



**DENEYSEL DİYABET OLUŞTURULMUŞ RATLARDA *ROSA CANINA L.*
BİTKİ KÖK EKSTRESİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTESİ İLE *INTERLÖKİN-
1 BETA* VE *TÜMÖR NEKROZ FAKTÖRÜ ALFA (TNF- α)* GEN İFADESİNE
ETKİSİ**

İlayda Sezin YALÇINKAYA

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

HAZİRAN 2022

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

İlayda Sezin YALÇINKAYA

29/06/2022

DENEYSEL DİYABET OLUŞTURULMUŞ RATLARDA *ROSA CANINA L.* BİTKİ
KÖK EKSTRESİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTESİ İLE *İNTERLÖKİN-1 BETA* VE
TÜMÖR NEKROZ FAKTÖRÜ ALFA (TNF- α) GEN İFADESİNE ETKİSİ
(Yüksek Lisans Tezi)

İlayda Sezin YALÇINKAYA

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Haziran 2022

ÖZET

Yapılan bu tez çalışmasında geçmişten günümüze yaygın olarak kullanılan, C vitamini içeriği nedeniyle tercih edilen, halk arasında kuşburnu olarak bilinen *Rosa canina L.* bitkisine ait köklerin su ve metanol ile hazırlanan ekstrelerinde olası antioksidant etki araştırılmıştır. Ekstrelerin DPPH, fenolik içerik tayini ve demir şelatlama aktivitesi belirlenmiştir. DPPH için su ekstresinin IC₅₀ değeri $23,31 \pm 0,14$ µg/ml, metanol ekstresinin IC₅₀ değeri ise $26,94 \pm 0,82$ µg/ml olarak BHT kontrol değerine göre yüksek bulunmuştur. Fenolik madde tayininde su ekstresi $34,96 \pm 3,91$ mg GAE/g olarak bulunurken metanol ekstresi $16,98 \pm 0,75$ mg GAE/g olarak bulunmuştur. Su ekstresinin demir şelatlama aktivitesi için IC₅₀ değeri $0,91 \pm 0,11$ µg/ml bulunurken metanol ekstresinin IC₅₀ değeri $10,77 \pm 0,24$ µg/ml olarak bulunmuştur. Bitki ekstrelerinin DNA üzerinde etkisinin aydınlatılabilmesi için DNA etkileşimi, enzim kesimi ve DNA koruyucu etki deneyleri yapılmıştır. Bu deneyler ışığında metanol ekstresinin DNA etkileşimi ile DNA üzerinde kırıklar oluşturması ve konformasyonel değişikliğe neden olabileceği belirlenmiştir. Enzim kesimi ile su ekstresinin G/G nükleotidine bağlandığı, metanol ekstresinin ise DNA'ya bağlandığı belirlenmiştir. DNA koruyucu etki deneyi ile su ekstresinin DNA üzerinde kısmi koruma etkisi görülürken metanol ekstresinin DNA üzerinde koruyucu etkisi olmadığı ortaya çıkmıştır. Ekstrelerin STZ ile diyabet oluşturulan ratlar üzerine etkisi ve diyabet ile ilişkilendirilen gen ekspresyonlarına etkisi araştırılmıştır. STZ ile diyabet oluşturulan ratlar ilgili gruplara göre ayrılarak ekstre uygulamaları düşük doz (250 mg/kg) ve yüksek doz (500 mg/kg) olacak şekilde gün aşırı 14 gün boyunca orogastrik gavaj uygulaması yapılmıştır. 14 gün sonunda yapılan kan şekeri tayinine göre yüksek dozda kullanılan, suyla hazırlanan ekstrenin diğer ekstre ve dozlara göre etkili olduğu bulunmuştur. 14 gün sonunda hayvanlardan alınan kan örneklerine RNA izolasyonu sonrası cDNA sentezi gerçekleştirilerek diyabet ile literatürde ilişkilendirdiğimiz İnterlökin 1-beta ve tümör nekroz faktörü alfa genlerinin ifadesine RT-PZR ile bakılmıştır. Her iki gen için su ekstresinin kontrole yakın olduğu yapılan diğer çalışmalara paralel olarak desteklenmiştir. Gen ifadelenmesinin ekstre verilmemiş diyabetik ratlara göre ekstre gruplarında daha düşük olduğu belirlenmiştir.

Bilim Kodu : 20326
Anahtar Kelimeler : *Rosa canina L.*, antioksidan aktivite, DNA, gen ifadesi
Sayfa Adedi : 145
Danışman : Prof. Dr. Leyla AÇIK

THE EFFECT OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF *ROSA CANINA L.* PLANT ROOT
EXTRACT AND THE EFFECT OF *INTERLEUKIN-1 BETA* AND *TUMOR NECROSIS*
FACTOR ALPHA (TNF- α) GENE EXPRESSION IN EXPERIMENTAL DIABETES-
CONDITIONED RATS.

(M.Sc. Thesis)

İlayda Sezin YALÇINKAYA

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

June 2022

ABSTRACT

The antioxidant impact of extracts made with water and matnol from the roots of the *Rosa canina L.* plant, which has been widely utilized from ancient times and is favoured due to its vitamin C content, was examined in this research. The extracts' DPPH, phenolic content, and iron chelating activity were determined. The IC₅₀ value of the water extract for DPPH was 23.31 ± 0.14 μ g/ml, while the IC₅₀ value of the methanol extract was 26.94 ± 0.82 μ g/ml, both of which were greater than the BHT control value. The water extract had a phenolic substance determination of 34.96 ± 3.91 mg GAE/g, whereas the methanol extract had a phenolic substance determination of 16.98 ± 0.75 mg GAE/g. The IC₅₀ value of the water extract for iron chelating activity was determined to be 0.91 ± 0.11 μ g/ml, whereas the IC₅₀ value of the methanol extract was determined to be 10.77 ± 0.24 μ g/ml. Experiments on DNA interaction, enzyme digestion, and DNA protective effect were performed to determine the effect of plant extracts on DNA. Based on these findings, it was concluded that the methanol extract might cause DNA breakage and structural changes when interacting with DNA. By enzyme digestion, it was discovered that the water extract binds to the G/G nucleotide while the methanol extract binds to DNA. The DNA protective effect test demonstrated that water extract had a partial protective impact on DNA, but methanol extract had no protective effect. The extracts' effects on diabetes-induced rats with STZ, as well as their impact on gene expressions related with diabetes, were studied. STZ-induced diabetes mellitus in rats was divided into groups, and orogastric gavage was used every other day for 14 days, with low-dose (250 mg/kg) and high-dose (500 mg/kg) extract applications. It was discovered that the water extract was more effective than the other extracts and dosages. Following RNA isolation, cDNA synthesis was done in blood samples collected from animals at the end of 14 days, and the expression of Interleukin 1-beta and tumor necrosis factor alpha genes, both of which have been linked to diabetes in the literature, was investigated using RT-PCR. In line with prior investigations, the water extract was shown to be close to the control for both genes. Gene expression was shown to be lower in the extract groups compared to the diabetic rats who did not receive the extract.

Science Code : 20326

Key Words : *Rosa canina L.*, antioxidant activity, DNA, gene expression

Page Number : 145

Supervisor : Prof. Dr. Leyla AÇIK

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmalarım sırasında bana yol gösteren, bilgisi, tecrübesi ve önerileri ile bana destek olan, değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Leyla AÇIK'a tez çalışmamda desteklerini esirgemeyen GÜDAM merkez ekibine ve çalışmam süresince benimle birebir ilgilenen Vet. Hek. Dr. Şeyda DİKER'e tez çalışmam süresince bilgilerini benimle paylaşan Doç. Dr. Gülnihal Kulaksız ERKMEN'e yüksek lisans çalışmalarımda desteklerini esirgemeyen Süheyla Pınar ÇELİK, Damla Nur PARILTI, Leyla BOZDAĞ ve Onur AKTAN başta olmak üzere Gazi Üniversitesi Moleküler Biyoloji Laboratuvarındaki asistanlarımıza ve ekip arkadaşlarıma; Hayatımın her alanında destek olan ve beni bugünlere getiren, her zaman arkamda olan aileme ve değerli eşim Sezgin YALÇINKAYA'ya, arkadaşım Elif Naz ALVER'e üniversite yıllarımdan beri her zaman yanımda olan 'Dostluğumuz Bir' ekibine en içten teşekkürlerimi sunarım. Bu çalışma "Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi" tarafından 05/2020-24 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xii
RESİMLERİN LİSTESİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	7
2.1. Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Tarih İçerisinde Kullanımı	7
2.2. Tıbbi ve Aromatik Bazı Bitki Türlerinin Hastalıklar Üzerine Etkisi	11
2.2.1. <i>Lavandula spp.</i> (Lavanta).....	11
2.2.2. <i>Humulus lupulus</i> L. (Şerbetçiotu)	11
2.2.3. <i>Papaver somniferum</i> L. (Haşhaş).....	11
2.2.4. <i>Rosa spp.</i> (Gül).....	12
2.2.5. <i>Salvia officinalis</i> (Tıbbi Adaçayı)	12
2.2.6. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Biberiye).....	13
2.2.7. <i>Asparagus spp.</i> (Kuşkonmaz)	13
2.2.8. <i>Mentha piperita</i> L. (Bahçe nanesi).....	13
2.2.9. <i>Chlorophytum borivillianum</i> (Musli).....	14
2.2.10. <i>Coleus forskohlii</i> (Wild) (Yaprak güzeli çiçeği- Kolyoz çiçeği)	14
2.2.11. <i>Rauvolfia serpentina</i> (L.) (Yılan kökü).....	14
2.3. Tıbbi Bitkilerin İlaç Mekanizması Üzerine Etkisi	14

	Sayfa
2.4. <i>Rosa spp.</i> (Kuşburnu).....	17
2.4.1. <i>R. canina</i> ve etnobotanik araştırmalar.....	19
2.4.2. <i>R. canina</i> ve fitokimyasal çalışmalar	20
2.5. Serbest Radikaller ile Antioksidan Aktivite İlişkisi.....	22
2.5.1. Serbest radikaller.....	22
2.5.2. Antioksidanlar	25
2.5.3. Antioksidanların gruplandırılması	26
2.6.1. DNA'nın yapısı	37
2.6.2. DNA -ilaç etki mekanizmaları	37
2.7. Diabetes Mellitus (Şeker Hastalığı)	39
2.7.1. Diabetes mellitus tanımı.....	39
2.7.2. Diabetes mellitus tarihçesi	40
2.7.3. Diabetes mellitus epidemiyolojisi	41
2.7.4. Pankreas ile insülin hormonu arasındaki ilişki.....	42
2.7.5. Diyabet tanı kriterleri	50
2.7.6. Deneysel diyabet modeli	50
2.7.7. Diyabette serbest radikallerin rolü	52
2.7.8. Tamamlayıcı tıp	54
2.7.9. Diyabet mellitus ve genler	55
2.7.10. Tümör nekroz faktörü alfa (<i>TNF-α</i>) ve İnterlökin 1 beta (<i>IL-1β</i>)	56
2.7.11. İnterlökin 1 beta (<i>IL-1β</i>)	60
2.8. Gen İfade Analizi	62
2.8.1. RNA İzolasyonu.....	62
2.8.2. cDNA sentezi	63
2.8.3. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR)	63

	Sayfa
3. MATERYAL VE METOT	67
3.1 Materyal	67
3.1.1. Bitki materyali.....	67
3.1.2. <i>R. canina</i> kök ekstrelerinin hazırlanması	67
3.1.3. Deney hayvanları	69
3.1.4. Deney hayvanları ve ortam koşulları	69
3.1.5. Deney hayvanlarının gruplandırılması ve diyabetin indüklenmesi.....	70
3.1.6. <i>R. canina</i> kök ekstrelerinin deney hayvanları üzerinde uygulanması.....	73
3.1.7. Kan materyalinin toplanması	74
3.1.8. Kullanılan kimyasal maddeler.....	75
3.1.9. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler ve laboratuvar cihazları	75
3.1.10. Kullanılan kitler	76
3.1.11. Deneylerde kullanılan çözeltilerin hazırlanması.....	76
3.2. Metotlar	78
3.2.1. <i>R. canina</i> kök ekstresi antioksidan aktivitesi	78
3.2.2. <i>R. canina</i> kök ekstresinin DNA üzerine etkisinin belirlenmesi	79
3.2.3. <i>R. canina</i> kök ekstrelerinin <i>IL-1β</i> ve <i>TNF-α</i> ifadesi üzerine etkisi	80
4. DENEYSEL BULGULAR	87
4.1. Ekstrelerin % Verimlerinin Hesaplanması.....	87
4.2. Antioksidan Deney Sonuçları	87
4.2.1. DPPH radikal süpürücü aktivite.....	87
4.2.2. Toplam fenolik içerik miktar tayini	89
4.2.3. Demir şelatlama aktivitesi.....	90
4.3. Ekstrelerin DNA Üzerinde Etkisi.....	91
4.3.1. Ekstrelerin DNA ile etkileşimi.....	91
4.3.2. Bitki ekstresinin DNA'ya bağlanma aktivitesi	92

	Sayfa
4.3.3. DNA koruyucu etki	93
4.4. Ekstrelerin Deney Hayvanları Üzerinde Etkisi	95
4.4.1. Diyabetik bulgular	95
4.4.2. Real Time PCR ile <i>TNF-α</i> ve <i>IL-1β</i> genlerinin ifadesinin belirlenmesi ..	99
5. TARTIŞMA	111
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	121
KAYNAKLAR	125
ÖZGEÇMİŞ	144

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Ülkemizde hastalıkların tedavisinde kullanılan tıbbi bitkiler.....	9
Çizelge 2.2. <i>R. canina</i> bitki türünün taksonomik basamakları	18
Çizelge 2.3. Serbest radikaller ve oksidanlar	23
Çizelge 2.5. Bazı serbest radikal ve radikal olmayan reaktif türleri	24
Çizelge 2.6. Antioksidanların sınıflandırılması	27
Çizelge 2.7. Diyabetin etiyolojik sınıflandırılması	47
Çizelge 2.8. Diyabet gelişimine etkisi olan bazı genler	56
Çizelge 3.1. Gruplandırılan deney hayvanlarına uygulanacak olan STZ ve ekstre içeriği.....	72
Çizelge 3.2. RNA'dan cDNA eldesi için hazırlanan karışım	82
Çizelge 3.3. Reaksiyon karışımı hazırlama.....	83
Çizelge 3.4. PCR programı	83
Çizelge 3.5. PCR karışımı.....	84
Çizelge 3.6. RT-qPCR Programı	85
Çizelge 4.1. <i>R. canina</i> bitki kök ekstre verimliliği	87
Çizelge 4.2. <i>R. canina</i> kök ekstrelerinin radikal süpürücü etki değerleri (% inhibisyon).....	88
Çizelge 4.3. <i>R. canina</i> kök ekstrelerinin IC ₅₀ değerleri (µg/ml)	88
Çizelge 4.4. <i>R. canina</i> ekstrelerinin GAE değerine denk gelen toplam fenolik madde miktarı içeriği (mg GAE/g).....	90
Çizelge 4.5. <i>R. canina</i> ekstrelerinin demir şelatlama aktivitesi IC ₅₀ değerleri (µg/mL).	90
Çizelge 4.6. Gruplar arası kan şekeri değerlerinin (mg/dl) karşılaştırılması	95
Çizelge 4.7. cDNA örnekleri ve miktar-safılık değerleri.....	100
Çizelge 4.8. <i>TNF-α</i> geninin β aktin referans genine göre ifade seviyesi analizi	101
Çizelge 4.9. <i>IL-1β</i> geninin β aktin referans genine göre ifade seviyesi analizi	102
Çizelge 6.1. Sonuç tablosu.....	123

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Bitki-ilaç etkileşim mekanizmalarının potansiyel sonuçları	15
Şekil 2.2. Türkiye’de yetişen <i>Rosa</i> türlerinin yayılışı.....	17
Şekil 2.3. <i>R. canina</i> bitki türlerinde bulunan fenolik bileşikler	20
Şekil 2.4. <i>Rosa</i> türlerinin içeriğinde olan lipofilik antioksidanlar	21
Şekil 2.5. <i>Rosa</i> türlerinde yer alan monogalaktozildiasilgliserol	21
Şekil 2.6. Oksidatif stresin sebep ve sonuçları	23
Şekil 2.7. Reaktif oksijen türlerinin hücreye etkileri	26
Şekil 2.8. Reaktif oksijen türlerinin üretimi ve savunma mekanizması	28
Şekil 2.9. Oksidatif strese karşı enzimatik savunma mekanizmaları.....	30
Şekil 2.10. Flavonoidlerin antioksidan mekanizması	33
Şekil 2.11. DNA bağlanma bölgeleri.....	38
Şekil 2.12. DNA bağlanma kompleksi	39
Şekil 2.13. Yaş gruplarına göre diyabet ve ölümler.....	42
Şekil 2.14. Pankreas ve ilgili hücreler	43
Şekil 2.15. Proinsülin yapısı	44
Şekil 2.16. İnsülin biyosentezi	45
Şekil 2.17. Pankreatik β hücreleri insülin sekresyon mekanizması	46
Şekil 2.18. Normal, Tip I ve tip II diyabetli kişilerin glikozun hücreye alınması	48
Şekil 2.19. Streptozotosin molekülünün açık formu	51
Şekil 2.20. STZ etki mekanizması	52
Şekil 2.21. Diyabet ile oksidatif stresin artışına paralel olarak meydana gelen olumsuz durumlar	53
Şekil 2.22. Diyabet ile oksidatif stres yolları	54
Şekil 2.23. <i>TNF-α</i> gen yerleşimi.....	57
Şekil 2.24. TNFR1 ile TNFR2 sinyal yolları	58

Şekil	Sayfa
Şekil 2.25. <i>TNF-α</i> ile insülin direnci.....	60
Şekil 2.26. <i>IL-1β</i> gen yerleşimi.....	60
Şekil 2.27. <i>IL-1</i> gen kümesinin şematik gösterimi	61
Şekil 2.28. RT-qPCR amplikasyon görseli	65
Şekil 3.1. <i>R. canina L.</i> bitkisinin kurutulmuş ve teşhis edilmiş örneği.....	67
Şekil 3.2. Metanol ekstresinin evaporasyon işlemi ve elde edilen kuru ekstre.....	68
Şekil 3.3. Su ekstresinin evaporasyon işlemi ve elde edilen kuru ekstre.....	68
Şekil 3.4. Deney hayvanlarının beslenmesi ve yaşama ortamları.....	69
Şekil 3.5. Gruplandırılan deney hayvanları	70
Şekil 3.6. İntraperitoneal STZ uygulaması	73
Şekil 3.7. Bitki kök ekstrelerinin uygulama öncesi hazırlığı	73
Şekil 3.8. Ekstrenin oral gavaj uygulaması.....	74
Şekil 3.9. Anestezi altındaki deney hayvanları.....	74
Şekil 3.10. Kan örneklerine RNA izolasyonu işlemi.....	81
Şekil 3.11. RT-qPCR cihazı.....	84
Şekil 3.12. RT-qPCR programı; (a) Programın başlangıcı, (b) Programın bitiminde genlerin verdiği ışıma.....	85
Şekil 4.1. Ekstrelerin ve standardın (BHT) DPPH süpürücü etkilerinin IC ₅₀ değerleri (µg/ml)	89
Şekil 4.2. <i>R. canina</i> bitki kök ekstrelerinin fenolik madde içeriği (µg GAE / mg ekstre).....	90
Şekil 4.3. <i>R. canina</i> ekstrelerinin demir şelatlama IC ₅₀ değerleri	91
Şekil 4.4. Grupların STZ ve ekstre uygulamalarına göre değerlendirilmesi (mg/dl)	97
Şekil 4.5. cDNA miktarları ve saflık değerleri grafiği.....	99
Şekil 4.6. Gruplar arasında <i>TNF-α</i> gen ifade düzeyi	103
Şekil 4.7. Gruplar arasında <i>IL-1β</i> gen ifade düzeyi	104

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. Bitki ekstralarının plazmit DNA ile etkileşimini gösteren agaroz jel görüntüsü.....	92
Resim 4.2. Ekstre -DNA karışımının enzim kesimi sonucunda jel elektroforez görüntüsü.....	93
Resim 4.3. DNA-fenton karışımının ekstralar ile etkileşim görüntüsü	94



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
DL	Desilitre
G	Gram
Kg	Kilogram
Mbar	Basınç
Mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Mikromolar
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
M	Molar
Ng	Nanogram
°C	Santigrat derece
%	Yüzde ifadesi

Kısaltmalar	Açıklamalar
ALX	Alloksan
BHT	Bütillenmiş Hidroksi Tolüen
cDNA	Tamamlayıcı DNA
CYP	Sitokrom
DM	Diabetes Mellitus
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik asit
DPPH	Difenilpikrilhidrazil
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü

Kısaltmalar**Açıklamalar****IL-1 β**

İnterlökin 1-beta geni

NF- κ B

Nuclear Factor kappa B

P-gp

P-glikoprotein

RNA

Ribonükleik Asit

RNT

Reaktif Nitrojen Türleri

ROT

Reaktif Oksijen Türleri

RT-PCR

Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyon

STZ

Streptozotosin

TNF-alfa

Tümör Nekroz Faktör alfa geni

TURDEP-1

Türkiye Diyabet Epidemiyolojisi Çalışması-I

TURDEP-2

Türkiye Diyabet Epidemiyolojisi Çalışması-II

WHO

Dünya Sağlık Teşkilatı

1. GİRİŞ

Geleneksel ilaçlar, halkın farklı hastalıkların tedavisi için kullandığı, yıllar içerisinde kuşaktan kuşağa aktararak varlığını devam ettiren doğal kaynaklardır. Şifalı bitkiler ile ilgili ilk yazılı belgeler 5000 yıl öncesinde Sümerler dönemine kadar uzanmaktadır. Arkeolojik veriler şifalı bitkilerin daha da eski zamanlarda kullanıldığını göstermektedir. Kullanılan şifalı bitkilerin birçok hastalık üzerinde etkisi olduğu bilinen bir durumdur. Bitkilerin ilaç mekanizmaları üzerinde çeşitli etkilerinden de bahsedilmektedir [1].

Bitki, hayvan, bakteri ve virüslerden elde edilen kimyasallara ek olarak doğal ürün bazlı sentetik ya da yarı sentetik bileşiklerin anti-kanser, anti-enfeksiyon, anti-diabetik olarak geniş kapsamlı tedavi etkisine sahip olduğu bilinmektedir. Kimyasal yöntemlerle üretilen sentetik ilaçların yan etkilerinin kişilerde gözlenmesi sonucu doğal ürünlere ve bitkisel tedavilere ilgi gün geçtikçe artmaktadır. İlaç geliştirme pahalı ve uzun bir süreçtir. Bazı hastalar, hastalığın ilk aşamalarında çeşitli nedenlerden dolayı halk ilaçlarını tercih etmiştir. Bitkilerde, biyolojik aktiviteden sorumlu birçok bileşiğin belirlenmesi ile hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçlar arasında bir bağlantı vardır [2].

İlaç etkisi, insan vücudunun ilaca karşı verdiği farmakolojik cevaptır. İlaç etkileşimi, ilaç etkisinin bitki veya bitki kaynaklı ürün, içecek, yiyecek ya da çevresel etmenli kimyasallar tarafından kantitatif veya kalitatif olarak değiştirilmesi şeklinde ifade edilmiştir [3]. Mekanizma farmakokinetik açıdan, bitkisel bir ürün ile etkileşim sonucunda geleneksel ilacın dağılımı, emilimi, atılımı veya biyotransformasyonu üzerinde etkin olması durumudur [4]. *Lamiaceae (Labiatae)*, *Asteraceae (Compositae)*, *Apiaceae (Umbelliferae)*, *Fabaceae (Leguminosae)*, *Rutaceae* ve *Rosaceae* familyalarına ait olan birçok türün ilaç mekanizmaları ve hastalıklar üzerinde farmakokinetik açıdan etkisi bilinmektedir [5].

Rosaceae familyasına ait birçok tür ülkemizde ve dünyada yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Geçmişten günümüze kadar gelen bu bitki; lezzetli olması, çay olarak tüketilmesi ile tercih sebebi olmuştur. Çin’de iltihaplanma, romatoid artrit, soğuk algınlığı ve kronik ağrı gibi rahatsızlıkların tedavisi için bitki bazlı takviye olarak kuşburnu ekstresi piyasaya sürülmüştür [5].

Ülkemizin bazı bölgelerinde kuşburnunun meyve suyu ve reçel olarak günlük hayatta sıklıkla tüketildiği bilinmektedir. Kozmetik alanında yapılan çalışmalarda kuşburnudan sağlanan yağın cilt üzerinde yara izlerini azalttığı ve pigmentasyonu önleyerek hücre yenileyici özelliklere sahip olduğu kanıtlanmıştır. *Rosa* türlerinin yüksek C vitamini içeriğine sahip olan yaprak ve meyvelerinin birçok hastalık için antioksidan, anti-mikrobiyal, diüretik, anti-mutajenik ve anti-diabetik etkilere sahip olduğu bildirilmiştir [6].

Rosa bitki türlerinin yüksek C vitamini içeriğine ek olarak oksidatif strese karşı da etkili olduğu belirlenmiştir [5,6]. Oksidatif stres, antioksidanlar ile serbest radikal arasındaki dengenin radikaller tarafına kayması ile ortaya çıkan durumdur. Serbest radikaller; lipid, enzim, protein, nükleotid koenzimler, DNA ve RNA gibi biyolojik materyale zarar verebilir [7]. Bu tahrip edici etkiden ötürü radikaller vücut içerisinde inme, katarkt, diyabet, yaşlanma, kalp damar hastalıkları, sinir sistemi rahatsızlıkları ve bağışıklık sisteminde zayıflamaya paralel olarak hücre ölümlerine sebep olmaktadır [8].

R. canina türlerinin mineral, flavonoidler ve vitamin bakımından oldukça zengin olduğu belirlenmiştir [9]. Antioksidan içeriğinin yüksek olması nedeniyle yüksek reaktif oksijen türleri (ROT) seviyeleri üzerinde hücrelerde NF- κ B (Nükleer faktör- κ B) yolu, hücresel adezyon molekülleri, interlökinlerin (IL) transkripsiyonu ile ilgili sinyal yolları üzerinde etkilidir. Yapılan çalışmalar doğrultusunda *R. rugosa*, *R. canina*, ve *R. levigata* türlerinin kuşburnu içeriği ile hazırlanan ekstrelerin ve fraksiyonların NF- κ B sinyal yolağının bazı basamakları üzerinde inhibe edici özelliği ve inflamasyonu azaltıcı etkisi olduğu rapor edilmiştir [10].

Diabetes Mellitus (DM) insülin hormonun yokluğu veya yetersizliği sonucu meydana gelen yağ, protein ve karbonhidrat metabolizmasına etki ederek bozukluklara neden olan, kronik hiperglisemi ile karakterize edilen metabolik ve endokrin bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. DM akut komplikasyonların (asidoz, ketoasidoz) yanında uzun dönemde retinal, nöropatik, vasküler bozukluklara neden olan bir hastalık olarak ön plana çıkar [11].

DM, Dünya ve Türkiye’de hızlı bir şekilde artarak önemli bir halk sağlığı sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2018 yılı verilerine göre dünyada 175 milyon diyabetik kişi varken bu rakamın 2025 yılında 300 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir. Türkiye diyabet epidemiyolojisi çalışması-I (TURDEP-1)’e göre ülkemizde

%7,2 olarak belirlenen hastalık prevalansı, TURDEP-2 çalışması ile 12 yıl içerisinde %90 oranında artarak 2010 yılında %13,7 olarak belirlenmiştir. IDF 2021 verilerine göre ise 6,7 milyon kişi diyabet ve komplikasyonlarına bağlı olarak yaşamını yitirmektedir. 2021 yılı itibarıyla 537 milyon erişkin yaşta diyabet hastasının olduğu ve bunların %80'inin düşük ve orta gelirli ülkelerde yaşadığı bildirilmiştir [12,13].

DM, etiyolojik ve patolojik mekanizmalara göre dört farklı grupta ele alınmaktadır. Bu gruplar; tip I diyabet, tip II diyabet, gestasyonel (gebelikte) diyabet ve diğer spesifik türler (β –hücresinin genetik bozuklukları, insülin etkisiyle gelişen genetik bozukluklar, endokrinopatiler, ekzokrin pankreas hastalıkları, ilaç veya kimyasal kaynaklı diyabet, enfeksiyonlar, immün aracılı diyabetin nadir çeşitleri) olarak adlandırılır. Tip I diyabet genellikle otoimmün mekanizmalarla gelişen pankreas adacık hücrelerinden β hücre hasarı ile meydana gelmektedir. Tip II diyabet, insülin direncine bağlı olarak insülin salınımı eksikliğidir [14].

Diyabet ile serbest radikallerin üretiminin artmasına bağlı olarak oksidatif stres düzeyinin arttığı belirtilmiştir. Güncel araştırmalar metabolik sendrom, pankreatit, ve tip II diyabet gibi klinik olayların gelişmesinde oksidatif stresin önemli olduğunu göstermektedir. Hem klinik hem de deneysel çalışmalar oksidatif stres artışının diyabetin her iki türünün patogeneğinde rol oynadığı belirlenmiştir. Oksidatif stres sonucunda meydana gelen reaktif oksijen türleri tip II DM'de; insülin direnci, glukoz toleransının bozukluğu ve β -hücrelerinin işlev kaybının temelinde yatan neden olarak gösterilmektedir [15].

Hastalıklara karşı alternatif olarak uygulanan bitkisel kaynaklı tedavi çoğu toplumlarda diyabet hastaları tarafından da tercih edilmektedir [16,17]. Dünya Sağlık Örgütü'nün diyabet konusundaki önerisiyle beraber şifalı bitkilerden hipoglisemik ajanların araştırılması oldukça önemli bir hal almıştır [18].

Diyabetin sebep olduğu komplikasyonların tedavisi ve incelenmesi yaklaşımlarının oluşmasında deneysel diyabet modelleri faydalı olmuştur. Günümüzde deneysel diyabet hayvan modeli oluşturmak amacıyla çeşitli ajanlar kullanılmaktadır. Yaygın kullanımda olan ajanlar; alloksan (ALX) veya streptozotosin (STZ) dir. Her iki ajan da β hücreleri üzerinde toksisite etkisi ile diyabet oluştururlar [16].

R. canina meyveleri ve yaprakları ile hazırlanan ekstrelerin streptozotosin (STZ) ile indüklenen ve diyabetik model oluşturulan sıçanlarda kan şekeri düzeyini önemli miktarda (%50-62) düşürdüğü bua bağlı olarak hipoglisemik etki gösterdiği bildirilmiştir [19]. *Rosa* türlerinin tip 2 diyabetin gerilemesine yardımcı bazı enzimleri aktive ettiği veya aktivitesini arttırdığı ve bitkilerin diyabet tedavisinde etkili olduğu bildirilmiştir. Günümüzde teknolojinin de gelişmesi ile hastalıklar üzerinde en etkili tedavi yönteminin genler ile olabileceği de belirtilmektedir [9].

Belirli bir hastalıktan sorumlu olan genlerin saptanmasına ilişkin en çok kullanılan yaklaşımlar, DNA markır yapılarının ilgili hastalık ile ilişkisini test eden bağlantı çalışmalarıdır. Bütün çalışmalar basit hastalık genetiğinin anlaşılmasında kılavuz olmuştur. Hastalık ile ilgili genlerin belirlenmesi hedefe yönelik ilaç üretilmesi erken genetik tanıya imkân sağlamaktadır [20,21].

Hastalıkların detaylı olarak ele alınması gen düzeyinde spesifik analizler (Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR (Real Time-qPCR), DNA Mikro dizilemeleri, Hibridizasyon temelli teknikler) ile gerçekleştirilmiştir. RT-qPCR (kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu) gen ifadesinin belirlenmesi için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem ile floresan boyaların moleküler bazlı çalışmalarda kullanılması gen ifadesi çalışmalarının büyük bir hız kazanmasını sağlamıştır. Diyabet üzerinde tümör nekroz faktör alfa geni (*TNF-α*) ile interlekin 1-beta (*IL-1β*) genleri ilişkilendirilmiştir [22,14].

TNF-α geni, doğal bağışıklık mekanizmasında önemli rol oynayan inflamasyonda etkili olan ve multifonksiyonel bir sitokin olarak tanımlanmıştır [23]. *IL-1β* geni inflamasyon ve bağışıklıkta anahtar role sahip olan doğal bağışıklık yanıtı ile ilişkilendirilmiştir [24].

Yapılan butez çalışmasında, *R. canina* suve metanol kök ekstraktlarının; DPPH, demir şelatlama aktivitesi, fenolik madde tayini olmak üzere antioksidan aktiviteleri ile DNA bağlanma ve DNA'da kırıklara sebep olma durumlarını ve DNA koruyuculuğunu belirlemek amaçlanmıştır. Ayrıca, streptozotosin (STZ) kullanılarak Tip I diyabet oluşturulan ratlara farklı dozlarda hazırlanan (250 mg/kg, 500 mg/kg) *R. canina* kök ekstraktları gruplara verilerek hastalık üzerinde tedavi edici etkisinin olup olmadığının tespit edilmesi amaçlanmıştır. Tedavi edici etki, diyabet ile ilişkilendirilen (*TNF-α*) ve (*IL-1β*) genlerinin ifade düzeyleri kontrol gen olan Beta-aktin (β -aktin) gen ifadesine bakılarak belirlenecektir.

Çalışmada artmış veya azalmış olan gen ifadesi ile tedavi sonuçları ilişkilendirilerek, diyabet hastalığı üzerinde bitki kök ekstresinin etkisi değerlendirilecektir.

Yapılan tez çalışması ile *R. canina* kök ekstrelerinin deney hayvanları üzerinde uygulaması ve bu sayede hastalığa ilişkin yeni tedavi yöntemlerinin yaklaşımına zemin oluşturulması hedeflenmektedir. Ekstreler üzerinde yapılan birçok çalışma ile birbirini destekleyen sonuçların elde edilmesi çağımızın hastalıkları arasında yerini alan diyabet üzerinde bitkisel tedavi başarısının yükseltilmesi hedeflenmektedir.





2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Tarih İçerisinde Kullanımı

Tarihte bitkilerin ilk kayıtları M.Ö. 5000'lere kadar uzanan Mezopotamya uygarlığında tedavi amaçlı kullanıldığı bilinmektedir [25]. Tedavi amacıyla kullanılanlar tıbbi bitkiler, kokulu olanlar ise aromatik bitkiler olarak isimlendirilmektedir. Aromatik ve tıbbi bitkiler, hastalıkları iyileştirici özelliği ile ilaç olarak geleneksel ve modern tıpta kullanılan önemli bileşikler bünyesinde barındırmaktadır [26].

Bitkilerin tıbbi alanda kullanımına ait ülkemizde en eski kanıt Hakkâri sınırlarının 40 km güneyinde yer alan Shanidar Mağarası'nda yapılan kazılar sonucunda 50 000 yıl öncesinde yaşayan ilk Neanderthal insanın mezarında bulunmuştur. Mezar çevresinde olan çiçek demetleri ve parçaları ile yapılan analizler sonucunda bulunan bitkilerin bölgede tıbbi bitki olarak varlıklarını sürdürdüğü belirlenmiştir. Sümer ve Asur tabletlerinde yer alan tıbbi bitkilerin, M.Ö 3000'li yıllara dayandığı ve günümüzde kullanılan tıbbi bitkilere benzer olduğu kaydedilmiştir. M.Ö 1500'lü yıllara ait Hitit tabletlerinde de tıbbi bitkilerden bahsedilmektedir [27].

Hindistanlı yazar Rig Veda'nın M.Ö 2500'lü yıllar içerisinde yaklaşık 1000'e yakın şifalı bitki içeren bir eser kaleme aldığı bilinmektedir. Eski Mısır uygarlığı tıbbına özgü bilgilerin yazıldığı ifade edilmiştir. Eski Mısır uygarlığı içerisinde Ebers papirüsüne ait yaklaşık 800 çeşit tıbbi bitkiden bahsedilmiştir. Bahsedilen bitkilerden bazıları; ardıç, tarçın, incir, adasoğanı, soğan, keten, safran, sarımsak ve üzüm olarak belirtilmiştir [28]. Bu bitkilerin ayinler ve mumyalama işleminde kullanımından bahsedilmekte ve küflü ekmeğin açık yaraların üzerine konulması gerektiği belirtilmiştir. Bu uygulamanın doğruluğu yaklaşık 2500 yıl sonra 1928'de Sir Alexandar Fleming tarafından tesadüf eseri küf oluşmuş ekmeğin etkili bir antibiyotik olduğunun bulunması ile kanıtlanmıştır [29].

Firavunların mezarı olarak bilinen piramitlerin yapımında çalışmış olan işçilerin mikrobiyal etkenli hastalıklardan korunabilmek için soğan, sarımsak tükettiği bilinmektedir [30]. Geçmişe ışık tutan Hipokrat yaklaşık olarak 400 bitkisel kaynaklı ilaçtan bahsetmiştir [28].

Biruni ve İbn-i Sina bu dönemlerde yaşamış olan ünlü bilim adamlarıdır. 100'den fazla kitap yazmış olan Biruni 973 yılında Türkmenistan'da doğmuştur. Kitaplarından biri olan 'Al-Saydalafi al-Tıp' eserinde yaklaşık 200 bitkisel temelli ilaç ismi yer almıştır. 980 yılında Buhara'da dünyaya gelen İbn-i Sina yaklaşık 100'e yakın eser yazmıştır. 'Tıp Kanunu' isimli eserinde 800'e yakın bitki ve hayvan kaynaklı ilaçtan bahsetmiş, ilaçların kullanım aşamalarını ve hazırlanmasını da açıklamıştır. Bu eser Avrupa'da tıp okullarında 17. yüzyıla kadar referans kitabı olarak tanıtılmıştır [30].

Uygur halkı hastalıklarla mücadelede oldukça önemli bir yere sahiptir. Uygur tıbbı, teşhis-tedavi yöntemlerini barındıran bir hazine olarak bilinmiştir. Bu tıbbın kökeninde 1000'den fazla bitki ve bu bitkilerin içerisinde 450 tanesinin yaygın olarak kullanıldığı bilgisi yer almıştır. Özellikle vanilya, gül, aspir, hindiba, kakule, lavanta ve karanfil gibi aromatik bitkileri kullanmakta usta oldukları ifade edilmiştir. Aromatik bitkiler özellikle baharat, kozmetik, güve kovucu ve hava temizleyici olarak kullanılmıştır. Bu bitkiler eski zamanlardan beri Uygur halkı tarafından günlük yaşantılarında yer almıştır [1].

Teşekküllü sağlık tesisleri Selçuklu Devleti Dönemi içerisinde kurulmuştur. Bu tesisler arasında Kayseri'de kurulan Gevher Nesibe Sultan Şifaiyesi ön plana çıkmıştır. Kurulan seyyar hastane Selçuklu Devleti'nin sağlık sistemine verdiği önemin göstergesi olarak ifade edilmiştir. Hekimlik alanındaki gelişmeler ise Osmanlı Devleti Dönemi'nde kaydedilmiştir. Akşemseddin, Fatih Sultan Mehmet'in öğretmenliğini yapmasının yanı sıra tıbbi bitkilerle ilgilenip hekimlik yapmıştır. İstanbul'un fethi sonrası Fatih Sultan Mehmet külliyesinde ilk olarak darüüşşifa binası inşa edilmiş, buna paralel olarak kurulan tıp medreseleri Kanuni Sultan Süleyman yönetiminde geliştirilmiştir [30].

Tıbbi bitkiler ve kaynağı bitki olan etken maddeler üzerine araştırmalar bilimin ilerlemesi ile hız kazanmıştır. Eczacı olan Wilhelm Sertürner bu alanda ilk keşfi 1805 yılında gerçekleştirmiştir. Sertürner afyon bitkisinden morfini saflaştırmıştır. Bu gelişmeler ışığında hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere kodein, digitoksin, kinin, striknin gibi etken maddeler keşfedilmiştir. Bu gelişme ile tedavi yönteminde yeni bir kapı açılmıştır. Bu maddelerin daha sonra sentezi yapılmıştır. Maddelerin fizyolojik etkileri ile kimyasal yapı arasında bir köprü olduğunun anlaşılması sonucunda etkileri benzer olabilecek yeni maddelerin sentezlenmesi yolu açılmıştır. Bu sürecin sonunda günümüze kadar ilaç endüstrisi üzerinde çalışmalarda büyük bir yol kat edilmiştir [27]. Geleneksel tıp piyasası

son 30 yıl içerisinde dünya çapında, tıbbi bitkilerin de etkisi ile hızlı bir şekilde gelişim göstermiştir. Tıbbi bitkilere duyulan ihtiyacın artmasına paralel olarak ihracatın da hızlı bir şekilde artması dünya genelinde bu tür bitkilere ilginin arttığının bir kanıtı olarak gösterilmiştir. Ülkemizde ise birçok bitkinin, çay olarak tüketimi ve krem yapımında kullanımı nedeniyle bitkilere hızlı bir şekilde artmıştır [31].

Çalışmalar ışığında ülkemiz içerisinde kullanılan tıbbi bitki sınıflandırılması Çizelge 2.1’de verilmiştir [32]. Çizelgeye göre sıklıkla kullanılan tıbbi bitkiler nane, ökseotu, ısırgan otu, anason, biberiye, adaçayı, kekik, tarçın ve kuşburnu vb. gibi bitkilerin olduğu ve bu bitkilerin hazımsızlık, böbrek hastalığı, soğuk algınlığı, şeker hastalığı (diyabet) ve stres gibi birçok hastalık durumunda kullanıldığı bilinmektedir. Dünyada ve Türkiye’de sıklıkla yetiştirilen ve kullanılan aromatik ve tıbbi bitkilere örnek olarak; *Lavandula* spp. (Lavanta), *Rosa* spp. (Gül), *Rosmarinus officinalis* L. (= *Salvia rosmarinus*) (Biberiye), *Salvia officinalis* L. (Adaçayı), *Mentha piperita* L. (Nane), *Humulus lupulus* L. (Şerbetçiotu), *Chlorophytum borivillianum* Santapau & Fernandez (Musli), *Papaver somniferum* L. (Haşhaş), *Asparagus* spp. (Kuşkonmaz), *Coleus forskohlii* (Yaprak güzeli çiçeği), *Rauvolfia serpentina* L. (Yılan kökü) sayılabilir.

Çizelge 2.1. Ülkemizde hastalıkların tedavisinde kullanılan tıbbi bitkiler [32]

Kullanılan bitkiler	Hastalıklar
Ayrıkotu, atkuyruğu, altın otu	Böbrek hastalıkları
Anason, zencefil, kakule, papatya, rezene	Hazımsızlık
Ökseotu, alıç	Kalp rahatsızlıkları
Isırgan otu, ökseotu, kırmızı biber	Kanserden koruma
Enginar, hindiba, zerdeçal	Karaciğer rahatsızlıkları
Adaçayı, tarçın, papatya, anason	Menopoz
Zerdeçal, yeşil çay, ısırgan otu	Prostat büyümesi
Anason, biberiye, melisa, papatya, karanfil, kekik	Romatizma ağrıları
Civanperçemi, altın otu, zerdeçal	Safra kesesi rahatsızlıkları
Lavanta, melisa, papatya, anason, kantaron	Stres, depresyon ve kaygı
Kakule, yeşil çay, zencefil, biberiye, adaçayı	Unutkanlık
Melisa, papatya, rezene, şerbetçiotu, anason	Uyku bozukluğu
Kekik, kuşburnu, zencefil, adaçayı, biberiye	Yorgunluk
Kuşburnu, yeşil çay, zencefil, üzüm çekirdeği	Kolestreol yüksekliği
Mersin, mahlep, tarçın	Glukoz yüksekliği

Bitki çeşitliliği bakımından zengin bir floraya sahip olduğu bilinen Türkiye’nin fitocoğrafik konumu, Güney Asya ile Güney Avrupa floraları arasında köprü görevi görmesi, birçok

cinsin farklılaşma merkezinin Türkiye olması nedeniyle ekolojik farklılaşmada ön plana çıktığı ve endemik tür sayısı açısından değerli topraklara sahip olduğu göze çarpmaktadır [33]. Ülkemiz 12 000 bitki taksonu ile flora çeşitliliği açısından dikkat çekmektedir [34]. Geçmişten günümüze kadar uzanan yolculukta tıbbi bitkilere verilen önem gittikçe artmaktadır. Ülkemizin zengin florası birçok aromatik ve tıbbi bitki barındırmaktadır. Bu aromatik ve tıbbi bitkiler hem doğal besin kaynağı olarak hem de ilaç olarak tüketilmesi ile geniş bir etki alanına sahiptir. Günümüzde birçok ilacın modern eczacılık içerisinde ve bu yöntemlerin ışığında geliştirildiği bilinmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün tıbbi bitkiler üzerine 91 ülkede yapmış olduğu araştırmalar ve hazırlanan makaleler baz alındığında hastalıkların tedavisinde kullanılan tıbbi bitkilerin 20.000 civarında olduğu ifade edilmiştir [35]. Gıda ve Tarım Örgütü (FAO)'nün aromatik ve tıbbi bitkilere ilişkin dünya üretim verilerine göre, Hindistan ve Çin gibi bitki türleri bakımından daha zengin olan ülkelerin diğer ülkelere oranla üretimde daha önde olduğu bilinmektedir. FAO'nun araştırmalarına göre günümüzde tıbbi bitkilerin sayısı 50 000'e yaklaşmış olup bu rakam dünya genelinde tüm bitkilerin %18,9'una karşılık gelir [36].

Aromatik ve tıbbi bitkilerin ham hali, bitki özleri veya aktif bileşikleri olmak üzere çeşitli formlarda kullanılmıştır. Tıbbi açıdan değerli olan bitkilerden birçok yöntemle elde edilen ekstrahelerin ve uçucu yağların antimikrobiyal açıdan etkili olduğu belirtilmiştir. Tıbbi ve aromatik bitkiler antimikrobiyal ve antioksidan gibi biyolojik aktiviteye sahip olmalarından ötürü birçok hastalığın tedavisinde kullanılmıştır. Bu bitkiler aktif bileşenler açısından zengin olması ile endüstriyel ve tıbbi amaçlı birçok alanda kullanılmıştır [37- 40]. Bitkilerden elde edilen yağların antiviral, antikanserojenik, spazmolitik (spazm giderici) ve farmakolojik etkilerinin olduğu belirtilmiştir. Gıda sektöründe de kullanımı yaygın olan bitki bileşenleri içeriklerinden ötürü ilaç yapımında kullanılmaktadır [41].

Bitkiler doğal yollar ile sentezledikleri bazı maddeler ile hayatta kalabilme şanslarını arttırma eğilimindedir. Bitkilerde hayati olayların düzenlenmesi için gerekli olan lipid, karbonhidrat ve hormon gibi maddeler birincil metabolit olarak adlandırılır. Bitkiler hayatta kalma mücadelesinde pek çok abiyotik (su, ışık, radyasyon, sıcaklık, nem, atmosfer, asitlik ve toprak) ve biyotik (üreticiler, tüketiciler, ayrıştırıcılar) etmen ile karşılaşabilmektedir. Doğaları gereği bitkilerin bu etmenlerden kaçma ihtimali olmadığı için ikincil metabolit adı verilen maddeler ile korunmuşlardır. İkincil metabolitler antioksidan savunma sistemlerinde oldukça etkin rol oynamaktadır [42].

Günümüzde bitkilerden elde edilen ve ilaç olarak kullanılan ikincil metabolitlerden biri olan Taksol Paclitaxel™'in Amerika Ulusal Kanser Enstitüsü tarafından 1967 yılında porsuk ağacından elde edildiği, akciğer ve göğüs kanseri tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir. Bir glikozit olan salisin, söğüt ağacı kabuklarından elde edilir. Felix Hoffmann tarafından 1897 yılında salisin maddesinden asetilsalisilik asit sentezlenmiştir.

2.2. Tıbbi ve Aromatik Bazı Bitki Türlerinin Hastalıklar Üzerine Etkisi

2.2.1. *Lavandula spp.* (Lavanta)

Lavandula spp. Lamiaceae familyasında olup, hastalıklarda sakinleştirici, antidepresan, yatıştırıcı, antiviral, antifungal, anti bakteriyel, anti-inflamatuvar, analjezik, antispazmodik özelliklere sahip olan 150 biyoaktif bileşen içermektedir. Parfümeri ve farmakoloji alanında, uçucu yağ eldesinde, gıda üretiminde ve alternatif tıpta kullanılan, rengi maviden mora kadar değişen, çok yıllık bir bitkidir [31].

2.2.2. *Humulus lupulus L.* (Şerbetçiotu)

Halk arasında ‘Bira çiçeği’ veya ‘Maya otu’ olarak bilinen Cannabaceae familyasında olan *Humulus lupulus* bitkisi, tırmanıcı özelliğe sahip olan çok yıllık bir bitkidir. Şerbetçiotu olarak da bilinen bu bitki bira yapımında yaygın olarak kullanılmaktadır. Genç sürgünleri sebze olarak değerlendirilirken, bira yapımına ek olarak ekmek ve maya yapımında da değerlendirilmektedir. Bunun yanı sıra kozmetik ve ilaç endüstrisinde etkili bir şekilde kullanılmaktadır. Bitkinin çiçek kozalakları acımsı bir tada sahiptir ve hastalıklara karşı koruyucu özelliği bulunmaktadır [43].

2.2.3. *Papaver somniferum L.* (Haşhaş)

Papaveraceae familyasında yer alan *Papaver somniferum*, kodein, morfin, tebain, noskapin, papaverin gibi narkotik analjezik türlerinin kaynağı olarak bilinmesi ile dünyada önemli bir yere sahip olan bitkiler arasında yer almaktadır [44].

Gıda maddesi olarak unlu mamuller ve şekerleme alanında kullanılmakta olup, tohumlarından elde edilen bitkisel yağlardan yararlanılmaktadır. Elde edilen yağ,

sabunlarda, verniklerde, boyalarda ve farmasötik alanlarda kullanıldığı gibi evlerimizin mutfaklarında da yer almaktadır. Tek yıllık ve otsu yapısı olan haşhaş, tüysüz bir yapıya sahip olmasının yanı sıra üzeri mumsu bir tabakayla örtülüdür. Olgunlaşan haşhaş rengi kahverengiye dönük sarı olarak nitelendirilmektedir. Yapraklarının tüysüz ve griden yeşile dönen mumsu bir tabakaya sahip olduğu ifade edilmiştir. Bitkinin meyvesini içeren kapsül yapılarında birçok tohum bulunmaktadır [45].

2.2.4. *Rosa spp.* (Gül)

Rosa spp., *Rosaceae* familyasında olan, Türkiye'nin çeşitli yerlerinde bulunan en çok Kuzeydoğu ve Orta Anadolu'da yetişen, boyu yaklaşık 2-3 metreyi bulan, çevre koşullarına oldukça dayanıklı, çalı şeklinde çok yıllık bir bitkidir. Kokusu ile aromatik bitkilerde, diyabet gibi önemli hastalıklara iyi gelmesi ile tıbbi bitkilerde yer alan önemli bitkiler arasında yer almaktadır. Bu bitki aromatik içeriğinden dolayı parfümeri, kozmetik ve gıda sektöründe kullanılmaktadır [46].

Yemeklerde baharat olarak ya da gül suyu olarak kullanılan *Rosa damascena*'nın reçel, sütlaç, dondurma, lokum ve yoğurt yapımında da kullanıldığı bilinmektedir. *R. canina* olarak bilinen kuşburnu, yabani gül meyvesi yapısına sahiptir. Kuşburnu vitamin ve mineral (K, P) açısından oldukça zengin bir içeriğe sahiptir ve pekçok bitkiye oranla C vitamini içeriği yüksektir [47].

Böbrekler üzerinde etkisi olan gül idrar söktürücü özelliği ile sinirim sistemi için olumlu etkiye sahiptir. Meyveleri ilaç, yemek ve çay gibi geniş kullanım yelpazesine sahiptir. *R. canina*'nın, vücudun soğuk algınlığına ve enfeksiyona karşı savunmasında dayanıklılığı arttırıcı etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Bunun yanı sıra meyveleri pektin, şeker, uçucu yağ, organik asit ve tanen bakımından oldukça zengindir [48].

2.2.5. *Salvia officinalis* (Tıbbi Adaçayı)

Çok yıllık bitki yapısına sahip ve *Lamiaceae* familyasına ait olan *Salvia officinalis*, peyzaj, bitkisel boya, kozmetik alanlarında kullanımının yanı sıra baharat olarak gıda sanayisinde de yer almaktadır. Gıda sektöründe doğal koruyucu içeriği ile sabun ve parfümeri

bileşenlerinin içerisinde kullanılır. Güçlü anti-bakteriyel özelliği ile et ürünlerinin raf ömrünü uzatmak amacıyla da kullanılmaktadır.

Tıbbi olarak bademcik iltihaplarında, diş eti hastalıklarında, ağız yaralarında kullanılmaktadır. Sindirim sistemi üzerinde düzenleyici etkiye sahip olan adaçayı, menopoz döneminde terlemeyi engelleyici etkiye sahip olması ile bu dönemde sıkıntıların azalmasına ve diyabetik hastalarda kan şekerinin düşürülmesine yardımcı olduğu bilinmektedir. Günümüzde ise yaygın olarak antiseptik özelliği ile üst solunum yolları hastalıklarında ve gaz söktürücü olarak sindirim sistemi rahatsızlıklarında kullanılır [28].

2.2.6. *Rosmarinus officinalis* L. (Biberiye)

Halk arasında biberiye olarak tanınan bitki *Lamiaceae* familyasına aittir. Akdeniz Bölgesine ait olan *Rosmarinus officinalis* iğne yaprakları olan mavi, mor, pembe veya beyaz renkte çiçekleri olan, kokusu ile aromatik içeriğe sahip, çok yıllık bitkidir. Kokusu ile aromatik bitkiler grubunda yer alan biberiye, mutfakta karakteristik aromasından dolayı tercih edilmektedir [49]. Bitkiden elde edilen ekstraktların hızlı bozulan gıda ürünlerinin tüketim tarihini uzatan doğal antioksidan olarak kullanıldığı bilinmektedir [50].

2.2.7. *Asparagus* spp. (Kuşkonmaz)

Kuşkonmaz bitkisinin beş farklı türü kanser önleyici ilaç olarak kullanılır. Bu bitki türleri; *Asparagus africanus* L., *Asparagus racemosus*; *Asparagus officinalis* L. ve *Asparagus densiflorus* (Kunth) Jessop.'dur. *Asparagus officinalis* olarak bilinen ve bitkinin en yaygın türü olan kuşkonmaz gıda sektöründe oldukça sık kullanılmaktadır. *Asparagus* ise tıbbi bitkiler alanında en yaygın olarak kullanılan türdür. Bitkinin kurutulmuş köklerinden elde edilen bitki ekstresinin, kadınlarda hormon ve çeşitli üreme sorunlarında hazımsızlık ve mide ülseri gibi sindirim sistemi rahatsızlıklarında kullanıldığı bilinmektedir [51].

2.2.8. *Mentha piperita* L. (Bahçe nanesi)

Lamiaceae familyasına ait bir bitki türü olan nane ve yapraklarının, sindirim sisteminde rahatlatıcı etkiye sahip olduğu ve soğuk algınlığına karşı çay halinde kullanıldığı bilinmektedir. Nane özü ve mentol kimyasalları; öksürük ilaçları, içecek, tütün ve krem

ürünlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Nane yağının huzursuz bağırsak sendromunda kısa süreli tedavi edici potansiyeli nedeni ile ön çalışmaları yapılmaktadır. Mentol, *Lactobacillus* ve *Streptococcus* bakterilerini yok etme potansiyeline sahip olması ile gargara şeklinde diş bakımında kullanıldığı bilinmektedir [52].

2.2.9. *Chlorophytum borivillianum* (Musli)

Liliaceae familyasına ait yaprakları mızrak şeklinde olan *Chlorophytum borivillianum* bitkisi Hindistan yarımadasındaki nemli ormanlarda yetişen bir türdür. Hindistan da bazı bölgeler içerisinde yaprakları sebze olarak, kökleri ise sağlık toniği olarak kullanılmaktadır. Bitkinin kurutulmuş yumruları, hipertansiyon ve diyabet gibi hastalıkları önlemek adına kullanılmakta olup Avrupa ve Orta Doğu'ya ihraç edilmektedir [53].

2.2.10. *Coleus forskohlii* (Wild) (Yaprak güzeli çiçeği- Kolyoz çiçeği)

Lamiaceae familyasına ait ve çok yıllık bir bitki türü olan *Coleus forskohlii*, hücre biyolojisi ve farmasötik preparat araştırmaları için faydalı bulunan forskolin maddesini üretmektedir. Alerjik astım, egzama, sedef hastalığı ve kardiyovasküler bozukluklar ile hipertansiyon gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan forskolinin aynı zamanda hastalık sürecinin kısılmasına yardımcı olduğu bilinmektedir [54,55].

2.2.11. *Rauvolfia serpentina* (L.) (Yılan kökü)

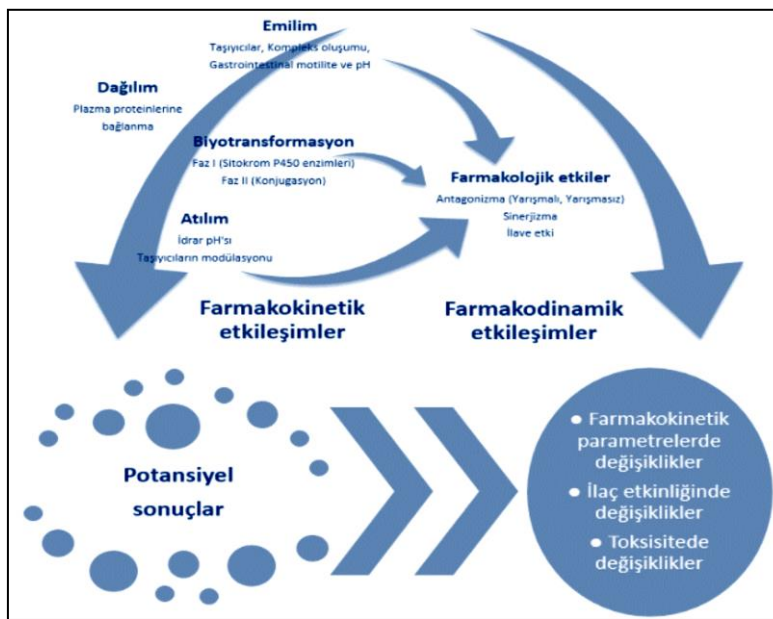
Rauvolfia serpentina bitkisi familyasındandır. Yaprakları mızrak veya elips şeklinde olup, rengi soluk yeşildir. Bitki, yaklaşık olarak 0,5 cm çapında, mor veya siyah renkte yuvarlak meyveleri olan beyaz veya küçük pembe çiçeklere sahiptir. Hipertansiyon tedavisinde tercih edilen fitokimyasal reserpinin ana kaynağı olarak bilinmektedir [56].

2.3. Tıbbi Bitkilerin İlaç Mekanizması Üzerine Etkisi

Antik çağlarda bitkiler hastalıkların tedavisi ve insan sağlığının korunmasında yaygın olarak kullanılmıştır [57]. Günümüzde çok sık rastlanılan kronik rahatsızlıklar başlıca ölüm ve hastalık nedenleri arasında yer almaktadır. Çağdaş tedavi ile ilaç kavramı arasında bir ilaca duyulan güvenilirlik, etkinlik, etki şekli, miktar ve tedaviye yönelik yanıt alınması önemli

özellikler olarak ortaya çıkarken, dünya genelinde “bitkisel ilaçlar” gittikçe artan bir popülerlik kazanmaktadır [58].

İlaç tedavisi ile bitkisel ilaçların eş zamanlı kullanımının artması ilaç-bitki etkileşimi riskini doğurmaktadır. Eş zamanlı kullanılan ilaç ve bitkilerin etkileşimi sonucunda, ilaçların toksikolojik veya farmakolojik özelliklerinde değişime neden olabilmektedir [2,3]. Bitki-ilâç etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamakla birlikte, farmakodinamik veya farmakokinetik etkileşim mekanizması şekilde verilmiştir (Şekil 2.1) [2,59].



Şekil 2.1. Bitki-ilâç etkileşim mekanizmalarının potansiyel sonuçları [2]

Bitki-ilâç etki mekanizma kavramı farmakokinetik açıdan, bitkisel bir ürün ile etkileşim sonucunda geleneksel ilacın dağılımı, emilimi, atılımı veya biyotransformasyonu üzerinde etkin olması olarak tanımlanmaktadır [4]. Bitkisel ilaçların, su ekstraktlarının tanenler, polifenoller, kalsiyum gibi metal katyonlar aracılığıyla kompleks oluşturarak emilim üzerinde inhibe edici etkisi oldukça yüksektir [2,60]. Bitki-ilâç etkileşiminde farmakokinetik mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamakla birlikte, kültürlenmiş hepatositler, hepatik mikrozomlar gibi *in vitro* model koşulların bitkisel bileşiklerin P-glikoprotein'nin (P-gp) ekspresyonu ve sitokromların (CYP)'ler aktivitesinin bitki-ilâç etkileşimine dair bilgiler ortaya çıkmıştır [61-63].

Bitki-ilaç etkileşiminin belirlenmesi, ilaçların tıbbi ve farmakolojik özellikleri baz alınarak yapılmaktadır. P-gp veya CYP3A4 için yüksek afiniteye sahip olan bitkisel ilaçlar, P-gp ve CYP'lerin güçlü indüksiyonuna veya inhibisyonuna neden olan bileşenler içeriyor ise, bitkisel etki potansiyelinin yüksek olması beklenmektedir. Örneğin; *Hypericum perforatum* L. adı verilen kantaron bitkisi Pgp'yi ve CYP'leri indükleyebilir veya inhibe edebilir. Bitkinin enzim indüksiyon ve inhibisyon özelliği iki aktif bileşen içeren hiperforinin konsantrasyonlarına bağlı olarak değişebileceği ifade edilmiştir [64]. Güçlü bir Pgp ve CYP3A4 indükleyicisi ve bitkinin aktif bileşeni olan hiperforin oral biyoyararlanımı düşürdüğü ifade edilmiştir. Buna ek olarak bitki ilaç mekanizmasında farmakokinetiğe bir örnek olarak *Citrus paradisi* olarak bilinen greylift ile etkileşim gösteren HMG-CoA redüktaz inhibitör yapıları, immün baskılayıcılar ve kalsiyum antagonistleri gibi çeşitli ilaçlar ile verilmiştir. Günümüzde bilinen en etkili mekanizmanın CYP P450'nin inhibisyonu olduğu bilinmektedir. *C.paradisi* ekstresi içerisinde yer alan kuarsetin, naringenin, kaempferol ve naringin gibi flavonoidlerin ilaç etkileşiminde görev aldığı ileri sürülmektedir [65, 66]. Bulgulara göre, *C. paradisi* suyunda hepatik hücre kültürü içerisinde düşük, bağırsak sistemi üzerinde büyük bir etkisi olduğu ortaya çıkmıştır. Bu etkileşimde baskın mekanizmanın, ince bağırsak içerisinde olan sitokrom P450 3A4'ün inhibisyon etkisi olduğu açığa çıkmıştır. Bu etki ilaç presistemik metabolizmada ciddi derece de bir azalmaya sebep olmaktadır. *C.paradisi* suyu alımının, enzimin parçalanmasını kolaylaştırması ile transkripsiyon sonrası oluşan aktivite ile CYP3A4 aracılığıyla mRNA aktivitesini azaltmaktadır. Ek bir mekanizma olarak Pgpand MRP2 ilaç akışı için inhibe edici olmuştur. Enterositlerden başlayıp ilaç lümenine doğru ilaç taşıyan yapılar, ilaç fraksiyonunun sistemik biyoyararlanımda ve emiliminde artışa neden olmaktadır [67]. Farmakodinamik etkileşimde bitki ilaç etkileşimi sonucunda benzer veya zıt farmakolojik etkenler ortaya çıkmıştır. Bitki ilaç etkileşiminin antagonistik, sinerjistik ve aditif katkı etkileri, bitkilerin de içerisinde olduğu her tip ilaçta görülmektedir. Antagonist etki veya sinerjik etki genelde bitkisel bileşenlerin ve ilacın aynı ilaç üzerinde komplementer veya yarışmalı etkisinden kaynaklanmaktadır [4]. Bir ilacın etkisini arttırmak için bitkisel antikoagülan, antihipertansif ve sedatiflerin kullanımı örnek olarak gösterilir. Bunlara ek olarak bazı kaynaklar *Hypericum perforatum*'un antidepresanlar ile birlikte kullanımının serotonerjik sendroma neden olduğu belirtilmiştir [62].

İlaç ve bitkilerin beraber kullanımı sonucu aydınlatılan mekanizmaların insan sağlığı açısından hayvanlar üzerinde yapılan çalışmaları oldukça sınırlıdır. Enzim ya da enzim

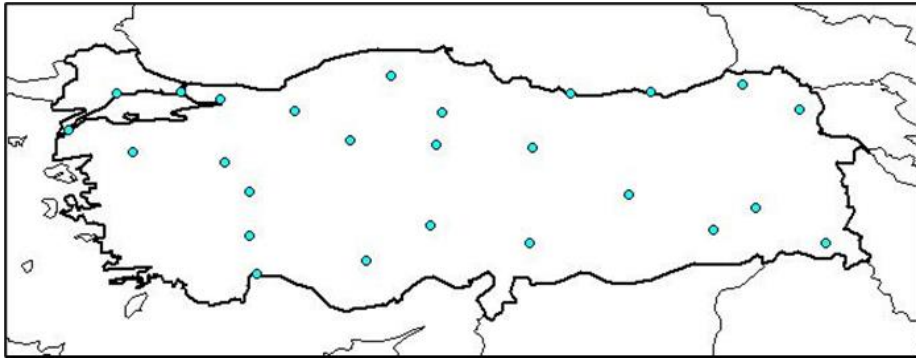
grubu üzerinden metabolize edilebilen ilaç ve bitkilerin beraber kullanımlarına dikkat edilmesi gerekir [68-75].

2.4. *Rosa spp.* (Kuşburnu)

R. canina, insan sağlığı açısından olumlu etkilerinin ortaya çıkmasıyla tıbbi alanda önem kazanan bitki ve meyve türleri arasında yer alır. Son yıllarda üzerinde daha çok araştırma ve çalışma yapılan türler arasında olduğu bilinmektedir.

Bitkinin patolojik durumlardan korunmak için veya bunların tedavisinde kullanılmak üzere tercih edildiği bilinmektedir. Avrupa, Batı Asya ve Kuzeybatı Afrika'da hızlı büyüyen ve tırmanıcı olan, boyu 1,5-3,5 metre arasında olan bitki gül türleri arasında yer almaktadır [76]. Ülkemizde yer alan ve *Rosaceae* (gülgiller) familyasında olan *R. canina* halk arasında kuşburnu olarak bilinmektedir. Türkiye'nin birçok bölgesinde yayılış gösteren bitkinin Avrupa ile Batı Asya kökenli olduğu bilinmektedir. Dünyada yayılım alanı fazla olan bu familya kuzey yarım kürenin ılıman bölgelerine kadar olan alan içerisinde çeşitlilik göstermektedir. Dünya üzerinde 100 cinsi ve 3000 türü olan bitki Türkiye florası içerisinde 25 takson 35 cins ve 250 tür ile temsil edilmektedir. Doğu Karadeniz Bölgesinde 17 adet takson ve Gümüşhane ilinde ise doğal 11 takson yetişmektedir. [77].

Ülkemiz sınırları içerisinde yer alan Amasya, Kastamonu, Gümüşhane, Tokat ve Çorum gibi Batı ve Orta Karadeniz bölgesi ile Erzurum, Erzincan, Bitlis, Hakkâri ve Van gibi Doğu Anadolu bölgesi içerisinde karasal iklimin hissedildiği illerde yaygın olarak yetişmektedir (Şekil 2.2) [32].



Şekil 2.2. Türkiye’de yetişen *Rosa* türlerinin yayılışı [78]

Ülkemiz florası içinde önemli bir yere sahip *Rosaceae* familyası, birçok odunsu ve otsu tür ile temsil edilmektedir. Genellikle her dem yeşil veya yaprak döken ağaçlara sahip olan familya, çalı şeklinde çok yıllık bitkileri içerir. Buna karşı az sayıda olsa da tek yıllık olan otsu bitkileri de içermektedir. Bazı bitkiler de gövde dikenli (*Crataegus*, *Prunus*) veya yüzey dikenli (*Rubus*, *Rosa*) olmak üzere dikenli bir yapıya sahiptir. Yaprak yapısı bileşik veya basit olup, çok sıralı, almaçlı ya da sarmal dizili, nadiren karşılıklı şekilde gelmektedir. Yaprak tabanında bulunan kulakçık yapıları yaprak sapı tabanı ile birleşmiş şekildedir. Çiçekleri aktinomorf, monoik veya hermafrodit olup, epigin veya perigin yapıdadır. Çoğunlukla hipantiyum bulunur. 4-5 adet sepal yapısına sahip olan familyanın 4-5 adet petalleri bulunmaktadır. Karpel yapısının serbest ve fazla sayıda olması nedeniyle meyvesi etli veya folikül tipinde sulu çekirdekli, nuks, kuru aken formundadır. Genellikle agregat meyvelidir. Besin maddeleri kotiledon yapısı içerisinde yer alır [73,78]. K5 C5 A 5/10/29 G (1-5-20) genel çiçek formülüne sahiptir. *Prunoideae*, *pomoideae*, *rosoideae*, *spiraeoideae* olmak üzere dört alt familyaya sahiptir [79]. *Rosaceae* familyasına ait alt türler; *Rosa sempervirens*, *Rosa phoenicia*, *Rosa arvensis*, *Rosa pisiformis*, *Rosa beggeriana*, *Rosa foetida*, *Rosa hemisphaerica*, *Rosa pimpinellifolia*, *Rosa elymaitica*, *Rosa gallica*, *Rosa villosa* (alt tür), *Rosa mollis* (alt tür), *Rosa hirtissima*, *Rosa tomentosa*, *Rosa jundzillii*, *Rosa micrantha*, *Rosa agrentis*, *Rosa pulverulenta*, *Rosa sicula*, *Rosa horrida*, *Rosa iberica*, *Rosa montana*, *Rosa canina*, *Rosa dumalis*, *Rosa heckeliana*'dır [78]. *R. canina* bitkisine ait sistematik basamaklar Çizelge 2.2'te verilmiştir.

Çizelge 2.2. *R. canina* bitki türünün taksonomik basamakları

Sistematik Sınıflandırma	
Alem	Plantae
Bölüm	<i>Magnoliophyta</i>
Sınıf	<i>Magnoliopsida</i>
Alt sınıf	<i>Rosidae</i>
Takım	<i>Rosales</i>
Familya	<i>Rosaceae</i>
Cins	<i>Rosa</i>
Tür	<i>Rosa canina</i> L.

R. canina bitkisinin çiçeklenme dönemi mayıs, haziran ve temmuz olan ilkbaharın son yazın ilk aylarıdır. 30-2500 m rakımlarında ormanlık alanda ve kayalık yamaçlarda 30-2500 m rakımlarında yaygın olarak bulunmaktadır. Çiçeklenme döneminden sonra çanak yapraklar dökülmektedir. Renkleri; koyu pembe, açık pembe ve beyaz olmak üzere değişen taç

yaprakları bulunmaktadır. Meyveleri 1-3 cm büyüklüğünde olmaktadır. Kırmızı, koyu pembe ve sarımsı renklerde meyve yapıları bulunur. Meyveleri sonbahar döneminde olgunlaşır. Meyve özellikleri açısından işlenmeye en yakın olan ve kuşburnu türleri içerisinde yaygın kullanımı olan türler arasında yer alır [80].

2.4.1. *R. canina* ve etnobotanik araştırmalar

Türkiye’de Rosa cinsi bitkiler halk tarafından soğuk algınlığı, diyabet tedavisi, mide ağrılarında, dispepsi, diyare, öksürük, diüretik ve bronşit durumlarında kullanılmaktadır. *R. canina* yaprakları ile hazırlanan çay diyabet tedavisinde tercih edilmektedir. 18. ve 19. yüzyıllar içerisinde kuduz köpeği ısırıklarını tedavi etmek amacıyla kullanılmıştır. Bu kullanım sebebi ile bitki halk arasında köpek gülü olarak isimlendirilir [81].

Arnavutluk ve İtalya’da kuşburnu mide ağrısı, böcek ısırıkları, öksürük ve antidepresan ilaç olarak kullanılmıştır. Bitki Macaristan’da Palinka yapımında kullanılırken Danimarka’da kuru kuşburnu tozu olarak kullanılmaktadır. İsveç’te kuşburnu ticari çorbaların üretilmesinde kullanılmıştır Çin’de iltihaplanma, romatoid artrit, soğuk algınlığı ve kronik ağrı gibi rahatsızlıkların tedavisine piyasaya sürülmüştür. C vitamini içeriğinin zengin olması sebebi ile gut, ateşli hastalıklar, üriner sistem, romatizma ve böbrek rahatsızlıklarında kullanılabileceği belirtilmiştir [5].

Bitkiler içerisinde bulunan maddeler antioksidan, antimitojen, antimikrobiyal ve antidepresan etkiye sahiptir. Bu nedenle, sebze ve meyveyi düzenli tüketen kişilerin kalp hastalıklarına ve kansere yakalanma riskinin azaldığı belirtilmektedir. Rosa türleri arasında en çok araştırılan ve çalışmalarda kullanılan *R. canina* türüdür. Bu türün meyveleri çeşitli amaçlarla naturopatik olarak ve gıda alanında kullanılmıştır. C vitamini dışında içerisinde A, B, P, K vitaminleri niasin, riboflavin ve pektin ve az oranda vanilin amino asitlerinin bulunduğu çalışmalarda yer almıştır [82,83].

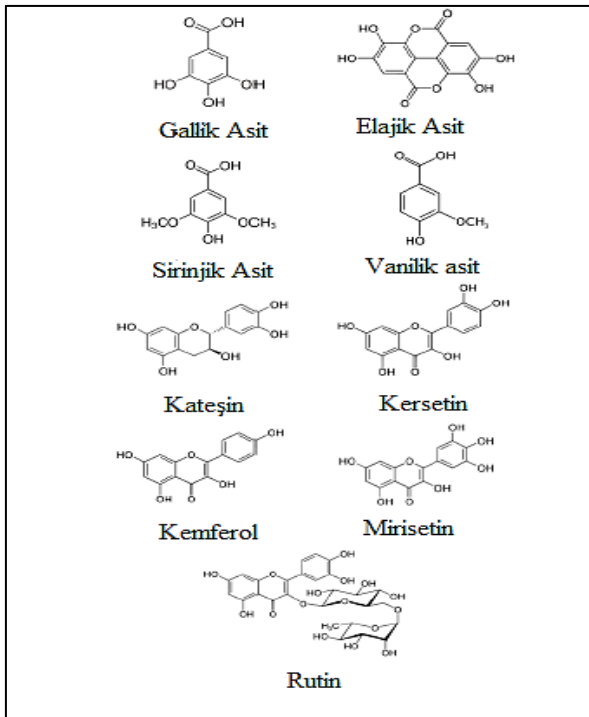
Kuşburnu bitkisinin enfeksiyona karşı vücudun bağışıklık sistemini güçlendirici etkisi ile soğuk algınlığına iyi geldiği bilinmektedir. Yapraklar, meyveler ve kökler su içinde kaynatılıp idrar söktürücü ilaç şeklinde kullanılır [82,83]. Bitkinin meyveleri içerisinde tahriş edici bir tabaka bulunması ile taze formu yerine işlenmiş veya halk tarafından işlenen

hali tüketilir. Kuşburnu meyveleri çoğunlukla reçel, jöle, çay ve probiyotik içeceklerde veya yoğurt şeklinde kullanılır. Cilt temizleme ve bakımında, gözleri rahatlatmada ve akne tedavisinde kullanıldığı kaydedilmiştir. Bitki üzerinde yoğun ve kapsamlı bilimsel araştırmalar yapılması sonucunda önemli bir vitamin, mineral, besin kaynağı ve fitokimyasal maddelerce zengin içeriğe sahip olduğu belirtilmiştir [84].

2.4.2. *R. canina* ve fitokimyasal çalışmalar

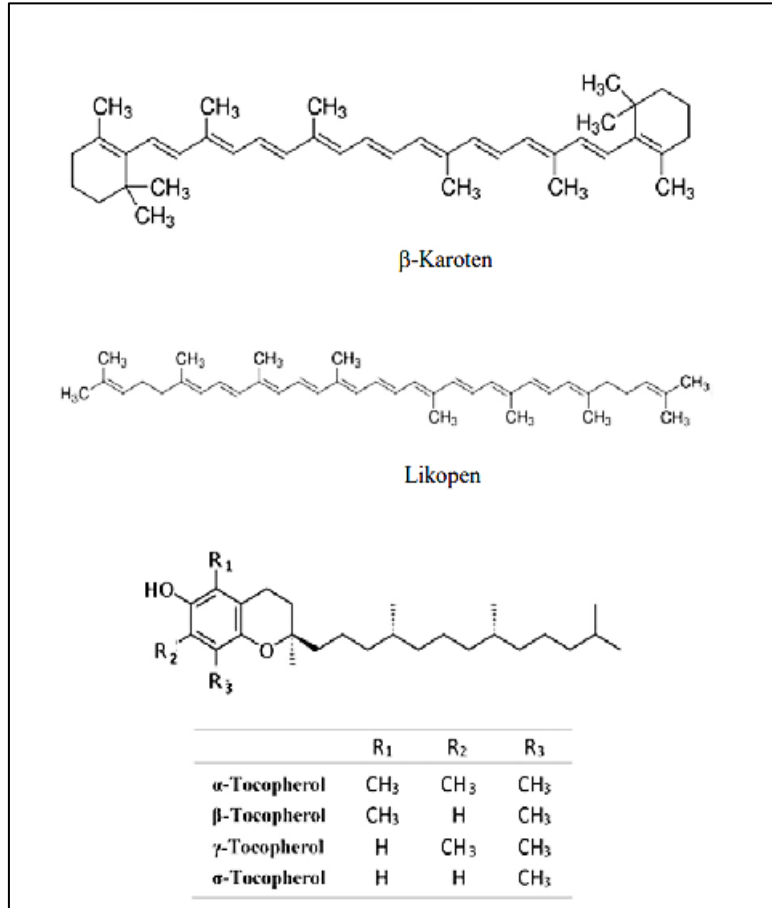
Gıdalarda bulunan antioksidan içerikli fenolik bileşiklerin, vücudun mikroplara karşı korunmasında, oksidatif stres oluşumunun engellenmesinde, yiyeceklere tat verme şeklinde birçok farklı işlevi bulunmaktadır. *R. canina* bitki meyvelerinin tıbbi değeri, fenolik madde içeriği ile değerlendirilebileceği ve fenolik yapılarının anti-karsinojenik, antioksidan etkileri ve gen ifadesinin değişmesine sebep olma gibi kapsamlı bir biyokimyasal etkinlik yelpazesi içeriğine sahiptir [85-90].

Yapılan çalışmalarda kuşburnu bitkisinin fenolik madde içeriğinin oldukça zengin olduğu ifade edilmiştir (Şekil 2.3). Bitkinin içerdiği fenolik maddelerin kamferol, hidroksisinnamik asit, kateşin ve kuersetin olduğu belirtilmiştir [86-92].

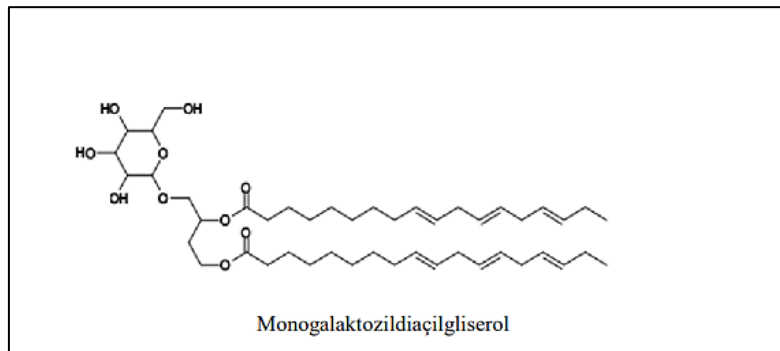


Şekil 2.3. *R. canina* bitki türlerinde bulunan fenolik bileşikler [9]

Suda çözünebilen antioksidanlar içeren *Rosa* türleri olduğu gibi tokoferoller ve karotenoidler gibi yağda çözünebilen antioksidanlar bulunduran türler de mevcuttur (Şekil 2.4). Bu yapılar içerisinde miktar olarak en çok gözleneni likopen ve β -karoten daha sonra zeaksantin, rubiksantin, β -kriptoksantin ve luteindir. *R. canina* türleri içerisinde yer alan kuşburnu bitkisinin meyvelerinde yüksek oranda glikolipitlerin olduğu belirlenmiştir (Şekil 2.5) [9].



Şekil 2.4. *Rosa* türlerinin içeriğinde olan lipofilik antioksidanlar [9]



Şekil 2.5. *Rosa* türlerinde yer alan monogalaktozildiasilgliserol [9]

R. canina olarak bilinen kuşburnu ekstresi içerisinde en güçlü ve en fazla bulunan triterpenoit türü pentasiklik triterpenlerdir. Örneğin; oleanolik asit ve ursolik asit, *R. laevigata*, *R. multiflora* ve *R. canina* 'dan izole edilmiştir [93].

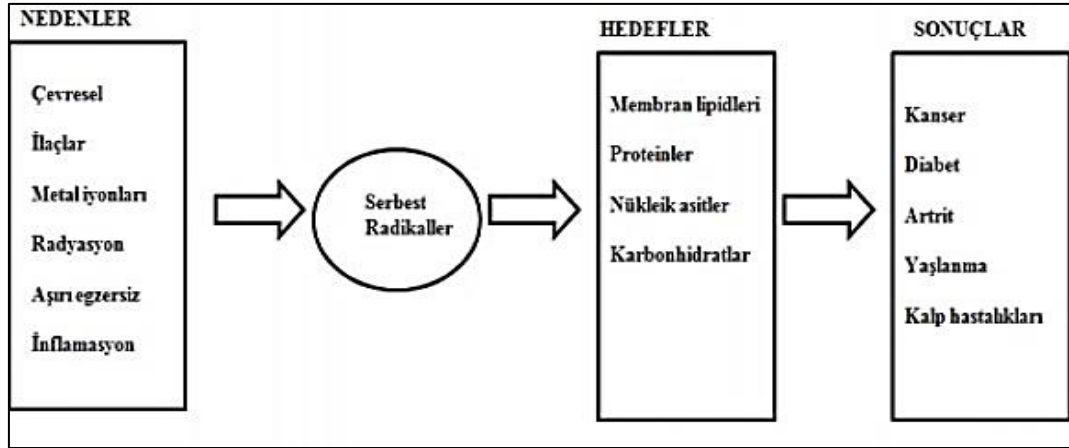
Fitosterol olarak bilinen steroid alkol grubu anti-inflamatuar ve antioksidatif etkileri içeren bitki kaynaklı yapılardır. *R. canina* türleri içerisinde yüksek miktarda bulunan fitosteroller arasında yer alan sitosterol; *R. multiflora*, *R. laevigata*, *R. canina*, *R. Davurica* 'dan elde edilmektedir [94, 95].

2.5. Serbest Radikaller ile Antioksidan Aktivite İlişkisi

2.5.1. Serbest radikaller

Serbest radikal, atomik ya da moleküler dış orbitalinde bir ya da birden fazla eşlenmemiş elektron bulunduran kimyasal bir yapıdır. Kararsız halde bulunan bu yapılar aktivasyon enerjilerinin yüksek olması ile çevrelerinde bulunan moleküllere saldırma eğilimindedir. Negatif, pozitif ya da yüksüz olabilirler. Serbest radikallerin içeriği lipit, enzim, protein, koenzimler, DNA ve RNA gibi biyolojik materyale zarar görme potansiyelini arttırmaktadır [7].

Bu tahrip edici etkiden ötürü radikaller vücut içerisinde inme, katarakt, diyabet, yaşlanma, kalp damar hastalıkları, sinir sistemi rahatsızlıkları ve bağışıklık sisteminde zayıflamaya paralel olarak hücre ölümlerine neden olur. Serbest radikaller vücut içerisinde antioksidanlar ile denge içerisinde bulunur. Hücreler az da olsa oksidatif stresi tolere edebilme kabiliyetini gösterebilirler bile genellikle antioksidan enzim sistemini aktive etmektedir. Serbest radikallerin hücre içerisinde artışı ile oksidatif stres meydana gelir. Serbest radikallerin artışı birçok nedene bağlıdır. Bunlar; çevresel etmenler, ilaçlar, metal iyonları, radyasyon, aşırı egzersiz ve inflamasyondur. Hücrede artış gösteren radikaller; membran lipidleri, protein, nükleik asit ve karbohidratları hedef alır. Hücreleri yıkıma uğratma özelliğine sahip olan serbest radikaller kanser, yaşlanma, diyabet, artrit ve kalp hastalıklarına neden olmaktadır [96].



Şekil 2.6. Oksidatif stresin sebep ve sonuçları [96]

Hücre içi savunma mekanizması yeterli olmadığı durumlarda reaktif oksijen türevleri ile antioksidanlar arasındaki düzen bozulur bunun sonucunda hasara karşı duyarlı olan karbonhidratlar, lipitler, DNA ve protein gibi hücresel makromolekül elemanları zarar görmektedir. Bazı serbest radikal ve oksidanlar Çizelge 2.3'te gösterilmiştir. Oksidanlara karşı vücut içerisinde oluşan antioksidan mekanizmaları Çizelge 2.4'de gösterilmiştir [97].

Çizelge 2.3. Serbest radikaller ve oksidanlar

Serbest Radikaller	Oksidanlar
Süperoksit anyon radikali	Singlet oksijen
Hidroksil radikali	Hidrojen peroksit
Hidroperoksil radikali	Ozon
Peroksil radikali	Hipoklorit
Lipit radikali	Azotlu asit
Nitrozil katyon	Nitro oksit
Nitrik oksit	Peroxyntrous asit

Serbest radikaller hücresel işlev ve normal solunum sırasında da ortaya çıkabilir. Normal fizyolojik durumlarda, solunum sırasında %2 olarak tüketilen oksijen vücut tarafından negatif yük içeren bir serbest radikal süperoksit anyonuna dönüşmektedir [98].

Çizelge 2.4. Oksidan kaynaklarına karşı bazı antioksidan savunma sistemleri [97]

Oksidan	Antioksidan Savunma
Sigara dumanı	Süperoksit dismutaz
Egzersiz	Katalaz
Çevre kirleticiler	Glutatyon peroksidaz
Radyasyon	Ubikinon
İskemi	E vitamini
Karsinojenler	C vitamini

Kararsız yapıda olan serbest radikallerin kökeni oksijen (Reaktif Oksijen Türleri: ROT), kükürt (Reaktif Kükürt Türleri: RST) ve azot (Reaktif Azot Türleri: RNT) kaynaklı olarak ifade edilmiştir. ROT ve RNT türevlerine örnek olarak hidroksil, alkoksil, süperoksit, lipid peroksil, azot dioksit ve nitrik oksit molekülleri verilebilir. Azotsuz radikal ve oksijen yapılarından türeyen hipokloröz asit, hidrojen peroksit ve peroksinitrit gibi radikal olmayan reaktif türlerde bulunmaktadır. ROT ve RNT yapılarının fizyolojik ve patolojik durumlarda insan ve hayvan hücrelerinde meydana geldiği belirtilmiştir. ROT nedenli oksidasyon hücresel boyutta hasara neden olmuştur. Oluşabilecek bu hasar nörodejeneratif, kanser ve kardiyovasküler rahatsızlıklarla ilişkilendirilmiştir. Bahsedilen radikal türevler ve radikal olmayan türevler Çizelge 2.5’de gösterilmiştir [99].

Çizelge 2.5. Bazı serbest radikal ve radikal olmayan reaktif türleri [99]

RADİKAL TÜRLER	RADİKAL OLMAYAN TÜRLER
<u>Reaktif Oksijen Türleri (ROT)</u>	<u>Radikal Olmayan Oksijen Türleri</u>
Hidroksil (OH)	Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)
Peroksil (ROO·)	Singlet oksijen (¹ O ₂)
Süperoksit (O ₂ ·)	Ozon (O ₃)
Alloksil (RO·)	Hipokloröz asit (HOCl)
<u>Reaktif Nitrojen Türleri (RNT)</u>	<u>Radikal Olmayan Nitrojen Türleri</u>
Nitrik oksit (NO·)	Nitrik asit (HNO ₂)
Nitrojen dioksit (NO ₂ ·)	Peroksinitrit (ONOO·)
	Nitrozil anyonu (NO ⁻)
	Nitrozil katyonu (NO ⁺)
	Nitril klorid (NO ₂ Cl)
	Dinitrojen tetroksid (N ₂ O ₄)

Birçok hücrede nitrik oksit sentezi L-argininden yapılır. Süperoksit ve nitrik oksit önemli reaktif türler arasında yer almaktadır. Hem nitrik oksit hem de süper oksit reaktifler hücresel düzeyde reaksiyona girebilmektedir. Bunun sonucunda reaktif azot türleri, reaktif oksijen türleri, reaktif sülfür türleri ortaya çıkar. Nitrik oksit, demir gibi geçiş metallerinin iyonlar ile bağlanabildiği reaksiyonlara katılarak ikincil mesaj niteliğinde olan guanozin monofosfat yapısının oluşumunda rol oynar. Nitrik oksit ve süperoksitin anyon radikalleri fizyolojik işlevler sırasında hücreler tarafından sentezlenen birincil düzeyde serbest radikaller olarak ifade edilir [100].

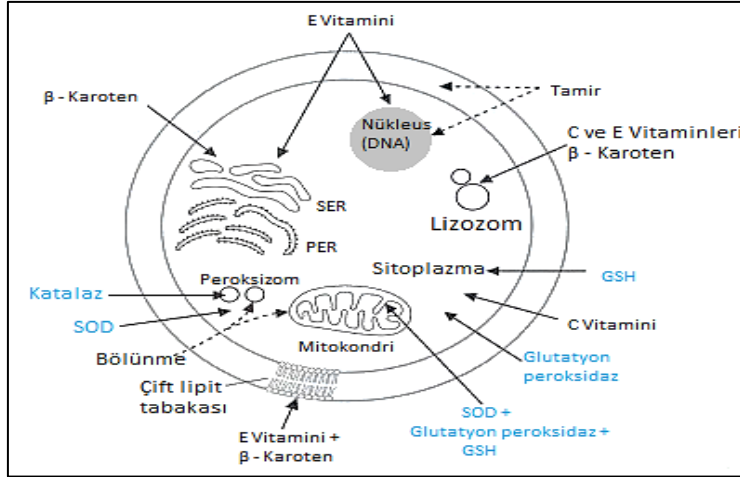
Oksijen metabolizması canlı hücrelerde birçok etmenden etkilenir. Radyasyon, kontamine sular, pestisitler, çevre kirleticileri ve tıbbi tedavi şekilleri gibi etmenler hücreler içerisinde oksijen kaynaklı serbest radikallerin oluşumuna neden olur. Hücrelere zarar verebilen reaktif oksijen türevleri vücut içerisindeki farklı doğal savunma sistemleri ile radikalleri kontrol

altına almaktadır. Bu sistemler birbiri üzerinde tamamlayıcı etkiye sahiptir. Serbest radikallerin hücrede neden olduğu oksidasyonları önleyebilme yeteneğine sahip olan bu radikalleri tutan ve elektron paylaşımı ile radikallerin kararlı hale geçmesini sağlayan maddelere antioksidan adı verilir. Bu maddeler mekanizmalarına göre, birincil ve ikincil antioksidanlar başlığı altında ayrılır. Birincil antioksidanlar; ilgili radikaller ile reaksiyona girerek kararlı hale dönüştürerek serbest radikal oluşumunu önleyen bileşikler olarak tanımlanır. Bu antioksidanlara örnek olarak; glutatyon peroksidaz (GSHPx), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz gibi enzim yapıları gösterilir. İlgili enzimler genel olarak radikallerin hücresel moleküllere zarar vermesini önleyebildiği gibi hücre içerisinde bir bölgeden diğerine geçişi de önlemektedir. İkincil antioksidanları oksijen radikalini yakalayarak radikal zincir reaksiyon üzerinde kırıcı etkisi olan E vitamini, bilüribin, C vitamini, polifenoller ve ürik asit gibi bileşikler oluşturmaktadır [101,102].

2.5.2. Antioksidanlar

Antioksidan sistem ve ilgili enzimler, yaşamsal reaksiyonların sonucunda üretilen serbest radikallerin makromolekül yapıları üzerinde oluşabilecek olumsuz etkileri iyileştirmekten sorumlu bileşiklerdir. Antioksidanlar hücresel ortamda bulunan ilgili serbest radikalın oksijenini kararlı hale getirerek oksidasyon reaksiyonlarının ilerlemesini veya başlamasını engelleyen bileşikler olarak görev alır. Antioksidan bileşikler birçok meyve, sebze, kabuk, kök, şifalı bitkiler, bitkilerin tohum yağları, ham bitki ilaçları gibi çeşitli şekilde bitki materyalinde bulunmuştur.

Sağlıklı kişilerde, serbest radikaller ile antioksidan savunma sistemi arasında denge mevcuttur. Bu denge, serbest radikal miktarının artması veya antioksidan seviyelerinin azalması ile bozulmaktadır. Bu bozulan denge sonucunda oksidatif stres meydana gelmektedir. Oksidatif stres (ROT) oluşumu veya antioksidanlar tarafından ortamdaki uzaklaştırılamaması olarak tanımlanır. Oksidatif stres oluşması sonucu (ROT) hücre düzeyinde karşılaşılabileceği olumsuz etkileri Şekil 2.7’de gösterilmiştir [103- 105].



Şekil 2.7. Reaktif oksijen türlerinin etkileri [105]

Antioksidanlar birçok farklı şekilde etkisini göstermektedir. Antioksidan etki mekanizmaları 4 farklı şekilde karşımıza çıkar.

1. Toplayıcı etki; ROT'lar ile etkileşime girerek radikallerin etkilerini azaltmaktadır. Antioksidanlar toplayıcı etki ile radikaller üzerinde etkilerini gösterir.
2. Bastırıcı etki; ROT'lar ile hidrojen atomu aktarımı yapıp etkileşime girerek radikallerin aktivitelerinde inaktivasyona veya azalmaya yol açmaktadır. Vitaminlerin radikaller üzerinde etkisi bastırıcı etkidir.
3. Zincir kırıcı etki; ROT'ları bağlayarak reaksiyon zincirlerini kırması ile radikaller üzerinde inaktivasyona yol açmaktadır. Hemoglobin bu şekilde bir etki gösterir.
4. Onarıcı etki; ROT'ların hücrede meydana getirdiği hasarların onarılması şeklinde tanımlanır [107].

2.5.3. Antioksidanların gruplandırılması

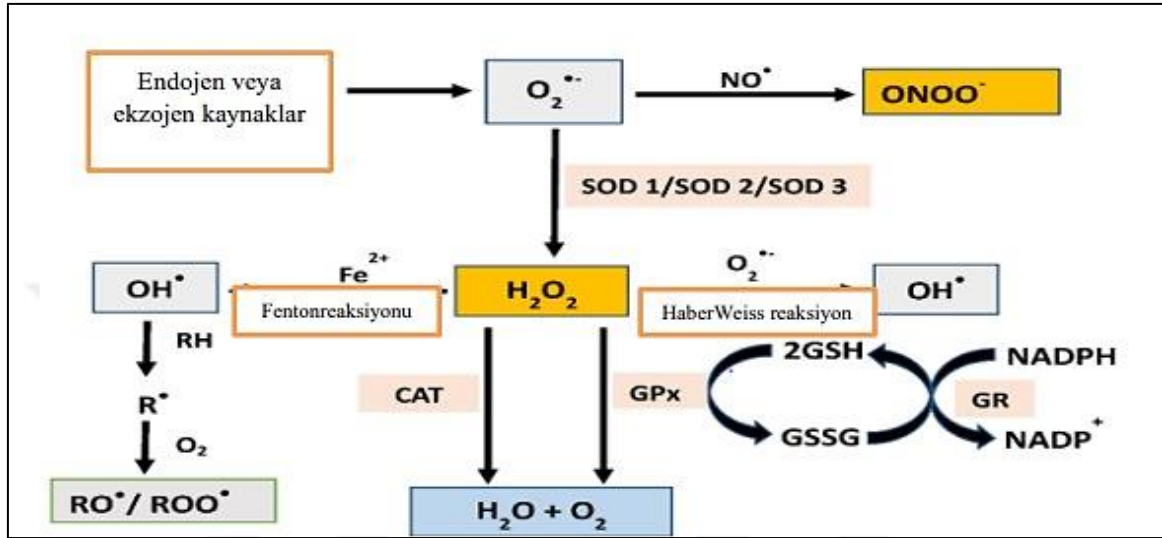
Antioksidanlar, doğal ve sentetik antioksidanlar şeklinde iki farklı başlık altında incelenir. Sentetik yapıda olan antioksidanların birçoğu fenolik yapı içerir. Antioksidan aktivite farklılıkları kimyasal yapıları üzerindeki çeşitlilikten kaynaklanmaktadır. Antioksidanların sınıflandırılması Çizelge 2.6'da verilmiştir [109].

Çizelge 2.6.Antioksidanların sınıflandırılması [109]

DOĞAL ANTİOKSİDANLAR			SENTETİK ANTİOKSİDANLAR
Enzimatik Olanlar	Enzimatik Olmayanlar		
Glutasyon peroksidaz Glutasyon redüktaz Katalaz Süperoksit dismutaz Glutasyon- S -transferaz	<u>Endojen Antioksidanlar</u> Bilirubin Ferritin Laktoferrin Ürik asit Albumin Glutasyon	<u>Eksojen Antioksidanlar</u> β-Karoten C Vitamini (Askorbik asit) Flavonoidler E Vitamini (Tokoferoller)	Bütillenmiş hidroksi tolüen Bütillenmiş hidroksi anisol Propil gallat

Doğal antioksidanlar

Son zamanlarda doğal antioksidanlar olarak karşımıza çıkan tıbbi bitkiler ve besinler kolay bulunabilir olması, yan etkilerinin olmaması veya daha az olması, güvenilir olması gibi özellikleri ile tercih sebebi olmuştur. Oksidanlara karşı insan vücudunda oluşan enzimatik antioksidanlar (CAT), (SOD) sürekli üretilmektedir. Besin ile dışarıdan alınan gıdaların da antioksidan içerikleri savunma mekanizmasını güçlendirmektedir. Besinlerin içeriğinde antioksidanlar doğal olarak bulunurlar. Fenolik maddeler, besinlerde yer alan temel antioksidan bileşikler arasında yer alır. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar ve klinik denemeler sebze ve meyve tüketimi ile bazı kronik rahatsızlıklar, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi hastalıkların oluşumu arasında zıt bir ilişki olduğunu göstermiştir. Sebze ve meyvelerin içeriğinde bulunan fenolik bileşikler, karotenoid, C vitamini ve E vitamini içeriği ile antioksidan etki gösterir. Oksidatif stres üzerinde etkili olan fenolik bileşikler, birçok hastalıktan korunmada önemli etkiye sahip olduğu bilinen bileşikler olarak ifade edilmiştir [110-112]. Reaktif oksijen türlerinin enzimler ile üretim ve savunma mekanizmaları Şekil 2.8’de gösterilmiştir [108].



Şekil 2.8. Reaktif oksijen türlerinin üretimi ve savunma mekanizması [108]

Antioksidan etki özelliğine sahip birçok madde bulunmaktadır. Antioksidan maddeler kaynaklarına ve yapılarına göre iki farklı sınıfa ayrılır. Kaynaklarına göre endojen ve ekzojen olarak gruplandırılan antioksidanlar, yapılarına göre enzimatik ve enzimatik olmayan olarak sınıflandırılır.

Enzimatik antioksidanlar

Hücre içerisinde çeşitli nedenlerle oluşan serbest radikaller birtakım enzimler aracılığıyla engellenir. Birçok enzim serbest radikal oluşumunu dolaylı ya da doğrudan olacak şekilde engellemektedir. Birtakım enzimatik antioksidanların çalışma şekli aşağıdaki gibidir:

Süperoksit dismutaz (SOD)

Joe McCord ve Irwin Fridovitch tarafından 1967 yılında keşfedilen (SOD)'ın serbest radikallerin hücrede oluşturduğu hasarlara karşı antioksidan etkiye sahip olan bir enzim olduğu ifade edilmiştir. Bu antioksidan enzimin yüksek reaktif etkiye sahip olan süperoksit anyonu oksijen ve düşük reaktif etkisi olan (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) reaksiyonları ile yıkılabilmektedir [113].

Oksijen metabolizmasının yan ürünü şeklinde ortaya çıkan süperoksit, vücut içerisinde dengede tutulmaz ise birçok hücre hasarına sebep olur. Biyolojik sistem içerisinde süperoksit

(O₂.-) dismutasyonu ile hidrojen peroksit meydana gelir. Gerçekleşen bu reaksiyonda iki adet süperoksit molekülünün iki proton alması ile hidrojen peroksit ve moleküler düzeyde oksijeni oluşturur. Bu reaksiyon SOD ile katalizlenir [114]. Bu enzim serbest radikal hasarlarını önleyebildiği gibi hücrelerin onarılması ve yenilenmesinde de görev alır. SOD; brokoli, brüksel lahanası, buğday, arpa ve lahana gibi besinlerde doğal olarak bol miktarda bulunur. Gehrig hastalığı olarak bilinen Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS) gelişimini inhibe etmede önem taşır. İnflamatuvar hastalıkların tedavisinde, kornea ülserinde, prostat sorunlarında ve yaralanmalarda kullanılır [113].

Glutasyon peroksidaz (GPx)

Glutasyon peroksidaz (GPx) 80 kDa ağırlığında ve selenyum içeriğine sahip tetramerik yapıda olan bir peroksidaz enzimdir. Bu enzim genellikle sitozol içerisinde bulunur. İlgili enzim redüklenmiş glutasyon tripeptidi (GSH) ile çeşitli hidro-peroksit moleküllerini içeren reaksiyonlarını katalizleyerek, peroksit moleküllerinin suya dönüşmesini sağlar. Bu özelliğinden dolayı bu enzim, oksidatif hasar içeriğine karşı memeli hücre membran yapısının bütünlüğünü ve organelleri korur. Glutasyon mekanizması en önemli antioksidan savunma mekanizması olarak bilinmektedir [113].

Katalaz (CAT)

Katalaz poriferin içeriğine sahip yüksek molekül ağırlığı olan bir enzimdir. Yüksek konsantrasyonda hidrojen peroksidi yıkabilmektedir. Bu enzim hidrojen peroksidi oksijen ve suya dönüştürerek radikali etkisiz hale getirir. SOD aktivitesi sonucunda meydana gelen H₂O₂ bir radikal öncüsü olması nedeniyle oksidatif hasara neden olur. Bu nedenle katalaz, hidrojen peroksit molekülünün iki elektronunu su ve oksijene dönüştürmesini katalizleyerek hücre içerisindeki derişimini azaltır.

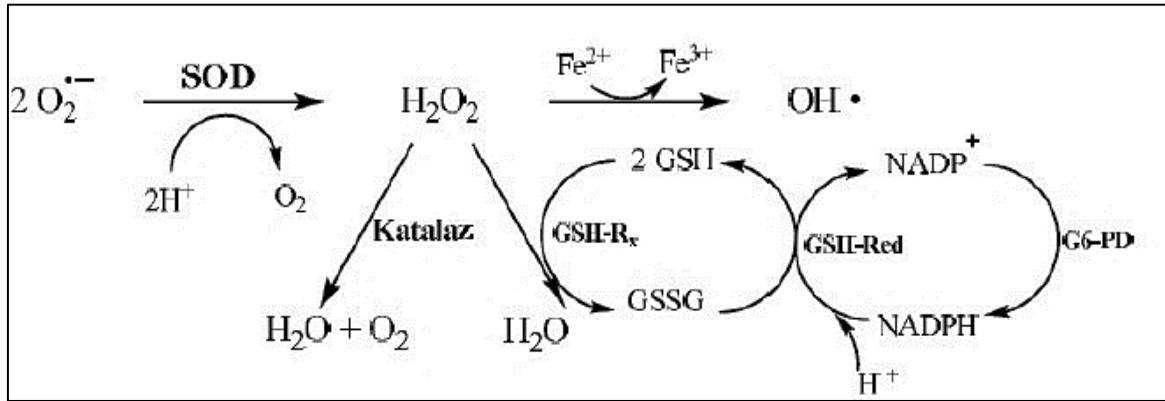
Gıda endüstrisinde de kullanılan CAT peynir ve süt üretimi öncesinde meydana gelen hidrojen peroksidin derişimini azaltmak veya ortadan kaldırmak için kullanılır. Kullanım alanı olarak yaygınlığı nispeten daha az olan kontakt lens bakımında da kullanımı sağlanmıştır. Son dönemlerde estetik sektöründe kullanımı da yaygınlaşmıştır [113].

Glutatyon-S-transferaz (GST)

Glutatyon S-transferazlar, hidrofilik ve elektrofilik bileşiklerin glutatyon ile etkileşimleri sonucu, hücrel makromolekülleri reaktif olan elektrofille karşı koruyan grup içerisinde Faz-II detoksifikasyon ailesinin üyesi olan bir enzimdir. 20.000-25.000 dalton molekül ağırlığına sahip olan bu enzim her bir biriminde yaklaşık 200-240 amino asitten oluşan alt birimlere sahiptir. Enzimin sıçan karaciğerinde ilk olarak Boyland ve ark. tarafından bulunduğu belirtilmiştir [115].

Bu enzimler kataliz reaksiyonlarında, elektrofilik substrat yapıların üzerine glutatyon tripeptidin nükleofilik reaksiyonunu katalizler. Bunun dışında oksidasyon sonucu oluşan ürünlerin veya dışarıdan alınan toksik içerikli maddelerin, vücutta bulunan makromoleküller ile birleşmesini önleyerek hücre bütünlüğünü korur. Bu nedenle GST enzimleri, hücre bütünlüğü için koruyuculuk görevini üstlenen enzimler arasında yer almaktadır [115].

Oksidatif stresin sebep olduğu zararlı etkenlere karşı enzimatik savunma sistemleri özet olacak şekilde verilmiştir (Şekil 2.9) [116].



Şekil 2.9. Oksidatif strese karşı enzimatik savunma mekanizmaları [116]

Enzimatik yapıda olmayan antioksidanlar

Vitamin C (Askorbik Asit)

C vitamininin keşfinden önce birçok denizcinin ölmesine neden olan iskorbit hastalığının narenciye tüketiminin azlığından yani vitamin eksikliğinden kaynaklandığı belirtilmiştir. C

vitamini protein metabolizması, L-karnitin biyosentezi, demir Emilimi ve kollajen biyosentezi gibi birçok metabolik yolak içerisinde rol alır [116]. C vitamini veya L-askorbik asit doğada yaygın olarak bulunmasının yanı sıra sentetik olarak da üretilir. Askorbik asit hem birincil hem de ikincil antioksidan görevi görmektedir. Askorbik asit hidrojen atomu vermesi ile birincil antioksidan özelliği gösterir. Serbest radikalleri elektron ilgisi nedeniyle hidrojen peroksit'e dönüştürerek doğrudan süpürme etkisi gösterir. Bitki dokularında özellikle oksidatif stres sonucu oluşabilecek hücresel hasarı engeller. Gıdalar içerisinde C vitaminine sahip olan meyve veya sebzeler askorbik asit içeriği ile ikincil yapıya sahip olan antioksidanlar olarak nitelendirilir. Oksijeni ortamdan uzaklaştırarak gıda sistemi üzerindeki yollarda indirgeyici aralığı redoks sistemi üzerine kaydırır. Bir veya iki elektron transferi ile okside olan askorbik asit, bu özelliği ile endiol yapısına sahiptir. Bu özellik oksijen için yüksek bağlanma ilgisi oluşturur [118].

Kanser, inme, ateroskleroz gibi rahatsızlıklar oksidatif stres kaynaklıdır. C vitamini oksidatif hasarı önleyebilme özelliği ile hastalıkların etkisini ve hastalıklara yakalanma riskinin azalmasında etkili olmuştur [119].

Vitamin E (α - tokoferol)

1922 de Evans ve Bishop tarafından keşfedilen E vitamini yaşamsal olaylar için önem taşımaktadır. İlgili vitaminin eksikliğinde erken doğan prematüre bebeklerde hemolitik anemi görülmektedir. Eksikliğine bağlı olarak A-betalipoproteinemi, ataksi ve kronik yağ Emilimi problemi gibi ciddi sağlık sorunlarına neden olmaktadır [120].

E vitamini 8 farklı forma sahiptir. Bu formlar; β -, γ -, α -, ve δ - tokoferol ve β -, α -, γ - ve δ tokotrienoldur. Bu formların hepsi bitkilerden sentezlenir. İnsan da α - tokoferol formu E vitamini ihtiyacını karşılamaktadır. Bunun nedeni karaciğerin transfer protein olarak sadece α - tokoferolü tanımasıdır. İlgili vitamin hidroksil grubu içermesiyle indirgeyebilme özelliğine ve eşlenmemiş elektronlarla reaksiyona girebilme özelliğine sahiptir.

Yağda çözünebilen bir vitamin olan E vitamini antioksidan özelliğe sahiptir. Yağda çözünebilmesi ile lipid membranına kolay bir şekilde bağlanarak lipid peroksidasyonuna karşı savunma mekanizması oluşturmaktadır. Redoks reaksiyonunda C vitamini ile radikal dönüşüm sağlayarak α - tokoferolü meydana getirmektedir. E ve C vitamini arasındaki bu

tamamlayıcı uyum antioksidan etkinin güçlü olması ile kansere karşı koruyucu etkisi olduğunu ortaya koymaktadır [121].

Karotenoidler

Karotenoidler kromatofor ve kloroplast yapılarında bulunan, bitkilere turuncu, kırmızı ve sarı renklerini veren doğal içerikli antioksidanlardır. Bu antioksidan yapıları lipit peroksit radikal içeriğini stabilize etmesinin yanı sıra güneş ışınlarını soğurarak hücreleri oluşabilecek hasarlara karşı korur [113].

Serbest radikalleri yakalayan karotenoidler birincil antioksidan ya da oksijeni tutarak ikincil antioksidan olarak hareket eder. Besinlerin içeriğinde yer alan karotenoidler ikincil antioksidan yapısındadır [118].

Polifenoller

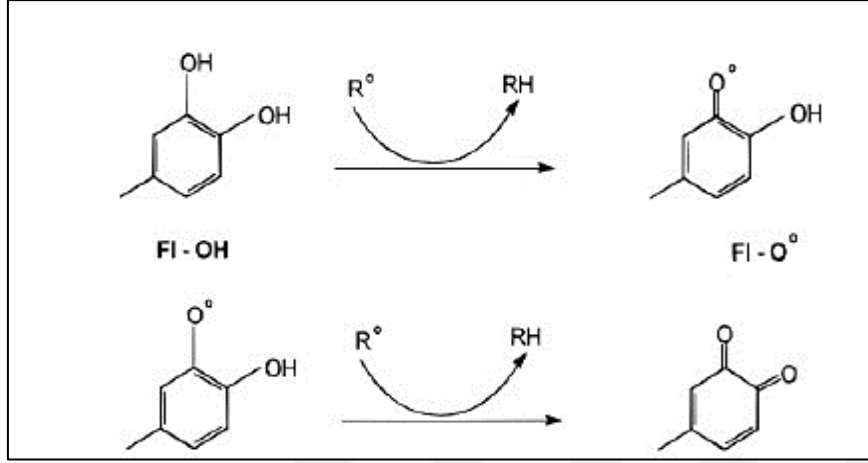
Bitkiler aleminde olduğu gibi insan beslenmesinde de geniş bir yere sahip olan fitokimyasal sınıflandırma içerisinde yer alırlar. Diyetle tüketilen fenolik bileşikler, fenolik polimerler (tanenler), flavonoidler ve fenolik asitleri içermektedir [120].

Flavonoidler

Bitkiler, antioksidan özellikteki vitaminlerin yanı sıra onlar kadar antioksidan aktiviteye sahip olan flavonoidler (serbest radikal süpürücü moleküller) içermektedir [122].

Flavonoidler geniş bir sınıflandırma içerisinde yer almaktadır. Spesifik şekilde C6-C3-C6 karbon iskelet yapısı ile karakterizedirler. Kromanol adı verilen benzopirano aromatik halkasının konumuna göre üç farklı sınıfa ayrılırlar. Bunlar; izoflavonlar (3-benzopiranlar), 2-fenillbenzopiranlar ve neoflavonoid (4-benzopiranlar) yapılarıdır. Flavonoidler bitkilerde glikolize edilen yapılar olarak bulunmuştur. Meyve, yaprak ve çiçeklerin turuncu, kırmızı ve mavi renklerinin parlak olmalarına katkıda bulunurlar. Çeşitli meyve ve sebze içeriğinin yanı sıra yemişlerde, tahıllarda, tohumlarda ve baharatlarda bulunmaktadır [122]. Antikanser, antimikrobiyal, antiviral, anti inflamatuvar aktiviteleri de içeren çeşitli farmakolojik ve biyolojik özelliklere sahiptirler [124].

Flavonoidler antioksidan etkilerini serbest radikaller ile reaksiyona girerek gösterirler. Flavonoidler; lipooksijenaz ve siklooksijenaz enzimlerini inhibe ederek ortamda oksidatif stres oluşturabilecek hidroksil radikali, süperoksit radikali ve singlet oksijeni temizlerler. Flavonoidlerin radikaller üzerinde etkili olan antioksidan etki mekanizması Şekil 2.10'da gösterilmiştir [123].



Şekil 2.10. Flavonoidlerin antioksidan mekanizması [123]

Alkoksil radikalini ve peroksil radikalini yakalayan flavonoidler lipid peroksil zincirini kırma etkisine sahip olan bileşiklerdir. Bu bileşikler hücreler arasındaki sinyali artırarak, laktat transportunu engelleyerek, kalmodülin yapısını inhibe ederek, hücre proliferasyonunu azaltıcı etki göstererek anti-tümör özelliğini ortaya koyar. Anti-viral etkilerini ise viral olan proteinlere bağlanarak ilgili virüsün replikasyonunu ve protein sentezini engelleyerek göstermektedirler. Anti-inflamatuvar etki mekanizmasında ise savunmada görevli mast hücrelerinin alerjik reaksiyonlarda ortaya çıkan histamin salınımını inhibe ederek gösterir [122,125].

Fenolik asitler

Fenolik asitler, flavonoid biyosentez öncülü olarak görev alırlar. Bu asitler hidroksibenzoik asitler (Gallik asit, elajik asit, salisilik asit, vanillik asit ve 4-hidroksibenzoik asit) ve hidroksisinamik asitler (Kafeik asit, sinapik asit, ferulik asit) olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Fenolik asitler serbest halde bulunmazlar. Karboksil grupları ile amino asit, protein, karbonhidrat yapıları reaksiyona girerek alkollerle fenol ester yapılarını, amino grupları ile amid bileşiklerini oluştururlar [118].

Hidroksisinamik asitler, bitkisel besinlerde yaygın olarak bulunmaktadır. Fenilpropan halkasına bağlanma ilgisi olan asitler hidroksil grubunun sayısına ve konumuna göre farklı özellikler içerir. Bu bileşikler arasında kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit önem teşkil etmektedir [124].

Hidroksibenzoik asitler, bitkisel besinlerin içerisinde iz miktarlarda (10 ppm kadar) bulunur veya bulunmazlar. Bu bileşikler arasında salisilik asit, gallik asit ve vanilik asit gibi yapılar yer alır [126].

Fenolik polimerler

Tanenler bitkilerin doğal yapısında olan polifenol yapısındaki bileşiklerdir. Proteinlere bağlanıp çöktürme özelliğine sahip olan bu bileşikler insanların ve hayvanların tükettiği birçok gıda içeriğinde yer almaktadırlar [127].

Ürik asit

Pürin metabolizmasında azotlu atık ürünü olan ürik asit vücut sıvılarında yaygın olarak bulunur. Serbest radikallere karşı süpürücü etkiye sahip olan ürik asit insan kanı içeriğinde bulunan önemli antioksidanlar arasında yer alır. Epidemiyolojik çalışmalara bakıldığında kardiyovasküler hastalıklar ve hiperürisemi için risk faktörü olmasına rağmen ateroskleroza karşı gelişmiş doğal antioksidan mekanizmasına sahip olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalar ışığında kırmızı şarabın kalp hastalıklarına karşı koruyucu etkisinin urat sebebiyle olduğu belirtilmiştir [128].

Bilirubin

Bilirubin, hem oksijenaz izoformunu ve hem oksijenaz-1 yapısını uyararak hem substratını kullanarak demir, biliverdin ve karbon monoksiti oluşturmaktadır. Biliverdin hızlı olarak azalma eğilimine geçer ve biliverdin redüktaz tarafından yapı bozunarak son ürün olan bilirubin oluşur. Son zamanlardaki araştırmalara göre bilirubin iskemik rahatsızlıkların önlenmesinde rol oynamaktadır [128].

Ferritin

Ökaryot ve prokaryot hücrelerde demir depolama görevi gören ve toksik madde içeriğini emilme olayı ile tolere edebilme potansiyeline sahip olan protein kompleksleridir. Bu protein bileşiği tüm hücre tiplerinde bulunmaktadır. Omurgasız canlılarda düşük ve yüksek moleküler ağırlıklı 19 kDa ve 21 kDa alt üniteleri bulunmaktadır. Demir hücresel yollar ve işlevler için elzem olan bir yapıdır. Hücreler için fazla olan demir oksidatif stres oluşumuna yol açarak protein, hücre zarı ve DNA yapılarına etki etmektedir. Demir seviyesinin dengede tutulması transkripsiyon sonrası meydana gelen mekanizmalarla sağlanmaktadır [128].

Glutasyon

Sistein, glisin ve glutamat amino asitlerden oluşan molekül ağırlığı düşük olan bir tripeptittir. Sitozol, mitokondri ve çekirdekte bol olarak bulunur ve antioksidan savunma mekanizmalarında önemli roller oynar. Glutasyon dolaylı olarak belli yolları kullanarak oksidatif strese karşı rol oynarken doğrudan ya da detoksifikasyon üzerinde yer alan enzimlerin kofaktörü olarak kullanılmaktadır. Seloenzim grubunu içeren bir enzim olması nedeniyle selenyum içeren besinlerin tüketilmesi antioksidan enzim aktivitesi için önem teşkil etmektedir [129].

Albumin

Her bir molekül yapısında bir adet sülfhidril grubu olduğu için kendi yapısı ile serbest radikallere karşı etki mekanizmasını ortaya koymaktadır. Antioksidan savunma mekanizmasının hücre dışı elemanları arasında yer alır. Bu molekül üzerinde meydana gelen hasar sonucu serbest radikalleri etkisiz hale getiremeyecek duruma gelir. Hücre dışında yer alan farklı plazma proteinleri olan transferrin ve serüloplazmin antioksidan aktivite etkisi gösterir [130].

Sentetik Antioksidanlar

Bütillenmiş Hidroksianisol (BHA)

BHA, beyaz renkte mumsu parçalar halinde bulunan 2-tertiyerbütıl, 3-tertiyerbütıl, 4-hidroksianisol izomer yapılarının karışımı şeklinde karşımıza çıkan sentetik bir antioksidandır. Bitkisel ve hayvansal yağlarda çözünürken suda çözünmez. 1948 yılında besin maddelerine koruyucu şeklinde ilave edilmesine karar verilmiştir. Sıvı ve katı yağlarda antioksidan kullanımının devam ettiğı bilinmektedir [131].

Bütillenmiş Hidroksitoluen (BHT)

İlk olarak soya yağı yapısının otoksidasyonunda bozunma sonucunda meydana gelen ürünlerin belirlenmesi sırasında keşfedilmiştir. Yağların oksidasyonu ile ortaya çıkan peroksit radikal bileşiklerinin neden olduğı zararı ortadan kaldırdığı ifade edilmiştir [131].

Propil Gallat (PG)

Bitkisel ve hayvansal kaynaklardan elde edilen yağların korunması için tercih edilen, gallik asit esteri olarak bilinen beyaz renkli kristal şeklinde bulunan antioksidandır [130]. Sitrik asit ile kullanılan bu sentetik antioksidan bakır ve demir iyonlarının katalizlediğı tepkimeleri önleyerek etki eder [128].

Antioksidan başlığı altında incelediğimiz yapılarda veya yolaklar üzerinde meydana gelen hasarlar sonucunda oksidatif stres kaynaklı hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Oksidatif stres kaynaklı ortaya çıkan hastalıklar; kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve merkezi sinir sistemi hastalıklarıdır. Yapılan çalışmalar doğrultusunda C ve E vitaminin kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu etkisi olduğı ortaya çıkmıştır. C vitamini eksikliği sonucu NO üretiminin artışı sonucunda yüksek tansiyon ve damar tıkanıklığı gibi rahatsızlıklar meydana gelmektedir. E vitamini kullanan hastalarda LDL düzeyinin vitamin tüketmeyen kişilere göre daha iyi düzeyde olduğı gözlenmiştir. Kanser araştırmalarının gelişmesinde en önemli adım DNA hasarına neden olan oksijen kökenli radikal mekanizmaların keşfedilmesi olduğı düşünülmektedir. Serbest radikal yapıları DNA sarmalı üzerinde hasar oluşturarak gen diziliminde dikkat çeken bozukluklar meydana getirir. Bu nedenle bazı hastalıklar ortaya

çıkmasına sebep olurlar. Bu hastalıklar arasında böbrek yetmezliği, inflamasyon, yaşlanma ve diyabet sayılabilir. Düşük glutatyon seviyesi ve oksijenin fazla tüketilmesi ile demir iyonları ve reaktif molekül türlerinin derişiminin artması sonucunda nöron hücreleri oksidatif strese karşı savunmasız kalmaktadır. Oksidatif stresin oluşması ile antioksidan savunma mekanizması zayıflayarak bazı hastalıkları meydana getirir. Bu hastalıklar; beyin tümörü, Parkinson, down sendromu ve Alzheimer olarak karşımıza çıkar [132-134].

2.6. Deoksiribonükleik Asit (DNA)

2.6.1. DNA'nın yapısı

Deoksiribonükleik asit (DNA), hücre içerisinde yer alan genetik bilginin kopyalanmasını, nesiller boyu aktarımının yapılmasını ve taşınmasını sağlayan en temel yapıdır [135]. Bu bilginin transkripsiyon ve replikasyon basamaklarında enzim ve protein gibi hayati düzeyde önem taşıyan moleküllerin sentezinde görevlidir [136,137]. DNA hücredeki görevleri nedeniyle antibiyotikler başta olmak üzere birçok ilacın ve tıbbi bitkinin hedefidir [141,142].

2.6.2. DNA -ilaç etki mekanizmaları

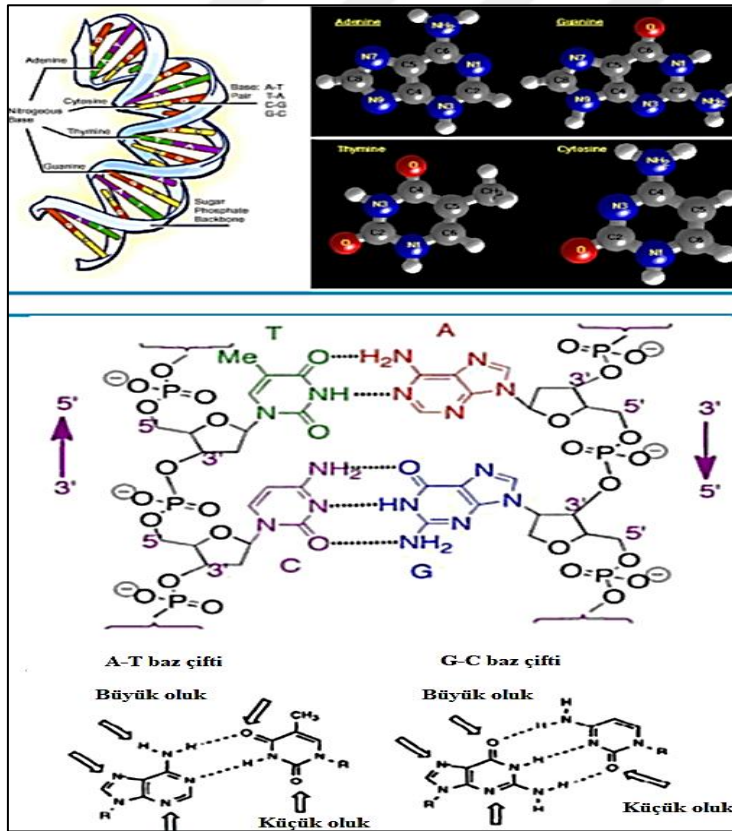
DNA'nın küçük moleküller ile etkileşimleri kovalent olmayan ve kovalent etkileşimler olmak üzere ikiye ayrılır. Bazı maddeler DNA ile zincirler arası, zincir içi ve alkilleme yöntemiyle kovalent bağlanma yapar. Kovalent bağlanma kalıcı ve geri dönüşümsüzdür. Bu sebeple DNA aktivitesinin engellenmesine bağlı olarak hücre ölümüne sebep olur. Yüksek bağlanma kuvvetinden dolayı DNA'nın omurgasının değıştirmesi sonucunda replikasyon ve transkripsiyon basamakları zarar görmektedir [139].

Cis- platin [cis-dichlorodiammineplatinum (II)] DNA bazlarında bulunan azotun kloro grupları arasında zincirler arası veya zincir içi çapraz bağlanmalar yapan bir kanser ilacıdır. Alkilleyici ajanlar DNA'ya alkil grubu eklemesi yapar. Kanser hücreleri üzerinde öldürücü etkisi olan alkilleyici ajanlar DNA'ya zarar verirler. Bu ajanlar DNA molekülüne alkil veya metil grupları eklemesine ek olarak guanin bazı ile etkileşime girer. Bu nedenle DNA doğru baz eşleniğı yapamaz. Ayrıca bu ajanlar DNA'nın kendi atomları arasında da çağraz bağlanmalar oluştururlar. Bu bağlanmalar DNA'nın tek zincirde transkripsiyon ve replikasyon için kalıp görevi görmesi engeller. Bundan dolayı hücre fonksiyonlarını

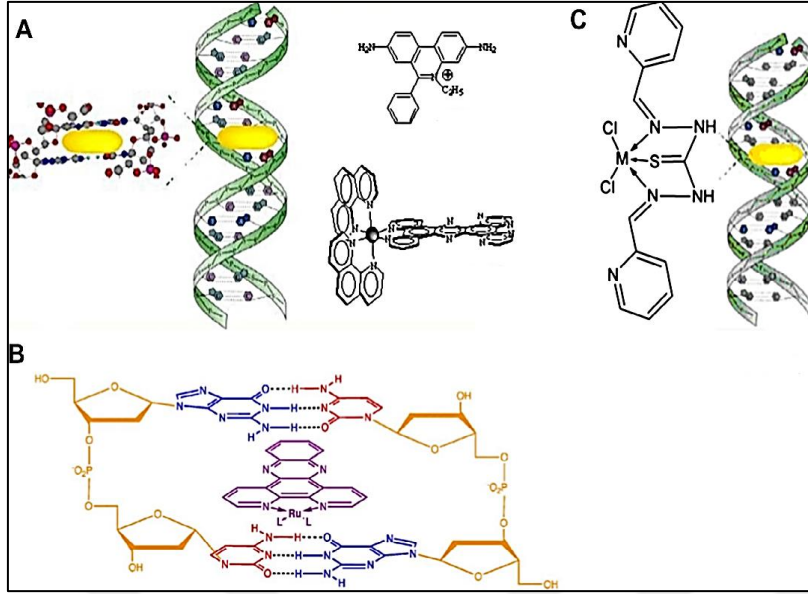
yapamadığı için ölür. Alkilleyici ajanlar yanlış baz eşleşmesine neden olarak mutasyon meydana getirir. Bu olay hücreyi apoptozise göndermektedir. Alkilleyici ajanlar günümüzde birçok kanser türü için kullanılmakta olan antikanser ilaçlarıdır (Şekil 2.11) [141].

Kovalent olmayan bağlanmalar DNA'nın yapısında değişiklikler meydana getirir. Buna ek olarak DNA zincir kırıklarına da neden olurlar. Topoizomeraz gibi proteinler DNA'nın etkileşimlerine müdahale eder [139]. Kovalent olmayan bağlanmalar DNA üzerinde geri dönüşümlüdür. Bu bağlanmaların üç türü vardır.

1. Elektrostatik bağlanma: DNA'nın negatif yüklü olan fosfat omurgası ile pozitif yüklü uçları arasında gerçekleşir.
2. Oluk bağlanma: DNA üzerindeki küçük ve büyük oluklara maddeler Van Der Waals ya da hidrojen bağları ile bağlanırlar.
3. İnterkalasyon: Nükleik asit baz çiftlerinin küçük moleküllerin arasına girmesi ile oluşur (Şekil 2.12) [139,141].



Şekil 2.11. DNA bağlanma bölgeleri [139]



Şekil 2.12. DNA bağlanma kompleksi

(A) DNA baz çiftleri kompleksinin üzerine düzlemsel bir ligandın araya eklenmesi, (B) Ara katlanmış kompleks, (C) Kompleksin DNA'ya interkalasyonu.

Bitkilerde bulunan bazı fenolik bileşikler mantar ve böceklerle karşı doğal savunma mekanizmasıdır. Bu bileşikler DNA'nın yapısına entegre olup pirimidin bazlarına bağlanır. Bunun sonucunda replikasyon ve transkripsiyon faaliyetleri engellenen hücreler ölür.

DNA üzerinde çeşitli yollarda hasara neden olan serbest radikaller DNA yapısında değişikliğe neden olur. Bu hasar sonucunda kanser, diyabet gibi bazı hastalıkların etiyolojisinde yer alır. Bu rahatsızlıkların gen düzeyinde ifade edilmesi ve nesillere aktarılması ile son zamanda yapılan çalışmaların hızlanmasına ve yeni pencerelerin açılmasına zemin oluşturmaktadır [143].

2.7. Diabetes Mellitus (Şeker Hastalığı)

2.7.1. Diabetes mellitus tanımı

Diabetes mellitus (DM) insülin aktivite bozukluğu ve/veya insülin eksikliğinde ortaya çıkan ketoasidoz ve koma gibi tipik akut, retinopati, nefropati, nöropati gibi vasküler bozukluklar ile seyreden kronik metabolik bozukluklara neden olan ve hiperglisemi ile karakterize edilen bir endokrin sistem rahatsızlığıdır [11].

2.7.2. Diabetes mellitus tarihçesi

Mellitus sözcüğü "bal" olan "mel" ifadesinden türetilmiştir. Bu hastalık ile ilgili ortaya çıkan bilgiler 1878 yılı içerisinde bulunan Ebers Papirüslerine dayanmaktadır [144].

Milattan sonra 9. yüzyıl içerisinde Razi ve 10-11. yüzyılda yaşayan İbn-i Sina'nın bazı hastalar da idrar içeriğinin tatlı olduğu ve su içme ihtiyacının oldukça fazla olduğu belirtilmiştir. İbn-i Sina'nın diyabet hastalarına ilk defa kangrenden bahsettiği ve hastalığın iki farklı şekilde ortaya çıkabileceği ifade edilmiştir. Willis tarafından hastalığa “Diabetes Mellitus” adı verilmiştir [145,146].

18. ve 19. yüzyıllarda diyabetin detaylandırılması ile glukozüri olarak açıklanan, sıklıkla kilolu ve yaşlı kişilerde ortaya çıkan ağırlık kaybı oluşturmeyen diyabetin bir alt tipi olarak belirtilmiştir. Bilim insanı olan Fehling 1860'lı yıllarda DM'li hastaların idrarında şeker olduğunu tespit eden biyokimyasal yöntem geliştirmiştir. Aynı zamanda pankreas organında bulunan Langerhans adacıkları keşfedilmiştir. 1870'li yıllarda, diyabet tanısı konan hastalar için beslenme önerileri verilmeye başlanmıştır [145].

William Osler isimli Kanadalı hekim 1892 yılında insipidus terimi ile diyabetin kendi içerisinde ayrılması gerektiğini ortaya atmıştır. Hastalığın beslenme ile bir ilişkisi olduğu, idrar yolu ile kanda şeker birikebileceği ve buna bağlı olarak idrar miktarının artacağı ve kronik ile akut formu olabileceği belirtilmiştir. Buna ek olarak bu formların birbirinden az da olsa farklı olduğu akut formun genç kişilerde başladığını, hızlı bir şekilde ilerlediğini ve kişi de kilo kaybına sebep olduğu ifade edilmiştir. Formları ifade etmesinin yanı sıra hastalığın üç tipinin olduğu belirtilmiştir. 1919 yılında Wu ile Folin adlı araştırmacılar kan şekeri ölçümü için miktar tayinini geliştirmişlerdir [145].

20. yüzyılın başında George Zuelzer tarafından pankreastan kan şekerini düşürebilecek etkiye sahip saf olmayan bir karışım elde etmişlerdir. Bu karışımın saf olmaması nedeniyle istenmeyen sonuçlarla karşılaşılması durumundan dolayı kullanımı yaygınlaşmamıştır. 1921 yılında yapılan ortak çalışmaları ile insülin izole edilerek önemli bir adım atılmıştır. Best ve Banting'in araştırmaları ile köpek pankreası içerisinde elde edilen karışımın alınarak diyabetik hale getirilen köpeğe verilmesi ile kan şekeri düzeyinin düştüğü belirlenmiştir. İlk olarak Leonard Thomson isimli diyabetik hasta üzerinde saflaştırılan insülinin

kullanılması ile alınan olumlu sonucun ardından ölümcül olan DM hastalığına yönelik tedavi bulunmuştur.1923 yılından itibaren Avrupa ve Amerika'da da kullanımına başlanan insülinin önem kazandığı ifade edilmiştir. Günümüzde diyabet tipi ve ağırlığa göre uygulanan insülin tedavisi etkin kullanılmaktadır [145].

2.7.3. Diabetes mellitus epidemiyolojisi

Diyabet hastalığının yaygınlaşması ile hasta sayısının artması, hastalıkla ilişkili sağlık sorunlarının kişilerin yaşamını ve sağlık düzeyini önemli ölçüde etkilemesi nedeniyle yaşadığımız yüzyıl içerisinde önemli bir hastalık olarak kabul edilmektedir [146].

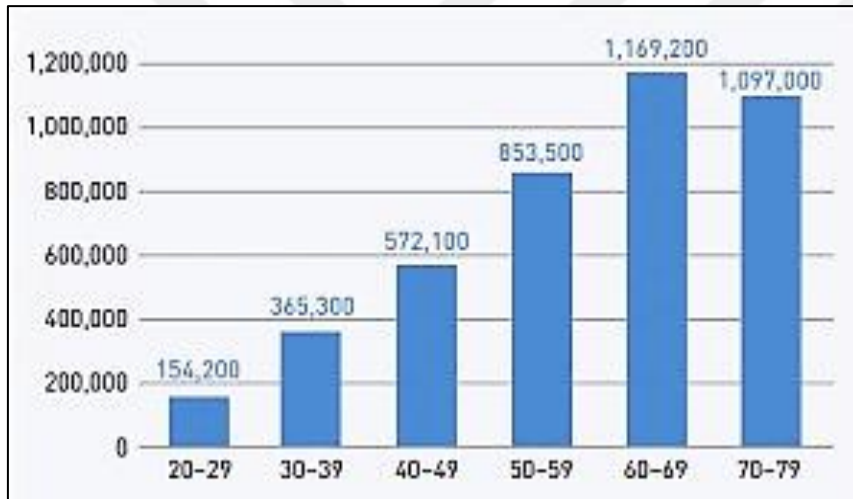
2016-2017 yılları arasında Dünya Diyabet Vakfı (DDV) ve Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) resmi verilerine bakıldığında, dünya genelinde yaklaşık 422-425 milyon insanın diyabetten etkilendiği ve 2017 yıllarının sonlarına doğru yaklaşık olarak 4 milyon kişinin bu hastalık nedeniyle yaşamını yitirdiği ifade edilmiştir. Bu veriler baz alınarak 2045 yılına gelindiğinde ise yaklaşık 629 milyon kişinin bu hastalıktan etkileneceği ileri sürülmüştür.

Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF)'nin son verilerine göre Türkiye'de 20-79 yaş aralığında olan yaklaşık 7 milyon diyabet hastası olduğu ve bu rakamın toplam yetişkin nüfusun yaklaşık %15'ine denk geldiği ifade edilmiştir. Her yıl yaklaşık olarak 46 bin kişinin ilgili hastalık nedeniyle yaşamını yitirmesine bağlı olarak gün geçtikçe artan ölüm oranlarının da dikkat çekici düzeyde olması endişe vericidir. Diyabet tedavisi amacıyla yapılan harcamalar dünya genelinde sağlık giderlerinin %20'sini oluşturmakta ve bu harcamalar küresel düzeyde ekonomi adına 727 milyar dolarlık kayıp olarak ifade edilmektedir [147-151].

2019 yılında küresel düzeyde diyabet prevalansı 463 milyon kişi (%9,3) olarak kaydedilmiştir. 2030 yılında 578 milyon kişiye (%10,2) ve 2045 yılında ise 700 milyon kişiye (%10,9) yükseleceği öngörülmektedir. Diyabeti olan her iki kişiden birisi (%50,1) hastalığı olduğunu bilmeden yaşamını sürdürmektedir. Bozulan glukoz tolerans düzeyinin küresel prevalansı 2019 yılında 374 milyon kişi ile %7,5 dilime karşılık gelmektedir. Bu prevalans düzeyinin 2045 yılına kadar 548 milyon kişi olarak %8,6 dilime karşılık geleceği öngörülmektedir. Dünya geneline bakıldığında yaklaşık olarak yarım milyar kişinin

diyabetle yaşadığı ve bu sayının 2030 yıllarında %25, 2045 yıllarında ise %51 oranında artacağı öngörülmektedir [152].

TURDEP-2 çalışmalarına bakıldığında 12 yılda tip II diyabetin risk faktörlerinden olan bozulmuş glukoz toleransının (BGT) %106, obezite görülmesinin %40, santral obezitenin ise %35 oranında artış gösterdiği ifade edilmiştir [12]. IDF 2021 verilerine göre 6,7 milyon kişi diyabet ve komplikasyonlarına bağlı olarak yaşamını yitirmiştir. 2021 yılı itibarıyla 537 milyon erişkin yaşta diyabet hastasının olduğu ve bunların %80'inin düşük ve orta gelirli ülkelerde yaşadığı bildirilmiştir [12-13]. Uluslararası Diyabet Federasyonunun yaş gruplarına (20-79) göre diyabet ve ölümler baz alınarak oluşturulan veriler Şekil 2.13'te gösterilmiştir [153].

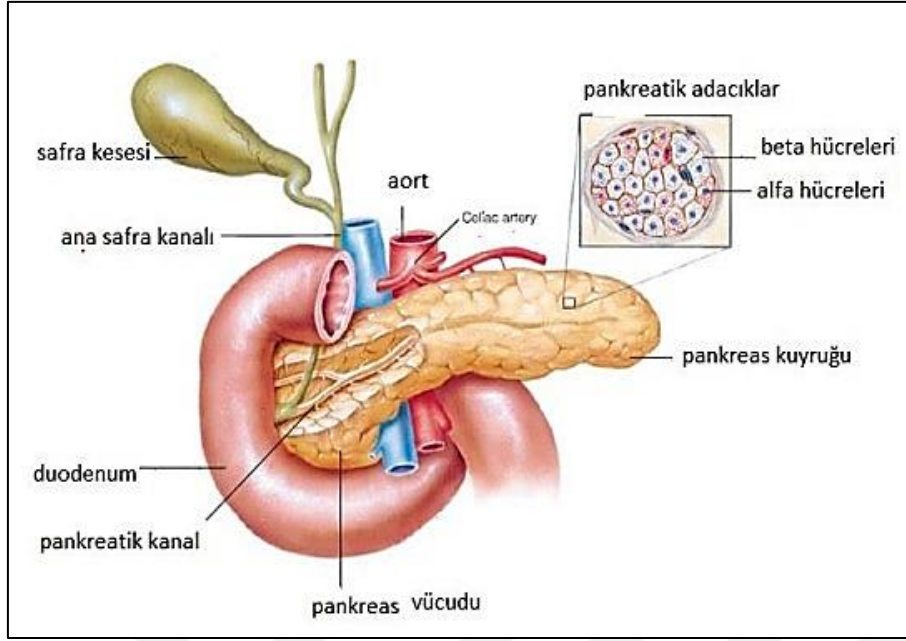


Şekil 2.13. Yaş gruplarına göre diyabet ve ölümler [153]

2.7.4. Pankreas ile insülin hormonu arasındaki ilişki

Pankreas

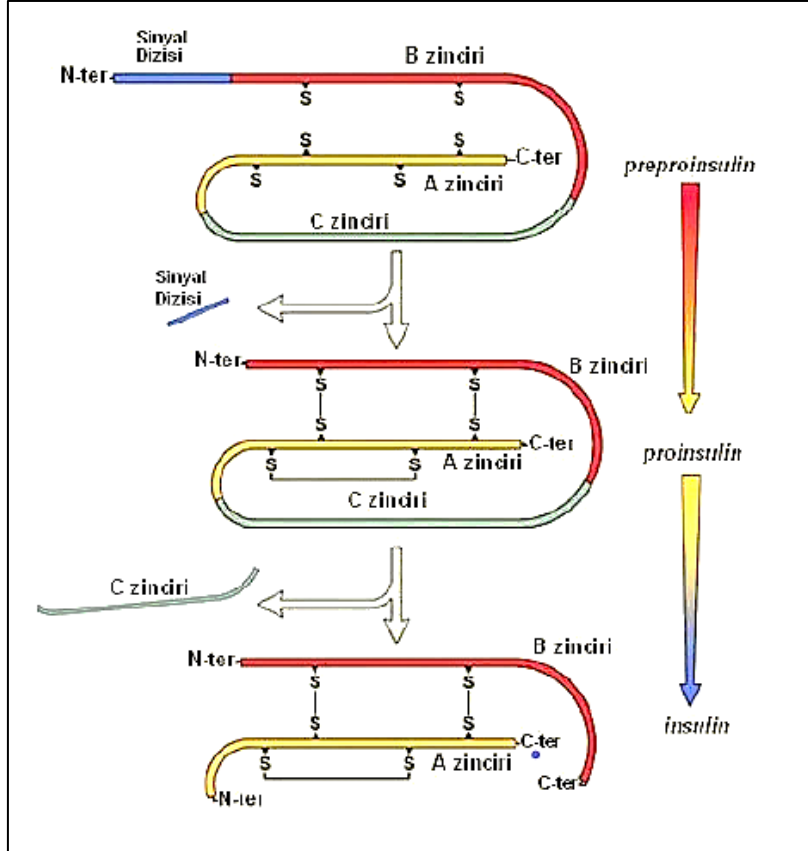
Pankreas hem ekzokrin hem de endokrin bir bez olma özelliğine sahip bir organdır. Pankreasın endokrin işlevleri Langerhans adacıklarında gerçekleşir. Bu adacıklar 76×175 µm büyüklüğünde yuvarlak yapıdaki hücre topluluğudur. Adacıklar pankreas yapısında dağılım göstermesine karşın, pankreasın diğer bölgelere göre kuyruk bölgesinde daha fazla bulunur (Şekil 2.14) [154,155].



Şekil 2.14. Pankreas ve ilgili hücreler [154]

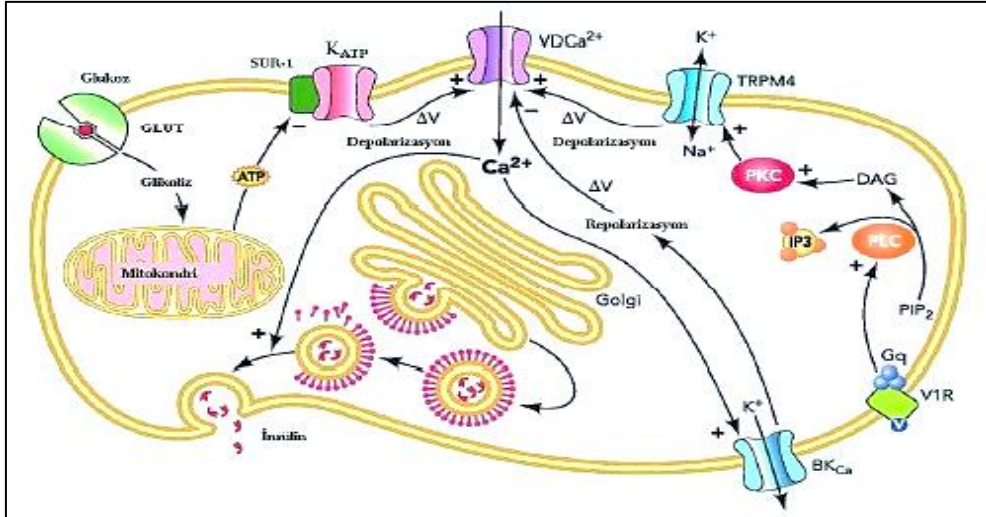
Adacık içerisinde yer alan hücreler morfolojik yapılarına ve boyanma durumlarına göre sınıflandırılır. İnsanlarda hormon salgılanmasında adacık hücre yapıları görev alır. Langerhans adacıklarında yer alan hücreler; glukagon (alfa hücreleri), insülin (beta hücreleri), somatostatin (delta hücreleri) ve pankreatik polipeptid (PP hücreleri) salgılayan hücrelerdir. Glukagon ve insülin ilgili adacık hücrelerinden salgılanan oldukça önemli hormonlardır. Glukagon ve insülin ilgili adacık hücrelerinden salgılanan oldukça önemli hormonlardır. Langerhans adacıklarında insülin hormonu β hücrelerinden, glukagon hormonu ise alfa hücrelerinden salınır. Pankreas β hücreleri, kan glikozunun homeostazi açısından oldukça önemlidir. İnsülin enerjinin yağ formunun glikojen olarak depo edilmesini, kan glikoz düzeyinin düşürülmesini sağlayan bir hormondur. Glukagon ise insüline zıt olarak çalışan bir hormondur [154,155]. Glukagon ve insülin salınımını etkileyen temel unsur kan plazmasında bulunan glikoz seviyesidir. Yüksek olan kan glikoz seviyesi insülin salgılanmasını, düşük olan glikoz -seviyesi ise glukagon salınımını indüklemektedir. Bazı dış faktörler bu hormonların salınımında rol oynar. Örneğin; bazı amino asitler, glukagon ve insülin salınımını indüklerken somatostatin iki hormon içinde inhibitör olarak görev yapar [156].

ile çökelmesi ve bu çökelmenin kristal şekilde olduğu bilinmektedir. Oluşan kristal yapıda iki molekül çinko ve altı molekül insülin yer alır. Veziküller olgunlaşması ile sitoplazmaya doğru harekete geçmektedir. İnsülin ekzositoz yoluyla hücreden salgılanırken C peptit ile çinko iyonu da hücreden dışarı verilir (Şekil 2.16) [159].



Şekil 2.16. İnsülin biyosentezi [159]

İnsülin depo görevi olan veziküller hücre içi mikrotübül yapıları aracılığıyla hücre membranına doğru taşınır. Membran yapışma noktasına geldiğinde delinir ve vezikül dışarıya doğru atılarak insülinin β hücresi temelli salınımı gerçekleşir [146]. Pankreatik β hücrelerinin sekresyon mekanizması Şekil 2.17’de gösterilmiştir [160].



Şekil 2.17. Pankreatik β hücreleri insülin sekresyon mekanizması [160]

Sekresyon mekanizması şu şekildedir. Kan glikozu yükseldiğinde glikoz β hücresi membranında yer alan GLUT 2 glikoz taşıyıcı transferi ile hücre içerisine alınır. Bu esnada glikoz, glikokinaz enzimi ile glikoz-6-fosfat'a dönüştürülür. Bu molekül glikoliz reaksiyonuna katılarak hücre içi ATP düzeyini artırır. Bu artış hücre membranında yer alan ATP duyarlı potasyum kanallarının kapanmasına neden olur. Bu olay sonucunda hücre dışına salınan potasyum miktarı azalır. Bu değişiklik ile membran yapısı depolarizasyonu sonucu voltaj bağımlı kalsiyum içerikli kapılarını açar. Bu durum, hücre dışından hücre içerisine kalsiyum iyonlarının geçişine neden olur. Kalsiyum iyonlarının hücre içerisine salınımı ile insülini taşıyan veziküller ekzositoza uğramaktadır [161].

İlk olarak 1979 yılında Ulusal Diyabet Veri Grubu, 1980 yılında ise Dünya Sağlık Örgütü Komitesi diyabet ile ilgili bir sınıflandırma yapmıştır. Sınıflandırma yapılırken 75 g glikoz çözeltisiyle yapılan oral glikoz tolerans testi sonuçlarına göre tip I, tip II ve diğer diyabet türleri olarak üç alt sınıf şeklinde incelemeye alındığı ifade edilmiştir. 1997 yılında hastalığın teşhisi ve sınıflandırılması Amerikan Diyabet Birliği (ADA)'nin tekrar ele alıp düzenlenmesi ile dört alt gruba ayrılmıştır. Yeniden düzenlenen sınıflandırma hastalığın etiolojisine ve tedavi şekline göre yapılmıştır [162].

Günümüzde diyabet etiyolojik olarak 4 alt grupta incelenmektedir. Alt gruplar tip I diyabet, tip II diyabet, gestasyonel diyabet ve diğer diyabet türleri olarak gruplandırılır. Spesifik diyabet türleri ise sekonder diyabet ifadesi içerisinde yer alır [163]. Diyabet

gruplandırılmasında farklılaşan türler olmasına rağmen genel olarak yaygın olanların tip I ve tip II diyabet olduğu görülmektedir (Çizelge 2.7) [14,164].

Çizelge 2.7. Diyabetin etiyolojik sınıflandırılması [14]

Diyabet Türleri	Diyabeti Oluşturan Durumlar	
Tip I diyabet	Genellikle beta hücre yıkımı sonucunda insülin eksikliğini oluşturan diyabet formudur İmmün nedenli Tip I DM İdiyopatik Tip I DM	
Tip II diyabet	İnsülin direncinin ilerleyen süreçlerde reseptörlerinde hasar oluşumu sonucunda salınım defekti ile karakterize diyabet formudur.	
Gestasyonel diyabet	Gebelikte ortaya çıkan ve genellikle doğum sonrasında düzelen diyabet formudur.	
Diğer hastalıklara ve spesifik mekanizmalara bağlı gelişen diyabet türleri	Spesifik Mutasyonlar	Beta hücre fonksiyonunda meydana gelebilecek genetik farklılıklar (MODY gibi)
		İnsülin aktivite düzeyine bağlı genetik defektler (insülin reseptörü gen mutasyonu gibi)
	Farklı hastalık veya durumlarda ortaya çıkan diyabet türleri	İlaç ve/veya kimyasal maddeler
		Enfeksiyonlar
		Endokrin ve ekzokrin pankreas rahatsızlıkları
		İmmün sistem kaynaklı diyabet formları
		Karaciğer hastalıkları etkisi ile gelişen diyabet formları
		Diyabet ile ortaya çıkan genetik rahatsızlıklar

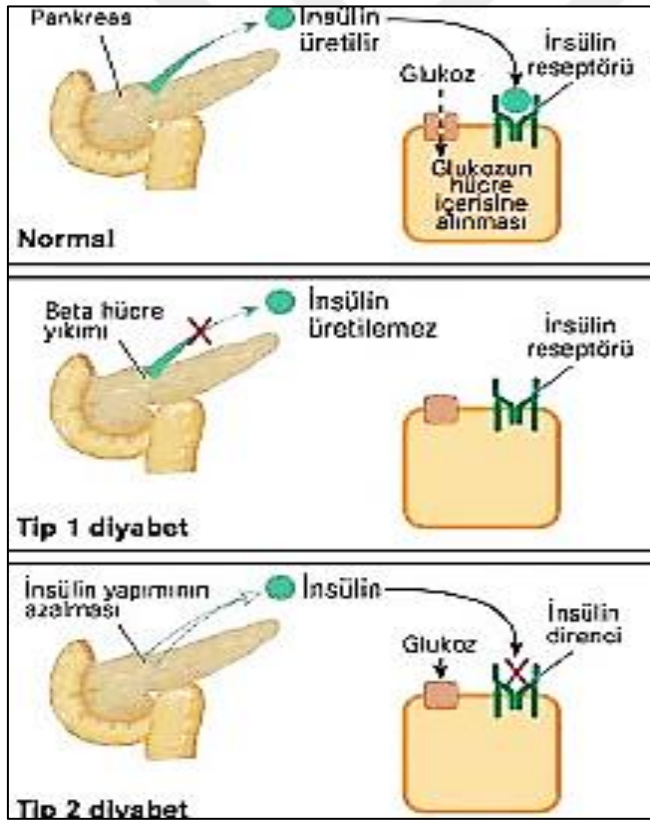
Tip I diyabet

İnsülin eksikliği ile pankreasın beta hücrelerinde meydana gelen yıkıma bağlı olarak insülin salgılama mekanizmasında ortaya çıkan bozukluk olarak ifade edilir. Pankreasta insülin salınımı ile görevli olan β hücreleri tahribatı nedeniyle ortaya çıkan insülin eksikliği sonucu ketoasidoz ve hiperglisemi ile seyreden diyabet formudur [165].

Bu hastaların %90'ında otoimmün, %10'unda oranında ise non-otoimmün β hücre yıkımı olduğu bunun sonunda insülin yetersizliği meydana geldiği ve hastalığın ortaya çıktığı ifade edilmektedir. Genetik yatkınlığı olan kişilerde çevresel etmenlerin etkisiyle meydana gelen otoimmünite ile β hücre yıkımı başladığı bilinir. Bu hücrelerin rezervi yaklaşık %80-90 olarak azaldığında klinik düzeyde diyabet belirtileri ortaya çıkmaktadır. Tip 1 diyabet formunun klinik olarak genellikle akut şekilde başladığı bilinmektedir [166-168].

Tip II diyabet

Diyabet hastalarının %90 oranını oluşturan tip II diyabet, tip I diyabete göre insülin yetersizliğinden değil, var olan insülinin kullanılamaması şeklinde ortaya çıkar [14]. Hastalığın temel nedeninde yaşam tarzına bağlı olarak gelişen insülin direnci nedenli genetik yatkınlığı görülen bireylerde insülin salgılanması zaman içerisinde azalmaktadır. Normal bireyler ile tip I ve tip II diyabet görülen bireylerin glikozun hücre içerisine alınma mekanizmaları gösterilmiştir (Şekil 2.18) [13]. Tip II diyabet tanısı konulan kişiler metabolik düzeyde iki temel problem ile karşılaşmaktadır. Bunlar; insülin etkinliğinin giderek azalması ve insülin etkisinin azalmasına paralel olarak insülin direnci gelişmesi şeklinde ifade edilir [14].



Şekil 2.18. Normal, Tip I ve tip II diyabetli kişilerde glikozun hücreye alınması [12]

Diyabetli bireylerde meydana gelen mikrovasküler komplikasyonlar yüksek lipid ve glikoz seviyelerinin uzun süre etkisinden kaynaklanmaktadır. Hiperglisemiye bağlı olarak serbest radikal oluşumunda artış gözlenir. Serbest radikallerin vücut içerisinde artışı sonucunda membran yapısında yer alan kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağlar ile reaksiyonu

sonucunda lipit peroksidasyonu ortaya çıkar. Özellikle diyabetli bireylerle yapılan çalışmalarda diyabetik belirtilerin tek sorumlusunun kan glikoz seviyesi olmadığı belirlenmiştir. Obezite, inflamasyon, hipertansiyon ve insülin direnci gibi etkenlerin yağ asidi metabolizması üzerinde etkili olduğu bilinir. Bu etkilerin sonucunda retinopati, nefropati ve nöropati gibi hastalıkların başlaması kaçınılmaz olarak görülmektedir. Tip II diyabet türünde insülin hedef dokular üzerinde etkisini gösteremediğinde gelişen hiperglisemi sonucunda protein, yağ ve karbohidrat metabolizmasında bozulma meydana gelmekte ve ilerleyen zaman içinde farklı komplikasyonların oluşmasına zemin oluşturmaktadır [169].

Aile içerisinde diyabet öyküsü olan kişilerin bulunması, kardiyovasküler hastalıklar, obezite, polikistik over sendromu (PCOS), prediyabet, hipertansiyon, insülin direnci ile ilgili hastalıklar (şizofreni, non-alkolik steatohepatit, fiziksel inaktivite) tip II diyabet için risk faktörleri olarak değerlendirilir [170]. Tip II diyabet fiziksel hareket eksikliği ve obezite ile ilişkili olarak karşımıza çıkar. Toplumun yaklaşık %5-10'luk kısmını tip II diyabetli kişiler oluşturmaktadır ve bu kişilerin çoğunluğu 40 yaş üzerindedir [14].

Gestasyonel diyabet

Gestasyonel diyabet ilk olarak gebelik döneminde ortaya çıkan glikoz intoleransı olarak ifade edilir. Tüm gebelerin %7'sinde gestasyonel diyabetin ortaya çıktığı görülmüştür [11]. Gebeliğin kontrolünde 2. veya 3. trimester testinde karbonhidrat intoleransı şeklinde ortaya çıkan daha öncesinde tespit edilmesi mümkün olmayan diyabet formudur [171].

Diğer spesifik diyabet türleri

Beta hücrelerinde genetik bozuklukları, insülin etkisiyle gelişen genetik bozukluklar, endokrinopatiler, ekzokrin pankreas hastalıkları, ilaç veya kimyasal kaynaklı diyabet, enfeksiyonlar ve immün aracılı diyabet spesifik türler arasında yer alır [12,13]. İnsülin salınımından sorumlu olan beta hücrelerinde meydana gelebilecek genetik değişiklikleri ekzokrin pankreas rahatsızlıkları, insülin etki mekanizmalarında meydana gelebilecek genetik farklılıklar ve enfeksiyonlar immün sistem ile bağlantılı olarak görülebilecek olan genetik sendromlar şeklinde belirtilmektedir [171].

2.7.5. Diyabet tanı kriterleri

Diyabet semptomları görülen kişiler için açlık kan glukoz değerinin 200 mg/dl veya üstünde, asemptomatik kişilerde ise açlık plazma glukoz düzeyinin 126 mg/dl'nin üstünde olması ve oral glukoz tolerans testi (OGTT) süresinde 2.saat içerisinde plazma glukoz değerinin 200 mg/dl'nin üstünde olması veya HbA1c değerinin %6,5 seviyelerinde olması ile tanı konulur [172]. Hiperglisemi semptomları olmayan bireylerde diyabet tanısı yapılan testin ertesi gün tekrarlanması ile doğrulanır. İki testin birlikte yapılması sonucunda diyabet tanısını doğrulaması ile ek tetkik yapılmasına gerek görülmez. Yapılan iki test birbiri ile uyumsuz olması takdirde diyabet tanısını destekleyebilecek yeni testler tekrar edilir [173,174].

Takip ve tedavide kullanılan bazı biyokimyasal belirteçler; keton cisimleri, mikroalbumin, glikozile hemoglobin (HbA1c), ileri düzeyde glikasyon ürünleri, antikorlar, lipid peroksidasyon düzeyinde artış, glutamik asit antikorları, çinko transport antikorları, leptin, *IL-6*, *TNF- α* ve *IL-1 β* seviyeleri bulunmaktadır [175].

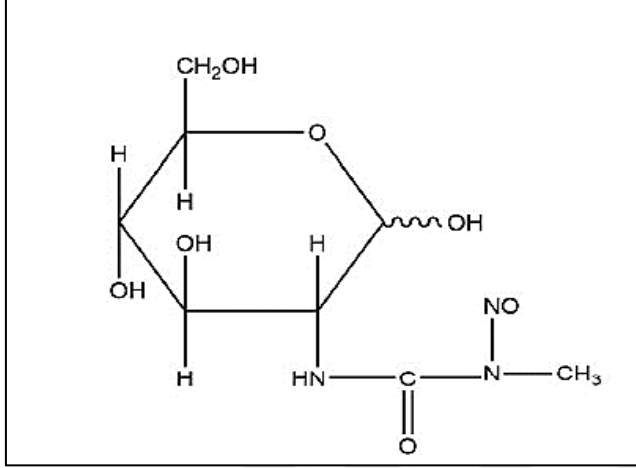
2.7.6. Deneysel diyabet modeli

Birçok hastalığın teşhis, tedavi ve patogenezinin bulunabilmesi için araştırmalarda deney hayvanları ile çalışılmıştır. Deneysel diyabet modelleri oluşturulmasında pankreasın β hücrelerinde tahribat oluşturulması veya pankreotektomi yöntemleri ile gerçekleştirilmiştir. Deneysel diyabet modeli için fare, kobay, sıçan, tavşan gibi birçok deney hayvanı ile çalışılmıştır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda diyabet modeli oluşturulması amacıyla en çok kullanılan yöntemin streptozotosin (STZ) ve alloxan (ALX) gibi toksik ajanlar kullanmak olduğu belirtilmiştir [176].

Streptozotosin (STZ) ile diyabet modeli

İlk olarak 1959 yılında *Streptomyces griseus* mantar küfünden izole edilen kimyasal yapıda bir toksin olan dar spektrumlu diyabetojenik yapıdaki antibiyotik olduğu belirtilmiştir. STZ (2-Deoksi-2-(3-Metil-3-Nitrozoüredio)-D-Glukopiranoz) pankreasın β hücrelerine özgü toksik glikoz analogu olması ile glikoz molekül yapısını içermekte ve beta hücreleri içerisine GLUT2 yolağıyla alınmaktadır [16]. Açık formül yapısı Şekil 2.19'da verilmiştir [177]. Deneysel olarak kalıcı diyabet oluşturabilmek için tercih edilen farmakolojik preparatlar

arasında yer alır [178]. Nötral pH şartlarında hızlı bir şekilde dekompanse olmasından dolayı etkisi pH 4-4.5 'da stabil olarak gösterilir. Çözelti uygulama yapılmadan hemen önce tampon içerisinde gerekli pH'da hazırlanır ve ışık görmeyecek şartlarda kullanımı sağlanır. STZ'nin, -20 °C 'de karanlık ortam eşliğinde saklanması önerilir [18,179].

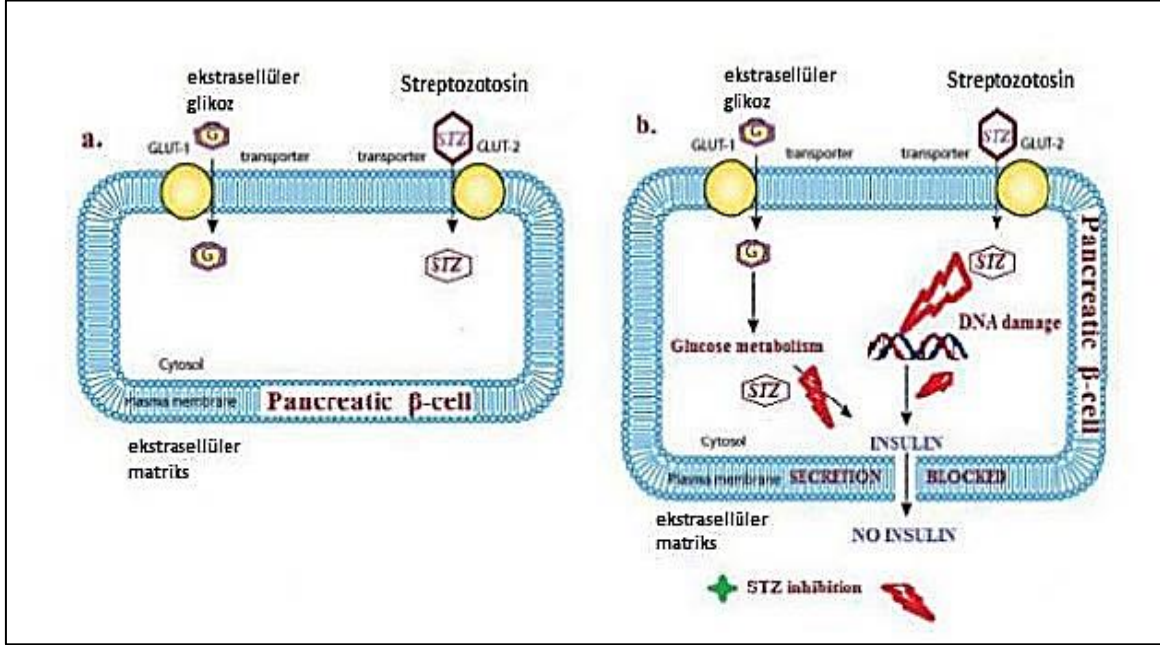


Şekil 2.19. Streptozotosin molekülünün açık formu [177]

Beta hücrelerine entegre olması GLUT2 taşıyıcı protein aracılığıyla gerçekleşir [16]. Beta hücrelerine entegre olması GLUT2 taşıyıcı protein aracılığıyla gerçekleşir [16]. GLUT2 üretiminin yavaşladığı durumlarda STZ'nin de diyabetojenik etki düzeyi orantılı şekilde azalır [180]. Pankreas beta hücrelerinin glikoz ile etkileşimi STZ aracılığı ile kaldırılır [187]. Bu durum kalıcı olarak hücrelerin zarar görmesi veya kaybı şeklinde görülür. Bu nedenle STZ uygulaması yapılan sıçanlarda glikoz seviyesinde 2 saatlik süre içerisinde hızlı bir artış yaşanmakla birlikte 6 saat sonrasında insülin seviyesinde düşüş sonucu hipogliseminin ortaya çıktığı bilinir. İlerleyen süreçte ise insülin düzeyinde yaşanan düşüş ile sıçanlarda hiperglisemi olması beklenir. Buna bağlı olarak STZ etkili diyabetojenik durumlar olarak görülmektedir [16,179].

STZ'nin hedefi olan hücreler beta hücreleridir. STZ'nin hücrelerde yer alan nitrozüre gruplarıyla birlikte dekompozisyon oluşturabilmesi reaktif olan karbonyum iyonlarının DNA üzerinde alkilasyon mekanizmasını harekete geçirir [181,182]. DNA alkilasyonu ile molekül üzerinde tamir mekanizması devreye girer. Tamir mekanizmasında görevli olan poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) enzimi hücrelerde elzem olarak bulunan nikotinamid adenin dinükleotidini (NAD) kullanır. Bu süreçte NAD depoları bitirilir ve buna bağlı olarak ATP

depoları azalır. Pankreas beta hücreleri içerisinde gerçekleşen nekroz olayı hücresel olarak bulunan depolanmış enerjinin tüketimi ile sonuçlanır (Şekil 2.20) [16].



Şekil 2.20. STZ etki mekanizması [183]

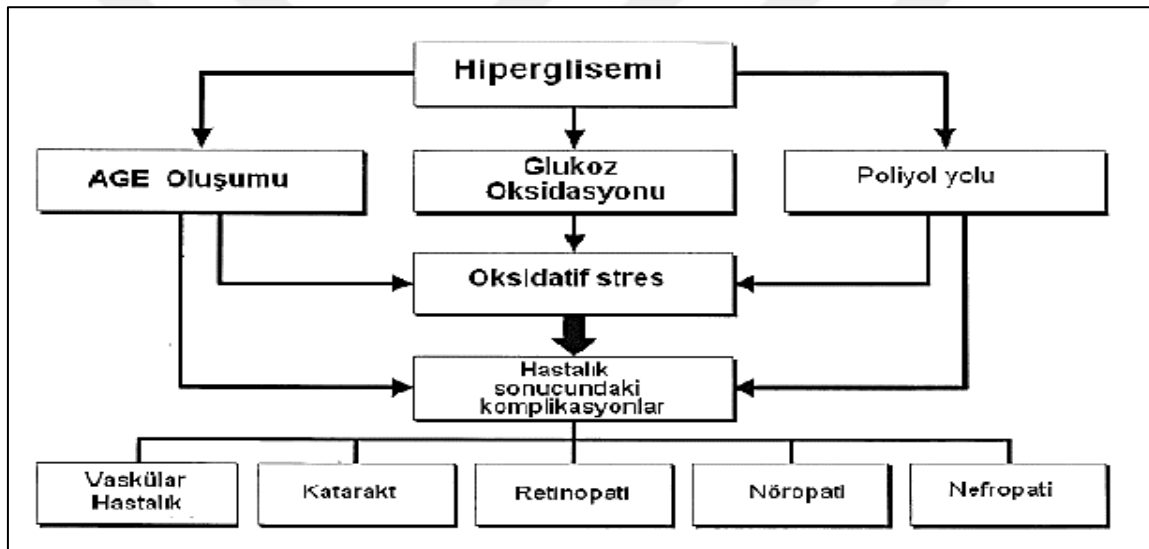
STZ, deney hayvanları araştırma ve çalışmalarında tip I ve tip II diyabet oluşturabilmek amacıyla yaygın olarak tercih edilmektedir [179]. Streptozotosinin uygulanmasında intraperitonel uygulamanın oldukça etkili olduğu ve STZ'nin 40 mg/kg'ın altında verilen dozlarda intraperitonel uygulamalarda diyabetojenik herhangi bir etki yaratmadığı bilinmektedir [184]. Deneysel diyabet modeli oluşturabilmek için sıçanlarda en çok tercih edilen dozun 60-80 mg/kg, farelerde ise 150 mg/kg olduğu görülmüştür. Dişi farelerin erkek farelere oranla STZ'ye daha az duyarlılığı olduğu bilinir. STZ uygulaması yapıldıktan iki üç gün sonra hayvanın kuyruk veninden yapılan ölçüm ile kan glukoz seviyesi 200 mg/dL'den yüksek çıkan değerler diyabet olarak kabul edilir. STZ adacık tahribatının yanında endotel hasarı, böbrek hasarına ve alkilleşici özelliğinden dolayı DNA hasarına sebep olur [185, 186].

2.7.7. Diyabette serbest radikallerin rolü

İmmün sistem vücudu doku hasarlarına ve hastalıklara karşı korur. Bu sistem vücudu uzun süre etkisi altına alabilen yangı durumunda ve doku düzeyinde indüklenen sitokinler,

hormonlar ve serbest radikaller gibi çeşitli yangısal durumlara maruz kalması ile mediyatörler aracılığıyla ürünlerin bozunması durumudur. Metabolizmada bu şekilde oluşabilecek bir bozulma tip I ve tip II diyabet gelişiminde olabildiğince etkili olmaktadır [187].

Oksidatif stres patogeneizde etkili olur. Hücre metabolizmasında oksidanlar zararlı etkileri ile kendini gösterir. Bu yapıların hücre içerisinde kompanze edilemeyecek düzeyde birikimi β hücre bozunumuna ve insülin direncine neden olur. Bu olaylar vücutta vasküler komplikasyonlar olarak ortaya çıkar [15]. Oksidatif stresin oluşması sonucunda diyabet başta olmak üzere meydana gelebilecek komplikasyonlar Şekil 2.21’de gösterilmiştir [188].

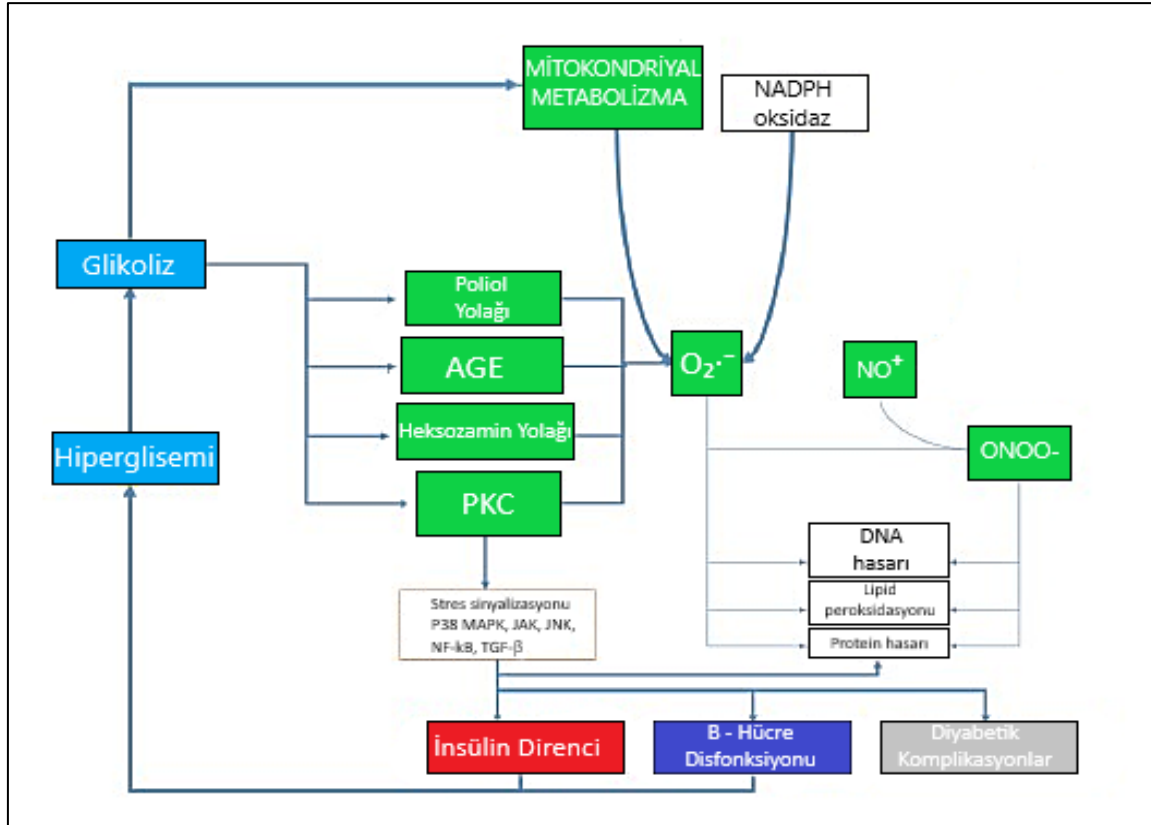


Şekil 2.21. Diyabet ile oksidatif stresin artışına paralel olarak meydana gelen olumsuz durumlar [188]

Diyabet sonucu oluşan hiperglisemi, mitokondrilerde gerçekleşen enzimatik reaksiyonları etkiler. Reaktif oksijen türlerinin aşırı üretilmesine yüksek glikoz oranı da katkıda bulunur. Hiperglisemi oksidatif stresin nedenlerinden sayılır. Buna paralel olarak diyabet hastası olan kişilerin antioksidan savunma mekanizmaları da zayıflar [189]. Mitokondri enzimleri arasında yer alan NADPH oksidazın aktivitesi, nitrik oksit yapılarının ayrışması ve ksantin oksidaz enziminin uyarılması kanda yüksek glikoz düzeyi ile ilişkilendirilmiştir [15].

Yapılan bir araştırmada vücutta glikoz düzeyinin β hücrelerinde mitokondriyal süperoksit aktivitesini baskıladığı belirtilmiştir. Yapılan bir diğer çalışmada ise mitokondriyal ETZ’de

olan kompleks I ve kompleks III'ün yapılarının streptozotosin ile deneysel diyabet modeli oluşturulmuş ratlar da süperoksitin üretilmediği belirlenmiştir [190]. Bu çalışmalara ek olarak yapılan bir diğer araştırmada, farelerin vücut glikoz düzeylerinin düşük olduğu koşullarda β hücrelerinde önemli düzeyde reaktif oksijen türlerinin biriktiği belirtilmiştir [191]. Diyabet ile oksidatif stres arasındaki yollar Şekil 2.22'de gösterilmiştir [198].



Şekil 2.22. Diyabet ile oksidatif stres yolları [189]

2.7.8. Tamamlayıcı tıp

Tamamlayıcı tıp uygulamalarının son zamanlarda artması ile birçok araştırmacı bu konu üzerine yoğunlaşmaktadır. Tıbbi uygulamanın dışında kalan tedavi işlemleri veya uygulamaları içerir. Tedavi; fiziksel (kayropraktikler veya akupunktur), farmakolojik (homeopati veya bitkilerle tedavi) ve diyet yaklaşımları şeklinde ayrılır [192]. Diyet yaklaşımı günümüzde tip I diyabet ve tip II diyabet için başarılı tedavi basamağı olarak nitelendirilir. Bitkisel preparatlar, çoğu toplumda diyabet hastaları tarafından yaygın olarak kullanılmaktadır [193]. Dünya Sağlık Örgütü'nün diyabet konusuna önerisi olarak şifalı bitkiler ifadesi ile hipoglisemik ajanların araştırılması oldukça önemli hale gelmiştir [18].

R. canina ekstresinin anti-diyabetik etkisi

R. canina meyveleri ile hazırlanan etanol ekstresinin streptozotosin (STZ) aracılığıyla indüklenen ve diyabetik model oluşturulan sıçanlarda kan şekeri düzeyini önemli düzeyde (%50-62) düşürdüğü buna bağlı olarak hipoglisemik etki oluşturduğu gözlenmiştir. Bulguları destekleyen histopatolojik düzeydeki incelemede, *R. canina* ekstresinin verildiği (250 mg/kg) düzeyin kontrol grubunda yer alan diyabetik sıçanlara oranla adacık sayısının arttığını ve nekrotik düzeyde olan adacıkların histolojisi üzerinde iyileştirici etkiye sahip olduğu kaydedilmiştir [19].

R. canina meyveleri ile hazırlanan etanol ve su içerikli ekstrelerinin tavşanlarda hipoglisemik etkiye sahip olmadığı görülmüştür. Hücre proliferasyonu ve sitotoksikite testleri ile bitki ekstresinin 0.001 mg/mL konsantrasyonu baz alındığında pankreatik β hücrelerinin proliferasyonu iyileştirme potansiyeli olmasına rağmen, DNA hasarını ve tip II diyabetde görülen glukotoksikite ile ilgili β hücresinin canlılığında azalma eğilimini önleyemediği sonucuna varılmıştır [194].

Diyabet tedavisine yönelik diğer tedavi yaklaşımı, yemek sonrası artan şeker düzeyini azaltabilmek amacıyla α -glukozidaz ve α -amilaz gibi karbonhidratları hidroliz etme etkinliğine sahip enzimlerin inhibe edilme durumu ile glikoz emiliminin veya üretiminin geciktirilmesi durumudur. *R. canina* türleri ile hazırlanan kuşburnu bazlı ekstrelerin her iki enzim üzerinde inhibe edici etkiye sahip oldukları bildirilmiştir. α -glukozidaz enzim aktivitesinin yüksek düzeyde baskılandığı durumlarda kan dolaşımına glikoz salınımı önlenir. Bu sayede kan şekeri düzeyinin dengede tutulmasına yardımcı olunur [9].

2.7.9. Diyabet mellitus ve genler

Belirli bir hastalıktan sorumlu olan genlerin saptanmasına ilişkin en çok kullanılan yaklaşımlar, DNA markır yapılarının ilgili hastalık ile ilişkisini test eden bağlantı çalışmalarıdır. Bağlantı analizi sonucunda aynı kromozomda birbirine yakın olan iki lokusun baba ve anneden çocuğa aktarılırken geçiş olasılığı hesap edilir. Bu tür çalışmalar basit hastalık genetiğini anlamada kılavuz olmuştur. İlişkilendirme kalıtım kalıbı şeklinde tam olarak belirlenemeyen hastalıklarda kullanılan bir yöntem olarak bilinir. Bu yöntemle kontrol ve hasta gruplarında belli bir markır baz alınarak bu markıra ilişkin alel gruplarının

frekans düzeyleri karşılaştırılır. Bu haritalama yöntemiyle hastalık geninin tanımı ve ilgili genin fonksiyonu ile hücresel mekanizmaların aydınlatılması sağlanır. Hastalık geninin belirlenmesi ile ilaç üretilmesine, doğum öncesinde olduğu gibi sonrasında da genetik tanı konulmasına imkân sağlayacaktır [20]. Bu şekilde hastalıkların yükünün azaltılabilmesi için önleyici stratejilerin benimsenmesi kolay hale gelmiştir. Diyabet hastalığının genler ile ilişkisini anlayabilmek için dünyada çalışmalar hızlı bir şekilde devam etmektedir [21,195]. Genetik faktörlerin yanında çevresel faktörlerin de diyabet üzerinde oldukça etkili olduğu bilinir. Bu faktörler içerisinde popülasyon düzeyindeki yaşam standardı ve kişinin yaşamı, kalori alımı ve hareketsiz yaşaması oldukça etkilidir. Diyabet olmaya elverişli kişilerde başlangıçta pankreas beta hücreleri aracılığıyla telafi edilen insülin direnci ilerleyen zamanlarda telafi edilememekte ve buna bağlı olarak diyabet gelişmektedir [196]. Genlerin fiziksel inaktivite ve obezite diyabet gelişiminde oldukça önemli olduğu ifade edilir [197]. Genlerin fiziksel inaktivite ve obezite sonucu tip II diyabet gelişiminde oldukça önemli olduğu ifade edilir [197]. Bu genlerden bazıları *ANK1*, *ANKRD55*, *BCAR1*, *BCL11A*, *GCK*, *GTB14*, *KLHDC5*, *MCR4*, *TNF- α* , *IL-1 β* ve *OriB*'dir. Genlerin detayları Çizelge 2.8'de verilmiştir [196].

Çizelge 2.8. Diyabet gelişimine etkisi olan bazı genler [196].

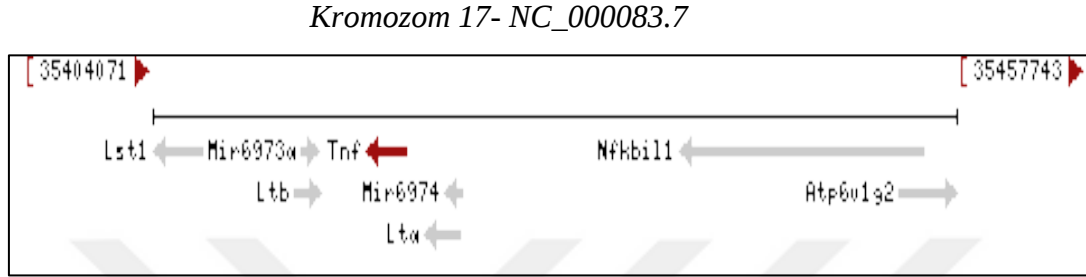
Gen	Kromozom	OR	RAF	Çalışma	İşlev ve Mekanizma
<i>ANK1</i>	8	1,09	0,76	MA	β -hücre işlevi ve hücre kararlılığı
<i>ANKRD55</i>	5	1,08	0,7	MA	İnsülin etkisi
<i>BCAR1</i>	16	1,12	0,89	MA	β -hücre işlevi ve kenetlenen protein
<i>BCL11A</i>	2	1,08	0,46	MA	β -hücre işlevi ve çinko parmak
<i>GCK</i>	7	1,07	0,20	MA	İnsülin etkisi
<i>GTB14</i>	2	1,07	0,60	MA	İnsülin etkisi ve adaptör proteini
<i>KLHDC5</i>	12	1,10	0,80	MA	Mitotik süreç ve sitokinez
<i>MCR4</i>	18	1,08	0,27	MA	G-protein yapılı reseptörler
<i>TNF-α</i>	6	1,09	0,55	MA	Transkripsiyonel düzenleyici İnsülin etkisi
<i>IL-1β</i>	2	1,08	0,35	MA	Transkripsiyonel düzenleyici İnsülin etkisi
<i>OriB</i>	mtDNA	1,10	0,30	MA	Transkripsiyonel düzenleyici

2.7.10. Tümör nekroz faktörü alfa (*TNF- α*) ve İnterlökin 1 beta (*IL-1 β*)

Tümör nekroz faktörü alfa (*TNF- α*)

Tümör nekroz faktör alfa , doğal bağışıklık mekanizmasında önemli rol oynayan inflamasyonda etkili olan, multifonksiyonel sitokin olarak tanımlanır.1975 yılında

keşfedilen bu sitokin, tümör hücreleri içerisinde hücre ölümünü indükleyen serum faktörü şeklinde ortaya çıkmıştır. İlerleyen yıllar içerisinde inflamatuvar hastalıklar için potansiyel bir hedef haline gelmiştir [23,198,199]. *TNF- α* geni insanlarda yerleşim yeri olarak 6.kromozom (6p21.33), MHC3 gen bölgesinde yer alır. Farelerde ise 17.kromozom üzerinde yer alır (Şekil 2.23).



Şekil 2.23. *TNF- α* gen yerleşimi [199-202]

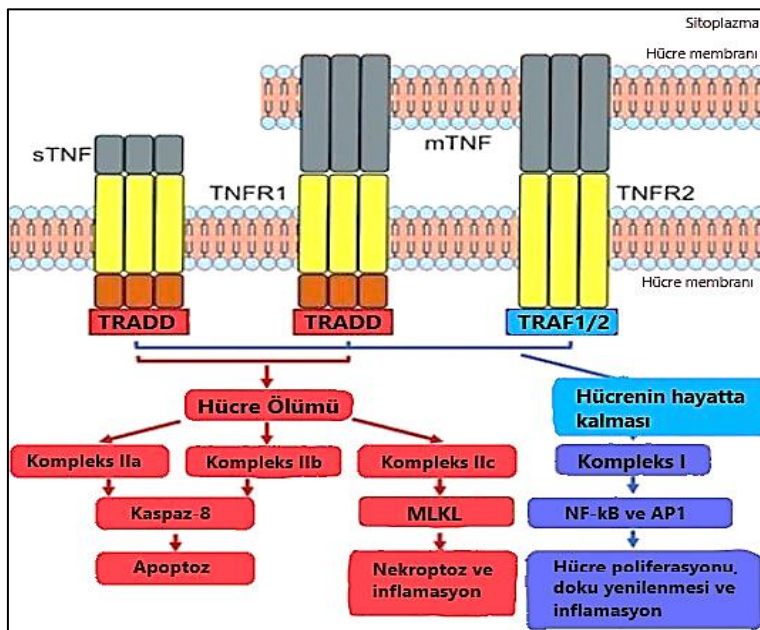
Farklı hücrelerde farklı görevleri olan *TNF- α* , makrofaj ve monositler tarafından üretilmesine ek olarak nötrofiller, B hücreleri gibi bağışıklık sisteminde önemli rol oynayan çeşitli hücreler aracılığıyla üretilir. *TNF- α* 'nın ilgili hücreler aracılığıyla üretilmesinin kimyasal ajanlar, ozmotik basınç, UV ışınları, virüs ve bakteriler gibi çeşitli faktöre bağlı olduğu bilinir. Sitokin, 26 kDa boyutunda olan homotrimer transmembran protein olarak ifade edilir. Sonrasında ADAM17 geni ile kodlanan sitokin, TACE olarak adlandırılan TNF dönüştürücü enzim ile kesilerek 17 kDa boyutunda çözünür forma dönüşür veya transmembran yapısında kalır. sTNF olarak isimlendirilen çözünür form ile mTNF olarak isimlendirilen transmembran form hücre içerisinde aktivitelerini TNFR1 ile TNFR2 olmak üzere iki reseptör aracılığıyla gerçekleştirir [200,201].

İnflamasyonda yer alan *TNF- α* başlıca lokal inflamatuvar cevabı sağlayan sitokin şeklinde görev yapar. Endotel hücrelerde kan pıhtılaşmasına yardımcı proteinlerin ve adezyon moleküllerin ekspresyonlarını indükler. Enfeksiyon ile makrofaj hücrelerinde sistemik şekilde *TNF- α* 'nın hızlı salınımı septik şoka neden olur. Crohn hastalığı, diyabet ve romatoid artrit gibi inflamatuvar ve otoimmün hastalıklarda *TNF- α* düzeyinin vücutta artış gösterdiği bilinmektedir [202].

TNF- α sinyal yolu

TNFR1 ve TNFR2 şeklinde iki farklı reseptörü bulunan genin, (mTNF) ile (sTNF) formlarının reseptörlere bağlanması ile aralarında *IL-6*, *IL-1*, *IL-8*'inde yer aldığı sitokin kaskadını oluşturması sonucu lökositlerin endotel yüzeylerden geçişini hızlandırıp makrofaj farklılaşmasına yol açar [202]. TNFR1 reseptörü makrofaj ve endotel hücreler başta olacak şekilde tüm hücrelerde ifade edilme özelliğine sahipken, TNFR2 genellikle endotel hücreler, nöronlar ve lenfositler de ifade edilir. Ayrıca T hücrelerinde ifade düzeyinin oldukça fazla olduğu bilinir. TNFR1 reseptörü inflamatuvar cevaplarda görevli iken TNFR2 reseptörü doku homeostazı ve rejenerasyonda görev alır [200-203].

mTNF formu TNFR2 reseptörüne bağlanması ile hücreler arası iletişim olayında bir ligand sorumluluğu alır. Ayrıca bu formun reseptör görevi üstlenerek de hücre içerisinde kaskadın oluşumunu başlatır. mTNF ve sTNF bağlanma bölgeleri ile TNFR1 ve TNFR2'de benzerlik olmasına rağmen, hücre içinde domain yapıları farklılık gösterir. TNFR1'in sitoplazma yapısındaki kuyruğu TNFR1'le ilgili DD (TRADD)'a bağlanmasına yardımcı domain bulundurur (Şekil 2.24). TNFR2'nin benzer bölgesi bulunmamakta bunun yerine TRAF adı verilen TNFR-ilişkili faktör 1 ve 2 protein yapılarına bağlanmaktadır. TNFR1 ile TNFR2'nin sinyal yolları NF- κ B'yi aktifleştirmesi ile hücrenin yaşamsal faaliyetinin devam etmesini sağlamaktadır [203,204].



Şekil 2.24. TNFR1 ile TNFR2 sinyal yolları [203]

TNF- α ifadesinin hastalıklara etkisi

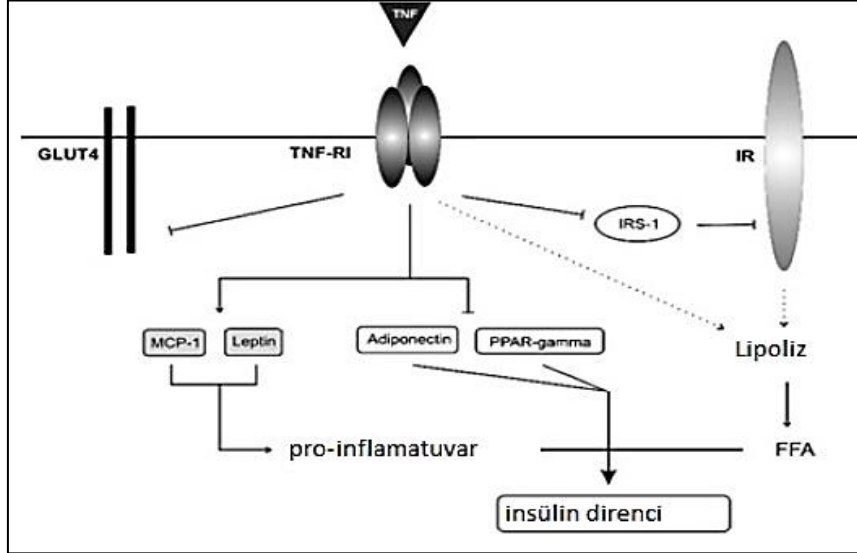
Mast hücreleri tarafından üretilen *TNF- α* , enfeksiyon bölgelerine nötrofillerin taşınmasını sağlar. Rothe ve diğerlerinin yaptığı çalışmada TNFR1 eksikliği sonucunda farelerin girebileceği septik şoka karşı direnç mekanizmalarının gelişmesine rağmen *Listeria monocytogenes* enfeksiyonunda duyarlılık gösterdiği bilinir [205]. Lin ve diğerlerinin yaptığı çalışmada ise TNFR2 aracılığıyla TNF yolağının bazı anti-apoptotik moleküllerin ifade edilme düzeylerinin arttığı ve T hücre aktivasyonu sürecinde hayatta kalmaya zemin oluşturduğu belirtilmiştir [206].

TNF-alfa konsantrasyonunun yüksek olması hematolojik rahatsızlıklara etki eder. Aplastik anemide önemli olan Th1 hücreleri, *TNF- α* düzeyinin fazla olması ile hücreleri baskılar ve buna bağlı olarak projenitörlerin ölümüne sebep olur [203]. Otoimmün inflamatuvar hastalık olarak ifade edilen romatoid artrit oluşan T hücrelerinin inflamasyonu ile ilişkilendirilir. Eklemlerin iltihaplanması *TNF- α* başta olmak üzere bazı sitokinlerin üretilmesi ile oluşur. Bu hastalarda kronik inflamatuvar sonucu kardiyovasküler rahatsızlıkların meydana gelme ihtimalinin arttığı bilinir. *TNF- α* konsantrasyonunun bazı hastalıklarda düzeyinin artması ile kardiyovasküler hastalık riskinin de buna bağlı olarak doğru orantılı arttığı bilinir [207].

TNF- α 'nın lipit metabolizması üzerinde oldukça etkilidir. Yükselen *TNF- α* düzeyi açığa çıkan inflamatuvar rahatsızlıklarda ve sepsiste, trigliserit içeriğinin de yükselmesi ile hipertrigliserit meydana gelebilir. Trigliserit sentezinde substrat görevine göre *TNF- α* serbest yağ asit düzeyini artırarak karaciğer ve adipoz doku içerisinde birirmektedir [208].

TNF- α konsantrasyon düzeyinin insülin direnci üzerinde etkili olduğu bilinir. İnflamatuvar markırlar içerisinde insülin direncinde ilk ifade edilenin *TNF- α* olduğu kaydedilmiştir. 1993 yılında yapılan çalışmada obez farelerin adipositlerinde yüksek miktarda *TNF- α* ifadesi görülmüştür. *TNF- α* 'nın insülin üzerine etkisini, IRS1 olarak bilinen insülin reseptörü substratı 1'in serin fosforilenmesini sağlayarak insülin reseptörü üzerinde tirozin kinaz enzim aktivitesini engelleyecek şekilde etkisi olduğu bilinir. Buna ek olarak, adiposit dokuda lipoliz artışı sonucunda plazmadaki serbest yağ asit düzeyinin de artması insülin direncinin gelişmesine neden olur (Şekil 2.26). Adipositler içerisinde yolaklarda insülin reseptörü birçok proteinin salgılanmasını azaltır [201,209,210]. Homeostazı düzenleyen *TNF- α* leptin üretimini arttırmasının yanında insülin salınımını da azaltıcı etki gösterir. Makrofaj

yapılarını adipositlere yönlendirmesi sonucu inflamatuvar durumun artması ile insülin direnci oluşabileceği belirlenmiştir (Şekil 2.25) [208].

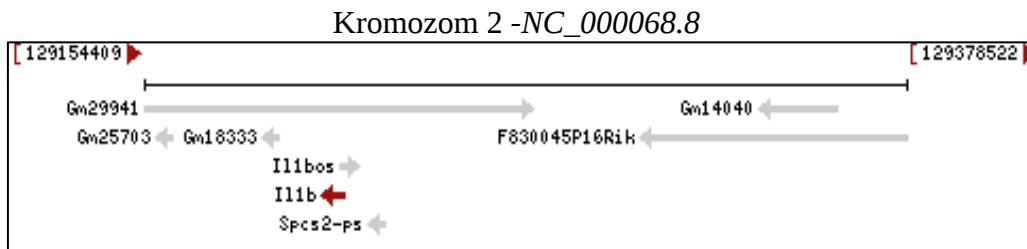


Şekil 2.25. *TNF-α* ile insülin direnci [208]

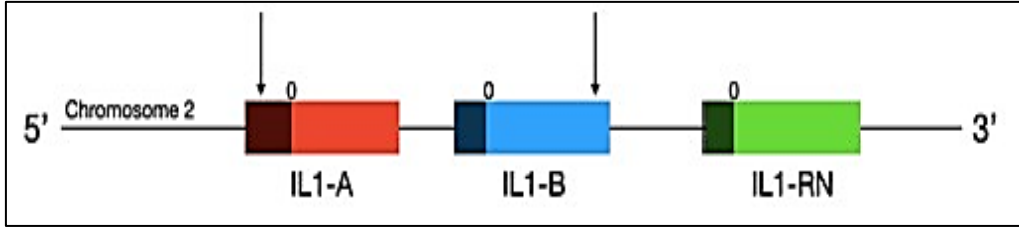
TNF-α, *IL-1β* sentezlemekle görevli eklem hücreleri tarafından salgılanır. Yüksek oranda *IL-1β* görülen sinovyal membran, sinovyal sıvı, kıkırdak gibi yapılarda bulunur [210].

2.7.11. İnterlökin 1 beta (*IL-1β*)

IL-1β katabolin olarak da ifade edilen, vücut içerisinde *IL-1β* geni aracılığıyla şifrelenen *IL-1* ailesinin içerisinde yer alan bir sitokin olarak bilinir. *IL-1* gen yapısı 2.kromozomun uzun kolu üzerinde (2q13-21) yerleşim yeri içerisinde bulunan 430 kb'lık bir bölge olarak tanımlanır. Farelerde de 2.kromozom üzerinde yer alır (Şekil 2.26). Bölgede *IL-1A*, *IL-1B* ile *IL1RN* genleri yer alır (Şekil 2.27) [211].



Şekil 2.26. *IL-1β* gen yerleşimi [211-212]



Şekil 2.27. *IL-1* gen kümesinin şematik gösterimi [211]

1972 yılında Igal Gert tarafından keşfedilen *IL-1* lenfosit indükleyici faktör olarak isimlendirilir. 1985 yılında α ve β formları başta olacak şekilde 15 farklı form ile tanımlanmıştır. *IL-1 β* 'nin aktivitesinin daha fazla olması ile proinflatuar etkiye sahip olduğu bilinir. Bu sitokin aktif olan makrofajlar tarafından propolein şeklinde üretilir. Bu yolak kaspaz 1 (CASP1/ICE) tarafından aktive edilir [212].

IL-1 β 'nin inflamasyon ve bağışıklık da anahtar role sahip olan doğal bağışıklık yanıtı ile doğrudan ilişkili olduğu bilinir. İnflatuar değişikliklere ve doku hasarına neden olan mediyatörlerin sentezi ve salgısını artırır. *IL-1 β* genellikle makrofaj, nötrofil ve monosit gibi bağışıklık hücreleri tarafından sentezlenir. *IL-1 β* endotel hücrelerde ICAM-1 salınımını artırır. Kemokin özelliği olan *IL-1 β* , *IL-8* salınımını aktive ederek ilgili dokulara nötrofil infiltrasyonunu kolaylaştırır [24].

İnterlökin 1-beta ifadesinin hastalıklara etkisi

IL-1 β , insanlarda ve farelerde tip 17 T hücrelerin farklılaşması ile *IL-17* üretimini artırarak adaptif bağışıklık yanıtlarının düzenlenmesinde görev alır [213]. *IL-2* ifade seviyesini arttırmasının yanında *IL-6* ve interferon benzeri inflamatuvar sitokinler ile sinerjistik etki gösterir. Endotel hücrelerin adezyon moleküllerinin üretimini destekler. Stromal bazlı hücreler aracılığıyla kemokinlerin salınması ile inflamasyon bölgesi içerisinde inflamatuvar hücrelerin toplanması teşvik edilir. *IL-1* bağ doku bozulmasına neden olan metalloproteinazların üretimini arttırarak kollojen ve proteoglikan üretimini de engeller. Böylelikle bağ dokusunda yıkımını artırır [214].

IL-1 β osteoklastların olgun hale gelmesi üzerinde dolaylı ve doğrudan olmak üzere uyarıcı etkiye sahip olduğu bilinir [215]. *IL-1 β* kazanılan bağışıklıkta etkili olduğu bilinen bir mediyatördür. Antijen içeren hücrelerin uyarılmasında, *IL-6*'nın makrofaj salınımı ve T

hücrelerinin antijen bazlı stimülasyonunun arttırılması durumlarında düzenleyici olarak görev yapar. *IL-1 β* 'nın hastalıklar üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmalarda periodontal hastalıklar önemli yer tutar. *IL-1 β* , fibroblastların, endotelyal hücrelerin ve keratinosit hücrelerinin çoğalmasını indükler. Fibroblastlardan kollajen, fibronektin ve hyaluronat sentezini arttırır. Bundan dolayı doku homeostazı için oldukça önemli bir sitokindir [216,217].

2.8. Gen İfade Analizi

Gen ifade analizi için mRNA izole edilir. Daha sonra cDNA'a dönüştürülür. Bir hücrenin yapısında olan tüm RNAlara (rRNA, tRNA, mRNA, diğer küçük RNAlar) transkriptom adı verilir. Transkriptom gen ifadesi çalışmasında kullanılan temel basamak olan RNA izolasyon aşamasını içerir. RNA izolasyonu sonrasında kararsız ve tek iplikli molekül olan RNA'yı kalıp olarak kullanan revers transkriptaz (RT) enzimi çift iplikli DNA molekülü sentezler. RT reaksiyonunda 3 farklı primer kullanılabilir. Bunlar oligo (dt) primerler, rastgele (heksamer) primerler, özel tasarlanmış primerlerdir. Oligo primerler yüksek kalitede RNA materyali mevcut ise tercih edilebilir. Primer ve bileşenler ile cDNA elde edildikten sonra RT-qPCR ile belli bir genin ifadesi çalışılabilir.

2.8.1. RNA İzolasyonu

Bir memeli hücrelerine ait toplam RNA'nın yaklaşık %80-90'ını rRNA, %3-5'ini tRNA geri kalanını ise mRNA'dır. Dokularda, RNA'nın çevresinde bulunan mantar ve bakterilerde yer alan RNazların etkisi ile parçalanmadan kalması oldukça güçtür. Bu nedenle RNA izolasyon kit protokollerinde güçlü protein denatürasyon ajanları ve RNaz inhibitörü kullanılır. DNA'ya asidik çözelti uygulaması ile RNA molekülü ayrımı yapılır. Bu nedenle deneyde kullanılacak olan materyal bir süre saklanacak ise yıkımı önleyebilmek adına uygun şartlarda saklanmalıdır [218-220].

Elde edilen DNA saflığı hassas spektrofotometreler veya NanoDrop cihazı kullanılarak fotometrik olarak ölçülebilir. Bu değerlendirme ile optik yoğunluk durumu farklı dalga boyları baz alınarak belirlenir. Bu dalga boylarından olan 230 nm dalga boyu için kontaminant yapıdaki maddelerin absorbans değeri, 260 nm dalga boyu için nükleik asit

saflığı absorbans değeri 280 nm dalga boyu için protein-fenol içerikli absorbans değeri ifade edilir. Optik yoğunluğun $260/280 = 1,80$ olması gerekir [221].

2.8.2. cDNA sentezi

Çalışılan materyalden izole edilen RNA, revers transkriptaz enzimi aracılığı ile tamamlayıcı DNA'sına (cDNA) çevrilir. Revers transkriptaz enzimi izole edilen tek iplikli RNA'yı kalıp olarak kullanarak kararlı çift iplikli DNA molekülü sentezler. Bu adım için RNA ve primer, RNA'nın ikincil yapısının denatüre edilebilmesi için ısıtılıp, buz üzerine alınarak ilgili primerin DNA'ya bağlanması hedeflenir. Reaksiyonun diğer gerekli bileşenleri (RNaz inhibitörü, dNTPler, tampon çözelti ve revers transkriptaz) reaksiyona eklenir. Termal döngü içerisinde transkripsiyon basamağı gerçekleşir. Son aşamada gerekli ısı sağlanarak enzim inaktivasyonu sağlanır [222].

2.8.3. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) DNA replikasyonunu *in-vitro* yapılmasıdır. Yüksek sıcaklık polimerizasyonu yapan polimeraz enzimi *Thermus aquaticus* bakterisinden elde edilmesi ile nükleik asitlerin çoğaltılması tekniği Kary Mullis tarafından yapılmıştır. Yaptığı çalışmalar ile 1993 yılında Nobel Kimya Ödülü almaya hak kazanmıştır. RT-qPCR ürünlerin analiz basamağı reaksiyon sırasında yapılır. Ürünlerin niceliksel ve niteliksel olarak analizlerinde diziye özgü olan problemler ve/veya diziye özgü olmayan içerikli floresan boyalar kullanılır. qPCR reaksiyon tüpü içerisinde çoğaltılan DNA'nın reaksiyona bağlı olarak takip edilmesine imkân sağlar. Bu yöntem ile RNA ve DNA örnekleri kantitatif ve kalitatif olmak üzere kısa zaman içerisinde analizi yapılabilir. Bu uygulama ile çok sayıda örnek olabildiğince az kontaminasyon riski doğrultusunda güvenle çalışılabilir. qPCR'da PCR reaksiyonları sırasında meydana gelen örnekleri görünür kılan ve sonuçları monitörize edebilen yapılar boya ve problemlerdir. Meydana gelen floresan ışıma, DNA miktarına bağlı olarak aynı oranda artış gösterir [223-226] (Şekil 2.29).

Her bir döngü ile açığa çıkan floresan ışıma miktarı kaydedilir. PCR ürünüde görülen ilk anlamlı artış üssel aşama niteliğinde görüntülenir. Bu artışın görüldüğü ilk döngü başlangıç materyal miktarı ile doğru orantılı olur. Başlangıç DNA miktarının fazla olması ilk görülen anlamlı artışın daha erken döngüde ifadelenmesi anlamına gelir. Çoğaltılacak hedef gen

dizilerinin tespiti için farklı metotlar geliştirilmiştir. Problar DNA/cDNA için tanımlanmak istenilen baz dizisine göre tasarlanan, radyoaktif veya kimyasal olarak işaretlenmiş yapıda olan tek zincirli oligonükleotid bileşiklerdir. Çalışılan bölgeyi belirleyebilmek için diziye özgü veya diziye özgü olmayan yapılar tasarlanabilmektedir [22].

Diziye özgü olmayan problar

DNA'ya bağlanma ilgisi olan florojenik yapıda boyalar kullanılır. Hassas kullanımı ile tercih sebebi olan YO-PRO, BEBO ve SYBR Green gibi florojenik boyalardır. Boyaların çift sarmal yapısında olan DNA'ya bağlandığı anda kuvvetli bir ışıma yapması beklenir. DNA miktarının artmasına bağlı olarak ışıyan floresan miktarının da artması beklenir. Çalışılan diziye özgü bir ışıma yapmamasından dolayı spesifik özelliğine sahip değildir. Karakterizasyon ve kantifikasyon erime eğrileri ile belirlenir. Primer yapılarının dimer oluşturma riski göz önüne alınarak tasarlanması gerekir [22].

Diziye özgü olan problar

Farklı boyalara ve moleküler yapıya sahip olmalarına rağmen çalışma hedefi olarak çoğaltılan DNA için hedef diziye ait bağlanma şeklinde ifade edilir. Bu nedenle floresan ışımanın tespit edilen hedef diziye ait olduğu bilinir. Bu yapılar; hibridizasyon probları, hidroliz probları ve hairpin olarak adlandırılan saç tokası prob yapıları olarak bilinir [22].

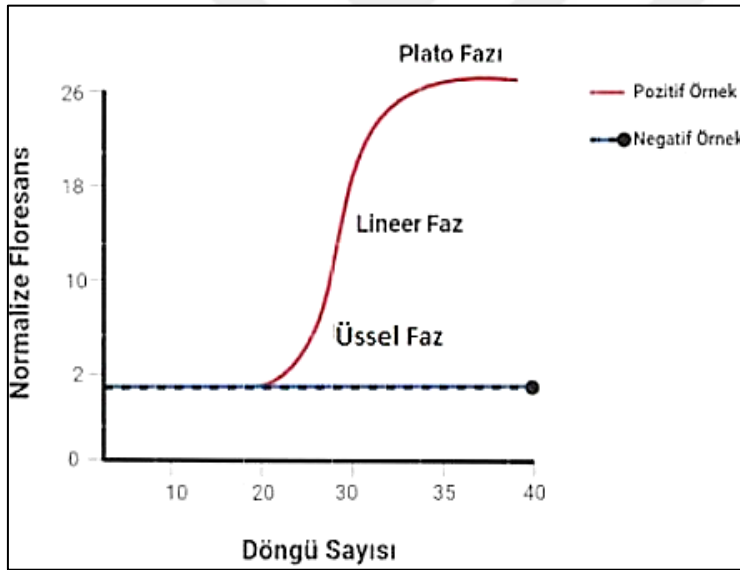
Hidroliz probları arasında yaygın olarak Taqman probları yer alır. Hedeflenen diziye özgü sentezlenen probun 5' bölgesinde reporter boya ve 3' bölgesinde quencher yapısı bulunur. Quencher yapısı 5' kısmındaki reporter boyanın ışımasını engeller. PCR amplikasyonu sırasında ilk olarak DNA'ya ilgili problar bağlanır. Sonrasında PCR karışımı içerisine eklenen primerler bağlanır. Bu bağlanma ile polimerizasyon işlemi başlar. DNA polimeraz ipliğin 5' ucundaki ekzonükleaz aktivitesi aracılığıyla Taqman probu bu uçtan yıkmaya başlar. Bu şekilde serbest kalan boya (reporter) floresan ışıma yapar. Her bir döngü içerisinde hedef dizi çoğaltılmasına bağlı olarak floresan ışıma da aynı oranda artar [22].

Hibridizasyon probları ifadesine bakılacak olan genin özel bölgesi için üretilerek daha spesifik bir çalışma sağlanmaktadır [227]. Enerji veren boyadan alan boyaya transferi gerçekleşen boyalar (FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer) olarak sınıflandırılır.

Transfer ile ortaya çıkan enerji sonucunda floresan ürün miktarına bağlı şekilde ifadelenir [228].

Hairpin problemleri ise yapısından dolayı saç tokasına benzetilir. Tokanın 5' kısmında florofor, 3' ucunda quencher boya içeren ters terminal tekrarları olan diziler bulunur. İki yapı arasında hedef diziyi tamamlayacak olan nükleotid dizi bulunur. Hedef diziyeye yaklaşan probun konformasyonu değişir. Diziyeye bağlanması ile saç tokası yapısı açılır. Bu açılma ile serbest kalmış olan florofor ışımaya yapar. Işıma dizi miktarına bağlı olarak artış gösterir [229].

Başlangıç reaksiyonunda DNA/cDNA miktarının her PCR döngüsünün bitiminde iki katına ulaşması beklenir. Bu beklenen artış üssel bir plato aşamasına kadar gelir. RT-PCR amplifikasyon Şekil 2.30'da gösterilmiştir [22].



Şekil 2.28. RT-qPCR amplifikasyon görseli [22]



3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1. Bitki materyali

R. canina türü 2019 yılının haziran ve ağustos ayları içerisinde İç Anadolu Bölgesi'nin Orta Kızılırmak Bölümü'nde yer alan Kırıkkale- Delice- Halitli köyü içerisinde bulunan meradan Habip Taşkın tarafından toplanmıştır. Bitki 28.07.2021 tarihinde Doç. Dr. Mehmet Ufuk Özbek tarafından teşhis edilmiştir. Toplanan bitki kökleri kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan bitki örneği Şekil 3.1 'de verilmiştir.



Şekil 3.1. *R. canina* L. bitkisinin kurutulmuş ve teşhis edilmiş örneği

3.1.2. *R. canina* kök ekstrelerinin hazırlanması

Kuruyan bitki kökleri Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalında kök öğütme cihazı ile öğütülmüştür. Bitki kökleri talaş haline getirildikten sonra iki farklı kök ekstresi hazırlanmıştır.

- a. Metanol ekstresi (Ekstre 1); Öğütülen bitki köklerinin (50g) üzerine 500 ml metanol ilave edilerek 16 gün boyunca, dört günde bir çözücü değiştirilerek yenilenmiştir. Süzme işlemi sonucunda elde edilen sıvı metanol ekstresi 337 mbar basınç ve 60 °C su banyosu ayarlı evaporatör sisteminde buharlaştırma işlemi tamamlanarak kuru ekstreler elde edilmiştir. Ekstrenin evaporasyon işlemi Şekil 3.2'de gösterilmiştir. Elde edilen ekstreler petrilere

konularak uygun saklama koşulları oluşturulup daha sonra kullanılmak üzere +4°C dolabına alınmıştır.



Şekil 3.2. Metanol ekstresinin evaporasyon işlemi ve elde edilen kuru ekstre

b. Su ekstresi (Ekstre 2); Öğütülen bitki köklerinin üzerine (50g) 1000 ml steril su ilave edilerek gece boyunca oda sıcaklığında bırakılmıştır. Elde edilen sıvı ekstre süzme işlemi ardından 337 mbar basınç ve 60 °C su banyosu ayarlı evaporatör sisteminde buharlaştırma işlemi tamamlanarak kuru ekstreler elde edilmiştir. Ekstrenin evaporasyon işlemi şekil 3.3'te verilmiştir. Elde edilen ekstre petri kaplarına alınarak uygun saklama koşulları oluşturulup daha sonra kullanılmak üzere +4°C dolabına alınmıştır.



Şekil 3.3. Su ekstresinin evaporasyon işlemi ve elde edilen kuru ekstre

3.1.3. Deney hayvanları

Etik Kurul

Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi (BAP) tarafından kabul edilen ve desteklenen, 6367 proje kimliği ve 05/2020-24 proje kodlu çalışma için Gazi Üniversitesi hayvan yerel etik kurul izni 26.06.2020 tarihli G.Ü.ET-20.037 numaralıdır. Proje kapsamında gerçekleştirilecek olan deney hayvanları uygulamaları Gazi Üniversitesi Etik Kurulu yönergesinin 13. maddesinde belirtilen “Etik kurallara uygunluk esası” kararına uygun olarak tamamlanmıştır.

3.1.4. Deney hayvanları ve ortam koşulları

Çalışmada 42 adet her biri 250-300 g ağırlık arasında değişen 10-12 haftalık Wistar albino erkek ratlar kullanılmıştır. Hayvanların seçiminde fizyolojik olarak durumlarının iyi olmasına ve deneysel bir çalışmada kullanılmamış olmasına önem verilmiştir. Deneyde kullanılacak olarak seçilen hayvanların laboratuvar koşullarına uyum sağlamaları amacı ile 10-12 haftalık ratlar deneyden yaklaşık 5 gün önce temin edilmiştir. Temin edilen ratlar uygun şartlar sağlanarak kafeslerine yerleştirilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Deney hayvanlarının beslenmesi ve yaşama ortamları

Ratlar, $24\pm 10^{\circ}\text{C}$ sıcaklık, $55\pm 5\%$ nem içeren ortamda 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık döngüsüne uygun şekilde kafes ortamında tutulmuştur. Gözlem altında tutulan deneklerin çalışma ortamına adaptasyonu ve stabilizasyonu sağlanmıştır.

3.1.5. Deney hayvanlarının gruplandırılması ve diyabetin indüklenmesi

Gruplandırılan deney hayvanları şekil 3.5'te gösterilmiştir. Deney planlamasında hayvan gruplarının detaylı içeriği ise Çizelge 3.1' de verilmiştir.



Şekil 3.5. Gruplandırılan deney hayvanları

Diyabet indüklenmesinde kontrol 1 (K) grubu dışında olan deney gruplarına 40 mg/kg dozunda STZ, taze hazırlanan sitrat tamponu içerisinde (pH 4.5) çözülerek intraperitoneal enjeksiyonla verilmiştir (Şekil 3.6) [230].

Grup 1- Kontrol 1 Grubu (K); Deney başlangıcında intraperitoneal olarak pH değeri 4.5 olan ve taze olarak hazırlanan 50 mM sitrat tamponunun uygulama yapılan, deney süresince ağırlıklarına paralel olarak her gün oral gavaj ile steril su verilen gruptur.

Grup 2- Kontrol 2 (Diyabetik Kontrol) Grubu (A); Deney sürecinin ilk basamağında hayvan başına 40 mg/kg gelecek şekilde STZ hesaplanarak pH değeri 4.5 olan ve taze olarak hazırlanan 50 mM sitrat tamponu içerisinde çözülüp intraperitoneal olarak uygulama yapılan gruptur. Kan şekeri ölçümleri sonucunda diyabet olduklarının belirlenmesi ile hayvanların ağırlıklarına paralel olarak her gün oral gavaj ile su verilen gruptur.

Grup 3- Ekstre1 (Metanol ekstre, 1.doz) Grubu (B); Deney sürecinin ilk basamağında hayvan başına 40 mg/kg gelecek şekilde STZ hesaplanarak pH değeri 4.5 olan ve taze olarak hazırlanan 50 mM sitrat tamponu içerisinde çözülüp intraperitoneal olarak uygulama yapılan gruptur. Kan şekeri ölçümü sonrasında diyabet olduğu belirlenen grup 3, deney süresince her gün metanol ekstresinin çözücüsü (steril su) içerisinde düşük doz (250 mg/kg/gün) olarak çözülüp, oluşan sıvı karışımının hayvan ağırlıkları baz alınarak oral gavaj yolu ile ratlara verilen gruptur.

Grup 4-Ekstre1 (Metanol ekstre, 2.doz) Grubu (D); Deney sürecinin ilk basamağında 40 mg/kg gelecek şekilde STZ hesaplanarak pH değeri 4.5 olan ve taze olarak hazırlanan 50 mM sitrat tamponu içerisinde çözülüp intraperitoneal olarak uygulama yapılan gruptur. Kan şekeri ölçümü sonrasında diyabet olduğu belirlenen grup 4, deney süresince hayvan ağırlıkları ve değişimleri baz alınarak çözücüsü (steril su) içerisinde yüksek doz (500 mg/kg/gün) olarak hesaplanarak çözülüp, gün aşırı oral gavaj yolu ile verilen gruptur.

Grup 5-Ekstre2 (Su ekstre, 1.doz) Grubu (E); Deney sürecinin ilk basamağında 40 mg/kg gelecek şekilde STZ hesaplanarak pH değeri 4.5 olan ve taze olarak hazırlanan 50 mM sitrat tamponu içerisinde çözülüp intraperitoneal olarak uygulama yapılan gruptur. Kan şekeri ölçümü sonrasında diyabet olduğu belirlenen grup 5, deney süresince hayvan ağırlıkları ve

değişimleri baz alınarak çözücüsü (steril su) içerisinde düşük doz (250 mg/kg/gün) olarak çözülüp, gün aşırı oral gavaj yolu ile verilen gruptur.

Grup 6-Ekstre2 (Su ekstre, 2.doz) Grubu (F); Deney sürecinin ilk basamağında 40 mg/kg gelecek şekilde STZ hesaplanarak pH değeri 4.5 olan taze olarak hazırlanan 50 mM sitrat tamponu içerisinde çözülüp intraperitoneal olarak uygulama yapılan gruptur. Kan şekeri ölçümü sonrasında diyabet olduğu belirlenen grup 6, deney süresince hayvan ağırlıkları ve değişimleri baz alınarak çözücüsü (steril su) içerisinde yüksek doz (500 mg/kg/gün) olarak hesaplanarak çözülüp, gün aşırı oral gavaj yolu ile verilen gruptur.

Çizelge 3.1. Gruplandırılan deney hayvanlarına uygulanacak olan STZ ve ekstre içeriği

	İntraperitoneal enjeksiyon	Gavajla verilecek madde	N (Kişi sayısı)
Grup 1- Kontrol 1 (K)	Yalnızca sitrat tamponu	Ekstrenin çözüldüğü madde (su)	7
Grup 2-Kontrol 2 (Diyabetik Kontrol) (A)	Streptozotosin(+)	Ekstrenin çözüldüğü madde (su)	7
Grup 3-Ekstre1 (Metanol ekstresi, 1.doz) (B)	Streptozotosin(+)	Ekstre 1, 1.doz (250 mg/kg/gün)	7
Grup 4-Ekstre1 (Metanol ekstresi, 2.doz) (D)	Streptozotosin(+)	Ekstre 1, 2.doz (500 mg/kg/gün)	7
Grup 5-Ekstre2 (Su ekstresi, 1.doz) (E)	Streptozotosin(+)	Ekstre 2, 1.doz (250 mg/kg/gün)	7
Grup 6-Ekstre2 (Su ekstresi, 2.doz) (F)	Streptozotosin(+)	Ekstre 1, 2.doz (500 mg/kg/gün)	7

Enjeksiyon sonrası hayvanlar kafeslerine geri bırakılarak aynı ortam koşulları sağlanmıştır. Kafesler içerisindeki suya ve yeme ulaşma imkânı değiştirilmemiştir. Uygulamadan 72 saat sonra kuyruk kanından açlık kan glukoz ve insülin düzeyi tayini yapılmıştır. Streptozotosin verilen gruplarda glukoz düzeyleri ≥ 200 mg/dL olarak saptandığında diyabet olarak kabul edilip, ekstre uygulaması olarak nitelendirilen bitki kök ekstralarının verilmesi basamağına geçilmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. İntraperitoneal STZ uygulaması

3.1.6. *R. canina* kök ekstrelerinin deney hayvanları üzerinde uygulanması

Hazırlanan kök ekstreleri hayvan gruplarının ağırlıkları baz alınarak steril su içerisinde taze olarak çözülerek (Şekil 3.7) oral gavaj yolu ile uygulaması yapılmıştır (Şekil 3.8). Ekstre uygulaması 14 gün olacak şekilde uygulama yapılmıştır. Süreç içerisinde diyabet olan hayvanların ağırlık değişimleri baz alınarak bu değişimler çerçevesinde ekstre uygulaması yapılmıştır.



Şekil 3.7. Bitki kök ekstrelerinin uygulama öncesi hazırlığı



Şekil 3.8. Ekstrenin oral gavaj uygulaması

3.1.7. Kan materyalinin toplanması

Hayvanlara her gün uygulanan ekstre uygulamasının 14. gününde gruplar etik kurul raporuna uygun olarak derin anestezi altında intrakardiyak kan alınarak sakrifiye edilmiştir (Şekil 3.9). Alınan kanlar mor kapaklı EDTA'lı biyokimya tüplerine aktararak pıhtılaşmamasına dikkat edilmiştir. Çalışma için gerekli olan kan örnekleri alınıp buz aküsü içerisinde Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkez biriminden Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Laboratuvarına getirilmiştir. Alınan örnekler -80°C de muafaza edilmiştir.



Şekil 3.9. Anestezi altındaki deney hayvanları

3.1.8. Kullanılan kimyasal maddeler

Metanol (Sigma), 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma), Gallik asit (Sigma), Bütien di-hidroksi tolüen (BHT) (Sigma), Demir Klorür (FeCl_2) (Merck), Ferrozin, 98%, (Sigma), Folin Ciocalteu's reagent (Meck), Sodyum karbonat (Na_2CO_3) (Merck), Gallik asit (Sigma), Tris (Merck), Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) (Merck), Yükleme tamponu / Bromfenol mavi (Merck), Etidyum bromür (Sigma), Agaroz (Applichem), pBR322 plazmit DNA (Sigma-Aldrich), Restriksiyon endonükleaz enzimleri (*Bam*HI ve *Hind*III) (Sigma-Aldrich), Dimetilsülfoksit DMSO (Merck), Askorbik asit (Sigma), Demir (III) Klorür (Merck), Hidrojen peroksit (Riedel-de haen), Tris (Merck), Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) (Merck), Etidyum bromür (Sigma), Agaroz (Applichem), Streptozotosin (Santa Cruz), Sodyum asetat (Sigma), Amonyum klorür (Sigma), Sodyum bikarbonat (Sigma), anestezik ilaçlar (Control %10-50 mL), (Ketasol %10).⁴

3.1.9. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler ve laboratuvar cihazları

Filtre kâğıdı (Whatman), laboratuvar cam malzemeler (mezür, beher, cam tüp, erlenmayer vb.), petri kapları (90x15mm), alüminyum folyo, niltril ve lateks eldiven, mikropipetler (10 μL , 100 μL , 1000 μL), filtreli mikropipet uçları, ependorf tüpleri (0,5 mL -1 mL -2 mL), petri kapları (90x15mm), steril insülin enjektörü, EDTA'lı mor kapalı tüp 10 ml, 5 ml'lik steril enjektör (Beybi), etiket, pens.

Evaporatör sistemi (BÜCHI, Distillation Chiller B-741, Vacuum Pump V-700, Vacuum Controller V-850, Rotavapor V-210), Distile Su Cihazı (JENCONS, AUTOSTILL 8000X), Spektrofotometre (SHIMATZU, UV-1700), Spektrofotometre küveti (LP Italiana), Distile su cihazı (JENCONS, AUTOSTILL 8000X), Worteks (FISONS), Hassas Terazî (Sartorius), Santrifüj (Hettich, MIKRO 22 R), Otoklav (TOMY, SX-700E), BioDoc Analyze (Biometra) görüntüleme cihazı, etüvler ve inkübatörler, (Memmert), Otoklav (TOMY, SX-700E), Distile su cihazı (JENCONS, AUTOSTILL 8000X), Mikrodalga fırın (Vestel), Yatay elektroforez tankı ve güç kaynağı (Biometra), Agaroz jel plakları ve taraklar, Worteks (FISONS), ağırlık ölçme cihaz,alet ve ekipmanları (Dijital, Scaltec), pH metre (Mettler toledo), glukometre cihazı ve cihaza uyumlu strip (Contour plus), DNA-RNA sayıcı (Nanodrop, ND1000), Steril Kabin Holten Lamin Air), Model 1.8, RealTime PCR cihazı (Roche, LightCycler®480), Buz makinesi, (Hoşishzaki, FM-80EE), Derin dondurucular (-

30°C), (SANYO, MDF-U537), Derin dondurucular (-80°C) (SANYO, MDF-U72V), Kit koruma dolabı (+4 °C) (Sanyo)

3.1.10. Kullanılan kitler

Gen ifadesi çalışmasında kullanılan kitler

RNA İzolasyon Kiti (Roche, Almanya), TAQMAN® Gen Ekspresyon Testleri Kiti, (Beta-Actin) (RAT) (Roche, Almanya), TAQMAN® Gen Ekspresyon Testleri Kiti, (İnterlökin-1 Beta) (RAT) (Roche, Almanya), TAQMAN® Gen Ekspresyon Testleri Kiti, (*TNF-α*) (RAT) (Roche, Almanya), Transkriptör Birinci İplik cDNA Sentez Kiti (Roche, Almanya), LightCycler® 480 Probes Master kiti (Roche, Almanya)

3.1.11. Deneylerde kullanılan çözeltilerin hazırlanması

Sterilizasyon işlemi: Sterilizasyon, otoklav kullanılarak 121 °C’de 1,5 atm basınç ayarında 15 dakika olarak yapılmaktadır. Deney hazırlığı aşamasında en önemli adımlardan biridir.

0,5M EDTA (pH 8.0): 186,12 gr EDTA bir miktar distile su ile çözülüp, son hacmi 800 mL olacak şekilde hazırlanmıştır. pH değeri 8 olana kadar NaOH tableti eklenmiştir. Tablet çözelti içerisinde karıştırıldıktan sonra çözeltinin son hacmi 1000 mL olacak şekilde distile su ilave edilmiştir.

1 M Tris-HCl çözeltisi: 12,11 gr Tris distile su içerisinde çözülüp konsantre halde olan HCl ile pH dengesi 8’e ayarlanmıştır. pH ayarlaması yapıldıktan sonra son hacim 100 mL olacak şekilde distile su ilave edilmiştir.

TE çözeltisi: 1 mL 1 M Tris-HCl ile 0,2 mL 0,5 M EDTA karıştırılıp çözeltinin son hacmi 100 mL olacak şekilde distile su ilave edilmiştir.

Stok Tris-Asetik Asit-EDTA (TAE) tamponu (50x) (pH: 8,0): İlk olarak 242 gr Tris, 57,1 mL glasial asetik asit ile 0,5 M 100 mL EDTA (pH 8,0) distile su içerisinde çözülerek ve hacmi 1000 ml’ye tamamlanmıştır.

TAE tamponu: TAE stok tamponundan (50x) 20 mL alınıp, üzerine distile su ilave edilerek 1000 ml'ye tamamlandı.

Agaroz: %0,8 ve %1'lik agaroz TAE tamponu içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

Yükleme tamponu: Sırasıyla tartımları yapılan 0,025 gr bromofenol mavisi, 0,25 gr ksilen siyanol ve 40 gr süktroz birleştirilerek 100 ml distile su ilave edilerek çözülmüştür.

Etidyum bromür (EtBr): 10 mg/mL derişimde hazırlanmış olup ışığı geçirmeyen koyu renkli şişelerde muhafaza edilmiştir.

Sitrat tamponu; 1,47 gr sodyum asetat tartılıp 80 ml su içerisinde çözülmüştür. Çözeltinin pH dengesi 6M HCl asit ile 4,5 olarak ayarlanıp 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Serum fizyolojik: Distile su içerisinde %0,9 oranında NaCl çözülerek hazırlandı ve otoklav kullanılarak sterilizasyon işlemi yapılmıştır.

DPPH çözeltisi: %0,004 oranında DPPH hassas terazi ile tartılıp metanol içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

BHT: 0,01 gram BHT tartılıp 10 ml metanol içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

Gallik Asit Çözeltisi: 0,001 gram gallik asit 1 ml metanol içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

10x Red Blood Cell Lysis Buffer: 8,26 g amonyum klorid, 1,19 g sodyum bikarbonat tartılıp 0.5M ve pH içeriğı 8 olan 200 ml EDTA tamponu içerisinde çözülmüştür. Çözelti son hacmi 100 ml olacak şekilde distile su ile tamamlanmıştır. Çözeltinin son pH içeriğı 7.3 olacak şekilde ayarlanmıştır. Steril edebilmek için otoklav kullanılmıştır. Deneylerde kullanılmak üzere (1x) olacak şekilde seyreltim yapılmıştır.

3.2. Metotlar

3.2.1. *R. canina* kök ekstresi antioksidan aktivitesi

Bitki ekstresinin antioksidan aktivite için hazırlanması

Bitki ekstraktları 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) ve toplam fenolik içerik madde tayininde kullanılmak üzere 1 mg/mL konsantrasyon olacak şekilde hazırlanmıştır.

DPHH yöntemi

Çalışmada öncelikli olarak bitki kök ekstraktlarının radikal süpürücü etkisini hesaplayabilmek için %0,004 DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) çözeltisinin 100-6,25 µg/ml olan farklı konsantrasyonlardaki su ve metanol ekstraktlarında meydana gelen renk değişimleri % inhibisyon olarak değerlendirilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ekstraktlara 500 µl %0,004 DPPH çözeltisinden 1 mL eklenerek karanlıkta 30 dakika bekletilmiştir. Örnekler karanlığa maruz bırakıldıktan sonra UV spektrofotometre cihazında 517 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Elde edilen veriler kontrol olarak kullanılan örnek (500 µl çözücü + 500 µl DPPH) baz alınarak değerlendirilmiştir. Bütillenmiş hidroksi tolüen (BHT) örneklerle karşı pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. DPPH'nin radikal süpürücü etkisi % inhibisyon formülü ile $(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}} / A_{\text{kontrol}}) \times 100$ hesaplanmıştır.

Toplam fenolik içerik miktar tayini

Deneyde kullanılmak üzere konsantrasyonları 1mg/ml olacak şekilde iki farklı bitki kök ekstresi ve galik asit stok çözeltisi hazırlanmıştır. Çalışmada 100 µL ekstre üzerine 200 µL %5'lik Folin-Ciocalteu reaktifi eklenilerek 3 dakika bekletildikten sonra üzerine 1 mL %2'lik Na₂CO₃ çözeltisi eklenilerek oda sıcaklığı koşullarında 1 saat bekletilmiştir. Bekleme süresi sonunda UV spektrofotometre cihazında 760 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır. Her çözücü için 3 tekrar yapılmıştır. Ölçüm sonuçları standart galik asit grafiğinden elde edilen eşitlik parametresi kullanılarak µg galik asite eş değer mg ekstre miktarı olarak saptanmıştır.

Demir Şelatlama

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan her bir bitki kök ekstresinden 500 µL cam tüpe alınıp üzerine 50 µL 2 mM FeCl₂ eklenip 5 dk bekletilmiştir. Tüplere alınan ekstreler için her konsantrasyondan 3 paralel olacak şekilde deney düzeneği tasarlanmıştır. Bekletilen karışım üzerine 100 µL 5 mM ferrozin eklenip 10 dk inkübasyonda bırakıldıktan sonra spektrofotometre cihazında 562 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır. Aynı işlem ekstre içermeyen farklı çözücüler üzerinde uygulanmış olup kontrol grubu olarak karşılaştırılması yapılmıştır. Ekstre içeriklerindeki demir iyonlarının yüzde şelatlama aktivitesi % Şelatlama = $(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}} / A_{\text{kontrol}}) \times 100$ formülü ile belirlenmiştir.

3.2.2. *R. canina* kök ekstresinin DNA üzerine etkisinin belirlenmesi

DMSO içerisinde çözülen 1000 µM bitki ekstresi pBR322 plazmit DNAsı üzerindeki etkisi agaroz jel elektroforez ile incelenmiştir. Farklı konsantrasyondaki ekstreler (1000, 500, 250, 125 µg/ml) pBR322 plazmid DNA'sı ile muamele edilip 37 °C 'de karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonunda örnekler agaroz jel elektroforezinde yürütülüp UV-DNA görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir. Kontrol olarak ekstre ile etkileşime sokulmamış plazmid DNA'sı kullanılmıştır.

Agaroz jel elektroforezi

%1 (w/v) agaroz, TAE tamponu içerisinde homojen hale getirildikten sonra jel tabağına dökülmüştür. Polimerleştikten sonra jele örnekler yüklenerek TAE tamponu içerisinde 70 V. 2 saat boyunca yürütülmüştür. Yürütme sonrası jel etidyum bromür ile boyanmıştır. Boyama işlemi tamamlanan jelin görüntülenmesi BioDoc Analyze (Biometra) görüntüleme cihazında yapılmıştır. Jel görüntüleri bilgisayar ortamında JPEG formatında kaydedilip görüntüler alınmıştır.

*Bam*HI ve *Hind*III enzimleri ile Restriksiyon Endonükleaz kesimi

DNA üzerinde 5'-G/GATCC-3' bölgesini tanıyan ve kesen *Bam*HI enzimi ve 5'- A/AGCTT-3' bölgesini tanıyan ve kesen *Hind*III enziminin madde ile etkileşen DNA'nın kesimi

gerçekleştirilmiştir. DNA üzerinde ekstrelerin bu bölgelere bağlanma durumunu anlayabilmek için DNA ile ekstreler 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında *Bam*HI ve *Hind*III enzimleri ile kesilerek 37 °C’de inkübe edilmiştir. Enzim ile muamele edilmiş ekstre-DNA bileşimi TAE tamponu içerisinde 70 V’de 1 saat boyunca %1’lik agaroz jel içerisinde yürütülmüştür. Elektroforez de yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel etidyum bromür ile boyanarak BioDoc Analyze (Biometra) cihazında jel görüntülenmesi yapılmıştır. Görüntüler JPEG formatında kaydedilmiştir.

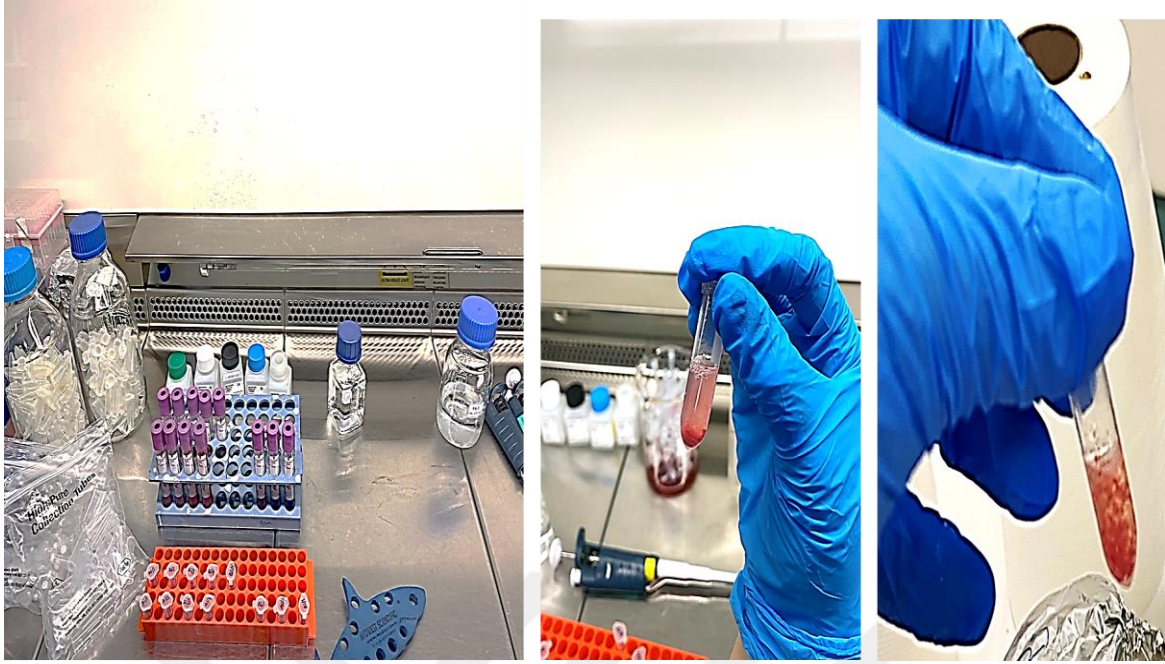
Ekstrelerin DNA koruyucu etkisi

Her bir kök ekstresi için 1 mg tartılıp 500 ml DMSO içerisinde çözülmüştür. 0,2 mg askorbik asit ve 0,4 mg demir III klorür ile fenton reaktifi hazırlanıp en son hacim 20 ml olacak şekilde su ile tamamlanmıştır. Karışım iyice çalkalanıp reaksiyonun bozulmaması için şişenin etrafı alüminyum folyo ile sarılmıştır. 35 µL su ve 5 µL ekstre içeriğinin son hacmi 40 µL olacak şekilde hesaplaması yapılmıştır. Pozitif kontrol ve negatif kontrol için 20 µL distile su konulmuştur. Hazırlanan fenton reaktifine hidrojen peroksit eklenip ependorflara negatif kontrol hariç 20 µL olacak şekilde dağıtım yapılmıştır. Pozitif kontrol içeriğine 20 µL fenton eklenirken negatif kontrol içeriğine 20 µL distile su eklenmiştir. Bu şekilde bütün ependorfların hacimleri eşitlenmiştir. Ependorf tüplere hızlı bir şekilde spin verilip, yarım saat etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi dolduktan sonra jel elektroforezinde 70 V akım da yürütülüp 90 dk ve 120 dk olacak şekilde görüntülenmesi BioDoc Analyze (Biometra) cihazında yapılmıştır. Jel görüntüleri bilgisayar ortamında JPEG formatında kaydedilmiştir.

3.2.3. *R. canina* kök ekstrelerinin *IL-1β* ve *TNF-α* ifadesi üzerine etkisi

Alınan kan örneklerinden RNA izolasyonu

Kan örnekleri deney hayvanlarından kalpten ponksiyon ile EDTA içeren steril tüplere alınmıştır. Uygun koşullar altında merkez birimden laboratuvara getirilen örnekler RNA izolasyon kiti kullanılarak RNA saflaştırılması yapılmıştır. Deney için steril ortam sağlayabilmek ve kontaminasyonu önleyebilmek adına izolasyon işlemi steril kabininin içerisinde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Kan örneklerine RNA izolasyonu işlemi

Kandan RNA izolasyonu

Red Blood Cell Lysis Buffer ile Lökosit Eldesi

2 ml'lik steril ependorflara 1 ml *Red Blood Cell Lysis Buffer* (RBC) eklenmiştir. Daha sonra üzerine EDTA'lı tüpte bulunan kandan 200 µl ilave edilmiştir. Bu aşamalarda vorteks kullanılmamaya özen gösterilmiştir. Tüpler bir platforma yerleştirilmiş ve oda sıcaklığında 10 dakika alt üst ederek karıştırılmıştır. 5 dk. 500 x g' de santrifüj işlemi yapıldıktan sonra oluşan kırmızı pelleti kaldırmamaya dikkat ederek süpernatant kısmı pipet yardımı ile alınmıştır. Ependorfa tekrar 1 ml RBC ekleyerek pellet RBC içinde tekrar çözülmüştür. 3 dk. 500 x g' de santrifüj yapılmıştır. RBC solüsyon işlemi beyaz pellet elde edilene kadar yaklaşık olarak 4-5 defa tekrar edilmiştir. Beyaz bir pellet elde edildiğinde süpernatant dökülmüş ve pellet 200 µl PBS içerisinde çözülmüştür. Bu aşamadan sonra kültür hücrelerinden total RNA izolasyonu protokolü takip edilmiştir.

Kültür Hücrelerinden Total RNA İzolasyonu

PBS' te çözülen hücre kültürü üzerine 400 µl *Lysis/-Binding Buffer* eklenerek 15 sn. iyice vortekslenmiştir. Kolon ve koleksiyon tüpü bir araya getirilip her bir örnek pipet yardımı ile

kolona aktarılmıştır. 15 sn. 8.000 x g 'de santrifüj işlemi yapıldıktan sonra aşağıda kalan sıvı kısım boşaltılmıştır. Kolon ve koleksiyon tüpü tekrar birleştirilmiştir. Örnek başına; 90 µl DNase Incubation Buffer ve 10 µl DNase I toplam hacim 100 µl olacak şekilde karışım hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım içerisinde 100 µl örnekler eklenerek oda sıcaklığında 15 dk. inkübasyona bırakılmıştır. 500 µl Wash Buffer I eklenmiştir. 15 sn. 8.000 x g 'de santrifüj işlemi yapılmıştır. Alttaki sıvı kısmı boşaltılmıştır. 500 µl Wash Buffer II eklenmiştir. Tekrar 15 sn. 8.000 x g 'de santrifüjleme yapılmıştır. Alttaki sıvı kısım boşaltılıp 200 µl Wash Buffer II eklenmiştir. 2 dk. 13.000 x g 'de santrifüj yapılarak tüm Wash Buffer kolondan uzaklaştırılmıştır. Koleksiyon tüpü atılıp kolon tüpü 1.5 ml'lik steril ependorfa alınmıştır. 50 µl elution buffer eklenmiştir. 1 dk. 8.000 x g 'de santrifüjleme işlemi yapılmıştır. Ependorf tüpünde kalan RNA'lar etiketlendirilip cDNA sentezi işlemi için -80 °C' ye kaldırılmıştır.

cDNA sentezi

İzole edilen RNA örneklerinden kit protokülü takip edilerek cDNA sentez işlemi yapılmıştır (Çizelge 3.2). Kit içerisindeki ürünler alkol ile temizlenerek kabin içerisine alınmıştır. Sentez işlemi sırasında deney süresince gerekli hesaplamalar yapılarak sonuçlar alınmıştır.

Çizelge 3.2. RNA'dan cDNA eldesi için hazırlanan karışım

MALZEME	1 X Miktar (µl)	n x Miktar (µl)
Total RNA	6 µl	Örnek sayısı
Anchored-oligo(dT) ₁₈ Primer	1 µl	Örnek sayısı
Random Hexamer Primer	2 µl	Örnek sayısı
Su	4 µl	Örnek sayısı
Total	13µl	

Her bir ependorfa 6 µl RNA eklenmiştir. Örnek başına: Anchored-oligo(dT)₁₈ Primer, random Hexamer Primer ve suyu karışım olarak hazırlanıp her ependorfa 7'şer µl dağıtılmıştır. Ependorflar ısıtıcıda 65°C'de 10 dakika bekletilip ependorflar buz üzerine alınmıştır. Reaksiyon karışımı hesabı yapılarak devam edilmiştir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Reaksiyon karışımı hazırlama

MALZEME	1 X Miktar (µl)	n x Miktar (µl)
Transkriptör Ters Transkriptaz Reaksiyon Tamponu	4 µl	Örnek Sayısı
RNaz İnhibitörü	0,5 µl	Örnek Sayısı
Deoks nükleotit Karışımı	2 µl	Örnek Sayısı
Transkriptör Ters Transkriptaz	0,5 µl	Örnek Sayısı
Total	20 µl	

Hazırlanan karışımdan her ependorfa 7 µl ekleyerek toplam hacim 20 µl'ye tamamlanmıştır. Örnekler spin verildikten sonra reaksiyonlar PCR da çoğaltılmıştır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. PCR programı

Sıcaklık (°C)	Zaman (dk)
25	10
55	30
85	5

PCR bittikten sonra örnekler hemen buza alınarak elde edilen cDNA miktarının ölçümü nano-drop cihazı ile yapılmıştır. Ölçüm yapıldıktan sonra tüpler -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

IL-1β ve *Tnf-α* gen ifade profili

cDNA'ların hedef genlerdeki ifade analizi için LightCycler®480 Real-Time PCR kullanılmıştır (Şekil 3.11). PCR protokolü firma tarafından optimize edilen TaqMan gene expression assay kitleri ve kit içeriğinde yer alan program baz alınarak yapılmıştır. Kit içerikleri rat gen dizilerine uygun olarak sentezlettirilmiştir. Normalizasyon için kullanılan housekeeping gen olarak beta-aktin kullanılmıştır.



Şekil 3.11. RT-qPCR cihazı

PCR karışımlarının hazırlanmasından önce ölçülen cDNA miktarları dikkate alınarak sulandırma işlemi yapılmıştır. Deney gruplarının birbirine yakın cDNA miktarı için ortak hesaplama yapılırken, ortalama değerin altında ya da üstünde kalan miktarlar için ayrı hesaplama yapılmıştır. Sulandırma işlemi 100 ng olacak şekilde 1/40 oranında yapılmıştır.

Housekeeping gen olarak beta-aktin geni kullanılmıştır. *IL-1 β* ve *TNF- α* gen ifadeleri için PCR karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan PCR karışımı Çizelge 3.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.5. PCR karışımı

Bileşen	Hacim (μ l)
Probes Master	10 μ l
Primer Prob	1 μ l
Su	2,5 μ l
MgCl ₂	0,5 μ l
Toplam Hacim	14 μ l

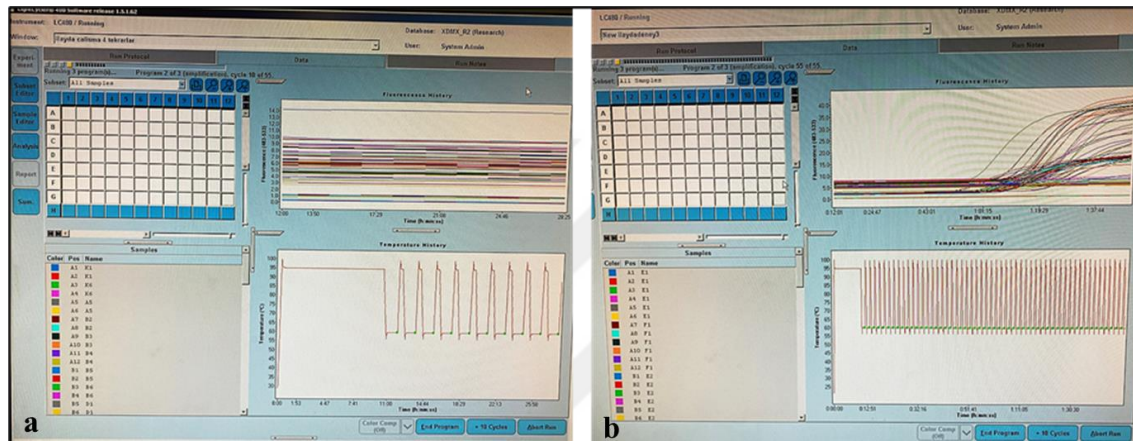
Hazırlanan karışım ve sulandırılan DNA tüpleri buz üzerinde spin verilerek çalışılma yürütülmüştür. Her bir gen için 2 tekrar olacak şekilde hesaplama yapılmıştır. 96'lık plate içerisinde önce hazırlanan PCR karışımı sonra 6 μ l DNA olacak şekilde dağıtım yapılmıştır. Plate içeriğinin her bir kuyusu 20 μ l olacak şekilde tamamlanmıştır.

Plate üzeri dikkatli bir şekilde MicroAmp Optical Adhesive Film ile kapatılıp plate hafifçe karıştırılarak cihaza konulmuştur. Cihazın başlatılması ile ara yüzüne ilgili gen isimleri ve

her bir rat örneğinin kodları girilip, RT-PCR programı başlatılmıştır (Şekil 3.12). İlgili PCR programı Çizelge 3.6’ da gösterilmiştir.

Çizelge 3.6. RT-qPCR Programı

	Derece	Süre	Döngü
Enzim aktivasyonu	95°C	10 dakika	1
Denatürasyon	95°C	15 saniye	40
Anneal/ Extend	60°C	1 dakika	40



Şekil 3.12. RT-qPCR programı; (a) Programın başlangıcı, (b) Programın bitiminde genlerin verdiği ışımaya

Program sonrası elde edilen sonuçlar cihaz üzerinde yer alan report seçeneği ile LightCycler®480 ara yüzünden alınıp değerlendirilmek üzere aktarılmıştır.

RT-qPCR ile *IL-1β* ve *TNF-α* Gen İfadesinin $2^{-\Delta\Delta CT}$ Değerleri

Diyabet ile ilişkilendirilen *IL-1β* ve *TNF-α* gen ifade düzeyi, referans gen olan β -actin ifadesine göre $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri hesaplanmıştır. LightCycler®480 Real-Time PCR Sistemi ile ara yüzüne aktarılacak çalışılan her bir örneğin Ct değeri cihazdan alınıp Microsoft Excel programına aktarımı yapılmıştır. Her örnek için hedef gen düzeyi ve referans gen ifadesi için iki tekrar sonrası elde edilen Ct değerleri yazılarak iki tekrarlı gen ifadelerinin ortalama Ct değerleri Microsoft Excel programında hesaplanmıştır. Tüm örnekler için:

$\Delta Ct = \text{hedef gen (Ct) değeri} - \text{referans gen (Ct) değeri}$ şeklinde hesaplanmıştır.

Kontrol 1 grubunun (K) housekeeping gen olarak kullanılan β -actin geninin *IL-1 β* ve *TNF- α* genleri için ayrı Ct değer ortalaması alınmıştır. Alınan değer Ct_{ort} olarak ifade edilmiştir. Her bir örnek için:

$\Delta\Delta CT = \Delta Ct - Ct_{ort}$ formülü ile hesaplanmıştır.

Tüm örnekler için $\Delta\Delta CT$ değerinin hesaplanması sonrasında $2^{-\Delta\Delta CT}$ değeri hesaplanmıştır. Microsoft Excel programı üzerinde yapılan bu hesaplamaların sonucunda deney grupları baz alınarak ortalamalar hesaplanıp grafik oluşturulmuştur. Deney gruplarının Kontrol 1 grubu baz alınarak gen ifadelerinin ne kadar arttığı veya ne kadar azaldığı değerlendirilmiştir.

İstatistiksel analiz

Yapılan çalışma doğrultusunda kontrol grubuna paralel olarak diyabetik kontrol, metanol ekstre düşük doz ve yüksek doz, su ekstre düşük doz ve yüksek doz parametrelerinin değerlendirilmesi yapılmıştır. Gen ifade analizi sonucu meydana gelen farklılıklarının değerlendirilmesi için Delta-delta Ct metodu dikkate alınmıştır [231].

İstatistiksel analiz değerlendirmeleri için literatürde yer alan yöntemlerden faydalanılmıştır. Bu yöntemlerden SPSS programı kullanılarak grupların kan şekeri düzeyleri ve ortalama gen ifade düzeyleri arasındaki farklılıkları değerlendirebilmek adına Kruskal-Wallis testi ile değerlendirilmiştir. İkili gruplar arasında yapılacak olan istatistiksel değerlendirmeler için Mann-Whitney U testi yapılmıştır. Yanılma düzeyi 0,05 olarak seçilerek $p < 0,05$ değeri için parametreler arası ifade düzeyleri istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. DENEYSEL BULGULAR

Bu çalışmada *R. canina* bitki kökünden elde edilen iki farklı ekstrenin verim hesabı yapıldıktan sonra ilk olarak antioksidan aktivite sonuçları değerlendirilmiştir. İkinci olarak, ekstrelerin DNA üzerindeki etkinliğini belirleyebilmek amacıyla DNA madde etkileşimi, enzim kesimi ve DNA koruyucu etki deneyleri yapılmıştır. Üçüncü olarak, elde edilen ekstrelerin hayvan deneylerinde diyabet oluşturulan ratlar üzerinde iyileştirme etkinliğine bakılmıştır. Son olarak diyabet oluşturulmuş ratlarda bitki ekstrelerinin *IL-1 β* , *TNF- α* genlerinin ifade düzeyleri üzerine etkisi belirlenmiştir.

Yapılan deneylerin ışığında ilgili bitki kökünün birçok alanda çalışması yapıp alınan sonuçların bir bütün olarak değerlendirilmesi yapılmıştır.

4.1. Ekstrelerin % Verimlerinin Hesaplanması

R. canina bitki kökünden elde edilen metanol ve su ekstresinin yüzde olarak verimleri aşağıda olduğu gibi hesaplanmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.1.'de gösterilmiştir. Çizelge 4.1 incelendiğinde % verim değeri metanol için %18 iken su ekstresi %12 olarak bulunmuştur. Hesaplama sonucunda metanol ekstre veriminin su ekstresine oranla yüksek olduğu görülmüştür.

$$\text{Yüzde Verim (\%)} = \frac{\text{Ekstraksiyon sonrası elde edilen ekstre} \times 100}{\text{Başlangıçta tartılan bitki miktarı}}$$

Çizelge 4.1. *R. canina* bitki kök ekstre verimliliği

Ekstraksiyon Çözücüsü	% VERİM DEĞERİ
Metanol (Ekstre 1)	18
Su (Ekstre 2)	12

4.2. Antioksidan Deney Sonuçları

4.2.1. DPPH radikal süpürücü aktivite

Bitki kök ekstrelerinin antioksidan radikal süpürücü aktiviteleri DPPH yöntemi ile belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan *R. canina* bitki kökü metanol ve su ekstrelerinden 6,25-

100 µg/ml aralığında farklı konsantrasyonlar hazırlanmıştır. Pozitif kontrol parametresi için BHT kullanılmıştır. Ekstrelerin ve pozitif kontrol olarak kullanılan BHT'nin 517 nm'de ölçülen absorbans değerleri, % İnhibisyon = $(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}} / A_{\text{kontrol}}) \times 100$ formülü ile DPPH radikal süpürücü aktivitesi hesaplanmıştır. Metanol ve su ekstralarının 6,25-100 µg/ml konsantrasyon değer aralığında okunan % inhibisyon ölçümleri Çizelge 4.2'de gösterilmiştir. Ekstrelerin IC₅₀ değerleri sırasıyla Çizelge 4.3'te ve Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. *R. canina* kök ekstralarının radikal süpürücü etki değerleri (% inhibisyon)

Konsantrasyon Ekstre	6,25 µg/mL	12,50 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
Metanol	17,12 ± 3,73	24,59 ± 1,28	53,22 ± 4,89	83,45 ± 0,77	90,24 ± 1,78
Su	23,29 ± 0,68	45,13 ± 2,38	59,25 ± 0,95	85,94 ± 1,57	92,86 ± 1,69

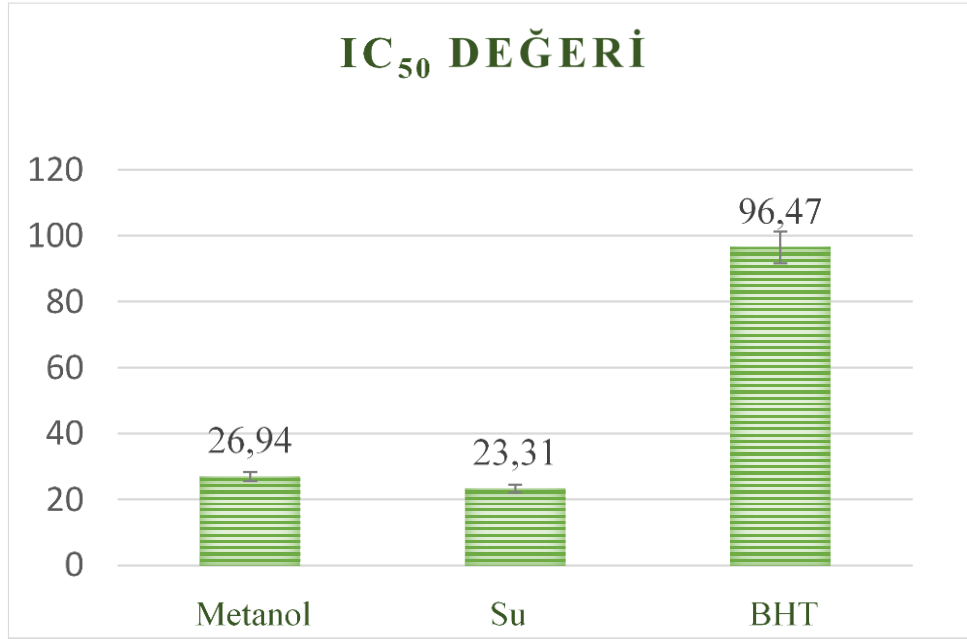
Çizelge 4.2' ye bakıldığında *R. canina* metanol ekstresinin radikal süpürücü etkisi 6,25 µg/mL'de %17,12 ± 3,73, 12,50 µg/mL'de %24,59 ± 1,28, 25 µg/mL'de %53,22 ± 4,89, 50 µg/mL'de %83,45 ± 0,77 ve 100 µg/mL'de %90,24 ± 1,78 olarak bulunmuştur. *R. canina* su ekstresinin radikal süpürücü etkisi 6,25 µg/mL'de %23,29 ± 0,68, 12,50 µg/mL'de %45,13 ± 2,38, 25 µg/mL'de %59,25 ± 0,95, 50 µg/mL'de %85,94 ± 1,57 ve 100 µg/mL'de %92,86 ± 1,69 olarak bulunmuştur. DPPH radikali süpürme etkisine göre ekstraların % DPPH giderme etkinliği aynı konsantrasyondaki standart antioksidan olan BHT kontrolünden daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Konsantrasyonun artmasına bağlı olarak DPPH radikalini süpürme etkisi ile antioksidan etkinin de arttığı belirlenmiştir.

IC₅₀ değeri ekstrenin veya standardın serbest radikal olan DPPH'ı süpürdüğü % inhibisyon değerinin yarısına denk gelen derişim değeridir. IC₅₀ değerinin düşük olması antioksidan etkisinin yüksek olduğuna işaret etmektedir. Çizelge 4.3'e göre bitki kökünden elde edilen metanol ekstresi ile su ekstresinin IC₅₀ değerleri kontrol olarak kullanılan BHT'ye göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak ekstraların kontrole göre antioksidan içeriğinin daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. *R. canina* kök ekstralarının IC₅₀ değerleri (µg/ml)

Ekstreler	Metanol	Su	BHT
IC ₅₀ Değerleri	26,94 ± 0,82	23,31 ± 0,14	96,47 ± 0,32

Ekstreler kendi aralarında kıyaslandığında ise su ekstresinin metanol ekstresine göre daha düşük IC_{50} içeriğine sahip olduğu dolayısıyla daha etkili olduğu belirlenmiştir. Ekstrelerin ve standart olarak kullanılan DPPH'nin süpürücü etkisinin yüksekten düşüğe doğru sıralaması; su ekstresi (IC_{50} : $23,31 \pm 0,14 \mu\text{g/ml}$) > metanol ekstresi (IC_{50} : $26,94 \pm 0,82 \mu\text{g/ml}$) > BHT (IC_{50} : $96,47 \pm 0,32 \mu\text{g/ml}$) olarak belirlenmiştir.



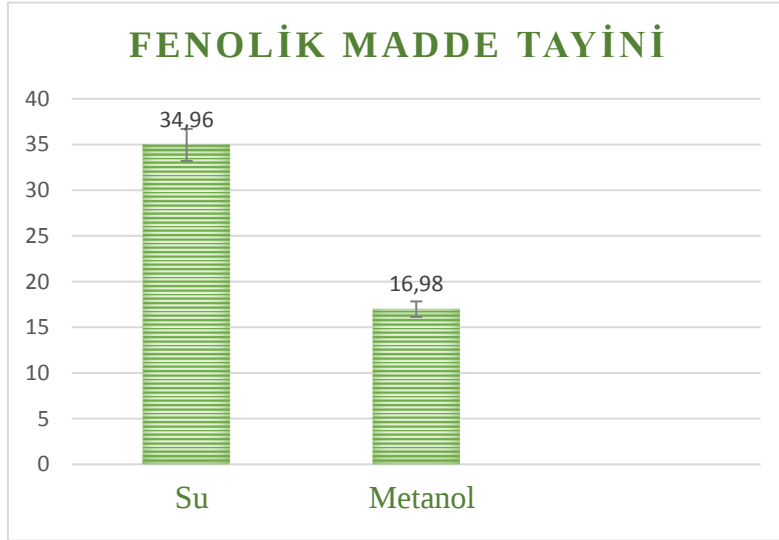
Şekil 4.1. Ekstrelerin ve standardın (BHT) DPPH süpürücü etkilerinin IC_{50} değerleri ($\mu\text{g/ml}$)

4.2.2. Toplam fenolik içerik miktar tayini

Toplam fenolik miktar tayininde gallik asit kontrol olarak kullanılmıştır. Gallik asit sonucuna göre standart grafik oluşturulmuştur. Bitki ekstralarının toplam fenolik içerik miktarı (μg) şeklinde ifade edilip, oluşturulan standart grafik ile denklem kurularak gallik asit standardına bakılarak (mg) fenolik madde miktarı (mg) cinsinden hesaplandı. Ekstrelerin spektrofotometre cihazında 760 nm'de okunan absorbans değerleri Çizelge 4.4'te gösterilmiştir. Ekstrelerin fenolik madde içeriği (μg GAE / mg ekstre) şekil 4.2'de gösterilmiştir. *R. canina* metanol ekstresinin fenolik madde miktarı $16,98 \pm 0,75 \mu\text{g}$ GAE/mg, su ekstresinin $34,96 \pm 3,91 \mu\text{g}$ GAE/mg olarak hesaplanmıştır. Daha fazla gallik asite denk olan fenolik madde içeriğinin su ekstresine ait olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.4. *R. canina* ekstrelerinin GAE değerine denk gelen toplam fenolik madde miktarı içeriği (mg GAE/g)

EKSTRELER µg GAE/mg	Metanol	Su
Toplam fenolik madde içeriği	16,98 ± 0,75	34,96 ± 3,91



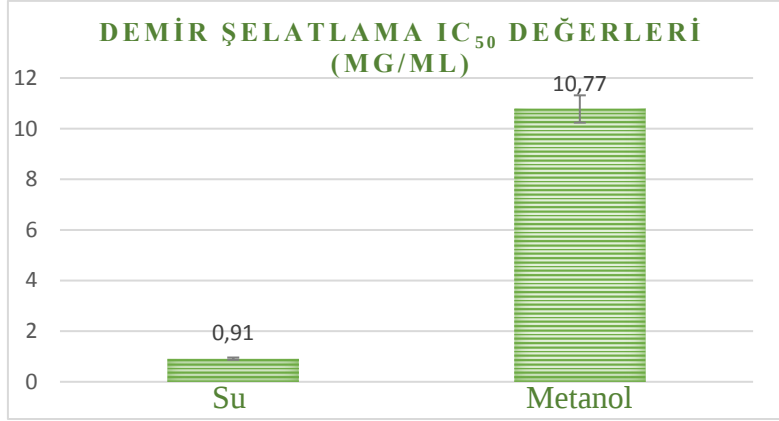
Şekil 4.2. *R. canina* bitki kök ekstrelerinin fenolik madde içeriği (µg GAE / mg ekstre)

4.2.3. Demir şelatlama aktivitesi

R. canina metanol ve su ekstrelerinin demir şelatlama aktivitelerinin IC₅₀ değerleri Çizelge 4.5'te grafik olarak ise Şekil 4.3'te gösterilmiştir. Sırasıyla metanol ekstresi 10,77 ± 0,24, su ekstresi 0,91 ± 0,11 olarak bulunmuştur. IC₅₀ değerlerine göre su ekstrelerinin demir şelatlama aktivitesinin metanol ekstresine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.5. *R. canina* ekstrelerinin demir şelatlama aktivitesi IC₅₀ değerleri (µg/mL)

EKSTRELER (µg/mL)	Metanol	Su
Demir şelatlama aktivitesi IC ₅₀ değeri	10,77 ± 0,24	0,91 ± 0,11



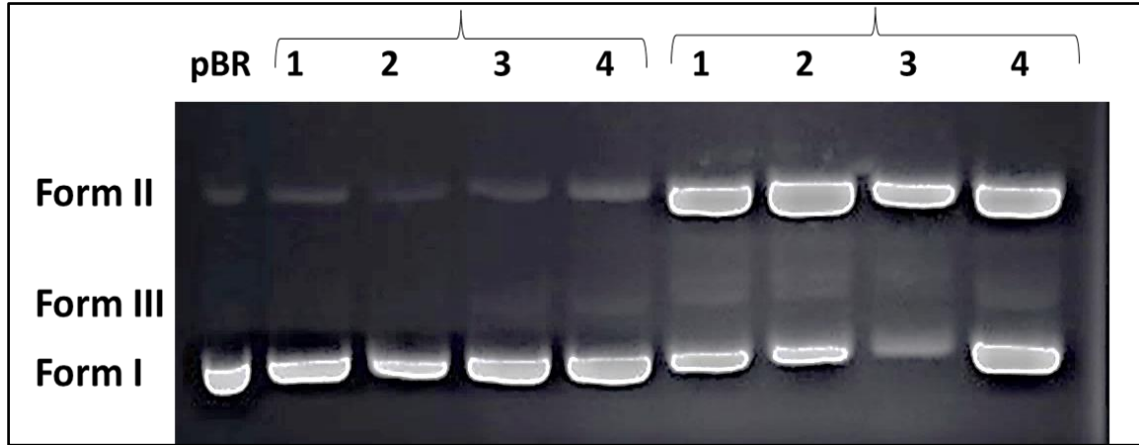
Şekil 4.3. *R. canina* ekstrelerinin demir şelatlama IC₅₀ değerleri

4.3. Ekstrelerin DNA Üzerinde Etkisi

4.3.1. Ekstrelerin DNA ile etkileşimi

Çalışmada kullanılan *R. canina* bitki kökünden elde edilen metanol ve su ekstrelerinin 1000, 500, 250 ve 125 µg/ml olmak üzere farklı konsantrasyonlarda plazmit DNA ile arasındaki etkileşimleri agaroz jel elektroforez aracılığıyla incelenmiştir.

Jel, Biometra UV-Jel görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir. Ekstrelerin DNA ile etkileşim çalışması sonucunda kaydedilen jel fotoğrafı Resim 4.1’de verilmiştir. Su ve metanol ekstresi ile muamele edilmemiş plazmit DNA kontrol grubu göstergesi olarak ilk kuyucuğa konulup “pBR” olarak belirtilmiştir. 1-4 arasındaki hatlar sırasıyla 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml arasında değişen konsantrasyonlarda su ekstresi ile muamele edilmiş pBR322 plazmit DNA içermektedir. 5-8 arasındaki hatlar ise sırasıyla 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml arasında değişen konsantrasyonlarda metanol ekstresi ile muamele edilmiş pBR322 plazmit DNA’sı içermektedir. Form I yapısı kapalı süpersarmal plazmiti, Form II açık halkasal plazmiti, Form III doğrusal plazmiti ifade etmektedir (Resim 4.1).



Resim 4.1. Bitki ekstralarının plazmit DNA ile etkileşimini gösteren agaroz jel görüntüsü

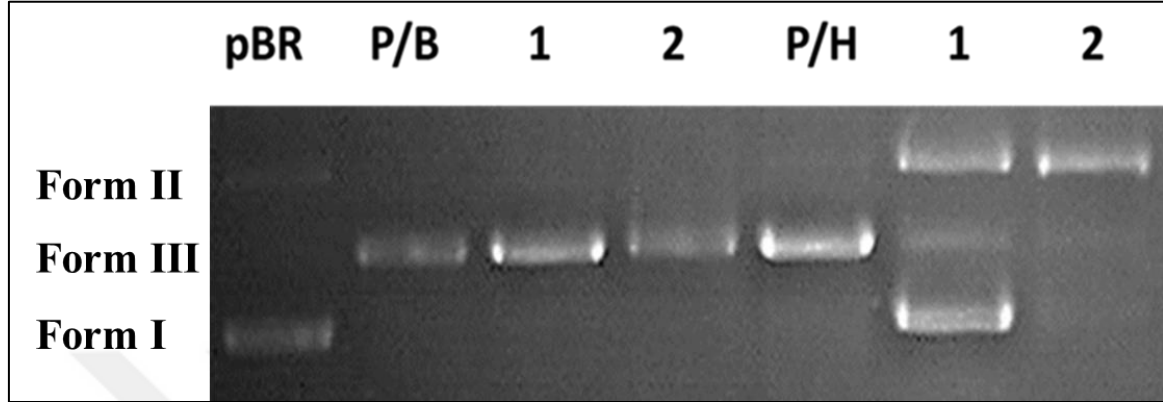
pBR; Kontrol plazmit DNA'sı, 1-4 numaralı hatlar, DNA ile etkileşime giren su ekstresinin yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyona doğru etkilerini göstermektedir (1000, 500, 250, 125 µg/ml'lik bitki ekstresi - plazmit DNA), 5-8 numaralı hatlar DNA ile etkileşime giren metanol, ekstresinin yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyona doğru etkilerini göstermektedir (1000, 500, 250, 125 µg/ml'lik bitki ekstresi - plazmit DNA)

Agaroz jel elektroforez sistemiyle, ekstraların süpersarmal plazmit DNA yapısında meydana getirdiği değişiklik belirlenmiştir. Jel görüntülemesi sonucunda ekstre ile muamele edilmemiş olan plazmit DNA jelde iki formda ortaya çıkar. Form I daha koyu renkli bant oluşturan kapalı halkasal (süpersarmal) yapı ve daha zayıf bant görüntüsü oluşturan açık halkasal Form II yapısıdır. Su ekstresinin DNA üzerinde belirgin bir etkisi gözlenmezken metanol ekstresi ile muamele edilmiş plazmitlerde form I, FormII 'e ilave olarak linear DNA'ya da rastlanmıştır. Sonuç olarak metanol ekstresinin DNA üzerinde çift zincir kırıklarına yol açtığı belirlenmiştir. Ayrıca ekstre DNA üzerinde konformasyonel değişikliğe neden olarak, Form I'in hareketliliğini azaltarak Form II miktarında artışa neden olmuştur.

4.3.2. Bitki ekstresinin DNA'ya bağlanma aktivitesi

Bitki kök ekstralarının DNA üzerindeki nükleotid gruplarından guanin-guanin (G/G) ve/veya adenin-adenin (A/A) bölgelerine bağlanma ilgisi restriksiyon endonükleaz enzim kesimi ile araştırılmıştır. Ekstrelerin DNA'daki nükleotidlere bağlanma durumlarını belirleyebilmek için 1000 µg/ml konsantrasyon ile etkileşime girmiş olan plazmit DNA'sı *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon endonükleazlar ile ayrı ayrı kesimleri yapılmıştır (Resim 4.2). *Bam*HI enzimi tanıma dizisi 5'-G/GATCC-3'; *Hind*III enzimininki ise 5'-A/AGCTT-3' dir. Ekstre le etkileşime girmiş ve kontrol plazmit DNA enzim kesim sonuçları Resim

4.2’de verilmiştir. Ekstre ile enzimin muamele edilmediği plazmit DNA “pBR” olarak, *Bam*HI enzimiyle kesilen plazmit DNA “P/B”, *Hind*III enzimiyle kesilen plazmit DNA “P/H” olarak ifade edilmiştir.



Resim 4.2. Ekstre -DNA karışımının enzim kesimi sonucunda jel elektroforez görüntüsü

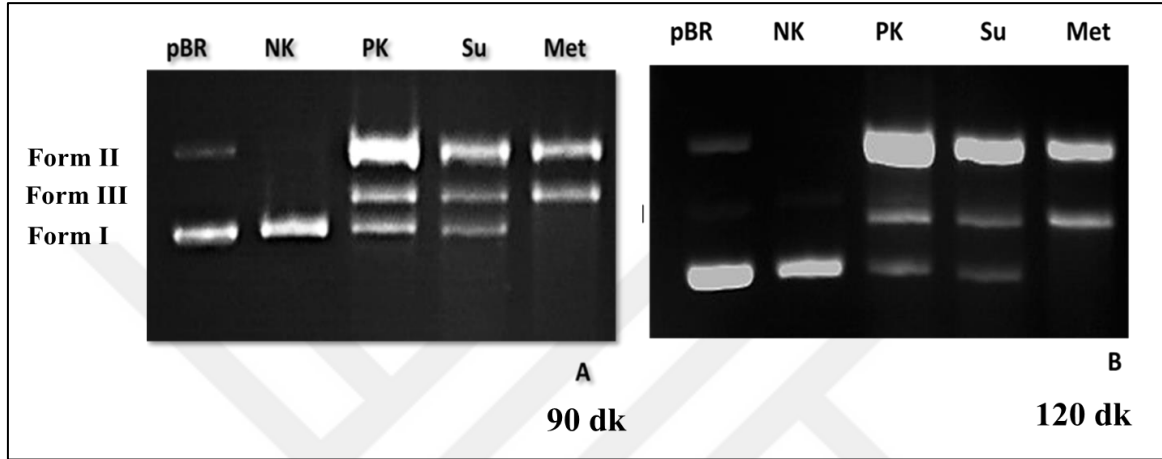
pBR: Ekstre ve enzim ile muamele edilmemiş plazmit DNA; P/B: plazmit DNA-*Bam*HI karışımı; P/H: plazmit DNA- *Hind*III karışımı (1) su ekstrelerinin 1000 µg/ml konsantrasyonda muamele edilmiş plazmit DNA enzim kesimi, (2) metanol ekstrelerinin 1000 µg/ml konsantrasyonda muamele edilmiş plazmit DNA enzim kesimi

Ekstre ile muamele edilmemiş plazmit DNA’nın *Bam*HI enzim kesimi sonucu Form III yapısının oluştuğu görülmüştür. Her iki ekstre ile muamele edilen plazmit DNA’nın *Bam*HI kesiminde doğrusal bant oluşması gözlenmiştir. Sonuç olarak ekstre *Bam*HI enzim kesimini inhibe edememiştir. Ekstre ile muamele edilmemiş plazmitin *Hind*III ve *Bam*HI enzim kesim sonucu doğrusal bant (Form I DNA) DNA elde edilirken su ekstre ile muamele edilmiş plazmit DNA’da her iki enzimde de Form I, Form II ve Form III DNA gözlenmiştir. Form III bandının da oluşması ekstreinin *Hind*III enzim kesim yerine ya da enzime bağlandığını göstermektedir. Kısmen enzim aktivitesi engellenmesi su ekstrelerinin G/G nükleotidinde bağlandığını gösterebilir.

4.3.3. DNA koruyucu etki

Bitki kök ekstralarının DNA üzerinde oluşan hasara karşı koruyucu etki oluşturabilme etkinliği araştırılmıştır. 2 mg/mL olacak şekilde hazırlanan DMSO içerisinde çözölen bitki ekstraları ile çalışılmıştır. 5 µL alınan bitki ekstralarından 350 µL su ilave edilerek son konsantrasyon 250 µg /mL olacak şekilde ayarlanmıştır. Hazırlanan fenton reaktifinden negatif kontrol hariç tüm örneklere 20 µL olacak şekilde dağıtım yapılmıştır. Negatif kontrole ise aynı miktarda steril su eklenmiştir. Ependorf tüplerine gerekli dağıtımlar

yapıldıktan sonra fenton reaktifi ilave edilerek DNA üzerinde hasar oluşturulmuştur. DNA üzerinde oluşturulan bu hasarın ilave edilen bitki kök ekstralarının DNA üzerinde bu hasarı koruma etkisine bakılmıştır. Yarım saat inkübasyon süresi tamamlandıktan sonra 70 V akımda elektroforez sisteminde 90 dk ve 120 dk olarak yürütme işlemi yapılmıştır. Yürütme işlemi sonrasında görüntüleme sisteminde elde edilen görüntü Resim 4.3'te verilmiştir.



Resim 4.3. DNA-fenton karışımının ekstralar ile etkileşim görüntüsü

pBR; Ekstre ve fenton karışımı ile muamele edilmemiş plazmit DNA, NK;(negatif kontrol) plazmit DNA üzerine 20 μ L eklenmiş distile su, PK; (pozitif kontrol) plazmit DNA üzerine 20 μ L eklenmiş fenton karışımı, Su; plazmit DNA fenton karışımı üzerine eklenen 5 μ L su ekstresi, Met; plazmit DNA fenton karışımı üzerine eklenen 5 μ L metanol ekstresi içeriğinin yarım saat inkübasyon sonrası oluşan 90 dk (A) 120 dk (B) bant görüntüleri

Pozitif kontrolün negatif kontrole göre Form III olan doğrusal plazmit yapısının oluştuğu gözlemlenmiştir. Fenton reaktifinin DNA üzerinde hasar oluşturduğu ve reaktifin Form I olan süper halkasal plazmit yapısı ile Form II olan açık halkasal plazmit yapısında kırıklara neden olduğu bunun sonucunda Form III yapısının oluştuğu gözlemlenmiştir. Su ekstresi ile muamele edilmiş fenton reaktifinde Form I olan süper halkasal yoğunluğunun azaldığını diğer Form II ve Form III bant yapılarının pozitif kontrole göre paralel olduğu görülmüştür. Su ekstresinin DNA üzerinde kısmi koruma etkisine sahip olduğu bulunmuştur. Metanol ekstresinin fenton reaktifi ile etkileşimi sonucunda Form II yapısı olan açık halkasal plazmit yapısının ortadan kalktığı ve DNA üzerinde herhangi bir koruyucu etkisi olmadığı bulunmuştur.

4.4. Ekstrelerin Deney Hayvanları Üzerinde Etkisi

4.4.1. Diyabetik bulgular

Çalışma doğrultusunda ağırlıkları yaklaşık 250-300 g olan STZ ile diyabet oluşturulan 42 adet Wistar albino erkek ratlardan kan örneği alınmıştır. STZ ile diyabet indüklenmesi yapıldıktan 72 saat sonra, tüm gruplardaki ratların ağırlıkları ve açlık kan şekeri değeri ölçülmüştür. STZ verilmeden önce deney gruplarının ölçülen kan şekeri değer aralığı 90-110 mg/dL olarak belirlenmiştir. Uygulama sonrası açlık kan şekeri değeri 200 mg/dl'nin üzerinde olduğu belirlenen ratlar diyabetik olarak kabul edilmiştir. Diyabet modeli oluşturulan hayvan gruplarında iki farklı ekstre için düşük doz (250 mg/kg/gün) ve yüksek doz (500 mg/kg/gün) olacak şekilde ekstre uygulaması başlanmıştır. Ekstre uygulaması hayvan ağırlıklarına göre 14 gün boyunca devam edilmiştir. Uygulama sonrası Wistar albino erkek ratlardan kan örnekleri toplanmıştır. Grupların STZ verilmeden önce, verildikten sonra ve 14 gün ekstre uygulaması yapıldıktan sonra ortalama ve standart sapma değerleri Çizelge 4.6'da verilmiştir.

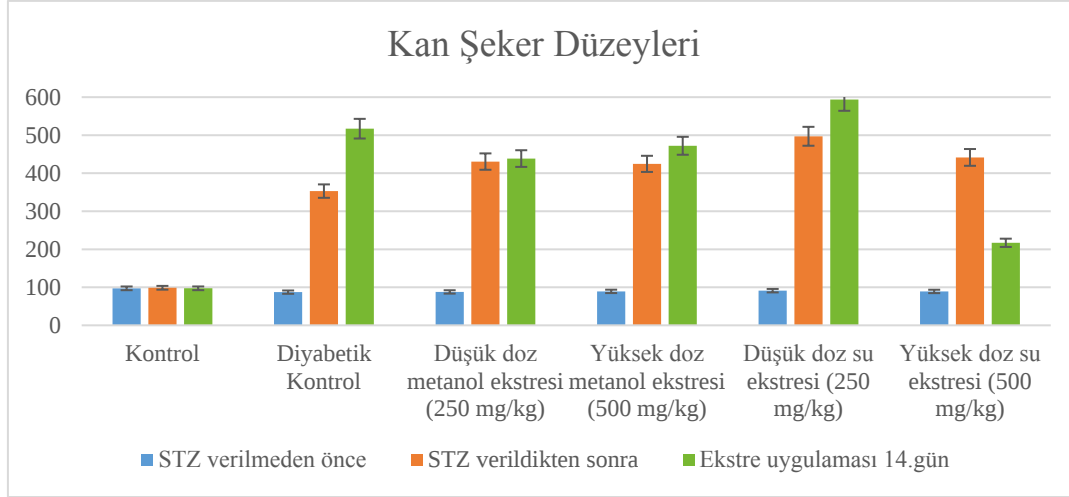
Çizelge 4.6. Gruplar arası kan şekeri değerlerinin (mg/dl) karşılaştırılması

Gruplar	İlk gün (mg/dl)	STZ uygulamasından 5 gün sonra (mg/dl)	Ekstre uygulamasının 14.günü (mg/dl)
Kontrol	97,28 ± 4,95	98,75 ± 4,25	97,35 ± 4,85
Diyabetik Kontrol	87,28 ± 7,06	353 ± 53,43	517,14 ± 76,81
Metanol ekstresi-Düşük doz (250 mg/kg)	87,85 ± 7,40	430,57 ± 85,92	438,57 ± 156,48
Metanol ekstresi -Yüksek doz (500 mg/kg)	89,28 ± 12,56	424,57 ± 136,30	472,14 ± 163,09
Su ekstresi -Düşük doz (250 mg/kg)	91,14 ± 7,35	497,14 ± 82,27	593,85 ± 12,41
Su ekstresi -Yüksek doz (500 mg/kg)	89,14 ± 8,47	441,57 ± 103,12	217 ± 53,28

Çizelgeye göre veriler incelendiğinde kontrol grubunun ilk gün ölçüm sonucu kan şekeri düzeyi ortalamasının 97,28 ± 4,95 mg/dl olduğu intraperitoneal su uygulamasından sonra ölçüm düzeyinin 98,75 ± 4,25 mg/dl olduğu diğer gruplarla 14 gün bekleme süresi sonrasında kan şekeri düzeyinin 97,35 ± 4,85 mg/dl olduğu belirlenmiştir. Diyabetik kontrol grubunun ilk gün ölçüm sonucu kan şekeri düzeyi ortalamasının 87,28 ± 7,06 mg/dl olduğu STZ uygulaması sonrası kan şekeri ölçüm düzeyinin 353 ± 53,43 mg/dl 14 gün sonunda 517,14 ± 76,81 (mg/dl) olduğu belirlenmiştir. Düşük doz metanol ekstre uygulanan grubun

ilk gün ölçülen kan şeker düzeyinin $87,85 \pm 7,40$ mg/dl olduğu STZ sonrası yapılan ölçüm sonucunun $430,57 \pm 85,92$ mg/dl olduğu 14 gün uygulanan düşük doz metanol ekstresi sonrası kan şeker düzeyinin $438,57 \pm 156,48$ (mg/dl) olduğu belirlenmiştir. Yüksek doz metanol ekstre uygulanan grubun ilk gün ölçülen kan şeker düzeyinin $89,28 \pm 12,56$ mg/dl olduğu STZ sonrası yapılan ölçüm sonucunun $424,57 \pm 136,30$ mg/dl olduğu 14 gün uygulanan yüksek doz metanol ekstresi sonrası kan şeker düzeyinin $472,14 \pm 163,09$ mg/dl olduğu belirlenmiştir. Düşük doz su ekstresi uygulanan grubun ilk gün ölçülen kan şeker düzeyinin $91,14 \pm 7,35$ mg/dl olduğu STZ sonrası yapılan ölçüm sonucunun $497,14 \pm 82,27$ mg/dl olduğu 14 gün uygulanan düşük doz su ekstresi sonrası kan şeker düzeyinin $593,85 \pm 12,41$ mg/dl olduğu bulunmuştur. Yüksek doz metanol ekstre uygulanan grubun ilk gün ölçülen kan şeker düzeyinin $89,14 \pm 8,47$ mg/dl olduğu STZ sonrası yapılan ölçüm sonucunun $441,57 \pm 103,12$ mg/dl olduğu 14 gün uygulanan düşük doz metanol ekstresi sonrası kan şeker düzeyinin $217 \pm 53,28$ mg/dl olduğu belirlenmiştir.

Diyabetik kontrol grubuna uygulama yapılmamasından dolayı kan şeker düzeyinin yükseldiği, metanol ekstre gruplarında STZ uygulamasından sonra ekstre verilmesi sonucunda kan şekerini azaltıcı yönde etki etmediği görülmüştür. Su ekstresinin düşük dozunda STZ sonrası uygulanan ekstrenin kan şeker değerlerine göre etki göstermediği buna bağlı olarak kan glikoz seviyesinde artış olduğunu, su ekstresinin yüksek dozunun ise STZ sonrasında yapılan ekstre uygulaması sonunda ölçülen kan şeker düzeyinde düşüş olduğu belirlenmiştir. Bu çizelgeye göre su ekstresinin yüksek dozunun ilk gün ile STZ verildikten sonra değerlere bakılarak STZ sonrası kan şekeri üzerinde düşürücü etkisi olabileceği belirlenmiştir. Bulunan değerlerin gruplar arasında STZ verilmeden önce, STZ verildikten sonra ve 14 gün ekstre uygulaması yapıldıktan sonra ortalama ve standart sapma değerlerine göre grafikleri gösterilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Grupların STZ ve ekstre uygulamalarına göre değerlendirilmesi (mg/dl)

Yüksek doz su ekstresi uygulanan ratlardan elde edilen örneklerde kontrol grubuna en yakın kan şeker değerleri ölçülmüştür. Sonuçlara göre hesaplanan ve grafikleri verilen örneklerin gruplar arasında Kruskal Wallis testi ile istatistiksel analizleri yapılmıştır. Bu test sonucu ile grupların verilen ekstre örneklerinin dozlarına göre anlamlı olma durumu belirlenmiştir. İstatistiksel değerlendirme için yanılma düzeyi 0,05 olarak seçilmiştir. Bulunan değer $p < 0,001$ ile $p < 0,01$ arasında yüksek anlamlı $p < 0,01$ ile $p < 0,05$ değer aralığında ise anlamlı olduğu kabul edilmektedir. $p < 0,05$ değerinden yüksek ise anlamlı olarak kabul edilmez. $p < 0,05$ değeri için parametreler arası ifade düzeyleri istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edilmiştir.

İstatistiksel analiz sonucunda gruplar arasında p değeri 0.001 olarak bulunmuştur. Bu nedenle kan şeker düzey farklarının gruplar arasında yüksek anlamlı olduğu kabul edilmiştir. İkili gruplar arasında anlamlı farklılık düzeylerinin değerlendirilebilmesi için Mann-Whitney U testi yapılmıştır. Elde edilen grafiklerle değerlendirilen sonuçların karşılaştırılmıştır. İstatistiksel değerlendirme için yanılma düzeyi 0,05 olarak seçilmiştir. $p < 0,05$ değeri için parametreler arası ifade düzeyleri istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Grupların kan şeker düzeylerinin ikili gruplar şeklinde kıyaslanması sonucunda: Kontrol grubunun diyabetik gruba göre yapılan istatistiksel analizinde p değerinin 0,002 bulunması iki grup arasında kan şeker düzey farkının anlamlı olduğunu göstermiştir.

Kontrol grubunun düşük metanol ekstresi grubuna göre yapılan istatistiksel analizinde p değerinin 0,002 bulunması kan şekeri düzey farkının anlamlı olduğunu göstermiştir.

Kontrol grubunun yüksek doz metanol ekstresi grubuna göre yapılan istatistiksel analizinde p değerinin 0,002 bulunması iki grup arasında kan şekeri düzey farkının anlamlı olduğunu göstermiştir.

Kontrol grubunun düşük su ekstresi grubuna göre yapılan istatistiksel analizinde p değerinin 0,001 bulunması iki grup arasında kan şekeri düzey farkının anlamlı olduğunu göstermiştir.

Kontrol grubunun yüksek su ekstresi grubuna göre yapılan istatistiksel analizinde p değerinin 0,002 bulunması iki grup arasında kan şekeri düzey farkının anlamlı olduğunu göstermiştir.

Diyabetik kontrol grubunun düşük metanol ekstresi grubuna göre yapılan istatistiksel analizinde p değerinin 0,522 bulunması iki grup arasında kan şekeri düzey farkının anlamlı olmadığını göstermiştir.

Diyabetik kontrol grubunun yüksek metanol ekstresi grubuna göre yapılan istatistiksel analizinde p değerinin 0,798 bulunması iki grup arasındaki kan şekeri düzey farkının anlamlı olduğunu göstermiştir.

Diyabetik kontrol grubunun düşük su ekstresi grubuna göre yapılan istatistiksel analizinde p değerinin 0,033 olması iki grup arasında kan şekeri düzey farkının anlamlı olduğunu göstermiştir.

Diyabetik kontrol grubunun yüksek su ekstresi grubuna göre yapılan istatistiksel analizinde p değerinin 0,002 olması iki grup arasında kan şekeri düzey farkının anlamlı olduğunu göstermiştir.

Metanol ekstrelerinin düşük ve yüksek doz gruplarının yapılan istatistiksel analizinde p değerinin 0,443 olması iki grup arasında kan şekeri düzey farkının anlamlı olduğunu göstermiştir.

Su ekstralarının düşük ve yüksek doz gruplarına göre istatistiksel analizinde p değerin 0,001 olması iki grup arasında kan şeker düzey farkının anlamlı olduğunu göstermiştir.

Düşük metanol ekstresi ile yüksek su ekstresi gruplarının istatistiksel analizinde p değerin 0,018 olması iki grup arasında kan şeker düzey farkının anlamlı olduğunu göstermiştir.

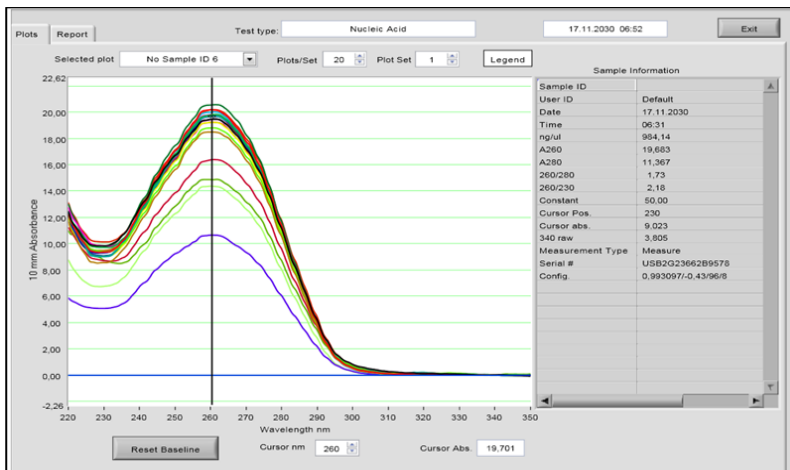
Düşük su ekstresi ile yüksek metanol ekstresi gruplarının istatistiksel analizinde p değerin 0,012 olması iki grup arasında kan şeker düzey farkının anlamlı olduğunu göstermiştir.

Yüksek metanol ekstresi ile yüksek su ekstresi gruplarının yapılan istatistiksel analizinde p değerin 0,018 olması iki grup arasında kan şeker düzey farkının anlamlı olduğunu göstermiştir.

Düşük doz su ekstresi ile düşük doz metanol ekstresi gruplarının yapılan istatistiksel analizinde p değerin 0,012 olması iki grup arasında kan şeker düzey farkının anlamlı olduğunu göstermiştir.

4.4.2. Real Time PCR ile *TNF- α* ve *IL-1 β* genlerinin ifadesinin belirlenmesi

Çalışma sonunda kontrol grupları ve STZ ile diyabet indüklenmiş ekstre uygulaması yapılan ratlardan toplanan kan örneklerinden RNA izolasyonu yapılmıştır. mRNA'lerden revers transkriptaz enzimi ile c-DNA sentezi yapılmıştır. cDNA saflık ve miktar değerleri Çizelge 4.7 ve Şekil 4.5'de verilmiştir.



Şekil 4.5. cDNA miktarları ve saflık değerleri grafiği

Çizelge 4.7. cDNA örnekleri ve miktar-safılık değerleri

Hayvan No.	260/280	260/230	cDNA Kon. (ng/ul)	Hayvan No.	260/280	260/230	cDNA Kon. (ng/ul)
K/1	1,74	1,98	972,5	D/1	1,80	2,16	2958,2
K/2	1,77	2,16	1008,5	D/2	1,80	2,16	2215,5
K/3	1,76	2,04	988,7	D/3	1,80	2,16	2172,6
K/4	1,75	2,16	924,0	D/4	1,80	2,15	2172,6
K/5	1,75	2,00	939,3	D/5	1,79	2,17	2774,9
K/6	1,73	2,18	984,1	D/6	1,80	2,18	2464,4
K/7	1,75	2,12	984,1	D/7	1,79	2,18	2243,4
A/1	1,78	2,03	1584,6	E/1	1,76	2,02	989,9
A/2	1,78	2,13	1835,7	E/2	1,71	1,88	818,3
A/3	1,80	2,18	2029,9	E/3	1,76	2,11	1027,1
A/4	1,78	2,17	2056,2	E/4	1,76	2,13	960,4
A/5	1,79	2,17	2048,5	E/5	1,71	1,70	743,2
A/6	1,77	2,11	2402,6	E/6	1,72	1,99	1008,3
A/7	1,79	2,17	2029,4	E/7	1,79	2,08	986,9
B/1	1,80	2,18	2027,9	F/1	1,79	2,13	999,2
B/2	1,79	2,18	2117,3	F/2	1,76	2,10	532,2
B/3	1,59	1,82	2619,4	F/3	1,79	2,13	718,3
B/4	1,77	2,12	1715,0	F/4	1,76	2,06	961,4
B/5	1,75	2,09	2112,6	F/5	1,76	2,14	973,2
B/6	1,79	2,15	2054,5	F/6	1,73	2,07	971,7
B/7	1,75	2,07	2170,3	F/7	1,77	2,15	727,0

Örneklerin diyabet ile ilgili olan *IL-1 β* , *TNF- α* gen ifadelerine etkisi LightCycler®480 Real-Time PCR cihazı ile RT-qPCR yöntemi iki tekrarlı olarak yapılarak istatistiksel olarak analiz edilmiştir [232].

IL-1 β , *TNF α* gen ifadesini standardize etmek için diyabet ve kontrol gruplarına ait 42 örnek, β -aktin housekeeping geni kullanılarak değerlendirilmiştir. Referans gene göre *IL-1 β* , *TNF- α* gen ekspresyon düzeyi gruplara göre göreceli olarak ΔC_t değeri ve buna bağlı $2^{-\Delta\Delta C_t}$ hesaplanmıştır [233].

TNF- α geninin referans genine göre yapılan hesaplamalar Çizelge 4.8’de *IL-1 β* geninin referans genine göre yapılan hesaplamalar ise Çizelge 4.9’da verilmiştir.

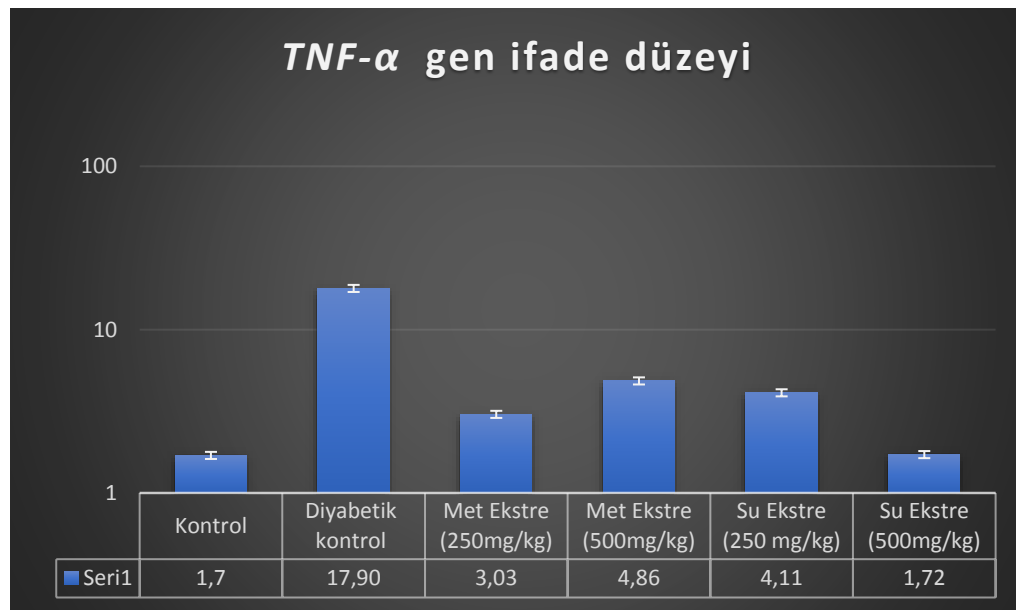
Çizelge 4.8. *TNF- α* geninin β aktin referans genine göre ifade seviyesi analizi

Örnek	<i>TNF-α</i> ortalama Ct değeri (hedef) /Ort.	β -aktin ortalama Ct değeri (referans)/Ort.	Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	2 ^{-$\Delta\Delta$Ct} örnek
K1	35,44	31,56	3,88	-3,24	0,16
K2	34,45	31,21	3,24	-3,88	1,28
K3	38,71	31,88	6,83	-0,29	1,22
K4	37,75	30,31	9,87	2,74	0,14
K5	38,62	29,68	8,94	1,81	0,28
K6	36,35	32,77	8,29	1,16	0,44
K7	39,88	31,06	8,82	1,69	0,30
A1	39,36	33,70	5,66	-3,54	11,66
A2	36,68	29,31	7,37	-1,83	3,56
A3	39,31	35,40	3,91	-5,29	39,24
A4	37,22	33,61	3,61	-5,59	48,31
A5	39,62	32,61	7,01	-2,19	4,57
A6	35,51	32,97	2,54	-6,66	5,42
A7	37,15	24,24	12,91	3,70	0,07
B1	39,41	31,06	8,35	-0,85	1,80
B2	39,12	33,15	5,97	-3,23	9,41
B3	37,26	27,92	9,34	0,13	0,91
B4	39,27	31,82	7,45	-1,75	3,37
B5	34,27	26,90	7,37	-1,83	3,56
B6	38,05	29,94	8,11	-1,09	2,13
B7	35,27	20,86	14,41	5,20	0,02
D1	37,93	34,47	3,46	-5,74	53,60
D2	40,11	31,16	8,95	-0,25	1,19
D3	36,88	31,86	5,02	-4,18	18,18
D4	35	22,29	12,71	3,50	0,08
D5	39,33	34,19	5,14	11,60	0,32
D6	38,45	35,01	3,44	-44,21	54,35
D7	37,46	31,39	6,07	14,40	8,78
E1	35,74	31,83	3,91	-5,29	39,24
E2	32,85	23,42	9,43	0,22	0,85
E3	36,37	31,11	5,26	-3,94	15,39
E4	39,83	31,16	8,67	-0,53	1,44
E5	38,50	35,97	2,53	-45,17	22,25
E6	39,54	31,73	7,81	-1,39	2,62
E7	39,25	32,57	11,14	1,93	0,26
F1	38,77	28,98	9,79	0,58	0,66
F2	39,71	29,98	9,73	0,52	0,69
F3	39,33	27,33	12	2,79	0,14
F4	37,71	28,70	9,01	-0,19	1,14
F5	38,54	27,86	10,68	1,47	0,35
F6	32,91	30,01	2,9	-6,30	79,02
F7	37,94	31,61	6,33	-2,87	7,33

Çizelge 4.9. *IL-1 β* geninin β aktin referans genine göre ifade seviyesi analizi

Örnek	<i>IL-1β</i> ortalama Ct değeri (hedef)/Ort.	β -actin ortalama Ct değeri (referans)/Ort.	Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	2 ^{Δ} - örnek
K1	37,25	31,56	5,69	-0,31	1,24
K2	36,93	31,21	5,72	-0,28	1,22
K3	37,54	31,88	5,66	-0,34	1,27
K4	35,94	30,31	5,63	-0,37	1,30
K5	37,76	29,68	8,08	2,07	0,23
K6	37,79	32,77	5,02	-0,98	1,98
K7	37,32	31,06	6,26	0,25	0,84
A1	37,10	33,70	3,40	-2,60	6,09
A2	36,31	29,31	7,00	0,99	0,50
A3	38,07	32,50	5,57	-0,43	1,35
A4	39,34	33,61	5,73	-0,27	1,21
A5	36,81	31,95	4,86	-1,14	2,21
A6	36,74	32,97	3,77	-2,23	4,71
A7	34,31	24,24	10,07	4,06	0,05
B1	37,51	31,06	6,45	0,44	0,73
B2	38,70	33,15	7,55	1,54	0,34
B3	37,62	27,92	9,7	3,69	0,07
B4	38,79	30,21	8,58	2,57	0,16
B5	33,16	26,90	6,26	0,25	0,84
B6	39,09	29,94	9,15	3,14	0,11
B7	29,88	20,86	9,02	3,01	0,12
D1	39,60	34,47	5,13	-0,87	1,83
D2	39,70	31,16	9,74	3,73	0,07
D3	39,58	31,86	7,72	1,71	0,30
D4	30,58	22,29	8,29	2,28	0,20
D5	38,67	34,19	4,48	-1,52	2,88
D6	39,25	35,01	4,24	-1,76	3,40
D7	36,74	31,39	5,35	-0,65	1,57
E1	38,54	31,83	6,71	0,70	0,61
E2	26,59	23,42	3,17	-2,83	7,15
E3	38,84	31,11	7,73	1,72	0,30
E4	38,10	31,16	6,94	0,93	0,52
E5	38,58	35,97	2,61	-3,39	10,54
E6	32,21	31,73	4,48	-1,52	2,88
E7	33,04	32,57	3,93	-2,07	4,22
F1	33,26	28,98	4,28	-1,72	3,31
F2	34,73	29,98	4,75	-1,25	2,39
F3	35,32	27,33	7,99	1,98	0,25
F4	36,52	28,70	7,82	1,81	0,28
F5	35,14	27,86	7,28	1,27	0,41
F6	31,04	30,01	1,03	-4,97	31,52
F7	33,25	31,61	1,64	-4,36	20,65

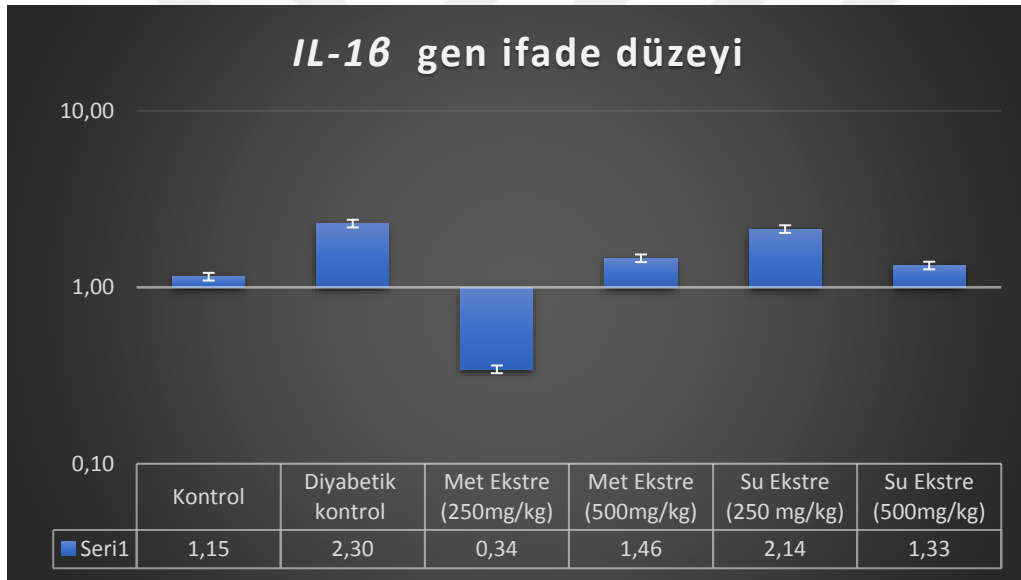
Hesaplamalar yapılırken referans gen olan β -aktin ile $IL-1\beta$, $TNF-\alpha$ genlerinin yapılan iki tekrar sonucunda alınan Ct değerlerinin ortalaması değerlendirilmiştir. Referans genin ortalama Ct değeri ile hedef genlerin ortalama Ct değerleri hesaplanmıştır. İlgili genin ortalama Ct değeri ile hedef genin ortalama Ct değer farkı hesaplanarak ΔCt değeri bulunmuştur. Her örnek için ΔCt değerinden kontrol ortalama değeri çıkarılarak $\Delta\Delta Ct$ değeri bulunmuştur. Son aşama olarak her bir grup için ortalama $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri hesaplanarak gruplara göre gen ifade düzeyindeki artış ya da azalış değerlendirilmiştir. Sonuçlar grafikler üzerinde Şekil 4.6 ve Şekil 4.7’de gösterilmiştir.



Şekil 4.6. Gruplar arasında $TNF-\alpha$ gen ifade düzeyi

Grupların karşılaştırılabilmesi adına ilgili gene ait her bir örnek için hesaplanan $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin gruplara göre ortalamaları hesaplanarak grafik oluşturulmuştur. Kontrol grubu için ortalama $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri 1,70 olarak bulunmuştur. Diyabetik kontrol grubu için ortalama $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri 17,90 olarak bulunmuştur. Metanol ekstresi düşük doz şeklinde ifade edilen grup için ortalama $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri 3,03 olarak tespit edilmiştir. Metanol ekstresi yüksek doz olarak ifade edilen grup için ortalama $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri 4,86 olarak belirlenmiştir. Su ekstresinin düşük dozu olarak ifade edilen grup için ortalama $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerinin 4,11 olduğu bulunmuştur. Son grup olan yüksek su ekstresi dozu grubu ortalama $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri 1,72 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.6).

Sonuçlara göre *TNF- α* geni diyabetik kontrol grubunda daha yüksek ifade edilmiştir. Diyabet oluşturulan ve ekstre verilen ekstre gruplarının değerlendirilmesi kontrol grupları baz alınarak yapılmıştır. Metanol ekstresi gruplarından düşük doz (250 mg/kg) verilen grubun yüksek doz (500 mg/kg) verilen gruba göre diyabet ile ilişkilendirilen *TNF- α* gen ifadesinin azaldığı belirlenmiştir. Su ekstresi verilen gruplardan yüksek doz (500 mg/kg) verilen grubun su ekstresi düşük doz (250 mg/kg) verilen gruba göre *TNF- α* gen ifadesinin oldukça azaldığı belirlenmiştir. Ekstre verilen grupların hepsinin diyabetik kontrole göre gen ifadesinin azaldığı belirlenmiştir. Diyabetik kontrol grubunun gen ifadesine en yakın grupların yüksek metanol ekstresi ve düşük su ekstresi gruplarının olduğu görülmüştür. Yüksek doz su ekstre grubunun diğer ekstre verilen gruplara oranla gen ifadesinin kontrol grubuna yakın bir şekilde azaldığı görülmüştür.



Şekil 4.7. Gruplar arasında *IL-1 β* gen ifade düzeyi

Grupların kıyaslanabilmesi adına ilgili gene ait her bir örnek için hesaplanan $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin gruplara göre ortalamaları hesaplanarak grafik oluşturulmuştur. Kontrol grubu için ortalama $2^{-\Delta\Delta CT}$ değeri 1,15 olarak bulunmuştur. Diyabetik kontrol grubu için ortalama $2^{-\Delta\Delta CT}$ değeri 2,30 olarak bulunmuştur. Metanol ekstresi düşük doz şeklinde ifade edilen grup için ortalama $2^{-\Delta\Delta CT}$ değeri 0,34 olarak tespit edilmiştir. Metanol ekstresi yüksek doz olarak ifade edilen grup için ortalama $2^{-\Delta\Delta CT}$ değeri 1,46 olarak belirlenmiştir. Su ekstresinin düşük dozu olarak ifade edilen grup için ortalama $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerinin 2,14 olduğu bulunmuştur. Son grup olan su ekstresinin yüksek dozu şeklinde ifade edilen grubun ortalama $2^{-\Delta\Delta CT}$ değeri 1,33 olarak bulunmuştur. İlgili sonuçlar grafik üzerinde değerlendirilmiştir (Şekil 4.7).

Sonuçlara göre *IL-1 β* geninin kontrol grubuna göre diyabetik kontrol grubunun ifadesi daha yüksek bulunmuştur. Diyabet oluşturulan ve ekstre verilen gruplarının değerlendirilmesi kontrol grupları baz alınarak yapılmıştır. Metanol ekstre gruplarından düşük doz (250 mg/kg) verilen grubun kontrol gruplarına göre gen ifadesinin azaldığı belirlenmiştir. Yüksek doz (500 mg/kg) metanol grubunun diyabetik kontrole oranla gen ifadesinin azaldığı belirlenmiştir. Yüksek doz (500 mg/kg) su ekstresinin düşük doz (250 mg/kg) ekstreya oranla kontrol grubu gen ifadesine yakın olduğu belirlenmiştir. Diyabetik kontrole en yakın grubun düşük doz su ekstresi olduğu görülmüştür. Diğer grupların diyabetik kontrole göre gen ifadesinin azaldığı görülmüştür. Ekstre verilen gruplar arasında sağlıklı kontrol grubu gen ifade düzeyine en yakın olan grubun yüksek doz su ekstresi grubu olduğu belirlenmiştir.

$2^{-\Delta\Delta CT}$ değeri hesaplanan ve grafikleri verilen örneklerin gruplar arasında Kruskal Wallis testi ile istatistiksel analizleri yapılmıştır. Bu test sonucu ile grupların verilen ekstre örneklerinin dozlarına göre anlamlı olma durumuna bakılmıştır. Bulunan değer $p < 0,001$ ile $p < 0,01$ arasında yüksek anlamlı $p < 0,01$ ile $p < 0,05$ değer aralığında ise anlamlı olduğu kabul edilmektedir. $p < 0,05$ değerinden yüksek ise anlamlı olarak kabul edilmez. İstatistiksel değerlendirme için yanılma düzeyi 0,05 olarak seçilmiştir. $p < 0,05$ değeri için parametreler arası ifade düzeyleri istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edilmiştir.

TNF- α gen ifadesi için kontrol grubun diğer gruplarla kıyaslanması Kruskal Wallis testi ile elde edilen sonuçlara göre p değerinin 0,041 çıkması ile gruplar arasında gen ifade düzeyinin anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$ değerine göre gruplar arası değerlendirme ile çıkan 0,041 değeri anlamlı olarak kabul edilmiştir). Grupların ortalama $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerine baz alınarak kontrol grubuna göre diyabetik kontrol grubunda gen ifade düzeyi 16,2 kat, metanol ekstresi düşük doz grubunda 1,33 kat, metanol ekstresi yüksek doz grubunda 3,16 kat, su ekstresi düşük doz grubunda 2,41 kat artış gözlenirken su ekstresi grubunda gen ifadesi düzeyinde kat artışı gözlenmemiştir.

IL-1 β gen ifadesi için kontrol grubunun diğer gruplarla kıyaslanması Kruskal Wallis testi ile elde edilen sonuçlara göre p değerinin 0,049 çıkması ile gruplar arasında gen ifade düzeyinin anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$ değerine göre gruplar arası değerlendirme ile çıkan 0,049 değeri anlamlı olarak kabul edilmiştir).

Grupların ortalama $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri baz alınarak kontrol grubuna göre diyabetik kontrol grubunda gen ifade düzeyi 1,15 kat, metanol ekstresi yüksek doz grubunda 0,31 kat, su ekstresi düşük doz grubunda 0,99 kat su ekstresi yüksek doz grubunda gen ifadesi düzeyinde 0,18 kat artışı gözlenirken metanol ekstresi düşük doz grubunda 0,81 kat gen ifadesinin düşüşü gözlenmiştir.

İkili gruplar arasında anlamlı farklılık düzeylerinin değerlendirilebilmesi için Mann-Whitney U testi yapılarak yorumlanmıştır. Alınan sonuçların elde edilen grafiklerle değerlendirilen sonuçların karşılaştırılması yapılmıştır. İstatistiksel değerlendirme için yanılma düzeyi 0,05 olarak seçilmiştir. $p < 0,05$ değeri için parametreler arası ifade düzeyleri istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edilmiştir.

TNF- α gen ifadesi için ikili grup değerlendirmeleri sonucunda; Kontrol grubunun diyabetik gruba göre yapılan istatistiksel analizinde p değeri 0,025 bulunmuştur. Bu nedenle iki grup arasında gen ifade düzey farkı anlamlı olarak kabul edilmiştir. Grupların $2^{-\Delta\Delta CT}$ değer ortalamalarına göre diyabetik kontrolün gen ifadesinde 16,2 kat artış görülmüştür.

Kontrol grubu ve düşük metanol ekstresi ile muamele edilmiş grup için p değeri 0,045 bulunmuştur. Bu nedenle iki grup arasında gen ifade düzey farkı anlamlı olarak kabul edilmiştir. Kontrol grubunun $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerine göre düşük metanol ekstresi grubunun gen ifadesinde 1,33 kat artış görülmüştür.

Kontrol grubunun yüksek metanol ekstresi grubuna göre yapılan istatistiksel analizinde p değeri 0,338 bulunmuştur. Bu nedenle iki grup arasındaki gen ifade düzeyinin anlamlı olmadığı kabul edilmiştir.

Kontrol grubunun düşük su ekstresi grubuna göre yapılan istatistiksel analizinde p değeri 0,034 bulunmuştur. Bu nedenle iki grup arasındaki gen ifade düzeyi farkı anlamlı olarak kabul edilmiştir. Kontrol grubunun $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerine göre düşük su ekstresi grubunun gen ifadesinde 2,41 kat artış görülmüştür.

Kontrol grubunun yüksek su ekstresi grubuna göre yapılan istatistiksel analizinde p değeri 0,049 bulunmuştur. Bu nedenle iki grup arasındaki gen ifade düzeyi farkı anlamlı olarak kabul edilmiştir. Gruplar arasında kat artışı gözlenmemiştir.

Diyabetik kontrol grubunun düşük doz metanol ekstresi grubuna göre yapılan istatistiksel analizinde p değeri 0,012 bulunmuştur. Bu nedenle iki grup arasındaki gen ifade düzeyi farkı anlamlı olarak kabul edilmiştir. Diyabetik kontrolün $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerine göre düşük metanol ekstresi grubunun gen ifadesinde 14,87 kat artış görülmüştür.

Diyabetik kontrol grubunun yüksek metanol ekstresi grubuna göre yapılan istatistiksel analizinde p değeri 0,170 bulunmuştur. Bu nedenle iki grup arasındaki gen ifade düzey farkının anlamlı olmadığı kabul edilmiştir.

Diyabetik kontrol grubunun düşük su ekstresi grubuna göre yapılan istatistiksel analizinde p değeri 0,201 bulunmuştur. Bu nedenle iki grup arasındaki gen ifade düzey farkının anlamlı olmadığı kabul edilmiştir.

Diyabetik kontrol grubunun yüksek su ekstresi grubuna göre yapılan istatistiksel analizinde p değeri 0,009 bulunmuştur. Bu nedenle iki grup arasında gen ifade düzeyi farkının anlamlı olduğu kabul edilmiştir. $2^{-\Delta\Delta CT}$ değer ortalamalarına göre diyabetik kontrol grubunun yüksek su ekstresi grubuna göre gen ifadesi için 16,18 kat artış görülmüştür.

Metanol ekstrelerinin düşük ve yüksek doz gruplarına yapılan istatistiksel analizinde p değeri 0,025 bulunmuştur. Bu nedenle iki grup arasında gen ifade düzey farkının anlamlı olduğu kabul edilmiştir. Grupların $2^{-\Delta\Delta CT}$ değer ortalamalarına göre düşük doz metanol ekstre grubunun yüksek doz grubuna göre gen ifadesi için 1,83 kat azalış görülmüştür.

Su ekstrelerinin düşük doz ve yüksek doz gruplarının yapılan istatistiksel analizinde p değerinin 0,338 bulunmuştur. Bu nedenle iki grup arasında gen ifade düzey farkının anlamlı olmadığı görülmüştür.

Düşük doz metanol ekstresi ile düşük doz su ekstresinin yapılan istatistiksel analizinde p değeri 0,034 bulunmuştur. Bu nedenle iki grup arasında gen ifade düzey farkının anlamlı olduğu kabul edilmiştir. Grupların $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerine göre düşük metanol ekstresi grubunun düşük su ekstresi grubuna göre gen ifadesi için 1,08 kat azalış görülmüştür.

Yüksek metanol ekstresi ile yüksek su ekstresinin yapılan istatistiksel analizinde p değeri 0,749 bulunmuştur. Bu nedenle iki grup arasında gen ifade düzey farkının anlamlı olmadığı bulunmuştur.

Düşük metanol ekstresi ile yüksek su ekstresinin yapılan istatistiksel analizinde p değeri 0,011 bulunmuştur. Bu nedenle iki grup arasında gen ifade düzey farkının anlamlı olduğu kabul edilmiştir. Grupların $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerine göre düşük metanol ekstresi grubunun yüksek su ekstresi grubuna göre gen ifadesi için 1,31 kat azalış görülmüştür.

Yüksek metanol ekstresi ile düşük su ekstresinin yapılan istatistiksel analizinde p değerinin 0,157 bulunmuştur. Bu nedenle iki grup arasında gen ifade düzey farkının anlamlı olmadığı bulunmuştur.

IL-1 β gen ifadesi için ikili grup değerlendirmeleri sonucunda: Kontrol grubun diyabetik gruba göre yapılan istatistiksel analizinde p değeri 0,027 bulunmuştur. Bu nedenle iki grup arasında gen ifade düzey farkının anlamlı olduğu kabul edilmiştir. Grupların $2^{-\Delta\Delta CT}$ değer ortalamalarına göre diyabetik kontrolün gen ifadesinde 1,15 kat artış görülmüştür.

Kontrol grubunun düşük metanol ekstresi grubuna göre yapılan istatistiksel analizinde p değeri 0,007 bulunmuştur. Bu nedenle iki grup arasında gen ifade düzey farkının anlamlı olduğu kabul edilmiştir. Grupların $2^{-\Delta\Delta CT}$ değer ortalamalarına göre düşük metanol ekstresi grubunun gen ifadesinde 0,81 kat azalış görülmüştür.

Kontrol grubunun yüksek metanol grubuna göre yapılan istatistiksel analizinde p değeri 0,025 bulunmuştur. Bu nedenle iki grup arasında gen ifade düzey farkının anlamlı olduğu kabul edilmiştir. Grupların $2^{-\Delta\Delta CT}$ değer ortalamalarına göre yüksek metanol ekstresi grubunun düşük doz grubuna göre gen ifadesinde 0,31 kat azalış görülmüştür.

Kontrol grubunun düşük su ekstresi grubuna göre yapılan istatistiksel analizinde p değeri 0,034 bulunmuştur. Bu nedenle iki grup arasında gen ifade düzey farkının anlamlı olduğu kabul edilmiştir. Grupların $2^{-\Delta\Delta CT}$ değer ortalamalarına göre su ekstresi düşük doz grubunun gen ifadesinde 0,99 kat azalış görülmüştür.

Kontrol grubunun yüksek su ekstresi grubuna göre yapılan istatistiksel analizinde p değeri 0,025 bulunmuştur. Bu nedenle iki grup arasında gen ifade düzey farkının anlamlı olduğu kabul edilmiştir. Grupların $2^{-\Delta\Delta CT}$ değer ortalamalarına göre yüksek su ekstresi grubunun gen ifadesinde 0,18 kat azalış görülmüştür.

Diyabetik kontrol grubunun düşük metanol ekstresi grubuna göre yapılan istatistiksel analizinde p değeri 0,048 bulunmuştur. Bu nedenle iki grup arasında gen ifade düzey farkının anlamlı olduğu kabul edilmiştir. Grupların $2^{-\Delta\Delta CT}$ değer ortalamalarına göre diyabetik kontrol grubunun düşük metanol ekstresi grubuna göre gen ifadesinde 1,96 kat artış görülmüştür.

Diyabetik kontrol grubunun yüksek metanol ekstresi grubuna göre yapılan istatistiksel analizinde p değeri 0,049 bulunmuştur. Bu nedenle iki grup arasında gen ifade düzey farkının anlamlı olduğu kabul edilmiştir. Grupların $2^{-\Delta\Delta CT}$ değer ortalamalarına göre diyabetik kontrol grubun yüksek metanol ekstresine göre gen ifadesinde 0,84 kat artış görülmüştür.

Diyabetik kontrol grubunun düşük su ekstresi grubuna göre yapılan istatistiksel analizinde p değeri 0,049 bulunmuştur. Bu nedenle iki grup arasında gen ifade düzey farkının anlamlı olduğu kabul edilmiştir. Grupların $2^{-\Delta\Delta CT}$ değer ortalamalarına göre diyabetik kontrol grubunun su ekstresi düşük doz grubuna kıyasla gen ifadesi için 0,16 kat artış görülmüştür.

Diyabetik kontrol grubunun yüksek su ekstresi grubuna göre yapılan istatistiksel analizinde p değeri 0,025 bulunmuştur. Bu nedenle iki grup arasında gen ifade düzey farkının anlamlı olduğu kabul edilmiştir. Grupların $2^{-\Delta\Delta CT}$ değer ortalamalarına göre diyabetik kontrol grubunun su ekstresi yüksek doz grubuna kıyasla gen ifadesi için 0,97 kat artış görülmüştür.

Düşük ve yüksek doz metanol ekstrelerinin yapılan istatistiksel analizinde p değeri 0,049 bulunmuştur. Bu nedenle iki grup arasında gen ifade düzey farkının anlamlı olduğu kabul edilmiştir. Grupların $2^{-\Delta\Delta CT}$ değer ortalamalarına göre düşük metanol ekstresinin yüksek metanol ekstre grubuna kıyasla gen ifadesi için 1,12 kat azalış görülmüştür.

Düşük ve yüksek doz su ekstrelerinin birbiriyle yapılan istatistiksel analizinde p değeri 0,049 bulunmuştur. Bu nedenle iki grup arasında gen ifade düzey farkının anlamlı olduğu kabul

edilmiştir. Grupların $2^{-\Delta\Delta CT}$ değer ortalamalarına göre düşük su ekstrelerinin yüksek su ekstreleri grubuna kıyasla gen ifadesi için 0,81 kat artış görülmüştür.

Düşük metanol ekstreleri ile düşük su ekstreleri grubunun yapılan istatistiksel analizinde p değeri 0,047 bulunmuştur. Bu nedenle iki grup arasında gen ifade düzeyinin anlamlı olduğu kabul edilmiştir. Grupların $2^{-\Delta\Delta CT}$ değer ortalamalarına göre düşük metanol ekstreleri grubunun düşük su ekstreleri grubuna kıyasla gen ifadesi için 1,18 kat azalış görülmüştür.

Yüksek metanol ekstreleri ile yüksek su ekstrelerinin yapılan istatistiksel analizinde p değeri 0,121 bulunmuştur. Bu nedenle iki grup arasında gen ifade düzey farkının anlamlı olmadığı kabul edilmiştir.

Düşük metanol ekstreleri ile yüksek su ekstrelerinin yapılan istatistiksel analizinde p değeri 0,028 bulunmuştur. Bu nedenle iki grup arasında gen ifade düzeyinin anlamlı olduğu kabul edilmiştir. Grupların $2^{-\Delta\Delta CT}$ değer ortalamalarına göre düşük metanol ekstreleri grubunun yüksek su ekstreleri grubuna kıyasla gen ifadesi için 1,80 kat azalış görülmüştür.

Yüksek metanol ekstreleri ile düşük su ekstrelerinin yapılan istatistiksel analizinde p değeri 0,121 bulunmuştur. Bu nedenle iki grup arasında gen ifade düzeyinin anlamlı olmadığı kabul edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Çalışmada, yüksek besin değeri ve halk arasında yaygın kullanımı olan *Rosa* türlerinden *R. canina*'nın kök ekstrelerinin antioksidan etkisi ile DNA ile etkileşimi ve koruyucu etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Ekstrelerin deney hayvanlarında STZ ile oluşturulan diyabet modeli üzerine olumlu etkisinin olup olmadığı belirlenmiştir. Diyabet ve inflamasyon ile ilişkili olan *TNF- α* ve *IL-1 β* gen ifadelerinin değerlendirilmesi ile diğer deney sonuçları ilişkilendirilmiştir. Bu bilgilerin ışığında farklı alanlarda yapılan birçok deneyin multidisipliner çatı altında değerlendirilip birleştirilmesi hedeflenmiştir.

Tıbbi bitkiler kullanılarak elde edilen ekstre içeriklerinin antioksidan etki üzerine çalışmaları son yıllarda büyük ilgi görmüştür. Sağlıklı metabolizma olaylarında oksidasyon reaksiyonlarında elde edilen serbest radikaller, antioksidan sistemlerin bozulması veya yetersiz kalması sonucunda hücre içerisinde DNA, lipit, karbonhidrat, protein ve diğer biyomoleküller ile etkileşime girmesi sonucunda oksidatif hasara yol açar. Bu hasarlar kişilerde yaşlanmaya ve hücre ölümüne neden olan biyolojik işlev kaybına neden olur. Antioksidan etki gösteren bitkilerin oksidatif hasarı önleyici etkisi ve çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanımı en temel yaklaşımlar arasında yer alır. *Rosa* türlerinin içeriğine bakıldığında fenolik bileşik yapıları ile antioksidan etkisinin oldukça güçlü olduğu ifade edilir.

Dünyada milyonlarca insanın hayatını olumsuz etkileyen diyabet hastalığının tarihi milattan öncesine dayanmaktadır. İnsülinin uzun yıllar sonra kullanılması milyonlarca insanın ölümüne ve kalitesiz yaşam standardına sebep olmuştur. Bitkisel tedaviler, diyabet ve bu hastalık ile ortaya çıkan komplikasyonlar için çeşitli çalışmalar yapılarak önemli bir boyuta ulaşmıştır.

Son yıllarda diyabetin ilgili genler, sitokinler ve oksidatif stres üzerinde rolüyle ilgili yapılan birçok araştırmada, diyabetik etkilerin önüne geçmesi ile bitkisel tedavi üzerine odaklanılmıştır. STZ ile deney hayvanları üzerinde diyabet modeli oluşturulan sıçanlarda *R. canina* bitki kök ekstrelerinin dozlara göre diyabetin komplikasyonlarında önemli olan inflamasyona (inflamasyonla ilişkili genlere) ve oksidatif strese etkisi ve ilgili genlerin ifade düzeylerinin değerlendirilmesi bu çalışmanın temelini oluşturur. Bitkisel uygulama

sonucunda elde edilen verilerin, yapılan antioksidan deney çalışmaları ve DNA etkileşim deneylerinin gen ifade sonuçları ile desteklenmesi amaçlanmıştır.

Rosa türlerinin yaprak kısımlarından elde edilen ekstrelerin içerikleri flavonoid ve fenolik miktarları gösterilmiştir. İncelenen 17 *Rosa* türünün yaprakları ile elde edilen metanol ekstrelerinin fenolik bileşik tayininin 5,7 ile 15,2 mg GAE/100 mg arasında olduğu, en düşük *R. rugosa* (%5,7) olarak ifade edildiği ve en yüksek *R. vosagiaca* (%7,7) olmak üzere *R. canina* türlerinin içerikleri bildirilmiştir. Bu çalışma sonucunda gül yapraklarının fenolik bileşik bakımından zengin olduğu ifade edilmiştir [232, 234].

R. arvensi ve *R. canina*'nın fitokimyasal kompozisyonu ile biyolojik aktiviteleri karşılaştırılan çalışmada toplam fenolik madde tayininin en yüksek *R. canina* sulu ekstrelerinde ($74,6 \pm 3,08$ mg GAE/g) bulunduğu belirlenmiştir [90]. İran *R. canina* meyvelerinde farklı ekstraksiyon çeşitlerinde en yüksek fenolik madde içeriğinin $424,6 \pm 1,8$ mg GAE/ g metanolik ekstresinde bulunmuştur [87].

Agourram ve diğerleri tarafından yapılan çalışmada *R. canina* tohumlarında fenolik madde değerinin belirlenebilmesi için farklı ekstreler hazırlanarak bakılmıştır. Alınan sonuçlara göre en yüksek değer %70 asetonlu ekstre içeriğinde $21,5 \pm 0,33$ mg GAE /g olmak üzere kaydedilmiştir [235].

Doğu Anadolu bölgesinde yer alan kuşburnu türleri üzerine yapılan çalışmaya göre *R. pimpinellifolia*, *R. canina*, *R. villosa*, *R. dumalis* meyvelerinde toplam fenolik madde tayini yapılmıştır. Alınan değerlere göre en yüksek fenolik içeriğe sahip olan kuşburnu türü $6.298 \pm 116,7$ mg GAE/100 g ile *R. canina* olarak belirlenmiştir [236].

Sırbistan'da yapılan çalışmaya bakıldığında *R. arvensis* ve *R. canina* kimyasal bileşenleri ile biyolojik aktivite karşılaştırmaları yapılmıştır. Bu çalışmaya göre flavonoid madde miktarları tespit edilmiştir. *R. canina* flavonoid madde tayini için metanol bazlı ekstre içeriğinin $0,65 \pm 0,03$ mg QE/g olarak sulu ekstresinin $1,22 \pm 0,02$ mg QE/ g olduğu belirtilmiştir. *R. arvensis* metanol içerikli ekstresinin $0,65 \pm 0,03$ mg QE/ g, sulu ekstre içeriğinin ise $2,24 \pm 0,05$ mg QE/ g olduğu belirlenmiştir. Bu deneylere ek olarak bitkilerin antioksidan çalışmaları FRAP ve DPPH yöntemleri ile tespit edilmiştir. Bu çalışma sonuçlarına göre DPPH analizi için en yüksek ifade *R. arvensis* sulu ekstresinin $313 \pm 10,9$

$\mu\text{g/ml}$ olarak FRAP yöntemi ile *R. canina* su içerikli ekstresinin en yüksek ifadesi $84,5 \pm 4,19$ mg AAE/g olarak ifade edilmiştir [90].

Gül yağı içeriğinin antioksidan aktivitesinin, pozitif kontrol olarak kullanılan BHT (bütillendirilmiş hidroksi tolueen)'e göre yüksek olduğu rapor edilmiştir [237].

Rosaceae familyasına ait olan türlerin biyolojik bileşikleri baz alınarak yapılan birçok araştırma bulunmaktadır. Yapılan araştırmalar ışığında kuşburnu türlerinin meyve ve tohumlarında glukoz, sakkaroz, früktoz, linoleik ve oleik asit, maltoz, vitamin C, vitamin E, δ -tokoferol, α -tokoferol içerdikleri rapor edilmiştir [87].

Lv ve diğerleri tarafından yapılan çalışmada %0,005 oranında olduğu tespit edilen gül yağının %75 antioksidan aktivitesi olduğu bulunmuştur. Bu çalışmaya göre %0,5-0,0625 (h/h) oranında çalışılan gül yağının %94-91 oranında antioksidan etkiye sahip olduğu ve pozitif kontrol baz alınarak kullanılan BHA (bütillendirilmiş hidroksi anisol)'e göre yüksek antioksidan aktivitesi olduğu belirlenmiştir [238].

R. canina meyvelerinin UV ışınlar karşı koruyucu etki göstermeleri ve yüksek antioksidan etkiye sahip olmaları UV üzerinde protektif bir bileşik olma özelliği olduğunu göstermiştir. *R. canina* meyvelerinin düşük konsantrasyon içeriğinde (1/10 oranında seyreltim) bile etki göstermesi güçlü antioksidan içeriğine işaret etmiştir. Protektif bileşikler arasında yer alan oksibenzon, güneş ışınları ve ultraviyolenin tahrip edici etkilerine karşı kişisel bakım ürünlerinde ve koruyucu losyonlarda kullanılmasının yanında şampuan ve kremler, yaşlanmayı önleyici kremler, el sabunu, maskara ve dudak parlatici gibi kişisel bakım malzemelerinde bileşen içeriği aktif olarak kullanılır [239].

Güneş kremlerinde tercih edilen retinil palmitat, oksibenzon gibi organik yapıdaki bileşenlerin alerjik ve fotokorsinejonik yan etkilerinin olduğu rapor edilmiştir. Oksibenzon, konsantrasyonunun artması ile DNA-AP lezyonları arasında pozitif düzeyde ilişki ortaya koyan endokrin bozucu ve genotoksikant bir maddedir [240].

Dokularda reaktif oksijen türlerinin artması ile meydana gelebilecek olan hemoliz, oksitlenen hemoglobin formlarının oluşmasına neden olur. Bu bileşenlerin etki ettiği hücrelerin, lipitleri, protein, hücre zarı ve DNA'sı üzerinde yıkıcı etki oluşturduğu çalışmalar

ile desteklenmiştir [241]. Bu sebeplerden ötürü hemolizi engelleme özelliğine sahip olan antihemolitik maddelerin belirlenmesi yapılan çalışmalarla önem kazanmıştır. Çalışmalar çeşitli bitkilerden elde edilen ekstreler veya ikincil metabolitlerin içeriğinde olan fenolik bileşenlerden ötürü antioksidan ve antihemolitik etkisi olduğu bildirilmiştir [242].

Ivanisova ve diğerleri tarafından yapılan çalışmalarda, antioksidanların çoğunun anti-tümör, anti-mutajenik, anti-inflamatuar, anti-viral, anti-diyabetik ve anti-bakteriyel aktiviteye sahip olduğu ifade edilmiştir. Buna ek olarak doğal antioksidan tüketilmesi ve kullanımı kardiyovasküler hastalık, diyabet, yaşlanma ve kanser gibi günümüz çağında popüler olan hastalıkların risklerinin azaltılması ile ilişkilendirilmiştir [243].

Antioksidanlar, serbest radikallerin neden olduğu olumsuz etkilere karşı vücut içerisinde düşük konsantrasyonlarda bulunur. Antioksidanların substrat oksidasyonunun önleminde görev aldığı gibi organizmanın artan ROT seviyelerine karşı savunma mekanizması oluşturmada önemli rol oynadığı rapor edilmiştir. Antioksidanların hedef moleküller üzerinde oksidatif hasarı engellediği, geciktirdiği veya etkisiz hale getirdiği ifade edilmiştir. Bitkiler ve hayvanlar organizmalar üzerinde radikal temizleyici olarak biyolojik görevler üstlenmektedirler [244].

Antioksidan savunma sistemi içerisinde açığa çıkan metal iyonlar lipid peroksidasyon oluşumuna neden olur. Fe^{+3} lipidlerle reaksiyona girerek alkil yapıdaki serbest radikalleri, hidroperoksitleri ayrıştırması ile radikalleri ortaya çıkarır [91]. Çalışmada *Rosa* ekstrelerinin demir iyonları üzerinde redükleyici etkiye sahip oldukları görülmüştür. Redükleyici güce sahip olan bitki ekstrelerinin serbest radikaller üzerinde elektron ilgisi ile zararsız hale getirildiği rapor edilmiştir. Bu çalışma sonucuna paralel yapılan *Rosa* türleri ile ilgili çalışmalar örtüşmektedir. Araştırılan ekstrelerin biyolojik sistem içerisinde elektron ve hidrojen atom transfer etkilerini belirlenmesi için sentetik olarak ABTS ve DPPH radikalleri kullanıldığı belirtilmiştir. *Rosa* türlerinin sentetik radikaller üzerinde antioksidan etkiye sahip olduğu belirlenmiştir [91,92].

Bakır (Cu^{2+}) ve demir (Fe^{2+}) iyonları gibi geçiş metallerinin Haber-Weiss ve fenton reaksiyonlarında hidroksil radikal üretimine neden olması spesifik olarak hücre membranları içerisinde oksidatif düzeyde hasar oluşumuna neden olmaktadır. Metal iyonların şelatlanması ile oksidasyona neden olan Fe^{2+} iyonların bağlanma kapasitesi molekül veya

söz konusu olan bitkilerin antioksidan özelliğinin belirlenmesinde etkili olarak kullanılan yöntem olduğu ifade edilmiştir [245].

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda süperoksit radikalının patolojik durumlarda nitrik oksit bileşiği ile reaksiyona girmesi ile peroksinitritin oluşmasına zemin oluşturduğu ileri sürülmüştür. Güçlü ve toksik oksidan olan peroksinitrik, DNA üzerinde hücrel hasara neden olur. DNA hasarı (ADP-riboz) ve (PARP) aktive ederek enzim substratı NAD⁺ seviyesini azaltır. NAD⁺ kullanılması ile glikoliz, ATP ve elektron taşınması yavaşlaması sonucunda ADP-ribozilasyonuna sebep olur. Bunun sonucunda ise diyabet gibi patolojik durum komplikasyonlarında gözlenen endotel disfonksiyonunun gelişebileceği öngörülmüştür [9].

Diyabet insanların yaşam kalitesini olumsuz etkileyen yüksek mortaliteyi ve morbiditeye sahip olan bir hastalıktır. Tanısı için poliüri, polifaji ve polidipsi ile biyokimyasal parametreler; glukoz, insülin, % glikolize hemoglobin (HbA1c) ve C peptit seviyelerinden yararlanılmaktadır. Bu parametreler ile hastalığın oksidatif stres ile arasında bir korelasyon olduğu kabul edilmiştir [246].

Oksidatif stres, diyabet sonucu oluşan komplikasyonların patogenezinde önem teşkil eder. Buna bağlı olarak proinflamatuvar sitokinlerin yüksek ifadesi, diyabetik etkileri ilerleten bir başka faktördür. Oksidatif stres ve diyabet inflamasyondan ve düzenleyici bazı genlerin üretiminden sorumlu olan NF- κ B aktivasyonunu aktive ettiği bildirilmiştir [247].

Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) ve Türkiye Diyabet Epidemiyolojisi Çalışması (TURDEP-1) ile Türkiye Diyabet Epidemiyolojisi Çalışması (TURDEP-2) verilerine göre diyabetin prevalansının genişlediği ve son yılların dikkat çeken hastalıkları arasında yerini aldığı ifade edilmiştir.

Son yıllarda pekçok kişinin çeşitli hastalıklarda bitkileri tercih edebilmektedir. Tıbbi bitkiler ile ilgili yapılan araştırmalar hastalıklara karşı yeni ilaçların üretilmesi ve geliştirilmesi için insan sağlığına yapılan büyük bir adım olarak görülmüştür [248].

Bu bilgiye göre; bazı bitki ekstrelerinin beta hücre rejenerasyonunu aktive ederek pankreası zararlı etkenlerin oluşturacağı hasarlardan koruduğu, glikoz alımına sınır konularak insülin

salınımını kontrol altına aldığı, insülin reseptörlerini etkili hale getirerek beta hücrelerinin insülin salgılanmasını uyarması ile kandan glikoz Emilimi için farklı mekanizma teknikleri ortaya çıkmıştır [249].

Dünyada diyabet ve bitki ekstraktları ile yapılan son zamanlardaki çalışmaların çoğunluğunda diyabet modeli için sıçanlar kullanılmış ve bu deneklerin insülin sentezleyen, pankreaslarında yer alan β hücrelerinin tahrip edilmesi sonucu meydana geldiği ifade edilmiştir. Bu işlem için N-nitroso türevi olan D-glukozamin yapısına sahip alloxan veya streptozotocinin sıçanlar üzerinde intraperitoneal (i.p.) uygulaması ile ortaya çıkmıştır. Çeşitli bitki ekstraktlarının birlikte veya tek olarak hayvanlara uygulanması sonucunda kan glikoz düzeyleri ölçülmüştür. Antioksidan aktivitesi yüksek olan bitkilerden elde edilen ekstraktlarının deneysel diyabet oluşturulmuş ratlar üzerinde kan glikoz seviyelerini düşürdüğü belirlenmiştir [189,192].

Vannucchi ve diğerleri tarafından yapılan çalışmada 1000 IU/kg olacak şekilde E vitamini alan farelerde diyabetin insidans oranının azaldığı bildirilmiştir. STZ ile diyabet oluşturulan sıçanlarda beta karotenin E ve C vitaminleri ile verilmesi sonucunda iyileştirici etki gözlenmesine neden olmuştur. Buna ek olarak STZ ile diyabet oluşturulan sıçanlarda E vitamini eksikliği sonucunda ölümlere yol açabileceği öne sürülmüştür [250].

Rasineni ve diğerleri ile yapılan çalışmada yüksek yağlı diyet ile besinlerini sağlayan sıçanların *C. roseus* bitkisinin yapraklarından hazırlanan sulu ekstraktlarının tedavi üzerine etkisi olduğu belirtilmiştir. 60 gün olan deney süreci sonunda, glukoz düzeyi, insülin, yağ düzeyleri fruktoz alan sıçanlarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu ifade edilmiştir. *C. roseus* bitki tedavisi sonucu fruktozun artan hiperglisemiye tamamen önlediği ifade edilmiştir. Araştırmacılar tarafından yüksek yağlı diyet ile beslenen sıçanların insülin direncinin, bitki tedavisi ile anlamlı düzeyde azaldığı gözlemlenmiştir. Fruktoz ile beslenen sıçanlarda ortaya çıkan kolesterol, total gliserit ve fosfolipit düzeylerinde %60'luk artışın, bitki uygulaması ile gruplara göre %21,4, %17,5, %16,57 ve %27 olmak üzere azaldığı belirtilmiştir [251].

Safran ile bileşenlerinin antioksidan özellikleri yapılan çalışmalarla araştırılarak diyabetik komplikasyonlar için yararlı olduğu bildirilmiştir. STZ ile diyabetik model oluşturulan sıçanlarda *Crocus sativus*'un etanol ekstresinin (40 mg/kg) olacak şekilde 8 hafta

hepatoprotektif etkisinin olduğu ifade edilmiştir. Bu etkinin oksidan seviyeleri düşürerek diyabet üzerinde iyileştirici etkisi olduğu ileri sürülmüştür [252].

Samarghandian ve diğerleri ile yapılan araştırmada diyabet oluşturulan hayvanlara farklı dozlarda krokin (40-80 mg/kg) olmak üzere 28 gün uygulamasından sonra kan glikoz düzeyinin azaldığını ve HDL düzeyinin ise arttığı bildirilmiştir [253].

Khajebishak ve diğerleri tarafından yapılan çalışmada diyabet oluşturulan tavşanlara nar çekirdeğinin verilmesinin hiperglisemik etkiyi azaltarak antidiyabetik özellik gösterdiği öne sürülmüştür. Nar çekirdeğinin yağı verilen diyabetik tavşanların serum insülin düzeyi, diyabetik grupta (6.11 ± 0.26) önemli düzeyde ($p < 0.05$) artmış olduğu (10.97 ± 0.72) belirlenmiştir. Sonuç olarak nar çekirdeği yağı (30 mg / kg / gün) uygulaması ile 45 günün sonunda hiperglisemiye azalttığı ve antidiyabetik etkiye sahip olduğu belirtilmiştir [254].

STZ ile diyabet oluşturulmuş ratlara 15 gün boyunca *Vitis vinifera L.* yapraklarının etanol ekstresinin hayvanların ağırlıkları baz alınarak verildiği bir çalışmada diyabetli gruplarda bitki ekstresi ile diyabetin iyileştirici aktivitesi olduğu bulunmuştur [255].

Al-Shaqha ve diğerleri tarafından yapılan araştırmada STZ ile diyabet oluşturulan farelerde 4 hafta süresince 100 mg /kg ve 200 mg / kg olmak üzere iki farklı doz ile etanol içerisinde çözülmüş olan *C. roseus* bitki ekstresinin 100 mg/kg insülin duyarlılığını arttıracak olan metformin ile tedavi etmişlerdir. Deney sonunda alınan verilere göre diyabetli fareler ile tedavi edilen grup karşılaştırıldığında ilgili bitki ekstresinin diyabetik fareler üzerinde kan şekerini düşürücü özelliğinin antidiyabetik ilaç olan metforminden daha etkili olduğunu öne sürmüşlerdir [256].

2009 yılında yapılan bir çalışmada *R. canina* 'nın meyvelerinden elde edilen etanol ekstresi ve bu ekstreten hazırlanan fraksiyonların antidiyabetik, antioksidan ve hipoglisemik aktiviteleri belirlenebilmesi için STZ ile indüklenmiş ratlarda 250 mg/kg doz olmak üzere 7 gün boyunca uygulandığında ciddi düzeyde hipoglisemik etki gözlemlenmiştir. Ekstrenin farklı polarite çözücüler ile fraksiyonlanmış ve fraksiyonlar diyabet olan ratlar üzerinde uygulanmıştır. Fraksiyonların subakut etkileri 7 gün sonunda diyabetik ratlarda incelenmiştir. Deneysel veriler, diyabetik sıçanlarda sulu ekstrenin ciddi düzeyde antidiyabetik etkiye (%50-62) sahip olduğunu rapor etmişlerdir. İn vitro şeklinde yapılan

antioksidan deney verilerine göre etil asetat fraksiyonunun DPPH düzeyi ($79,5 \pm 0,4$) olmak üzere en fazla radikal süpürücü etki gösterirken kloroform fraksiyonunun maksimum indirgeme gücü olduğu belirlenmiştir [203].

Yüksek ve düşük diyetle beslenen ratlara düşük doz STZ uygulaması yapılarak oluşturulan diyabet modelinden sonra glikoz düzeyleri, kimyasal parametreler ve kas ile yağ dokudaki yağların yıkımı ile ifade edilen gen düzeyleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, yüksek diyetle beslenen gruplarda glikoz düzeylerinin normal beslenen grup ile anlamlı bir fark görülmediği belirlenmiştir. Gen ifade seviyelerinin ise sonuçlara göre yağ dokusunda ifadesinin artmasına karşın karaciğer dokusunda azaldığı belirtilmiştir [257].

Çalışmalarda farklı bitki ekstrelerinin yüksek olan glikoz seviyesine etkilerini inceleyen birçok çalışma olmasının yanında gül ve üzüm çekirdeklerinin antioksidan ve antidiyabetik etkilerinin yanı sıra bitkilerin yaprak ekstrelerinin de diyabetik ratlarda kan glikoz seviyesini düşürdüğü rapor edilmiştir [255].

Yapılan çalışmalarda 6 hafta süresince yüksek yağlı diyet ile beslenen farelerin *C. roseus* bitkisinin yapraklarından elde edilen ekstrenin etkisi ile tedavi edilen bir çalışmada IL-6 ve *TNF- α* konsantrasyonlarını düşürmesi ile inflamasyon etkisini azaltabileceğini göstermiştir. Yapılan araştırmada %20 *C. roseus* yaprak özütü ilavesi ile *TNF- α* ifadesinin azaldığı belirtilmiştir [257].

Çalışmalarda *TNF- α* geninin mikrovasküler düzeyde diyabetik komplikasyonların ilerleme derecesinde belirleyici olduğu ileri sürülmüştür [253]. Şifalı olan tıbbi bitkilerin inflamasyon seviyesini azaltması ile hiperglisemi koşullarında çeşitli organların işleyişinde düzenleyici olduğu ifade edilmiştir. Diyabet oluşturulmuş sıçanların bazı doku ve kan örneklerinde artan *TNF- α* ifadesinin bitki ekstresi verilen çalışma ve gruplarında azaldığı rapor edilmiştir [258].

Lipit, protein ve karbonhidrat metabolizması ile bu yollar üzerinde düzenleyici etkiye sahip olan insülin ile inflamasyon arasında bir ilişki olduğu belirtilmiştir. Yapılan çalışmalar bu durumu desteklemek ile insülinin yetersiz olması veya az salgılandığında yeterince etki gösterememesi ile insülin direnci olduğu belirlenmiştir [259].

Adipositlerde salgılandığı bilinen *TNF- α* 'nın kinaz yolağı üzerinden IRS-1 in fosforillenmesini indükleyerek hücre içerisinde insüline karşı oluşacak yanıtı engelleyebildiği rapor edilmiştir [198].

Yüksek kan glikoz seviyelerinde pankreasın β hücrelerinde *IL-1 β* ifadenin düzeyinin ve salınımının artmasına sebep olduğu, bununla birlikte *IL-1 β* 'nin birçok sitokin artışına neden olduğu ve pankreasın β hücreleri içerisinde apoptoza sebep olduğu belirtilmiştir [260].

Yapılan tez çalışması *R. canina* kök ekstrelerinin DNA ve deney hayvanları üzerinde etkisine bakılması ile yenilikçi bir yaklaşım oluşturmaktadır. Sonuçlarımıza baktığımızda *R. canina* kök ekstrelerinin antioksidan etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Su ekstresinin metanol ekstresine göre DPPH aktivitesinin, fenolik madde içeriğinin ve demir şelatlama aktivitesinin daha yüksek etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Bitkinin DNA üzerinde etkisi literatürde yapılan çalışmalara paralel olarak oksidatif stres sonucu oluşan DNA hasarını önleyebileceği potansiyelini ortaya çıkarmıştır. Ayrıca bitkinin antioksidan özelliğinden dolayı inflamasyon sonucu meydana gelen serbest radikaller üzerinde etkili olduğu da daha önce yapılan çalışmalar ile uyumaktadır. Daha önce ratlar üzerinde diyabetik model oluşturmada kullanılan STZ kimyasal ajanı tercih edilmiştir. *R. canina* antioksidan içeriğinden dolayı diyabet sonucu hücre hasarını düzenleyici olabileceği ve kök ekstresinin diyabet üzerinde etkili olabileceğini söyleyebiliriz. Daha önce yapılan çalışmalarda bitkinin diyabet hastalığı tedavisinde etkili olabileceği ifadesi yapılan deneylerle paralellik göstermiştir. Bitkinin yaprak, meyve ve tohumlarından elde edilen ekstreler ile deney hayvanları üzerinde çalışılmasına karşın kök ekstresinin hayvanlar üzerinde uygulanmasına ilişkin güncel bir veri bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçların yorumlanabilir olması için bitkinin iki ekstresinin farklı dozları ile çalışılmıştır. Bu da daha önce yapılan çalışmalar ile örtüşmektedir. Diyabet oluşturulan ratlarda gruplara 14 gün süresince ağırlıklarına uygun olarak bitki ekstre uygulaması yapılmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda ekstre uygulamalarının 7 -28 gün arasında olduğu görülmüştür. Çalışılan hayvanların diyabet olmaları nedeniyle strese gireceklerini öngördüğümüz çalışmamızda daha fazla stres yaratmamak için ekstre uygulamasının 14 gün olmasına karar verilmiştir.

Daha önce yapılan çalışmalara paralel olarak ratlar üzerinde STZ öncesi, STZ sonrası ve ekstre uygulaması bitiminde kan şeker düzeyleri ölçülmüştür. Ölçüm sonucunda elde edilen verilerin ortalama değerleri hesaplanmıştır. Kan şeker düzeyleri gruplara göre istatistiksel

olarak değerlendirilmiştir. Literatürde yapılan çalışmalar baz alındığında gen ifadesi çalışması sonucunda kontrol ve diyabetik kontrole göre diğer gruplarda *TNF-α* ve *IL-1β* genlerinin ifadesinin istatistiksel değerlendirmeleri sonucunda iyileşme düzeyinin daha az olduğu gruplarda gen ifadesinin yüksek olduğu ve diyabetik kontrole göre yakın bulunduğu belirlenmiştir.

Analiz sonuçlarımız:

TNF-α gen ifadesi için kontrol grubun diğer gruplarla değerlendirilmesi Kruskal Wallis testi ile yapılmıştır. Sonuçlara göre p değeri 0,041 bulunmuştur. Bu nedenle gruplar arasında gen ifade düzey farkının anlamlı olduğu kabul edilmiştir.

IL-1β gen ifadesi için kontrol grubun diğer gruplarla değerlendirilmesi Kruskal Wallis testi ile yapılmıştır. Sonuçlara göre p değeri 0,049 bulunmuştur. Bu nedenle gruplar arasında gen ifade düzey farkının anlamlı olduğu kabul edilmiştir.

Daha önce yapılan çalışmalara bakıldığında yapılan gen ifadesi çalışmasının yapılan deneyler ile paralellik gösterdiği bulunmuştur. Daha önce bu alanda yapılan çalışmalar ile paralellik gösteren tez çalışmamız ilgili genlerin diyabet ile ilişkilendirilebileceğini desteklemektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan yüksek lisans tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar ve bu sonuçlara göre kullanılabileceği alanlar ve yapılabilecek ek çalışmalar aşağıda sunulmuştur.

1. Yapılan çalışmada *R. canina* kökünün antioksidan etkisini değerlendirmek için metanol ve su olmak üzere iki farklı ekstre hazırlanmıştır. Hazırlanan ekstrelerin antioksidan aktivitesi olduğu bulunmuştur. Su ekstresinin metanol ekstresine göre antioksidan aktivitesinin daha etkili olduğu belirlenmiştir.
2. Ekstrelerin DNA ile yapılan etkileşim ve koruyucu aktivite deneyleri agaroz jel elektroforez sistemiyle incelenmiştir. Bant yapılarına göre su ekstresinin DNA üzerinde herhangi bir konformasyonel değişikliğe neden olmadığı belirlenmiştir. Metanol ekstresinin DNA üzerinde kırıklara yol açtığı ve konformasyonel değişikliğe neden olduğu belirlenmiştir. Su ekstrenin P/H kontrolü baz alındığında Form III bandının oluşmaması ekstrenin *HindIII* enzim kesim yerine ya da enzime bağlandığını göstermiştir. Enzim kesimi sonucunda su ekstresinin G/G nükleotit grubuna bağlandığı belirlenmiştir. Metanol ekstresinin DNA'ya bağlandığı ve *BamHI* enzim kesim bölgesine ya da enzime bağlanmadığı belirlenmiştir. Ekstrenin *HindIII* enzim kesimi için kısmi kesim etkisi görülmüştür. DNA koruyucu etki deneyinde su ekstresi ile muamele edilmiş fenton reaktifinde Form I olan süperhalkasal yapının yoğunluğunun azaldığını diğer Form II ve Form III bant yapılarının pozitif kontrole göre paralel olduğu görülmüştür. Su ekstresinin DNA üzerinde kısmi koruma etkisine sahip olduğu belirlenmiştir. Metanol ekstresinin fenton reaktifi ile etkileşimi sonucunda Form II yapısı olan açık halkasal plazmit yapısının ortadan kalktığı ve DNA üzerinde herhangi bir koruyucu etkisi olmadığı bulunmuştur. Ekstrelerin farklı enzim kesimi noktalarına bağlanabilme ihtimali göz önüne alınarak başka enzim kesim çalışmaları yapılabileceği düşünülmektedir.
3. Yapılan çalışma ile diyabet olan ratlara farklı ekstre ve farklı doz uygulamalarının STZ ile indüklenmiş diyabetik rat modeli üzerindeki etkilerine bakılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre uygulanan STZ ile başarılı bir şekilde diyabet modeli oluşturulmuştur. Gruplara 14 gün ekstre uygulaması yapıldıktan sonra ölçülen kan şeker düzeylerine göre yüksek doz su ekstresinin kontrole en yakın düzeye ulaştığı görülmüştür. Alınan sonuçlara Kruskal Wallis testi ile istatistiksel analiz yapılmıştır. İstatistiksel analiz sonucunda gruplar arasında p değerinin 0.001 çıkması ile kan şeker düzey farkının gruplar arasında anlamlı olduğu belirlenmiştir.

4. Ekstreler STZ ile diyabet modeli oluşturulan ratlar üzerinde değerlendirilmiştir. Diyabet ile inflamatuvar cevap oluşturma özelliği olan genlerin ifadesi araştırılmıştır. Çalışmamızda gruplara göre farklı ekstre ve doz uygulamaları yapılmıştır. İfadelerine bakılan *TNF- α* ve *IL-1 β* genleri değerlendirildiğinde istatistiksel sonuçlara göre gen ifade düzey farklarının anlamlı olduğu belirlenmiştir.

Diyabetik gruplarda genlerin ifadelerinin kontrol gruplarına göre arttığı, ekstre uygulamasının genlerin ifade düzeyleri üzerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir etkisi olduğu bulunmuştur. Su ekstresinin metanol ekstresine oranla diyabet üzerinde daha etkili olmuştur. Gen ifade düzeyinde her iki gen için kontrole yakın ifade veren grubun yüksek doz su ekstresi olduğu belirlenmiştir.

Diyabetin sebep olduğu moleküler düzeyde değişikliklerin belirlenmesi ve ekstre uygulaması ile bitkileri inceleyen birçok çalışmaya yön verebilecek düzeyde sonuçlar elde edilmiştir.

5. Çağımızın en temel hastalıklarından olduğu bilinen diyabetin yüksek doz su uygulaması ile elde edilen sonuçlar ileriki çalışmalar için temel oluşturabilir. Kök ekstrelerindeki fenolik madde tayini ve sonrasında daha spesifik çalışmalarla elde edilen etkiden sorumlu bileşiklerin tanımlanması yolunda ilk çalışmalar bu tez kapsamında gerçekleştirilmiştir.

6. Su ekstresinin hem antioksidan içeriği hem de DNA üzerine olumlu etkilerine ek olarak diyabet üzerinde en etkili grup olması birçok çalışma düzeyinde ekstrenin güvenilirliğini desteklemiştir.

7. Çalışmamız sonucunda *R. canina* kök ekstrelerinin antioksidan içerikleri ile orantılı olarak diyabet indüklenen ratlar üzerinde antidiyabetik ve antihiperglisemik etkisi olduğu belirlenmiştir. Ekstrelerin antioksidan içeriği sebebiyle diyabet ile gelişen oksidatif stres üzerinde iyileştirici etkiye sahip olabileceği düşünülmektedir. Yapılan tez çalışmasının daha sonra yapılacak yeni çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

Çalışma sonucunda alınan verilerin sonuçları ve değerlendirilmesi detaylı olarak Çizelge 6.1 üzerinde yer almaktadır.

Çizelge 6.1. Sonuç tablosu

Yapılan Çalışmalar	Sonuçlar	
	Su Ekstresi	Metanol Ekstresi
Antioksidan aktivite deneyleri DPPH Demir şelatlama aktivitesi Fenolik madde tayini	DPPH aktivitesi kontrol ve metanol ekstresine göre daha yüksek bulundu. Demir şelatlama aktivitesi metanol ekstresine göre daha yüksek bulundu. Fenolik madde içeriği metanol ekstresine göre daha yüksek bulundu.	DPPH aktivitesi kontrole göre daha yüksek su ekstresine göre daha düşük bulundu. Demir şelatlama aktivitesi su ekstresine göre daha düşük bulundu. Fenolik madde içeriği su ekstresine göre daha düşük bulundu.
DNA etkileşimi	DNA üzerinde konformasyonel değişiklik görülmedi.	DNA üzerinde konformasyonel değişikliğe neden oldu.
Enzim kesimi	<i>Hind</i> III enzim kesim yerine ya da enzime bağlandığı belirlendi. Ekstrenin G/G nükleotidine bağlandığı belirlendi.	<i>Hind</i> III enzimi ile kısmi kesim etkisi görüldü.
DNA koruyucu aktivite	DNA üzerinde kısmi koruma görüldü.	DNA üzerinde etki görülmedi.
Kan şekeri düzeyine etki	Yüksek doz su ekstresinin kontrole en yakın grup olduğu belirlendi.	Kan şekeri üzerine etki görülmedi.
Gen ifadesi (<i>TNF-α</i>)	Diyabetik kontrole göre gen ifadesinde azalma görüldü. Yüksek doz su ekstresi kontrole en yakın grup olarak belirlendi.	Diyabetik kontrole göre gen ifadesinde azalma görüldü.
Gen ifadesi (<i>IL-1β</i>)	Diyabetik kontrole göre gen ifadesinde azalma görüldü. Yüksek doz su ekstresi kontrole en yakın grup olarak belirlendi.	Diyabetik kontrole göre gen ifadesinde azalma görüldü.



KAYNAKLAR

1. Zhao, L. (2017). An ethnopharmacological study of aromatic Uyghur medicinal plants in Xinjiang. *Pharm Biol*, 55(1), 1114-1130.
2. Tarirai, C., Viljoen A. M., and Hamman J. H. (2010). Herb-drug pharmacokinetic interactions reviewed. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 6(12), 1515-38.
3. Poppenga, R. H. (2002). Herbal medicine: potential for intoxication and interactions with conventional drugs. *Clin Tech Small Anim Pract*, 17(1), 6-18.
4. Yang, X. X. (2006). Drug-herb interactions: eliminating toxicity with hard drug design. *Curr Pharm Des*, 12(35), 4649-64.
5. Guo, D. (2011). Anti-inflammatory activities and mechanisms of action of the petroleum ether fraction of *Rosa multiflora* Thunb. *Journal Ethnopharmacol*, 138(3), 17-22.
6. Tumbas, V. T. (2012). Effect of rosehip (*Rosa canina* L.) phytochemicals on stable free radicals and human cancer cells. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(6), 1273-81.
7. Ningappa, M. B., and Srinivas, L. (2008). Purification and characterization of approximately 35 kDa antioxidant protein from curry leaves (*Murraya koenigii* L.). *Toxicol In Vitro*, 22(3), 699-709.
8. Fubini, B., and Hubbard, A. (2003). Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radic Biol Med*, 34(12), 1507-16.
9. Marmol, I. (2017). Therapeutic Applications of Rose Hips from Different *Rosa* Species. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6).
10. Shakibaei, M. (2012). Botanical Extracts from Rosehip (*Rosa canina*), Willow Bark (*Salix alba*), and Nettle Leaf (*Urtica dioica*) Suppress IL-1 β -Induced NF- κ B Activation in Canine Articular Chondrocytes. *Evid Based Complement Alternat Med*, 12(3), 509-383.
11. American Diabetes Association (ADA). (2014). Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care*, 37(1), (14-80).
12. Satman, I. (2013). Twelve-year trends in the prevalence and risk factors of diabetes and prediabetes in Turkish adults. *European Journal of Epidemiology*, 28(2), 169-80.
13. Satman, I. (2016). Baseline renal function and associated factors in a high cardiovascular risk type 2 diabetes population. *Journal of Diabetes and its Complications*, 30(8), 1631-1639.

14. American Diabetes Association (ADA). (2020). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 37(1), 81-S90.
15. Pitocco, D. (2013). Oxidative stress in diabetes: implications for vascular and other complications. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(11), 25-50.
16. Lenzen, S. (2008). The mechanisms of alloxan and streptozotocin induced diabetes. *Diabetologia*, 51(2), 216-26.
17. Mukesh, R., and Namita, P. (2013). Medicinal plants with antidiabetic potential: a review. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental*, 13(1), 81-94.
18. Panda, S., Das, D., Tripathy, N., Panda, S., Das, D., and Tripathy, N. (2015). Screening of antidiabetic activity of leaf extracts of *Crotalaria Pallida* in alloxan induced diabetic rats. *Pelagia Res Library Der Pharmacia Sinica*, 6(2), 41-4.
19. Orhan, N., Aslan, M., Hoşbaş, S., ve Deliorman, O. D. (2009). *Pharmacognosy Magazine*, 5(20), 309-315.
20. Örenay, B. S., ve Dündar, M. (2012). Gen haritalama stratejileri. *Sağlık Bilimleri Dergisi*, 21(1), 50-60.
21. Meigs, J. B., Shrader, P., Sullivan, L. M., McAteer, J. B., Fox, C. S., Dupuis, J., Manning, A. K., Florez, J. C., Wilson, P. W. F., D'Agostino, R. B., and Cupples, L. A. (2008). Genotype score in addition to common risk factors for prediction of type 2 diabetes. *The New England Journal of Medicine*, 359(21), 2208–2219.
22. Ercan, Ş. ve Yaylim, İ. (2020). Gen Anlatımının Kantitatif Analizi “Real-time PCR”. *Ürolojik Cerrahi Derneği Güncelleme Serileri*, 9(2), 43-56
23. Baud, V., and Karin M. (2001). Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends in Cell Biology*, 11(9), 372-375.
24. Heasman, P. A., and Collins J. G. (1993). Changes in crevicular fluid levels of interleukin-1 beta, leukotriene B4, prostaglandin E2, thromboxane B2 and tumour necrosis factor alpha in experimental gingivitis in humans. *Journal Periodontal*, 28(4), 241-7.
25. Demirezer, L. Ö. (2010). Bitkilerin Tıpta Kullanılması Konusundaki Sorumluluklarımız. *Bildiri Kitabı*, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 87- 88.
26. Doğanoglu, Ö., Gezer, A., ve Yücedağ, C. (2006). Yenişarbademli yöresi’nin önemli bazı tıbbi ve aromatik bitki taksonları üzerine araştırmalar, *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 10-1, 66-73.
27. Mat, A. (2010). *Bitkiden İlaça Hepsinin Bir Öyküsü Var*. 1. Baskı, İstanbul: Pharma Vision, 1.
28. Baytop, T. (1999). Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi: *Geçmişte ve Bugün*. İstanbul: Nobel Tıp, 20-22.

29. Baydar, S. N. (2006). Şifalı Bitkiler Ansiklopedisi. *Modern Tıp Alternatif Tıp ile Elele*. Ankara: Palme Yayınevi, 8- 9.
30. Asımgil, A. (2009). *Şifalı Bitkiler Kitabı*. İstanbul: Timaş Yayınları, 10-11.
31. Baser, K. H. C. (1997). Industrial utilization of medicinal and aromatic plants. In *II WOCMAP Congress Medicinal and Aromatic Plants*, 2(1), 177-192.
32. Doğan, Ö., ve Avcı, A. (2018). Bitkilerle tedavi ve ilaç etkileşimleri. *Türkiye Klinikleri Journal of Public Health-Special Topics*, 4 (1), 49-54.
33. Tan, A. (1992). Türkiye’de bitkisel çeşitlilik ve bitki genetik kaynakları. *Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 2, 50 – 64.
34. Şenkul, Ç., ve Kaya, S. (2017). Türkiye’de endemik bitkilerin coğrafi dağılışı. *Türkiye Coğrafya Dergisi*, 69, 109-120.
35. Faydaoğlu, E., ve Sürücüoğlu, M. S. (2011). Geçmişten günümüze tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanılması ve ekonomik önemi. *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 11(1), 52-67.
36. Safaa, B., Chalak L., Dalleh, H., and Arold, N. (2015). Ethnopharmacological Survey of Medicinal Plants Used in Traditional Medicine by the Communities of Mount Hermon. Lebanon. *Journal of Ethnopharmacology*, 173, 139-156
37. Bahi, A., Guardiola, F. A., Messina, C., Mahdhi, A., Cerezuela, R., Santulli, A., Bakhrouf, A., and Esteban, M. A. (2017). Effects of Dietary Administration of Fenugreek Seeds, Alone or in Combination with Probiotics, on Growth Performance Parameters Humoral Immune Response And Gene Expression Of Gilthead Seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol*, 60, 50-58.
38. Dorman, H.J. and Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308-16.
39. Khanzadi, S., Gharibzadeh, S., Raoufy, M., Razavilar, V., Khaksar, R., and Radmehr, B. (2010). Application of artificial neural networks to predict *Clostridium botulinum* growth as a function of Zataria Multiflora essential oil, pH, NaCl, and temperature. *Journal of Food Safety*, 30, 490–5.
40. Liang, C., Mcclean, M. D., Marsit, C., Christensen, B., Peters, E., Nelson, H. H., and Kelsey, K. T. (2009). A population-based case-control study of marijuana use and head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Prevention Research*, 2, 759-768.
41. Schenkel, E. P., Gosmann, G., and Petrovick, P. R. (2003). Vegetable products and drug development. In: *Simões*, 5(2), 371-400.
42. Taiz, L., and Zeiger, E. (2008). *Bitki Fizyolojisi*. Ankara: Palme Yayıncılık, 285-292.
43. Kneen, R. (2003). Small scale and organic hops production. *Research*, 12(1), 122.

44. Yadav, H. K., Shukla, S., and Singh, S. P. (2006). Genetic variability and interrelationship among opium and its alkaloids in opium poppy (*Papaver somniferum* L.). 150, 207-214.
45. Krist, S., Stuebiger, G., Unterweger, H., Bandion, F., and Buchbauer, G. (2005). Analysis of volatile compounds and triglycerides of seed oils extracted from different poppy varieties (*Papaver somniferum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(21), 8310-8316.
46. Jabbarzadeh, Z., and Khosh-Khui, M. (2005). Factors affecting tissue culture of Damask rose (*Rosa damascena* Mill.). *Scientia horticultrae*, 105(4), 475-482.
47. Oszmianski, J., and Chomin, W. (1993). Experimental commercial manufacture of high-vitamin C cloudy juice from *Rosa rugosa* fruits. *Przemysl Fermentacyjny i Owocowo Warzywny*, 37, 16-17.
48. Zhao, G., Hou A., and Gao, F. (1988). Study on the change of vitamin c content of rose fruit during its storage and processing. *Journal of North East Forestry University*, 16(2), 102–105.
49. Jardak, M., Elloumi-Mseddi, J., Aifa, S., and Mnif, S. (2017). Chemical composition, anti-biofilm activity and potential cytotoxic effect on cancer cells of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil from Tunisia. *Lipids Health Dis*, 16(1), 190.
50. Habtemariam, S. (2016). The therapeutic potential of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) diterpenes for Alzheimer's disease. *Based Complement. Alternat. Med.*, 26(8) 04-09.
51. Hechtman, L. (2018). Clinical Naturopathic Medicine. *Elsevier Health Sciences*, 879-908.
52. Freires, I. A., Denny, C., Benso, B., De Alencar, S. M., and Rosalen, P. L. (2015). Antibacterial activity of essential oils and their isolated constituents against cariogenic bacteria: a systematic review. *Molecules*, 20(4), 7329-7358.
53. Thakur, M., Bhargava, S., and Dixit, V. K. (2007). Immunomodulatory activity of *Chlorophytum borivillianum*. *Evidence-Based complementary and alternative medicine*, 4.
54. Alasbahi, R. H., and Melzig, M. F. (2010). *Plectranthus barbatus*: a review of phytochemistry, ethnobotanical uses and pharmacology–part 2. *Planta medica*, 76(08), 753-765.
55. Kavitha, C., Rajamani, K., and Vadivel, E. (2010). *Coleus forskohlii* A comprehensive review on morphology, phytochemistry and pharmacological aspects. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(4), 278-285.
56. Lobay, D. (2015). *Rauwolfia* in the treatment of hypertension. *Integrative Medicine: A Clinician's Journal*, 14(3), 40

57. Wynn, S. G., and Fougere, B. (2006). Veterinary herbal medicine. *Elsevier Health Sciences*, 12(1), 8-9.
58. Tindle, H. A., Davis, R. B., Phillip, R. S., and Eisenberg, D. M. (2005). Alternative Therapies in Health and Medicine. *Aliso Viejo*, 11(1), 42-9.
59. Gezmen, K. M., Türközü, D., ve Topağaç, K. D. (2013). Bitkiler ve ilaç etkileşimleri. *Medeniyet Medical Journal*, 28(4), 164-170
60. Shi, S., and Klotz, U. (2012). Drug interactions with herbal medicines. *Clinical pharmacokinetics*, 51(2), 77-104.
61. Unger, M. (2010). Pharmacokinetic drug interactions by herbal drugs: Critical evaluation and clinical relevance. *Wiener medizinische Wochenschrift*, 160(21-22), 571-577.
62. Williamson, E. M. (2003). Drug interactions between herbal and prescription medicines. *Drug safety*, 26(15), 1075-1092.
63. Zhou, S., Huang, M., Xu, A., Yang, H., Duan, W., and Paxton, J. W. (2005). Prediction of herb–drug metabolic interactions: a simulation study. *Phytotherapy Research*, 19(6), 464-471.
64. Shord, S. S., Shah, K., and Lukose, A. (2009). Drug—Botanical Interactions: A Review of the Laboratory, Animal, and Human Data for 8 Common Botanicals. *Integrative cancer therapies*, 8(3), 208-227.
65. Rodríguez-Fragoso, L., Martínez-Arismendi, J. L., Orozco-Bustos, D., Reyes-Esparza, J., Torres, E., and Burchiel, S. W. (2011). Potential risks resulting from fruit/vegetable–drug interactions: effects on drug-metabolizing enzymes and drug transporters. *Journal of food science*, 76(4), R112-R124.
66. Hanley, M. J., Cancalon, P., Widmer, W. W., and Greenblatt, D. J. (2011). The effect of grapefruit juice on drug disposition. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 7(3), 267-286.
67. Kim, H., Yoon, Y. J., Shon, J. H., Cha, I. J., Shin, J. G., and Liu, K. H. (2006). Inhibitory effects of fruit juices on CYP3A activity. *Drug Metabolism and Disposition*, 34(4), 521-523.
68. Huang, Y., Jiang, B., Nuntanakorn, P., Kennelly, E. J., Shord, S., Lawal, T. O., and Mahady, G. B. (2010). Fukinolic acid derivatives and triterpene glycosides from black cohosh inhibit CYP isozymes, but are not cytotoxic to Hep-G2 cells in vitro. *Current drug safety*, 5(2), 118-124.
69. Pang, X., Cheng, J., Krausz, K. W., Guo, D. A., and Gonzalez, F. J. (2011). Pregnane X receptor-mediated induction of Cyp3a by black cohosh. *Xenobiotica*, 41(2), 112-123.
70. Gupta, R. C., Srivastava, A., and Lall, R. (Eds.). (2019). Nutraceuticals in Veterinary Medicine. *Springer*, 11(3).

71. Zhang, J., Yamada, S., Ogihara, E., Kurita, M., Banno, N., Qu, W., and Akihisa, T. (2016). Biological activities of triterpenoids and phenolic compounds from *Myrica cerifera* bark. *Chemistry & biodiversity*, 13(11), 1601-1609.
72. Yipel, M., Yipel, F. A., Tekeli, I. O., and Güzel, Y. (2017). Ethnoveterinary uses of medicinal plants in Mediterranean district, 68(2), 411-416.
73. Akkemik, Ü. (2018). Türkiye'nin Doğal-Egzotik Ağaç ve Çalıları, *İ.Ü. Orman Fakültesi Orman Botaniği Anabilim Dalı*, İstanbul, T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı Orman Genel Müdürlüğü, ISBN: 978-605-9550-14-7.
74. Zaiter, A., Becker, L., Baudelaire, E., and Dicko, A. (2018). Optimum polyphenol and triterpene contents of *Hedera helix* (L.) and *Scrophularia nodosa* (L.): The role of powder particle size. *Microchemical Journal*, 137, 168-173.
75. Rebey, I. B., Wannes, W. A., Kaab, S. B., Bourgou, S., Tounsi, M. S., Ksouri, R., and Fauconnier, M. L. (2019). Bioactive compounds and antioxidant activity of *Pimpinella anisum* L. accessions at different ripening stages. *Scientia horticulturae*, 246, 453-461.
76. Jiménez, S. (2016). *Rosa canina* Extracts Have Antiproliferative and Antioxidant Effects on Caco-2 Human Colon Cancer. *Journals*, 11(7).
77. Heywood, V.H., Brummit, R.K., Culham, A., and Seberg, O. (2007). Flowering Plants Families of The World. *Firefly Books*, New York, 280-283.
78. İnternet: TÜBİVES. (2012). *Rosa canina* L., URL: <https://http://194.27.225.161/yasin/tubives/index.php?sayfa=dizin&cins=Rosa>, Son Erişim Tarihi: 01.03.2022.
79. Hummer, K. E., and Janick, J. (2009). Rosaceae: taxonomy, economic importance, genomics. *Genetics and genomics of Rosaceae*, 1-17.
80. Anşın, R. (1996). Karadeniz bölgesinde doğal olarak yetişen *Rosa* L. taksonları. *Kuşburnu Sempozyumu, Bildiriler Kitabı*, 85-95.
81. Kultur, S. (2004). A new *Rosa* species for European flora. *Istanbul Journal of Pharmacy*, 37, 75-83.
82. Kazaz, S., Baydar, H., ve Erbas, S. (2009). Variations in chemical compositions of *Rosa damascena* Mill. and *Rosa canina* L. Fruits. *Czech journal of food sciences*, 27 (3), 178-184.
83. Chrubasik, C., Roufogalis, B.D., MüllerLadner, U., and Chrubasik, S. (2008). A systematic review on the *Rosa canina* effect and efficacy profiles. *Phytotherapy research*, 22 (6), 725-733.
84. Guimaraes, R., Barros, L., Carvalho, A.M., and Ferreira, I.C. (2010). Studies on chemical constituents and bioactivity of *Rosa micrantha*: An alternative antioxidants source for food, pharmaceutical, or cosmetic applications. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58, 6277–6284.

85. Nakamura, Y., Watanabe, S., Miyake, N., Kohno, H., and Osawa, T. (2003). Dihydrochalcones: evaluation as novel radical scavenging antioxidants. *Journal agriculture food chemistry*, 51, 3309–3312.
86. Gao, X., Björk, L., Trajkovski, V., and Uggla, M. (2000). Evaluation of antioxidant activities of rosehip ethanol extracts in different test systems. *Journal science food agricultural*, 80, 2021–2027.
87. Hvattum, E. (2002). Determination of phenolic compounds in rose hip (*Rosa canina*) using liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry and diode-array detection. *Rapid commun mass spectrom*, 16, 655–662.
88. Montazeri, N., Baher, E., Mirzajani, F., Barami, Z., and Yousefian, S. (2011). Phytochemical contents and biological activities of *Rosa canina* L. fruit. *Journal of medicinal plants research*, 5(18), 4584–4589.
89. Hosni, K., Zahed, N., Chrif, R., Abid, I., Medfei, W., Kallel, M., and Sebei, H. (2010). Composition of peel essential oils from four selected Tunisian Citrus species. *Food chemistry*, 123 (4), 1098–1104.
90. Stanila, A. (2015). Extraction and characterization of phenolic compounds from Rose hip. *Notulae botanicae horti agrobotanici*, 43 (2), 349.
91. Nadpal, J. D., Lesjak, M. M., Sibul, F. S., Anackov, G. T., Cetojevic-Simin, D. D., Mimica-Dukic, N. M., and Beara, I. N. (2016). Comparative study of biological activities and phytochemical composition of two rose hips and their preserves. *Food chemistry*, 192, 907–914.
92. Ouerghemmi, S., Sebei, H., Siracusa, L., Ruberto, G., Saija, A., Cimino, F., and Cristani, M. (2016). Comparative study of phenolic composition and antioxidant activity of leaf extracts from three wild *Rosa* species grown in different tunisia regions. *Industrial Crops and Products*, 94, 167–177.
93. Saaby, L., Jager, A.K., Moesby, L., Hansen, E.W., and Christensen, S.B. (2011). Isolation of immunomodulatory triterpene acids from a standardized rose hip powder (*Rosa canina* L.). *Phytotherapy Research*, 25 (2), 195–201.
94. Chen, F.Z., Peng, S.L., Ding, L.S., He, Y.H., and Wang, M. K. (2001). Chemical Constituents from fruits of *Rosa davidii*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 43, 101–104.
95. Ropciuc, S., Cenuşa, R., Capriţa, R., and Creţescu, I. (2011). Study on the ascorbic acid content of rose hip fruit depending on stationary conditions. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 44, 129–132.
96. Ferreira, C.A. (2009). High-dose aprotinin does not affect troponin I, N-Terminal pro-B-type natriuretic peptid and renal function in children submitted to surgical correction with extracorporeal circulation. *Rev Bras Cir Cardiovasc*, 24(4), 519–32.

97. Lhassani, M., Chavignon, O., Chezal, J. M, Teulade, J. C, Chapat, J. P, Snoeck, R., Andrei, G., Balzarini, J., De Clerq, E., and Gueffier, A. (1999). Synthesis and antiviral activity of imidazol [1,2-a] pyridines. *Euorope Journal of Medicinal Chemistry*, 271-274.
98. Kunwar, A. (2012). Dimethoxycurcumin-induced cell death in human breast carcinoma MCF7 cells: evidence for pro-oxidant activity, mitochondrial dysfunction, and apoptosis. *Arch Toxicol*, 86(4), 603-14.
99. Boots, A. W., Haenen, G. R., and Bast, A. (2008). Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *European journal of pharmacology*, 585(2-3), 325-337.
100. Powere, S. K., and Jackson, M. J. (2008). Exercise induced oxidative stress: cellular mechanism and impact on muscle force production. *Physiological Reviews*, 88,1243-76.
101. Diplock, A. (1998). Healty lifestyles nutrition and physical activity. *Antioxidant nutrients*, 59.
102. Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., and Deemer, E. K. (2002). Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. *Journal of Agricultur Food Chemistry*, 50(11), 3122-3128.
103. Okcu, Z., ve Keleş, F. (2009). Kalp damar hastalıkları ve antioksidanlar. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 40(1), 153-160.
104. Stanner, S. A., Hughes, J., Kelly, C. N. M., and Buttriss, J. (2003). A review of the epidemiological evidence for the antioxidant hypothesis. *Public Health Nutrition*, 7(3), 407–422.
105. Yinrog, L., and Foo, L. Y. (2000). Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food Chemistry*, 68(2000), 81-85.
106. Ayaz, E., ve Alpsoy, H. C. (2007). Sarımsak (*Allium sativum*) ve geleneksel tedavide kullanımı. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 31(2), 145-149.
107. Cherubini, A., Ruggiero, C., Polidori, M.C., and Mecocci, C. (2005). Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radical Biology & Medicine*, 39: 841 – 852.
108. Ajuwon, O. R., Marnewick, J. L., and Davids, L. M. (2015). Rooibos (*Aspalathus linearis*) ve başlıca flavonoidlerin oksidatif stres kaynaklı koşullara karşı potansiyelleri. *Oksidatif Stresin Temel İlkeleri ve Klinik Önemi*, 171.
109. Pradedova, E. V., Isheeva, O. D., and Salyaev, R. K. (2010). Classification of the antioxidant defense system as the ground for reasonable organization of experimental studies of the oxidative stress in plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 58 (2), 210-217.

110. Pellegrini, N., Miglio, C., and Del-Rio, D. (2009). Effect of domestic cooking methods on the total antioxidant capacity of vegetables. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(2), 12–22.
111. Yılmaz, İ. (2010). Antioksidan içeren bazı gıdalar ve oksidatif stres. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 17(2), 143-153.
112. Giovannucci, E., Rimm, E. B., Liu, Y., J. Walter, S., and Willett, C. (2002). A prospective study of tomato products, lycopene, and prostate cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*, 94(5), 391-398.
113. Singh, M., Shrivastava, D., and Kale, R. (2012). Antioxidant Enzyme. *El-Missiry, M. A. (Editors.)*, 12-330.
114. Perry, R. P., Stupnisky, R. H., Hall, N. C., Chipperfield, J. G., and Weiner, B. (2010). Attributional retraining and initial performance in competitive achievement settings. *Journal of Social and Clinical Psychology*, 29(6), 668-700.
115. Hayes, J. D., Flanagan, J. U., and Jowsey, I. R. (2005). Glutathione transferases. *Pharmacology and Toxicology* 45, 51-88.
116. Kavas, C. (2008). *Kurşun aracılı doku hasarında flavonoidlerin rolü*, Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 5.
117. Cahill, L., Fontaine, B., and El-Sohemy, A. (2009). Functional genetic variant of glutathione S- transferase protects against ascorbic acid deficiency. *American. Journal of Clinical Nutrition*, 90(5), 1411-17.
118. Reische, D. W., Lillard, D. A., and Eitenmiller, R. R. (2002). *Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology*. Akoh, C. C, Min, D. B. (Editors). New York, 335-542.
119. Johnston, C. S., and Bowling, D. L. (2012). Stability of ascorbic acid in commercially available orange juices. *Journal of American Dietetic Association*, 102(4), 525-9.
120. Yavaşer, R. (2011). *Doğal ve sentetik antioksidan bileşiklerin antioksidan kapasitelerinin karşılaştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
121. Penniston, K. L., and Tanumihardjo, S. A. (2006). The acute and chronic toxic effects of vitamin A. *American. Journal of Clinical Nutrition*, 83(2), 191-201.
122. Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., and Tattini, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant science*, 196, 67-76.
123. Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63(7), 1035-1042.
124. Chen, T., Li, J., Chen, J., Song, H., and Yang, C. (2015). Anti-hyperplasia effects of *Rosa rugosa* polyphenols in rats with hyperplasia of mammary gland. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 39 (2) 990-996.

125. Serafini, M., Peluso, I., and Raguzzini, A. (2010). Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proceedings of the Nutrition Society*, 69, 273-278.
126. Grotewold, E. (2006). The Science of Flavonoids. *Springer Science*, 1-47.
127. Aydın, S. A., ve Üstün, F. (2007). Tanenlerin kimyasal yapıları, farmakolojik etkileri, analiz yöntemleri. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 33(1), 21-31.
128. Giardi, M. T., Rea, G., and Berra, B. (2010). Bio-Farms for Nutraceuticals Functional Food and Safety Control by Biosensors. *Springer Science*, 52-67.
129. Falandysz, J. (2008). Selenium in edible mushrooms. *Journal of Environmental Science and Health Part C*, 26(3), 256-299.
130. Caylak, E. (2011). Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 9(1), 73-83.
131. Uğuzlar, H. (2009). *Antalya'da yetişen Araceae arum'un antioksidan aktivitesi ve toplam fenolik madde tayini*, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
132. Rao, G. M., Rao, A.V., Raja, A., Rao, S., and Rao, A. (2000). Role of antioxidant enzymes in brain tumours. *Clinica Chimica Acta*, 296, 203-212.
133. Chang, D. K., Goel, A., Ricciardiello, L., Lee, D. H., Chang, C. L., Carethers, J. M., and Boland, C. R. (2003). Effect of H₂O₂ on cell cycle and survival in DNA mismatch repair-deficient and -proficient cell lines. *Cancer Letters*, 195, 243-251.
134. Gardes-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., and Jore, D. (2003). Reactive oxygen species, How oxygen may become toxic?. *Actualite Chimique*, 11-12, 91-96.
135. Bayrakcı, M., ve Yılmaz, B. (2019). DNA ile bağlanabilen suda çözünür sülfonato kaliks [8] aren sentezi ve antimikrobiyal aktivitesi synthesis and antimicrobial activity of water-soluble sulfonato calix [8] aren binding with DNA. *Ömer Halisdemir Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 8(1), 615-620.
136. Alotaibi, S. H., and Momen, A. A. (2020). Anticancer Drugs' Deoxyribonucleic Acid. *Biophysical Chemistry Advance Applications*, 1064-1088.
137. Yılmaz, B. (2021). Spektroskopik Teknikler Kullanılarak Furosemid ile DNA Etkileşimlerinin İncelenmesi. *Araştırma Makalesi*, 10(2), 325-331.
138. Sadav, D., Hillis, D. M., Heller, H. C., and Berenbaum, M. R. (2014). *Yaşam Bilimi Biyoloji* (C. 1).
139. Sirajuddin, M., Ali, S., and Badshah, A. (2013). Drug-DNA Interactions and Their Study by UV-Visible, Fluorescence Spectroscopies and Cyclic Voltametry. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 124, 1-19.

140. İnternet: Shaikh, S., and Jayaram, B. (January, 2006). DNA Drug Interaction. URL: <http://www.scfbio-iitd.res.in/doc/preddicta.pdf>, Son Erişim Tarihi:03.02.22.
141. Rehman, S., Sarwar, T., Husain, M., Ishqi, H., and Tabish, M. (2015). Studying Non-Covalent Drug–DNA Interactions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 576, 49–60.
142. Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., ... Walter, P. (2019). *Essential Cell Biology*
143. Muti, M., and Muti, M. (2018). Electrochemical Monitoring of the Interaction Between Anticancer Drug and DNA in the Presence of Antioxidant. *Talanta*, 178, 1033-1039.
144. Robertson, R., and Harmon, J. (2006). A case of double jeopardy for the pancreatic islet beta cell. *Free Radical Biology and Medicine*, 41(2), 177-184.
145. Malek, M. (2010). *Tıp 2 diyabetli hastalara verilen beslenme eğitiminin beslenme bilgi ve alışkanlıkları üzerine etkisinin incelenmesi*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 159.
146. Özbalıkçı, G. (2011). *Tarçının (Cinnamomum sp.) Bazı biyokimyasal parametreler üzerine etkisi*, Yüksek Lisans Projesi, K.K.T.C Yakın Doğu üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Lefkoşa, 69.
147. Ekim, A. (2007). *Tıp 1 Diyabetli Çocukların Yaş Dönemlerine Göre İnsülin Uygulama Becerileri*, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
148. Tuchman, A. (2009). Diabetes and the public's health. *The Lancet*, 374(9696), 1140–1.
149. İnternet: Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF). (2022, Mayıs 5). URL: <http://www.diabetesatlas.org/component/attachments.html?id=254&task=download>, Erişim tarihi: 01.03.22.
150. İnternet: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization) WHO. (2022, Mayıs 5). URL: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204871/9789241565257_eng.pdf;jsessionid=A80706B831A03A7F77CCCF7752BB56E6?sequence=1, Erişim tarihi: 01.03.22.
151. İnternet: World Diabetes Federation WDF. (2022, Mayıs 5). URL:<http://www.worlddiabetesfoundation.org/>, Erişim tarihi: 06.03.22.
152. Saeedi, P., Petersohn, I., Salpea, P., Malanda, B., Karuranga, S., and Unwin, N. (2019). Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 157:107843.
153. Uluslararası Diyabet Federasyonu. (2019). *Diabetes Atlas*.

154. Sembulingam, K., and Sembulingam, P. (2012). Endocrine functions of pancreas. *Essential medical physiology*, 415–24.
155. Barret, K. E., Barman, S. M., Boitano, S., and Brooks, H. L. (2012). Endocrine funtions of the pancreas regulation of carbohydrate metabolism. *Ganong's review's of medical physiology*, 431–50.
156. Barrett, K. E., Barman, S., Susan, M., Brooks, H. L., and Yuan, J. X. J. (2019). Regulation of Insulin Secretion. Glucagon. *Ganong's Review of Medical Physiology*, 433-437.
157. Koolman, J., and Roehm, K. H. (2005). Color atlas of biochemistry. *Second Edition*, 161-234.
158. Baz, H. (2014). *Streptozotocinle indüklenen diyabetli ratlar üzerinde myrtus communis l. yaprağı su ekstresi etkilerinin araştırılması*, Yüksek Lisans tezi, Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 136.
159. Campbell, (2009). Beta Cell Biology Consortium, Chapter 4: Amino Acids, Peptides, and Proteins, 150-155.
160. Guinamard, R., Demion, M., and Launay, P. (2010). Physiological roles of the TRPM4 channel extracted from background currents. *Physiology*, 25(3), 155- 164.
161. LEHNINGER, (2008). Principles of Biochemistry, Chapter 3: Amino Acids, Peptides, and Proteins, 84-95.
162. Hazman, Ö. (2011). *Oral antidiyabetik ilaç sitagliptin'in oksidan-antioksidan denge üzerine etkisinin deneysel tip 2 diyabet modeli oluşturulan ratlarda araştırılması*, Doktora Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Afyon, 125.
163. Türk Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği (TEMED), (2020). Diabetes Mellitus Çalışma ve Eğitim Grubu, Diabetes Mellitus ve Komplikasyonları Tanı, Tedavi ve İzlem Kılavuzu. (8. baskı).
164. Skyler, J. S., Bakris, G. L., Bonifacio, E., Darsow, T., Eckel, R. H., Groop, L., and Mathieu, C. (2017). Differentiation of diabetes by pathophysiology, natural history, and prognosis. *Diabetes*, 66(2), 241-255.
165. Harreiter, J., and Roden, M. (2019). Diabetes mellitus—definition, klassifikation, diagnose, screening und prävention. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 131(1), 6-15.
166. Türkiye Endokrinoloji ve Metablizma Derneği, (2020). Diabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Kılavuzu.
167. American Diabetes Association, (2020). Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes. 14–31
168. DiMeglio, L. A., Evans, M. C., and Oram, R. A. (2018). Type 1 diabetes. *The Lancet*. 2449–62.

169. Blanco, A., and Blanco, G. (2016). Biochemical Bases of Endocrinology (II) Hormones and Other Chemical Intermediates: Medical Biochemistry, Ed:Versteeg-Buschman, L. *Academic Press*, 605-611
170. Goyal, A., Gupta, Y., Singla, R., Kalra, S., and Tandon, N. (2020). American Diabetes Association “Standards of Medical Care—2020 for Gestational Diabetes Mellitus”: A Critical Appraisal. *Diabetes Therapy*, 11(8), 1639-1644.
171. American Diabetes Association. (2019). Glycemic targets: standards of medical care in diabetes 2019. *Diabetes Care*, 42(1), 61-S70.
172. Uygur, M. M., ve Doğan, G. Y. (2017). Diyabet Tanısı ve Sınıflandırılması. *Türkiye Klinikleri J Nutr Diet-Special Topics*, 3(3), 120-129.
173. Association, A. D. (2015). Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes care*, 38(1), S8-S16.
174. Selvin, E., Crainiceanu, C. M., Brancati, F. L., and Coresh, J. (2007). Short-term variability in measures of glycemia and implications for the classification of diabetes. *Archives of internal medicine*, 167(14), 1545-1551.
175. Şahin, E. ve Öncel, M. (2014). Diyabet tanı ve takibinde geleneksel ve yeni biyokimyasal belirteçler. *Eur J Basic Med Sci*, 4 (3), 66-73.
176. Öztürk, Z. (2018). Diabetes, oxidative stress and endothelial dysfunction. *Bezmialem Science*, 21-45.
177. Schafer, Q. F., Spitz, D. R., and Domann, F. E. (2001). Streptozotocin, free radicals in biology and medicine. 342 (1), 63-64.
178. Ganda, O.P., Rossini, A.A., and Like, A.A. (1976). Studies on streptozotocin diabetes. *Diabetes*. 25(7):595-603.
179. Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res*, 50(6):537-546.
180. Schnedl, W.J., Ferber, S., Johnson, J.H., and Newgard, C.B. (1994). STZ transport and cytotoxicity: specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes*, 43(11):1326-1333.
181. Yamamoto, H., Uchigata, Y., and Okamoto, H. (1981). Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly (ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature*. 294(5838), 284-286.
182. Uchigata, Y., Yamamoto, H., Kawamura, A., and Okamoto H. (1982). Protection by superoxide dismutase, catalase, and poly (ADP-ribose) synthetase inhibitors against alloxan- and streptozotocin-induced islet DNA strand breaks and against the inhibition of proinsulin synthesis. *J Biol Chem*, 257(11), 6084-6088.
183. Streptozotocin K- Streptozotocin. (2015). *A Diabetogenic Agent in Animal Models*, 1.

184. Katsumata, K., Katsumata, K., and Katsumata, Y. (1992). Protective effect of diltiazem hydrochloride on the occurrence of alloxan- or streptozotocin-induced diabetes in rats. *Horm Metab Res.* 24(11), 508-510.
185. Patel, R., Shervington, A., Pariente, J. A., MARTINEZ-BURGOS, M. A., Salido, G. M., Adeghate, E., and Singh, J. (2006). Mechanism of exocrine pancreatic insufficiency in streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1084(1), 71-88.
186. Valentovic, M. A., Alejandro, N., Carpenter, A. B., Brown, P. I., and Ramos, K. (2006). Streptozotocin (STZ) diabetes enhances benzo (α) pyrene induced renal injury in sprague dawley rats. *Toxicology Letters*, 164(3), 214-220.
187. Zhang, K., and Kaufman, R. J. (2008). From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature*, 454(7203), 455.
188. Thatcher, S. A. (2015). DNA/RNA preparation for molecular detection. *Clinical Chemistry*, 61(1), 89-99.
189. Lazo, M.L., and Fernandez, M. C. (2013). Oxidative stress in diabetes mellitus and the role of vitamins with antioxidant actions. *In Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases-A Role for Antioxidants*, 4(7).
190. Martens, G.A., Cai, Y., Hinke, S., Stange, G., Van, C. M., and Pipeleers, D. (2005). Glucose suppresses superoxide generation in metabolically responsive pancreatic β cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(21), 20389- 20396.
191. Hou, N., Torii, S., Saito, N., Hosaka, M., Takeuchi, T. (2008). Reactive oxygen species-mediated pancreatic β -cell death is regulated by interactions between stress-activated protein kinases, p38 and c-Jun N-terminal kinase, and mitogen- activated protein kinase phosphatases. *Endocrinology*, 149(4), 1654-1665.
192. Al Rowais, N. (2002). Herbal medicine in the treatment of diabetes mellitus. *Saudi Med J*, 23(11), 1327-31.
193. Huseini, F., Larijani, B., and Shikh Samani A. (2006). Review of antidiabetic medicinal plant used in traditional medicine. *J Med Plants*, 1(17), 1-8.
194. Fattahi, A., Niyazi, F., Shahbazi, B., Farzaei, M.H., and Bahrami, G. (2017). Antidiabetic mechanisms of Rosa canina fruits. *Journal of Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 22, 127-133.
195. Singh, S. (2011). The genetics of type 2 diabetes mellitus: a review. *Journal of Scientific Research*, 55, 35-48.
196. Brunetti, A., Chiefari, E. and Foti, D. (2014). Recent advances in the molecular genetics of type 2 diabetes mellitus. *World Journal of Diabetes*, 5(2), 128-140.
197. Inzucchi, S. E. (2009). Diabetes mellitus el kitabı. Demiriz, I. Ş., ve Demiriz, B. (Editors). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 26-75.

198. Anusree, S. S. (2018). Insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes by TNF- α is improved by puniceic acid through upregulation of insulin signalling pathway and endocrine function, and downregulation of proinflammatory cytokines. *Biochimie*, 146, 79-86.
199. Holbrook, J., Lara-Reyna, S., Jarosz-Griffiths, H., and McDermott, M. F. (2019). Tumour necrosis factor signalling in health and disease. *Research*, 8.
200. Richter, F., Zettlitz, K. A., Seifert, O., Herrmann, A., Scheurich, P., and Pfizenmaier K. (2019). Monovalent TNF receptor 1-selective antibody with improved affinity and neutralizing activity. *Mabs*.
201. Sharif, P. M., Jabbari, P., Razi, S., Keshavarz-Fathi, M., and Rezaei, N. (2020). Importance of TNF- α and its alterations in the development of cancers. *Cytokine*, 130(155066).
202. Fernández-Ruiz, M., and Aguado, J. M. (2018). Risk of infection associated with anti-TNF- α therapy. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 16(12), 939-56.
203. Nekoua, M. P. (2016). Modulation of immune cells and Th1/Th2 cytokines in insulin-treated type 2 diabetes mellitus. *Afr Health Sci*, 16(3), 712-724.
204. Eissner, G., Kolch, W., and Scheurich, P. (2001). Ligands working as receptors: reverse signaling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system. *Cytokine & growth factor reviews*. 15(5), 353-66.
205. Rothe, J., Lesslauer, W., Lötscher, H, Lang, Y., Koebel. P., Köntgen, F. (1993). Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to IMF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature*, 364(6440), 798-802.
206. Lin, R. H., Hwang, Y. W., Yang, B. C., and Lin, C. S. (1997). TNF receptor-2-triggered apoptosis is associated with the down-regulation of Bcl-xL on activated T cells and can be prevented by CD28 costimulation. *The Journal of Immunology*, 158(2), 598-603.
207. Bradley, J. (2008). TNF-mediated inflammatory disease. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*. 214(2), 149-60.
208. Popa. C., Netea, M. G., Van, R. P. L., Van, D. M. J. W., and Stalenhoef, A. F. (2007). The role of TNF- α in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *Journal of lipid research*, 48(4), 751-62.
209. Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S., and Spiegelman, B. M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 259(5091), 87-91.
210. Asirvatham, A., William, J., and Thomas, B. (2009). miRNA regulation of cytokine genes. *Cytokine*, 45(2), 58-69.

211. Abtahi, S. (2015). "IL-1A rs1800587, IL-1B rs1143634 and IL-1R1 rs2234650". *Genes*, 12(1).
212. Graves, D.T. and Cochran, D. (2003). The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*, 74(3), 391- 401.
213. Chung, Y., Chang, S. H., Martinez, G. J., Yang, X. O., Nurieva, R., Kang, H. S., and Dong, C. (2009). Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity*, 30(4), 576-587.
214. Chen, C. C., Chang, K. L., Huang, J. F., Huang, J. S., and Tsai, C. C. (1997). Correlation of interleukin-1 beta, interleukin-6, and periodontitis. *Kaohsiung J Med Sci*, 13(10), 609-617.
215. Jacques, C., Gosset, M., Berenbaum, F., and Gabay, C. (2006). The role of IL-1 and IL-1Ra in joint inflammation and cartilage degradation. *Vitam Horm*, 74, 371-403.
216. Oduncuoglu, B. F. (2018). Effects of a cyclic NSAID regimen on levels of gingival crevicular fluid prostaglandin E2 and Interleukin-1beta: A 6-month randomized controlled clinical trial. *Niger J Clin Pract*, 21(5), 658-666.
217. Cheng, R. (2020). Interleukin-1beta is a potential therapeutic target for periodontitis: a narrative review. *Int J Oral*, 12(1), 2.
218. Buckingham, L. (2019). Molecular diagnostics: fundamentals, methods and clinical applications. *F.A. Davis Company*, 125-138.
219. Vomelova, I., Vaníčková, Z., and Sedo, A. (2009). Technical note methods of RNA purification. *Folia Biologica*, 55, 243-251.
220. Nolan, T., and Bustin, S. (2008). Procedures for quality control of RNA samples for use in quantitative reverse transcription PCR. In J.T. Kerr and L. Birch (Editors). *Essentials of nucleic acid analysis: a robust approach*, Cambridge: RSC Publishing, 189-207.
221. Becker, C., Hammerle-Fickinger, A., Riedmaier, I., and Pfaffl, M. (2010). mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. *Methods*, 50(4), 237-243.
222. Okutucu, B., ve Pehlivan, S. (2003). Reverz-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ve Uygulama Alanları. *Kaynak Tarama Dergisi*, 12(2), 138-148.
223. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487-491.
224. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 263-273.

225. Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., and Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, 11(9), 1026-1030
226. Gibson, U. E., Heid, C. A., and Williams, P. M. (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research*, 6(10), 995-1001.
227. Caplin, B., Rasmussen, R., Bernard, P., and Wittwer, C. (1999). Lightcycler™ hybridization probes- the most direct way to monitor PCR amplification and mutation detection. *Biochemica*, 1, 5-8.
228. Günel, T. (2007). Gen Anlatımının Kantitatif Analizi “Real-Time PCR”. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 27, 763-764.
229. McChlery, S. M., and Clarke, S. C. (2003). The use of hydrolysis and hairpin probes in real-time PCR. *Molecular Biotechnology*, 25(3), 267-273.
230. Furman, B.L. (2015). Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr Protoc Pharmacol*, 5 (47), 1-20.
231. Schmittgen, T. D. (2001). Real-time quantitative PCR. *Methods*, 25(4), 383-385
232. Khodadadi, S., and Nasri, H. (2017). An update on ellagic acid as a natural powerful flavonoid. *Annals of Research in Antioxidants*, 2(2), 02.
233. Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *Methods*, 25(4), 402-408.
234. Imran, M., Salehi, B., Sharifi-Rad, J., Gondal, T.A., Imran, A., Shahbaz, M., Fokou, P.V.T., Arshad, M.U., Khan, H., Guerreiro, S.G., Martins, N., and Estevinho, L.M. (2019). Kaempferol: A Key Emphasis to Its Anticancer Potential. *Molecules*, 24(12), 2277
235. Agourram, A., Ghirardello, D., Rantsiou, K., Zeppa, G., Belviso, S., Romane, A. and Giordano, M. (2013). Phenolic content, antioxidant potential, and antimicrobial activities of fruit and vegetable by-product extracts. *International journal of food properties*, 16(5), 1092-1104.
236. Murathan, Z. T. (2016). Characterization of bioactive compounds in rosehip species from East Anatolia region of Turkey. *Italian Journal of Food Science*, 28 (2), 314-325.
237. Yassa, N., Masoomi, F., Rohani- Rankouhi, S.E., and Hadjiakhoondi, A. (2009). Chemical Composition and Antioxidant Activity of the Extract and Essential oil of *Rosa damascena*. *Population of Guilan*, 17(3), 175-180.
238. Lv, X., Cong, Z., Liu, Z., Ma, X., Xu, M., Tian, Y., and Tang, Z. (2018). Improvement of the solubility, photostability, antioxidant activity and UVB photoprotection of trans-resveratrol by essential oil based microemulsions for topical application. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 48, 346-354

239. Downs, C. A., Esti, K. W., Roee, S., John, F., Sean, K., Omri, B., Frederic, R., Ciner., Rina, J., Yona, L., Cheryl, M., Paul, P., Kelli, C., Ariel, K., and Yossi, L. (2015). Toxicopathological Effects of the Sunscreen UV Filter, Oxybenzone (Benzophenone-3), on Coral Planulae and Cultured Primary Cells and Its Environmental Contamination in Hawaii and the U.S. *Virgin Islands, Arch Environ Contam Toxicol*, 70: 265–288
240. Zachary, R. H., Sebastian, S., and Lee, B. (2017). Ozonation of the oxybenzone, octinoxate, and octocrylene UV-filters: Reaction kinetics, absorbance characteristics, and transformation products. *Journal of Hazardous Materials*, 338 23–32.
241. Kristiansson, A., Bergwik, J., Alattar, A. G., Flygare, J., Gram, M., Hansson, S. R., and Åkerström, B. (2020). Human radical scavenger α 1-microglobulin protects against hemolysis in vitro and α 1-microglobulin knockout mice exhibit a macrocytic anemia phenotype. *Free Radical Biology and Medicine*, 12(1).
242. Hmidani, A., Ajbli, M., Khouya, T., Benlyas, M., and Alem, C. (2021). In vitro investigation of antioxidant and antihemolytic activities of three Lamiaceae species from Morocco. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 10(1), 1-8.
243. Ivanisova, E., Tokar, M., Mocko, K., Bojnanska, T., Marecek, J., Mendelova, A. (2021). Antioxidant activity of selected plant products. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 1692-1703
244. Taira, J., Tsuchida, E., Katoh, M. C., Uehara, M., and Ogi, T. (2015). Antioxidant capacity of betacyanins as radical scavengers for peroxy radical and nitric oxide. *Food Chemistry*, 166, 531-536.
245. Navanesan, S., Wahab, N. A., Manickam, S., and Sim, K. S. (2015). Evaluation of selected biological capacities of *Baekea frutescens*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1),186.
246. Dalar, A., Dogan, A., Bengu, A. S., ve Mukemre, M., Celik, I. (2018). Screening in vivo antioxidant and haematological properties of sumac and acorn bioactive rich extracts. *Industrial Crops and Products*, 124, 20-27.
247. Li, Z., Geng, Y., Jiang, J., and Kong, W. (2014). Antioxidant and anti-inflammatory activities of berberine in the treatment of diabetes mellitus. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 289-264
248. Bisla, G., Choudhary, S., and Chaudhary, V. (2014). Evaluation of the nutritive and organoleptic values of food products developed by incorporated *Catharanthus roseus* (Sadabahar) fresh leaves explore their hypoglycemic potential. *The Scientific World Journal*, 3.
249. Jayaraman, R., Shivakumar, A., Anitha, T., Joshi, V.D., and Palei, N. N. (2009). Antidiabetic effect of petroleum ether extract of *Citrullus colocynthis* fruits against streptozotocin-induced hyperglycemic rats. *Rom J Biol Plant Biol*, 54(2), 127-34.

250. Vannucchi, H., Araujo, W., Bernardes, M., and Jordao, R. A. (1998). Effect of different vitamin E levels on lipid peroxidation in streptozotocin-diabetic rats. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 64(4), 250-254.
251. Rasineni, K., Bellamkonda, R., Singareddy, S. R., and Desireddy, S. (2013). Antihyperglycemic activity of *Catharanthus roseus* leaf powder in streptozotocin induced diabetic rats. *Pharmacognosy research*, 2(3), 195.
252. Rahbani, M., Mohajeri, D., Rezaie, A., and Nazeri, M. (2012). Protective effect of ethanolic extract of saffron (dried stigmas of *Crocus sativus* L.) on hepatic tissue injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Animal Veterinary Advances*, 11, 1985- 1994.
253. Samarghandian, S., Azimi, N. M., and Samini, F. (2014). Ameliorative effect of saffron aqueous extract on hyperglycemia, hyperlipidemia, and oxidative stress on diabetic encephalopathy in streptozotocin induced experimental diabetes mellitus. *BioMed Research International*, 857-920.
254. Khajebishak, Y., Payahoo, L., Hamishehkar, H., Alivand, M., Alipour, M., and Solhi M. (2019). Effect of pomegranate seed oil on the expression of PPAR-c and pro-inflammatory biomarkers in obese type 2 diabetic patients. *Nutr Food Sci*, 49 (5), 854-65.
255. Şendoğdu, N., Aslan, M., Deliorman, O. D., Ergun, F. ve Yeşilada, E. (2006). Antidiabetic and antioxidant effects of *Vitis vinifera* L. leaves in streptozotocin-diabetic rats. *Turkish J. Pharm*, 3(1), 7-18.
256. Al-Shaqha, W. M., Khan, M., Salam, N., Azzi, A., and Chaudhary, A. A. (2015). Anti-diabetic potential of *Catharanthus roseus* Linn. and its effect on the glucose transport gene (GLUT-2 and GLUT-4) in streptozotocin induced diabetic wistar rats. *BMC complementary and alternative medicine*, 15(1), 379
257. Wahjuni, S., Santi, S. R., and Gunawan, A. N. (2014). Supplementation of *Cantharanthus Roseus* Leaf Extract as Anti-Inflammatory Substance to Hypercholesterolemic Wistar Derived-Rats. *Pure and Applied Chemical Sciences*, 3(2), 22.
258. Ashrafi, M., Afsar, Z., Erjae, H., and Nazifi, S. (2018). The Effects of Saffron (*Crocus sativus*) Aqueous Extract on TNF- α Levels in Liver, Kidney, and Lens Tissues of Diabetic Rat. *Turkish Journal of Endocrinology and Metabolism*, 22, 217-224.
259. Fukuhara, A. (2005). Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science*, 307(5708), 426-30.
260. Li, J. (2019). Acute pancreatic beta cell apoptosis by IL-1 β is responsible for postburn hyperglycemia: Evidence from humans and mice. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1865(2), 275-284.



GAZİ GELECEKTİR..