçerek C-reaktif protein (CRP), serum amiloid A, fibrinojen, haptogloblin ve  $\alpha$ 1-antikimotripsin gibi akut faz proteinlerinin sentezini arttırmaktadır. Albumin üretimini ise inhibe etmektedir. Ayrıca IL-6, antikor üretimi ile ilişkili B hücreleri ve efektör T hücrelerinin uyarılmasıyla kazanılmış bağışıklık tepkisi üzerinde önemli bir rol oynar. Diyabet gibi kronik hastalıklarda düzensiz sürekli IL-6 üretimi, çeşitli hastalıkların başlamasına yol açarak beta hücre harabiyetini, renal ve hepatik apoptozu tetikler (96–98). Tüm bu bulguları ve saptadığımız IL-6 değişimini doğrular şekilde bu çalışmada antienflamatuvar sitokin olan IL-10 düzeylerinde de önemli değişimler saptanmıştır. IL-10 düzeyleri IL-6 düzeyleriyle paralel olacak şekilde değişim göstermiştir. Bu bulgunun muhtemel sebebi IL-6'nın antienflamatuvar düzenleyici olarak güçlü antienflamatuvar sitokin olan IL-10 üzerine uyarıcı etkiye sahip olmasına bağlandı (99,100).

Ghanim ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada sağlıklı deneklere 6 hafta boyunca 40 mg/gün resveratrol içeren *polygonum cuspidatum* ekstresi verdikten sonra IR, plazma kolesterol, HDL, LDL, trigliserit ve leptin konsantrasyonları parametrelerinde önemli bir değişiklik olmazken mononükleer hücrelerde NF- $\kappa$ B'nin bağlanması baskılandığı saptanmıştır. Ayrıca NF- $\kappa$ B tarafından düzenlenen iki ana proenflamatuvar sitokin olan TNF- $\alpha$  ve IL-6'nın plazma seviyesinde de önemli bir azalma gözlenmiştir (101). Yine Lai ve arkadaşları immünsupresif farelerde resveratrol ile immün fonksiyonla ilişkili serum IL-1 $\alpha$ / $\beta$ , IL-2, TNF- $\alpha$  ve NF- $\kappa$ B düzeylerini regüle ederek, immün sistemi düzenleyebileceğini tespit etmişlerdir (102). Hiperglisemi, NF- $\kappa$ B ile ilişkili çeşitli yollarla oksidatif stresi indükleyebilmektedir. Oksidatif stresin uyarılmasıyla birlikte proenflamatuvar sitokinler daha da artmakta ve apoptoz uyarılmaktadır. Bunun tam aksine resveratrolün, dolaşımdaki proenflamatuvar sitokinleri azaltarak, apoptozu inhibe ederek ve antioksidan savunmayı güçlendirerek anti-

diyabetik etki yaptığı belirtilmiştir. Resveratrol, oksidatif hasarı ve NF- $\kappa$ B aktivitesini azaltarak enflamatuvar süreci azaltabilmektedir (103). Bu işleyişin en iyi takibi, proenflamatuvar sitokin olan IL-6 ve TNF- $\alpha$  yanı sıra IL-10 düzeylerinin kontrolü ile yapmak mümkündür. Bizim yaptığımız çalışmada sağlıklı sıçanlara kıyasla hiperglisemik sıçanlarda IL-6 ve IL-10 düzeyleri daha yüksek bulunurken resveratrol alanlarda IL-6'nın daha düşük bulunması yukarıdaki bilgilerle örtüşmektedir. Ayrıca gruplar arasında IL-6 düzeylerinde fark bulunmasına rağmen TNF- $\alpha$  düzeylerinde fark bulunmaması TNF- $\alpha$ 'ın IL-6 ya göre daha lokal salınımından (104) kaynaklı olarak TNF- $\alpha$  düzeylerindeki değişimlerin kan düzeylerine yeterince yansımadığını düşünmekteyiz.

Diyabet tedavisi esas olarak kan şekerinin düşürülmesini, insülin duyarlılığının iyileştirilmesini ve pankreas beta hücrelerinin korunmasını içerir (3). Resveratrolün diyabet ve diyabetik komplikasyonlar üzerindeki etkileri, kapsamlı bir şekilde analiz edilmesine rağmen, kesin mekanizmaları hala belirsizdir. Resveratrolün terapötik aktiviteleri artan insülin duyarlılığı, azaltılmış IGF-1 seviyeleri, AMPK ve peroksizom proliferatörü ile aktive edilen reseptör-c koaktivatör 1a aktivitesindeki artışlar, artan mitokondriyal sayı ve geliştirilmiş motor fonksiyonu olarak dikkat çeker (105). Yüksek kan şekeri düzeyi zamanla metabolik anormalliklere ve çeşitli diyabetik komplikasyonlarına yol açabilir. Diyabette normogliseminin sürdürülmesi için pankreas beta hücrelerinin korunması büyük önem taşır. Deneysel diyabetli hayvanlarda resveratrolün insülin direncini azalttığı, beta hücrelerini koruduğu, ve kan glukoz düzeylerini düşürerek faydalı etkileri indüklediği belirtilmektedir (36). Çalışmamızda da bu bilgilere paralel olacak şekilde resveratrol alan sıçanların serum kan glukoz düzeylerinde azalma saptanmıştır.

Resveratrolün diyabetin tedavisinde çoklu moleküler mekanizmalar üzerinden etkisini gösterdiği belirtilmektedir. Resveratrolün AMPK ve SIRT'ı aktive edebileceği bildirilmiştir. Bu aktivasyon sayesinde insülin ve insülin benzeri büyüme faktörlerinin sentezinin artabileceği ve kan glukoz homeostazını düzeltebileceği düşünülmektedir (57). Kalori kısıtlaması, AMPK aktivasyonunu uyaran bir durumdur, bu da mitokondriyal biyogenezi teşvik eder ve glukoz kullanımını arttırmaktadır (50). Resveratrolün kalori kısıtlaması etkilerini taklit ederek glukoz kullanımını yanı sıra yaşam süresini uzatabileceği ve yaşlanmaya bağlı hastalıkları geciktirebileceği bildirilmiştir (53,57,106). Yaptığımız bu çalışmada AMPK aktivitesi veya SIRT

düzeyleri ile doğrudan ilişkili parametreler değerlendirmeye alınmamıştır. Ancak resveratrol alan grupta glukoz düzeylerinin daha düşük olma eğiliminin muhtemel AMPK ve SIRT ile ilişkisi, ileri çalışmalara ilham vermektedir.

Resveratrol ayrıca ROS üretiminde rol alan NADPH oksidaz, hipoksantin/ksantin oksidaz ve miyeloperoksidaz vb. enzimlerin aktivitelerini inhibe ettiği bildirilmektedir (52). Bu bilgiler ışığında yürüttüğümüz bu çalışmada TAS ve TOS açısından gruplar arasında fark saptanmaması yukarıdaki bilgilerle çelişiyor şeklinde yorumlanabilir. Ancak antioksidan/oksidan sistem karmaşık moleküler mekanizmalara sahiptir. Çünkü ilişkili olduğu metabolik süreçlerdeki davranışı çeşitli olabilmekte ve farklı hedeflerde farklı işlevlere sahiptir. Ayrıca TAS ve TOS farklı oksidan türlerin ve antioksidan moleküllerin aditif özelliklerinden faydalanılarak numunenin toplam serum (veya plazma) antioksidan veya oksidan konsantrasyonlarını temsil eder. Oysa özellikle dokularda meydana gelen ROS ve serbest radikaller DNA, protein, karbonhidrat ve lipitler gibi biyolojik molekülleri okside ederek yapılarını bozarlar. Bu nedenle spesifik etkilerin araştırıldığı deneylerde bu tür hasarların ayrı ayrı incelenmesi daha faydalı bilgiler sunacaktır. Kaldı ki bu çalışmada TAS ve TOS açısından gruplar arasında fark bulunmazken MDA açısından fark saptanması bu iddiamızı doğrulamaktadır.

Lipit peroksidasyonu genel olarak serbest radikallerin çoklu doymamış yağ asitlerine saldırması sonucunda, lipidlerin ROS ile oksidasyonuna neden olduğu bir süreç olarak tanımlanabilir. Oksitlenmiş lipitler nispeten uzun yarı ömürlerinden dolayı uzaktaki proteinler, lipid membranlar ve nükleik asitler gibi bir dizi biyomolekül içinde yıkıcı olabilirler. MDA lipit peroksidasyonunun en mutajenik türüdür ve lipit peroksidasyonu sırasında yüksek oranda oluşmaktadır. MDA hem oksidatif stresin bir ölçüsü olarak hem de lipit peroksidasyonunu en iyi tanımlayan moleküllerden biri olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (107–110). MDA tiyobarbitürük asit ile (TBA) kolayca reaksiyona girdiğinden omega-3 ve omega-6 yağ asitlerinden lipit peroksidasyonunu göstermede oldukça kullanışlıdır. TBA testi, yoğun renkli bir kromojen floresan kırmızı renk elde etmek için TBA'nın MDA ile girişimine dayanmaktadır. Bu yöntem MDA'nın miktar tayini için spesifik olmadığından kullanımı pek önerilmemektedir. Bunun yerine MDA'nın gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS/MS) ve sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) ile tespiti önerilmektedir (107,108,111–113). MDA'nın tüm bu özellikleri nedeni ile bu çalışmada

TAS ve TOS gruplar arasında farklı bulunmaz iken MDA farklı bulunmuştur. Kaldı ki TOS düzeyi farklı oksidan türleri içerdiğinden lipit oksidasyonu ile ilişkili spesifik artışlar totalde yeterli fark oluşturamayabileceğinden istatistiksel olarak anlamlı bulunmayacaktır.

Oksidatif stres aracılı DNA hasarı, poli (ADP-riboz) polimeraz-1 (PARP-1)'i indükleyerek p53 indüksiyonuna ve SIRT1'i negatif olarak düzenlenmesine neden olarak apoptozu başlatır. SIRT1'in aktivatörü olarak düşünülen resveratrol, DNA hasarının neden olduğu PARP-1 aktivasyonuna müdahale ederek ve SIRT1 inhibisyonunu engelleyerek hücreleri apoptozdan kurtarır (50). Bununla birlikte resveratrol AMPK'ın aktivasyonu yoluyla fosfodiesteraz 4'ün inhibe ederek cAMP seviyesinin yükselmesini sağlar, bunun sonucunda SIRT1'in aktivesi sağlanır (12). Resveratrolün bu sayede anormal insülin, insülin benzeri büyüme faktörleri ve kan glukoz düzeylerini düzeltebileceği düşünülmektedir. Ayrıca insan vasküler endotel hücrelerinde SIRT3 sinyal yoluyla mitokondriyal ROS homeostazını düzenler yani mitokondriyal metabolizmayı iyileştirerek ROS üretimini azaltır ve buna bağlı olarak da mitokondride yağ asidi oksidasyonunu arttırarak yağ asidi peroksidasyonunu engellediği bildirilmiştir. Böylece yağ asitleri yıkımı arttırılarak okijjen radikallerinin yağ asitleri ile etkileşimi engellenmiş olur. Resveratrolün GSH-Px, izositrat dehidrojenaz 2 (IDH2) ve manganez süperoksit dismutazın (SOD2) enzimatik aktivitelerini arttırdığı bununla birlikte SOD2'nin deasetilasyonunu da arttırdığını belirtmişlerdir (57,114). Ayrıca resveratrolün farelerde lipojenik genlerin mRNA düzeylerini düşürmesi yanı sıra, mitokondriyal yağ asidi oksidasyonunda hız sınırlayıcı bir enzim olan karnitin palmitoiltransferaz 1'in mRNA düzeylerinde artış sağlayarak yağ asitlerinin beta-oksidasyonu hızlandırarak ve oksidatif metabolizmanın baskılayıcı bir proteinide inhibe ederek trigliserid düzeyini azalttığı bildirilmiştir (115). Tüm bu bilgiler MDA ölçümü ile saptadığımız diyabet ile tetiklenmiş olan lipit oksidasyonunun resveratrolten sonra neden düşme eğiliminde gösterdiğinin açıklamasıdır.

Resveratrolün insülin yokluğunda hücre membranındaki GLUT4 ekspresyonu arttırdığı bildirilmiştir. Resveratrol bunu PI3K/Akt veya AMPK/Akt'ye bağlı sinyal yollarının fosforilasyonunu güçlendirerek glukoz alımını arttırdığı düşünülmektedir. Ancak, kesin etki mekanizmaları belirsizliğini korumaktadır (57). Chi ve arkadaşları STZ ile indüklenmiş diyabetik sıçanlarda 1 haftalık resveratrol tedavisi ile resveratrolün PI3K aracılığıyla gerçekleşen Akt fosforilasyonunun artışı ile ilişkili glukoz alımını

arttırdığı ayrıca iskelet kaslarında GLUT4 ekspresyonunda bir artışa ve karaciğerde fosfoenolpiruvat karboksikinaz (PEPCK) ekspresyonunda bir azalmaya neden olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmanın sonucu olarak resveratrol tedavisi ile insüline bağımlı ve bağımsız mekanizmalar yoluyla plazma glukoz seviyesini düştüğünü belirtmişlerdir (116). Su ve arkadaşları STZ ile indüklenmiş diyabetik sıçanlara 2 haftalık resveratrol tedavisi uygulamışlardır. Tedavi sonucunda diyabetik sıçanların plazma insülin seviyeleri resveratrol uygulamasıyla değişmediği, bu da resveratrolün insülin benzeri etkisinin insülinden bağımsız mekanizma yoluyla periferik dokudaki glukoz kullanımını artırabileceğini belirttiler (87). Resveratrolün umut verici özelliğini sağlayan şey hücrel fonksiyonlar üzerindeki çoklu etkilerinden kaynaklanıyor gibi görünmektedir. Sıçanlarda resveratrol ile ilgili olarak bizim yürüttüğümüz çalışmada, glukoz metabolizma açısından olumlu sonuçlanmıştır.

ADM'nin normoglisemi ve insülin homeostazını sürdürmede etkin bir faktör olabileceği belirtilmektedir. Bu nedenle de diyabet kontrolünde kullanışlı bir ajan olarak görülmektedir (117). Kan ADM düzeylerinin konjestif kalp hastalığı, akut miyokard infarktüsü, hipertansiyon, kronik böbrek yetmezlik ve sepsis hadiselerde arttığı saptanmıştır. Ayrıca vazodilatör ve natriüretik özellikleri dolayısıyla kardiyovasküler ve renal homeostazı koruduğu bildirilmiştir (118). Sağlıklı koşullarda plazma düzeyleri düşük olup, fizyolojik fonksiyonlarının büyük kısmında rolü olduğuna inanılmaktadır. ADM'nin plazma seviyesindeki artışın kalp yetmezliği, hipertansiyon ve ateroskleroz gibi hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Ayrıca glukoz metabolizması ve insülinin metabolik kontrolünde önemli olduğu belirtilmektedir. ADM düzeyindeki artışın hastalık durumunun şiddeti ile ilişkili olabileceği ve yüksek ADM düzeylerinin koruyucu bir rol oynayabileceği düşünülmektedir. ADM üretimi çeşitli hücre ve fiziksel faktörler tarafından kontrol edilmekte olup TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  gibi enflamatuvar sitokinlerin ADM üretimini ve salgılanmasını uyarabileceği saptanmıştır (119). Ayrıca ADM, sitokin üretimini aktive ederek veya baskılayarak sitokin üretimini modüle edebilir (120). ADM'nin kısa bir yarı ömrü olması nedeniyle daha yüksek stabilizeye sahip ADM'nin öncü molekülü olan MR-proADM bir vekil biyobelirteç olarak ölçülmektedir (60). Bu nedenle bizim yürüttüğümüz çalışmada da daha stabil olması nedeniyle MR-proADM ölçümü tercih edildi.

Plazma ADM seviyeleri diyabetik komplikasyonları olan hastalarda yükselmesi hiperinsülinemi, oksidatif stres ve endotel hasarından kaynaklanabileceği

belirlenmektedir (119). Hiperglisemi, protein kinaz C'ye aracılığıyla vasküler ADM ekspresyonunu arttırmaktadır (120). Tip 1 diyabette plazma ADM artışı, hastalığın bir sonucu gibi düşünülmektedir (119) Hayashi ve arkadaşları böbrek yetmezliği ve diğer hastalıkları olmayan 13 kötü kontrollü diyabetik hasta ile 20 sağlıklı gönüllüden oluşan çalışmalarında plazma adrenomedullin düzeyleri karşılaştırıldı. Çalışmanın sonucunda diyabetli hastalarda sağlıklı gönüllülere göre plazma adrenomedullin düzeyi anlamlı olarak arttığı belirtilmiştir (121). Diğer taraftan Kinoshita ve arkadaşları yaptığı bir çalışmada, 77 diyabetik hastanın oluşturduğu grubun 15 sağlıklı kişilerin oluşturduğu gruba göre plazma glukoz ve HbA1c seviyeleri önemli ölçüde yüksek olduğunu ancak ADM düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmadığını saptamışlardır (120). Anlaşılan o ki, artan ADM salınımının telafi edici bir mekanizma mı yoksa tesadüfi bir olay mı olduğu hala belirsizliğini korumakta olup, ADM'nin diyabetik komplikasyonların patogenezindeki kesin rolü hala aydınlatılmamıştır (25). Bizim çalışmamızda kontrol gruplarına göre diyabetik grupta MR-proADM düzeyinin yukarıdaki bilgilerden farklı şekilde azalmış saptaması, ADM'nin diyabet ile ilişkili olarak farklı davranışlar sergileyebileceğini gösterdi. Diyabetin sınırlandırılmasında faydalı olabileceği düşünülen ADM'nin bizim çalışmamızın diyabetik grubunda baskılanmasının muhtemel sebebi, ADM sentezinin uyarılmasında görevli TNF- $\alpha$  gibi sitokin (119) veya mediatörlerin yeterli sinyal üretememesine bağlandı. Genel olarak bakıldığında oldukça karmaşık mekanizmalar sahip olan metabolizmanın değişen şartlara göre farklı sonuçlar üretebileceği anlaşılmaktadır. Ayrıca resveratrol tedavi grubunda MR-proADM düzeylerinin kontrol grubu değerlerine yükselmiş olması, diyabetik komplikasyonlarının önlenmesinde resveratrolün ADM düzeylerini artırarak etkili olabileceğini düşündürdü. Kaldı ki MR-proADM düzeyleri ile ilişki olarak proenflamatuar olan IL-6'nin ve anti-enflamatuar olan IL-10 düzeylerinde değişim saptanması bu düşüncemizi doğrular mahiyettedir. MR-proADM ile MDA arasında saptanan ters orantılı korelasyon da bu düşüncüyü güçlendirmektedir.

Bu çalışmada TAS ve TOS açısından fark yokken diyabetik grupta MDA düzeyleri kontrol ve resveratrol tedavi grubuna kıyasla çok yüksek saptanması, buna karşılık antioksidan özelliğe sahip olduğu bilinen melatonin düzeyleri açısından gruplar arasında belirgin bir fark bulunmamış olması, MDA ile ilişkili olarak farklı antioksidan ve oksidan mekanizmaların tartışılması gerektiğini gösterdi. Bu bağlamda melatonin etkisi incelendiğinde melatoninin gruplar arasında farklı bulunmaması, MDA ile ilişkili

antioksidan sistemde melatoninin etkisinin zayıf veya olmadığını düşündürdü. Ayrıca yaptığımız çalışmada alınan kanların sabah saatlerin de (7.00 – 9.00) alınmış olması ve melatonin hormonunun yarı ömrünün çok kısa olması (yaklaşık 40 dakika) (15) da gruplar arasındaki farkın bulunmamasına etkili olabilir. Bu durumun teyidi ancak melatonin hormonunun pik yaptığı gece saatlerinde (23.00–05.00) (15) kanın alınmasıyla yapılabilir.

MDA ile ilişkili olarak MR-proADM düzeylerindeki değişimler incelendiğinde, ADM'nin MDA oluşumu üzerine antioksidan etki göstermiş olabileceği anlaşılmaktadır. Yoshimoto ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ADM'nin antioksidan etki göstererek anjiyotensin II ile ilişkili ROS'un oluşumunu düşürdüğünün saptanması (122,123), bu bulgumuzu doğrular mahiyettedir.

Diyabette IR düzenlenmesinde önemli olan parametrelerden biri de iNOS'dur. iNOS çoğunlukla transkripsiyonel olarak düzenlenir ve çoğu hücrede normal olarak üretilmeyip patofizyolojik koşullar altında üretilmi artmaktadır (124). Diyabete bağlı gelişen hiperglisemi durumunda da iNOS enzimi uyarılarak NO üretimi artmaktadır (125). Fizyolojik düzeylerin üstünde anormal miktarda artan NO, ROS oluşumunu hızlandırır ve hücrelerde zararlı etkilere neden olur. Halbuki fizyolojik düzeylerdeki NO, hücresel fonksiyonlar için faydalıdır (126). iNOS kaynaklı NO'nun, farklı mekanizmalar yoluyla tüm vücutta glukoz ve lipit metabolizmasını büyük ölçüde etkilediği düşünülmektedir (26). Ayrıca, STZ ile oluşturulan Langerhans adacık hücre harabiyetindeki temel mekanizmada, oksidanların oluşumu ile ilişkili olarak STZ ile oluşturulan uygunsuz NO cevabı suçlanmaktadır. Yine yapılan bir araştırmada iNOS inhibitörü ile tedavinin, obez farelerde hiperinsülinemide iyileşme ve insülin duyarlılığını arttırarak açlık hiperglisemisini tersine çevirdiği gözlenmiştir. Ancak aşırı miktarda üretilen NO DM'nin patogenezindeki rolü halen tartışılmaya devam edilmektedir (127–129). Tüm bu bulguların aksine Ayub ve arkadaşları komplikasyonsuz diyabetik hasta ve sağlıklı kontrolde plazma NO düzeylerini araştırdıkları bir çalışmada, plazma NO konsantrasyonu sağlıklı kontrollere kıyasla komplikasyonsuz diyabetik hastalarda anlamlı derecede düşük olduğunu tespit etmişlerdir (130). Buna ilave olarak Adela ve arkadaşları sıçanların STZ ile diyabetik sıçan modeli oluşturduktan 8 hafta sonra serum NO seviyesi ölçtüler. Ölçüm sonucunda STZ ile indüklenmiş diyabetik sıçanların kontrol grubuna göre NO seviyesinde önemli derecede yükseldiğini saptamışlardır (126). Elhessy ve arkadaşları STZ ile indüklenmiş

diyabetik sıçanların beyinciklerinde nNOS mRNA ekspresyonunun azaldığını ve iNOS mRNA ekspresyonunun ise önemli ölçüde arttığını tespit etmişlerdir. Ayrıca SOD düzeylerinde anlamlı azalma görülürken MDA ve NO düzeylerinde anlamlı bir yükselme görülmüştür (63). Tüm bu çalışmalar NO üretiminin hiperglisemi üzerine etkisinin olduğunu göstermektedir. Yukarıdaki bilgilerin ışığında yürüttüğümüz çalışmada diyabetik sıçan grubunda iNOS düzeylerini daha yüksek saptadık. Resveratrol verilen sıçan grubunda ise iNOS düzeylerinin kontrol grubu düzeylerine gerilediğini gözlemledik. iNOS düzeylerinin yüksek olduğu diyabetik grupta iNOS düzeylerine paralel olarak IL-6, IL-10 ve MDA düzeylerinde yükseklik saptanması, diyabetin hiperglisemik komplikasyonlarına bağlı artan enflamatuvar ve oksidan hasarın bulgusu olarak değerlendirildi. Ayrıca resveratrolün sıçanlarda bu enflamatuvar ve oksidan hasarı düşürebileceği sonucuna varıldı.

Bizim bulgularımıza benzer şekilde Yang ve arkadaşları STZ ile indüklenen diyabetik sıçanlarda kontrol grubuna göre serum iNOS düzeyi arttığını tespit etmişlerdir (131). Stadler ve arkadaşlarının yürüttüğü bir diğer çalışmada ise STZ ile indükledikleri diyabetik hayvan modelinde iNOS'un aşırı üretilmesine bağlı olarak peroksinitrit oluşumundan kaynaklanan  $\cdot\text{OH}$  radikallerinin lipid peroksidasyonunu arttırabileceğini belirtmişlerdir (132). Spesifik olarak lipid peroksidasyonundaki bu artışın bizdeki MDA artışına karşılık geldiği düşünülmektedir. Ayrıca TAS ve TOS düzeylerinde belirgin değişimin gözlenmemiş olması da bu spesifikliği pekiştirmektedir. Bu bulgular diyabetin aterosklerotik ve enflamatuvar potansiyelinin iNOS'un da dahil olduğu karmaşık patolojisine açıklık getirmektedir. Ayrıca Zheng ve arkadaşları iNOS'un, farelerde diyabetik retinopatinin erken evrelerinin özelliği olan vasküler lezyonların patogenezinde önemli bir rol oynadığını göstermiş olmaları (133), bu görüşümüzü destekler mahiyettedir. Yine Oltulu ve arkadaşları STZ ile indüklenmiş diyabetik sıçanların karaciğerlerinde iNOS ve NF- $\kappa$ B protein ekspresyonunun arttığını ve eNOS protein ekspresyonunun azaldığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca kan plazmalarında MDA seviyeleri yüksek iken SOD aktivitelerinin düşük olduğunu tespit etmişlerdir (134).

Hiperglisemi, ileri glikasyon son ürünlerinin üretimini uyarak protein kinaz C, poliol, ve heksozamin yollarını geliştirerek oksidatif strese neden olur. Daha sonra ROS, NO radikalleri ile reaksiyona girerek peroksinitrit anyonunu oluşturmaktadır. peroksinitrit anyonu toksik bir oksidan olup birçok biyolojik moleküle zarar verebilmektedir (125). Bizim çalışmamızda diyabetik gruba kıyasla

resveratrol verilen grupta iNOS düzeyinin düşmesinin, iNOS kaynaklı oluşan NO üretimini azalttığı anlaşılmaktadır. Böylece bu azalışın etkisiyle de MDA ile gözleyebileceğimiz lipid peroksidasyonunun oluşumu engellenmiştir. Dolayısıyla lipid peroksidasyonunun engellenmesi ile diyabete bağlı gelişecek olan doku hasarlarında azalma olacağı şeklinde yorumlanmalıdır.



## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. Resveratrol verilen grupta açlık kan şekeri düzeyinde azalma eğilimi saptanmıştır. Ancak bu durum HbA1c ile ve daha geniş çalışmalarla teyit edilmelidir.

2. Kontrol grubuna kıyasla diyabetik grupta IL-6 ve IL-10 düzeylerindeki belirgin yükselme saptanmıştır ( $p<0,05$ ). Resveratrol alan diyabetik grupta ise özellikle IL-6 düzeylerinde belirgin derecede azalma saptanmıştır.

3. Çalışmada sıçan grupları arasında TNF- $\alpha$  ve melatonin düzeyleri açısından fark saptanmamıştır ( $p>0,05$ ).

4. Diyabetik sıçan grubunda (kontrol grubuna kıyasla) multi fonksiyonel bir modülatör olan ADM'nin bir göstergesi olan MR-proADM düzeylerinin belirgin derecede azalması ve bu azalışın IL-6 ve MDA düzeyleri ile ters korelasyon göstermesi ADM'nin diyabetin enflamatuar ve oksidan süreçlerinde önemli rolünün olabileceğini akla getirdi. Ayrıca resveratrol verilen diyabetik grupta MR-proADM düzeylerinin kontrol grubu değerlerine yakın yükselme eğilimi göstermesi resveratrolün ADM üzerinden homeostazisi düzenleyerek de antidiyabetik etki gösterebileceğinin bir kanıtı olarak görüldü.

5. MDA ile ilişkili olarak MR-proADM düzeylerindeki değişimler incelendiğinde, ADM'nin MDA oluşumu üzerine antioksidan etki gösterebileceği saptandı.

6. Kontrol grubuna kıyasla diyabetik grupta TAS ve TOS düzeylerinde önemli bir değişiklik olmadan iNOS ve MDA düzeylerinde belirgin derecede yükselme saptandı ( $p<0,05$ ). Bu yükselişe proenflamatuar ve enflamatuar belirteçler olan IL-6 ve IL-10 da eşlik etmekteydi. Bu durum diyabetin aterosklerotik ve enflamatuar patolojisinde iNOS'un önemli rolü olduğunu gösterdi. Ayrıca iNOS'un spesifik olarak lipid peroksidasyonu yoluyla aterojenik etki gösterdiği düşünüldü. Resveratrol alan diyabetik grupta iNOS ve MDA'nın kontrol düzeylerine düşmesi, resveratrolün iNOS ve MDA üzerinden anti-diyabetik etkiye sahip olabileceğini gösterdi.

Sonuç olarak resveratrol tedavisinin diyabetik sıçanlarda MDA'yı azaltarak antioksidan ve IL-6, IL-10, ADM ve iNOS'u etkileyerek antienflamatuar ve homeostatik etkiler yoluyla diyabetin neden olduğu olumsuz etkileri azaltabileceği

saptandı. Ayrıca ADM'nin MDA oluşumunu antioksidan etki göstererek engelleyebileceği düşünüldü.



## KAYNAKLAR

1. Golden, S. H., Robinson, K. A., Saldanha, I., Anton, B., Ladenson, P. W., (2009). Prevalence and Incidence of Endocrine and Metabolic Disorders in the United States: A Comprehensive Review. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 94(6), 1853–1878.
2. Care, D., Suppl, S. S., (2019). 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetesd-2019. *Diabetes Care*, 42, S13–S28.
3. Han Cho, N., (2019). *IDF Diabetes Atlas 2019*.
4. Yau, M., Maclaren, N. K., Sperling, M., (2000). Etiology and Pathogenesis of Diabetes Mellitus in Children and Adolescents, MDText.com, Inc.,
5. Cebioglu, M., Schild, H. H., Golubnitschaja, O., (2010). Cancer predisposition in diabetics: risk factors considered for predictive diagnostics and targeted preventive measures. *EPMA J.*, 1(1), 130–137.
6. Kumar, S., Mittal, A., Babu, D., Mittal, A., (2021). Herbal Medicines for Diabetes Management and its Secondary Complications. *Curr. Diabetes Rev.*, 17(4), 437–456.
7. Patel, D., Prasad, S., Kumar, R., Hemalatha, S., (2012). An overview on antidiabetic medicinal plants having insulin mimetic property. *Asian Pac. J. Trop. Biomed*, 2(4), 320-30.
8. Tran, N., Pham, B., Le, L., (2020). Bioactive Compounds in Anti-Diabetic Plants: From Herbal Medicine to Modern Drug Discovery. *Biology (Basel)*, 9(9), 252.
9. Szkudelski, T., Szkudelska, K., (2015). Resveratrol and diabetes: from animal to human studies, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis*, 1852(6), 1145–1154.
10. Smoliga, J. M., Baur, J. A., (2011). Hausenblas, H. A., Resveratrol and health - a comprehensive review of human clinical trials. *Mol. Nutr. Food Res.*, 55(8), 1129–1141.
11. Roy, S., Sannigrahi, S., Majumdar, S., Ghosh, B., Sarkar, B., (2011). Resveratrol regulates antioxidant status, inhibits cytokine expression and restricts apoptosis in carbon tetrachloride induced rat hepatic injury. *Oxid. Med. Cell. Longev*, 2011.
12. Vallianou, N. G., Evangelopoulos, A., Kazazis, C., (2013). Resveratrol and diabetes. *Rev. Diabet. Stud.*, 10(4), 236–242.
13. Leischner, C., Burkard, M., Pfeiffer, M. M., Lauer, U. M., Busch, C., Venturelli, S., (2016). Nutritional immunology: Function of natural killer cells and their modulation by resveratrol for cancer prevention and treatment. *Nutr. J.*, 15(1), 1–12.
14. Baltaci, S. B., Mogulkoc, R., Baltaci, A. K., Emsen, A., Artac, H., (2018). The effect of zinc and melatonin supplementation on immunity parameters in breast cancer induced by DMBA in rats. *Arch. Physiol. Biochem.*, 124(3), 247–252.
15. Özçelik, F., Erdem, M., Bolu, A., Gülsün, M., (2013). Melatonin: General Features and its Role in Psychiatric Disorders, *Psikiyatr. Güncel Yaklaşımlar - Current Approaches in Psychiatry.*, 5(2), 179-203.
16. Thakur, P., Kumar, A., Kumar, A., (2018). Targeting oxidative stress through antioxidants in diabetes mellitus. *J. Drug Target*, 26(9), 766–776.
17. Reyes-Toso, C. F., Rosón, M. I., Albornoz, L. E., Damiano, P. F., Linares, L. M., Cardinali, D. P., (2002). Vascular reactivity in diabetic rats: Effect of melatonin. *J. Pineal Res.*, 33(2), 81–86.
18. Karabulut, H., Gülay, M. Ş., (2016). Free Radicals. *MAKÜ Sag. Bil. Enst. Derg.*, 4(1), 50–59.
19. Bailey, C. J., Atkins, T. W., Matty, A. J., (1974). Melatonin inhibition of insulin secretion in the rat and mouse. *Horm. Res. Paediatr.*, 5, 21–28.
20. Rasmussen, D. D., Mitton, D. R., Larsen, S. A., Yellon, S. M., (2001). Aging-dependent changes in the effect of daily melatonin supplementation on rat metabolic and behavioral responses. *J. Pineal Res.*, 31(1), 89–94.
21. Mellado, C., Rodríguez, V., de Diego, J. G., Alvarez, E., Blázquez, E., , (1989). Effect of Pinealectomy and of Diabetes on Liver Insulin and Glucagon Receptor Concentrations in the Rat, *J. Pineal Res.*, 6(4), 295–306.
22. Diaz, B., Blazquez, E., (1986). Effect of pinealectomy on plasma glucose, insulin and glucagon levels in the rat. *Horm. Metab. Res.*, 18(4), 225–229.
23. Rodríguez, V., Mellado, C., Alvarez, E., Diego, J. G., Blázquez, E., (1989). Effect of Pinealectomy on Liver Insulin and Glucagon Receptor Concentrations in the Rat, *J. Pineal Res.*, 6, 77–88.
24. Miller, S. C., Pandi, P. S. R., Esquifino, A. I., Cardinali, D. P., Maestroni, G. J. M., (2006). The role of melatonin in immuno-enhancement: Potential application in cancer. *Int. J. Exp. Pathol.*,

- 87(2), 81–87.
25. Ruzicska, E., Toth, M., Tulassay, Z., Somogyi, A., (2001). Adrenomedullin and diabetes mellitus. *Diabetes. Metab. Res. Rev.*, 17(5), 321–329.
  26. Anavi, S., Tirosh, O., (2020). iNOS as a metabolic enzyme under stress conditions. *Free Radic. Biol. Med.*, 146, 16–35.
  27. Diabetes, Erişim 1.07.2021, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>
  28. Gan, Q., Wang, J., Hu, J., Lou, G., Xiong, H., Peng, C., Zheng, S., Huang, Q., (2020). The role of diosgenin in diabetes and diabetic complications. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 198.
  29. Kazi, A. A., Blonde, L., (2001). Classification of diabetes mellitus. *Clin Lab Med*, 21(1), 1-13.
  30. Satman, İ., İmamoğlu, Ş., Yılmaz, C., Ayvaz, G., Çömlekçi, A., (2012). Türkiye’de ve Dünya’da Diyabet. *J. Soc. Endocrinol. Metab. Turkey*, 16, 1–50.
  31. Krentz, N. A. J., (2021). Improvements in stem cell to beta-cell differentiation for the treatment of diabetes. *J. Immunol. Regen. Med.*, 12, 100043.
  32. Akçay, T., (2013). Diabetes Mellitus. İçinde Fauci A.S., Kasper D.L., Longo D.L. ve ark. (Ed.) *Harrison’s Principles of Internal Medicine*. İzmir: Nobel Tıp Kitabevleri; 2275-2310.
  33. Freeland, B., (2017). Hypoglycemia in diabetes mellitus. *Home Healthc Now*, 35(8), 414–419.
  34. Masharani, U., (2016). Diabetes Mellitus ve Hipoglisemi, M.A. Papadakis, S.J. McPhee (Ed.), *Güncel Tıbbi Tanı ve Tedavi*, 54. Baskı. Ankara: Akademisyen Tıp Kitapevi; 1184–1213.
  35. Patel, S. K., Ma, C. S., Fourlanos, S., Greenfield, J. R., (2021). Autoantibody-Negative Type 1 Diabetes: A Neglected Subtype. *Trends Endocrinol. Metab.*, 32(5), 295–305.
  36. Szkudelski, T., Szkudelska, K., (2015). Resveratrol and diabetes: From animal to human studies. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, 1852(6), 1145–1154.
  37. Howlader, M., Sultana, M. I., Akter, F., Hossain, M. M., (2021). Adiponectin gene polymorphisms associated with diabetes mellitus: A descriptive review. *Heliyon*, 7(8), e07851.
  38. Tabák, A. G., Herder, C., Rathmann, W., Brunner, E. J., Kivimäki, M., (2012). Prediabetes: A high-risk state for diabetes development. *Lancet*, 379, 2279–2290.
  39. Braga, T., Kraemer-Aguiar, L. G., Docherty, G. H., Le Roux, C. W., (2019). Treating prediabetes: why and how should we do it? *Minerva Med*, 110(1), 52–61.
  40. Egan, A. M., Dinneen, S. F., (2019). What is diabetes? *Med.*, 47(1), 1–4.
  41. Alfadhli, E. M., (2015). Gestational diabetes mellitus. *Saudi Med. J.*, 36, 399–406.
  42. Pathak, V., Pathak, N. M., O’Neill, C. L., Guduric-Fuchs, J., Medina, R. J., (2019). Therapies for Type 1 Diabetes: Current Scenario and Future Perspectives, *Clin. Med. Insights. Endocrinol. Diabetes.*, 12.
  43. Szkudelski, T., (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.*, 50(6), 537–546.
  44. Kurçer, Z., Karaoğlu, D., (2012). Deneysel Diyabet Modellerinde Alloxan ve Streptozotosin Kullanımı. *Turkish J. Endocrinol. Metab.*, 16, 34–40.
  45. Al-Awar, A., Kupai, K., Veszeka, M., Szucs, G., Attieh, Z., Murlasits, Z., Török, S., Pósa, A., Varga, C., (2016). Experimental Diabetes Mellitus in Different Animal Models. *Journal of Diabetes Research*, 2016.
  46. Park, E. J., Pezzuto, J. M., (2015). The pharmacology of resveratrol in animals and humans. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, 1852(6), 1071–1113.
  47. Gambini, J. vd., (2015). Properties of resveratrol: In vitro and in vivo studies about metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2015.
  48. Bansal, M., Singh, N., Pal, S., Dev, I., Ansari, K. M., (2018). Chemopreventive role of dietary phytochemicals in colorectal cancer, *Advances in Molecular Toxicology*. 1. baskı, Elsevier: 81-84.
  49. Pallàs, M., Porquet, D., Vicente, A., Sanfeliu, C., (2013). Resveratrol: New avenues for a natural compound in neuroprotection. *Curr. Pharm. Des.*, 19(38), 6726–6731.
  50. Goutham, G., Manikandan, R., Arulvasu, C., Arumugam, M., Beulaja, M., et al. (2017). A focus on resveratrol and ocular problems, especially cataract: From chemistry to medical uses and clinical relevance. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 86:232-241
  51. Şahin, G., Keser, A., (2017). Resveratrolün adipozite üzerine etkileri, *Beslenme ve Diyet Derg.*, 45(3), 264–272.
  52. Prasad K., (2012). Resveratrol, wine, and atherosclerosis. *International Journal of Angiology*. Thieme Medical Publishers, 1(1):7-18.
  53. Chen, C., Zhou, M., Ge, Y., Wang, X., (2020). SIRT1 and aging related signaling pathways. *Mech. Ageing Dev.*, 187, 111215.

54. Shahgaldi, S., Kahmini, F. R., (2021). A comprehensive review of Sirtuins: With a major focus on redox homeostasis and metabolism. *Life Sci.*, 282, 119803.
55. Wątroba, M., Dudek, I., Skoda, M., Stangret, A., Rzdokiewicz, P., Szukiewicz, D., (2017). Sirtuins, epigenetics and longevity. *Ageing Res. Rev.*, 40, 11–19.
56. Lee, J. H., Song, M. Y., Song, E. K., Kim, E. K., Moon, W. S., Han, M. K., Park, J. W., Kwon, K. B., Park, B. H., (2009). Overexpression of SIRT1 protects pancreatic  $\beta$ -cells against cytokine toxicity by suppressing the nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathway. *Diabetes*, 58(2), 344–351.
57. Huang, D. D., Shi, G., Jiang, Y., Yao, C., Zhu, C., (2020). A review on the potential of Resveratrol in prevention and therapy of diabetes and diabetic complications. *Biomed. Pharmacother.*, 125, 109767.
58. Kitamura, K., Kangawa, K., Kawamoto, M., Ichiki, Y., Nakamura, S., Matsuo, H., Eto, T., (1993). Adrenomedullin: A Novel Hypotensive Peptide Isolated from Human Pheochromocytoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 192(2), 553–560.
59. Julián, M., Cacho, M., García, M. A., Martín-Santamaría, S., De Pascual-Teresa, B., Ramos, A., Martínez, A., Cuttitta, F., (2005). Adrenomedullin: A new target for the design of small molecule modulators with promising pharmacological activities, *Eur. J. Med. Chem.*, 40(8), 737–750.
60. Koyama, T. vd., (2021). Mid-regional pro-adrenomedullin is a novel biomarker for arterial stiffness as the criterion for vascular failure in a cross-sectional study. *Sci. Rep.*, 11(1), 1–7.
61. Grunnet, L. G., Mandrup-Poulsen, T., (2011). Cytokines and type 1 diabetes: A numbers game. *Diabetes*, 60(3), 697–699.
62. Xiao, J., Li, J., Cai, L., Chakrabarti, S., Li, X., (2014). Cytokines and diabetes research, *J. Diabetes Res.*, 2014.
63. Elhessy, H. M., Eltahry, H., Erfan, O. S., Mahdi, M. R., Hazem, N. M., El-Shahat, M. A., (2020). Evaluation of the modulation of nitric oxide synthase expression in the cerebellum of diabetic albino rats and the possible protective effect of ferulic acid. *Acta Histochem*, 122(8), 151633.
64. Lechner, M., Lirk, P., Rieder, J., (2005). Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: The two sides of the same coin, *Semin. Cancer Biol.*, 15(4), 277–289.
65. Eghbalzadeh, K., Brixius, K., Bloch, W., Brinkmann, C., (2014). Skeletal muscle nitric oxide (NO) synthases and NO-signaling in “diabesity” - What about the relevance of exercise training interventions? *Nitric Oxide - Biol. Chem.*, 37(1), 28–40.
66. Bagherifard, A., Amini Kadijani, A., Yahyazadeh, H., Rezazadeh, J., Azizi, M., Akbari, A., Mirzaei, A., (2020). The value of serum total oxidant to the antioxidant ratio as a biomarker of knee osteoarthritis. *Clin. Nutr. ESPEN*, 38, 118–123.
67. Singh, M., Kapoor, A., Bhatnagar, A., (2015). Oxidative and reductive metabolism of lipid-peroxidation derived carbonyls. *Chem. Biol. Interact.*, 234, 261–273.
68. Telek, H. H., (2019). Effects of selenium and melatonin on ocular ischemic syndrome. *Biomed Res. Int.*, 2019.
69. Maritim, A. C., Sanders, R. A., Watkins, J. B., (2003). Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review, *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 17(1), 24–38.
70. Hernández-Marco, R., Codoñer-Franch, P., Pons Morales, S., del Castillo Villaescusa, C., Boix García, L., Valls Bellés, V., (2009). Oxidant/antioxidant status and hyperfiltration in young patients with type 1 diabetes mellitus. *Pediatric Nephrology*, 24(1), 121–127.
71. Kumar, A., Kaundal, R. K., Iyer, S., Sharma, S. S., (2007). Effects of resveratrol on nerve functions, oxidative stress and DNA fragmentation in experimental diabetic neuropathy. *Life Sciences*, 80(13), 1236–1244.
72. Slatyer, D. A., Bolton, C. H., Bailey, A. J., (2000). The importance of lipid-derived malondialdehyde in diabetes mellitus. *Diabetologia*, 43(5), 550–557.
73. Su, L. J., Zhang, J. H., Gomez, H., Murugan, R., Hong, X., Xu, D., Jiang, F., Peng, Z. Y., (2019). Reactive oxygen species-induced lipid peroxidation in apoptosis, autophagy, and ferroptosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019.
74. Şimşek, F., (1999). Serbest oksijen radikalleri, antioksidanlar ve lipid peroksidasyonu. *Türkiye Klinikleri Pediatri Dergisi*, 8(1), 42–47.
75. Losada, M., Alio, J. L., (1997). Malondialdehyde serum concentration in type 1 diabetic with and without retinopathy. *Documenta Ophthalmologica*, 93(3), 223–229.
76. Moridi, H. vd., (2015). Resveratrol-dependent down-regulation of receptor for advanced glycation end-products and oxidative stress in kidney of rats with diabetes. *International Journal of Endocrinology and Metabolism*, 13(2), 8–13.
77. Gallou, G., Ruelland, A., Legras, B., Maugendre, D., Allannic, H., Cloarec, L., (1993). Plasma malondialdehyde in type 1 and type 2 diabetic patients. *Clinica Chimica Acta*, 214(2), 227–234.

78. Noberasco, G., Odetti, P., Boeri, D., Maiello, M., Adezati, L., (1991). Malondialdehyde (MDA) level in diabetic subjects. Relationship with blood glucose and glycosylated hemoglobin. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 45(4-5), 193–196.
79. Reis, J. S., Veloso, C. A., Volpe, C. M. O., (2012). Fernandes, J. S., Borges, E. A., Isoni, C. A., Dos Anjos, P. M. F., Nogueira-Machado, J. A., Soluble RAGE and malondialdehyde in type 1 diabetes patients without chronic complications during the course of the disease. *Diabetes and Vascular Disease Research*, 9(4), 309–314.
80. Sandyk, R., (1993). Weak magnetic fields antagonize the effects of melatonin on blood glucose levels in parkinson's disease. *International Journal of Neuroscience*, 68(1-2), 85–91.
81. Lyssenko, V. vd., (2009). Common variant in MTNR1B associated with increased risk of type 2 diabetes and impaired early insulin secretion. *Nature Genetics*, 41(1), 82–88.
82. Prakash, P., Laloraya, M., Kumar G, P., (1998). Influence of a melatonin implant on the free radical load in avian thyroid and its relation with thyroid hormonogenesis. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 46(6), 1249–1258.
83. Hoyos, M., Guerrero, J. M., Perez-Cano, R., Olivan, J., Fabiani, F., Garcia-Pergañeda, A., Osuna, C., (2000). Serum cholesterol and lipid peroxidation are decreased by melatonin in diet-induced hypercholesterolemic rats. *Journal of Pineal Research*, 28(3), 150–155.
84. Milcu, S. M., Milcu, I., (1958). Über ein hypoglykämisch wirkendes Hormon in der Zirbeldrüse., *Medizinische*, 17, 711–715.
85. Schmatz, R. vd., (2009). Ectonucleotidase and acetylcholinesterase activities in synaptosomes from the cerebral cortex of streptozotocin-induced diabetic rats and treated with resveratrol. *Brain Research Bulletin*, 80(6), 371–376.
86. Aktaş, H. S. vd., (2019). Protective effects of resveratrol on hepatic ischemia reperfusion injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 460, 217–224.
87. Su, H. C., Hung, L. M., Chen, J. K., (2006). Resveratrol, a red wine antioxidant, possesses an insulin-like effect in streptozotocin-induced diabetic rats. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 290(6), 1339–1346.
88. Wang, Z., Yang, Y., Xiang, X., Zhu, Y., Men, J., He, M., (2010). [Estimation of the normal range of blood glucose in rats]. *Wei Sheng Yan Jiu*, 39(2), 133–7, 142.
89. Burnett, R. W. vd., (2001). IFCC recommendation on reporting results for blood glucose. *Clinica Chimica Acta*, 307(1-2), 205–209.
90. Mukaka, M. M., (2012). A guide to appropriate use of Correlation coefficient in medical research. *Malawi Medical Journal*, 24(3): 69-71
91. Schuster, D. P., Duvuuri, V., (2002). Diabetes mellitus. *Clinics in Podiatric Medicine and Surgery*, 19(1), 79–107.
92. Abudawood, M., (2019). Diabetes and cancer: A comprehensive review. *Journal of Research in Medical Sciences*, 24(1), 94.
93. DeCoste, K. C. S., Leslie K. S., (2004). Diabetes update: promoting effective disease management. *AAOHN Journal*, 52(8), 344-353.
94. M. Thadhani, V., (2019). Resveratrol in Management of Diabetes and Obesity: Clinical Applications, Bioavailability, and Nanotherapy, *Resveratrol - Adding Life to Years, Not Adding Years to Life*, IntechOpen.
95. Palsamy, P., Subramanian, S., (2010). Ameliorative potential of resveratrol on proinflammatory cytokines, hyperglycemia mediated oxidative stress, and pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. *Journal of Cellular Physiology*, 224(2), 423–432.
96. Krijnen, P. A. J., Simsek, S., Niessen, H. W. M., (2009). Apoptosis in diabetes. *Apoptosis*, 14(12), 1387–1388.
97. Tanaka, T., Narazaki, M., Kishimoto, T., (2009). IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(10), a016295–a016295.
98. Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V. K., IL-17 and Th17 Cells. *Annual Review of Immunology*, 27(1), 485–517.
99. Jawa, R. S., Anillo, S., Huntoon, K., Baumann, H., Kulaylat, M., (2011). Interleukin-6 in Surgery, Trauma, and Critical Care Part II: Clinical Implications. *Journal of Intensive Care Medicine*, 26(2), 73–87.
100. Sapan, H. B., Paturusi, I., Jusuf, I., Patellongi, I., Massi, M. N., Puspongoro, A. D., Arief, S. K., Labeda, I., Islam, A. A., Rendy, L., Hatta, M., (2016). Pattern of cytokine (IL-6 and IL-10) level as inflammation and anti-inflammation mediator of multiple organ dysfunction syndrome (MODS) in polytrauma. *International journal of burns and trauma*, 6(2), 37–43.

101. Ghanim, H., Sia, C. L., Abuaysheh, S., Korzeniewski, K., Patnaik, P., Marumganti, A., Chaudhuri, A., Dandona, P., (2010). An antiinflammatory and reactive oxygen species suppressive effects of an extract of *Polygonum cuspidatum* containing resveratrol. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 95(9), E1.
102. Lai, X. vd., (2016). The enhancement of immune function and activation of NF- $\kappa$ B by resveratrol-treatment in immunosuppressive mice, *Int. Immunopharmacol.*, 33, 42–47.
103. Carrizzo, A., Forte, M., Damato, A., Trimarco, V., Salzano, F., Bartolo, M., Maciag, A., Puca, A. A., Vecchione, C., (2013). Antioxidant effects of resveratrol in cardiovascular, cerebral and metabolic diseases. *Food and Chemical Toxicology*, 61, 215–226.
104. Karakoç, S., Şahin, Calapoğlu, N., Gonca, T., Evgen Tülüceoğlu, E., Öztürk Ö, Calapoğlu M., (109). Interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha levels and body mass index change in obesity. *Future Visions Journal*, Interleukin-6 and Tumour Necrosis Factor-Alpha levels and Body Mass Index Change in Obesity.;3(3), 1-8.
105. Lee, S. M., Yang, H., Tartar, D. M., Gao, B., Luo, X., Ye, S. Q., Zaghouani, H., Fang, D., (2011). Prevention and treatment of diabetes with resveratrol in a non-obese mouse model of type 1 diabetes. *Diabetologia*, 54(5), 1136–1146.
106. Tang, B. L., (2016). Sirt1 and the mitochondria, *Mol. Cells*, 39(2), 87–95.
107. Ayala, A., Muñoz, M. F., Argüelles, S., (2014). Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2014, 1–31.
108. Esterbauer, H., Cheeseman, K. H., (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology*, 186, 407–421.
109. Esterbauer, H., Eckl, P., Ortner, A., (1990). Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 238(3), 223–233.
110. Mas-Bargues, C., Escrivá C., Dromant M, Borrás., C, Viña, J., (2021). Lipid peroxidation as measured by chromatographic determination of malondialdehyde. *Human plasma reference values in health and disease. Arch Biochem Biophys*, 709, 108941.
111. Pryor, W. A., (1989). On the detection of lipid hydroperoxides in biological samples. *Free Radical Biology and Medicine*, 7(2), 177–178.
112. Sinnhuber, R. O., Yu, T. C., Yu, T. C., (1958). Characterization of the red pigment formed in the 2-thiobarbituric acid determination of oxidative rancidity. *Journal of Food Science*, 23(6), 626–634.
113. Giera, M., Lingeman, H., Niessen, W. M. A., (2012). Recent Advancements in the LC- and GC-Based Analysis of Malondialdehyde (MDA): A Brief Overview. *Chromatographia.*, 75(9-10), 433–440.
114. Zhou, X., Chen, M., Zeng, X., Yang, J., Deng, H., Yi, L., Mi, M., (2014). Resveratrol regulates mitochondrial reactive oxygen species homeostasis through Sirt3 signaling pathway in human vascular endothelial cells. *Cell Death & Disease*, 5(12), e1576–e1576.
115. Mercader, J., Palou, A., Bonet, M. L., (2011). Resveratrol enhances fatty acid oxidation capacity and reduces resistin and Retinol-Binding Protein 4 expression in white adipocytes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 22(9), 828–834.
116. Chi, T. C., Chen, W. P., Chi, T. L., Kuo, T. F., Lee, S. S., Cheng, J. T., Su, M. J., (2007). Phosphatidylinositol-3-kinase is involved in the antihyperglycemic effect induced by resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci.*, 80(18), 1713–1720.
117. Martínez-Herrero, S., Martínez, A., (2016). Adrenomedullin regulates intestinal physiology and pathophysiology. *Domest Anim Endocrinol*, 56, 66–83.
118. Güneysel, Ö., (2004). Multifonksiyonel bir peptid; adrenomedullin. *Türkiye Klin Tıp Bilim Derg*, 24(2), 159–66.
119. Wong, H. K., (2014). Adrenomedullin and diabetes. *World J. Diabetes.*, 5, 364.
120. Kinoshita, H., Kato, K., (2000). Kuroki, M., Nakamura, S., Kitamura, K., Hisanaga, S., Fujimoto, S., Eto, T., Plasma adrenomedullin levels in patients with diabetes. *Diabetes Care.*, 23(2), 253–254.
121. Hayashi, M., Shimosawa, T., Isaka, M., Yamada, S., Fujita, R., Fujita, T., Hayashi, M., (1997). Plasma adrenomedullin in diabetes. *Lancet*, 350(9089), 1449–1450.
122. Yoshimoto, T., Fukai, N., Sato, R., Sugiyama, T., Ozawa, N., Shichiri, M., Hirata, Y., (2004). Antioxidant Effect of Adrenomedullin on Angiotensin II-Induced Reactive Oxygen Species Generation in Vascular Smooth Muscle Cells. *Endocrinology*, 145(7), 3331–3337.
123. Yoshimoto, T., Gochou, N., Fukai, N., Sugiyama, T., Shichiri, M., Hirata, Y., (2005). Adrenomedullin Inhibits Angiotensin II-Induced Oxidative Stress and Gene Expression in Rat

- Endothelial Cells. *Hypertension Research*, 28(2), 165–172.
124. Soskic, S. S., (2011). Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) and its Potential Role in Insulin Resistance. *The Open Cardiovascular Medicine Journal*, 5(1), 153–163.
  125. Assmann, T. S., Brondani, L. A., Bouças, A. P., Rheinheimer, J., de Souza, B. M., Canani, L. H., Bauer, A. C., Crispim, D., (2016). Nitric oxide levels in patients with diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Nitric Oxide - Biol. Chem.*, 61, 1–9.
  126. Adela, R., Nethi, S. K., Bagul, P. K., Barui, A. K., Mattapally, S., Kuncha, M., Patra, C. R., Reddy, P. N. C., Banerjee, S. K., (2015). Hyperglycaemia enhances nitric oxide production in diabetes: A study from South Indian patients. *PLoS One*, 10(4), e0125270.
  127. Bitar, M. S., Wahid, S., Mustafa, S., Al-Saleh, E., Dhaunsi, G. S., Al-Mulla, F., (2005). Nitric oxide dynamics and endothelial dysfunction in type II model of genetic diabetes. *European Journal of Pharmacology*, 511(1), 53–64.
  128. Rochette, L., Lorin, J., Zeller, M., Guillard, J.-C., Lorgis, L., Cottin, Y., Vergely, C., (2013). Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: Possible therapeutic targets? *Pharmacology & Therapeutics*, 140(3), 239–257.
  129. Fujimoto, M., Shimizu, N., Kunii, K., Martyn, J. A. J., Ueki, K., Kaneki, M., (2005). A role for iNOS in fasting hyperglycemia and impaired insulin signaling in the liver of obese diabetic mice. *Diabetes*, 54(5), 1340–1348.
  130. Ayub, S.G., Ayub, T., Khan, S. N., Dar, R., Andrabi, K. I., (2011). Reduced nitrate level in individuals with hypertension and diabetes. *Journal of Cardiovascular Disease Research*, 2(3), 172–176.
  131. Yang, R., Jia, Q., Liu, X. F., Wang, Y. Y., Ma, S. F., (2017). Effects of hydrogen sulfide on inducible nitric oxide synthase activity and expression of cardiomyocytes in diabetic rats. *Molecular Medicine Reports*, 16(4), 5277–5284.
  132. Stadler, K., Bonini, M. G., Dallas, S., Jiang, J. J., Radi, R., Mason, R. P., Kadiiska, M. B., (2008). Involvement of inducible nitric oxide synthase in hydroxyl radical-mediated lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetes. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(6), 866–874.
  133. Zheng, L., Du, Y., Miller, C., Gubitosi-Klug, R. A., Kern, T. S., Ball, S., Berkowitz, B. A., (2007). Critical role of inducible nitric oxide synthase in degeneration of retinal capillaries in mice with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 50(9), 1987–1996.
  134. Oltulu, F., Buhur, A., Gürel, Ç., Kuşçu, G. C., Dağdeviren, M., Karabay, Yavaşoğlu, Ü., N., Köse, T., Yavaşoğlu. A., (2019). Mid-dose losartan mitigates diabetes-induced hepatic damage by regulating iNOS, eNOS, VEGF, and NF-κB expressions. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 49(5). 1582-1589.

## EKLER

### EK-1 ETİK KURUL İZNİ

Evrak Tarih ve Sayısı: 21.10.2021-5206



T.C.  
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ  
HAMİDİYE HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 13.10.2021  
Toplantı Sayısı : 08  
Karar Sayısı : 11

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı öğretim üyesi **Doç. Dr. Fatih ÖZÇELİK**'in yürütücüsü olduğu 19.02.2021 tarih ve 2021-01/05 sayılı kararı ile Etik Kurul onayı verilmiş olan "**Streptozosin ile diyabet oluşturulan ratlarda resveratrolün antienflamatuar, antioksidan ve homeostatik etkisinin kan adrenomedulin, indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve melatonin ile ilişkisi**" başlıklı bilimsel çalışma önerisine ait 06.10.2021 tarihli dilekçesi incelenmiş olup, proje başlığının "**Diyabetik Sıçanlarda Resveratrolün Antienflamatuar, Antioksidan ve Homeostatik Etkisi**" olarak değiştirilmesi talebi 13.10.2021 tarihli 08 sayılı toplantıda Etik Kurulumuz tarafından görüşülmüş olup, etik açıdan "**uygun**" olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.

Aslı Gibidir  
**e-imzalıdır**  
Prof. Dr. Ülkan KILIÇ  
HADYEK Başkanı

Evrakı Doğrulamak İçin : <https://www.turkiye.gov.tr/sbu-ebys?eD=BSVBBF7H14>

Bu belge,güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.



