



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

FRUKTOZ ve STREPTOZOTOCİN ile OLUŞTURULAN DİYABETİK SIÇAN
MODELİNDE RESVERATROLÜN KARACİĞER HASARI ve FERROPTOZ
ÜZERİNE ETKİLERİ

Mahsa HOSEINI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ali Nur Turgut ULUTİN
II. DANIŞMAN
Doç. Dr. Fatma KAYA DAĞISTANLI

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tıbbi Biyoloji, Tezli Yüksek Lisans Programı

Ağustos, 2024

TEZ KABUL VE ONAYI

Mahsa HOSEINI tarafından, Prof. Dr. ALİ NUR TURGUT ULUTİN danışmanlığında hazırlanan " FRUKTOZ ve STREPTOZOTOCİN ile OLUŞTURULAN DİYABETİK SIÇAN MODELİNDE RESVERATROLÜN KARACİĞER HASARI ve FERROPTOZ ÜZERİNE ETKİLERİ " başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 09/08/2024 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

	İmza	Sonuç
DANIŞMAN	Prof. Dr. Ali Nur Turgut ULUTİN	<input type="checkbox"/> Kabul
	İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	<input type="checkbox"/> Ret
II. DANIŞMAN	Doç. Dr. Fatma KAYA DAĞISTANLI	<input type="checkbox"/> Kabul
	İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	<input type="checkbox"/> Ret
ÜYE	Prof. Dr. Melek ÖZTÜRK SEZGİN	<input type="checkbox"/> Kabul
	İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	<input type="checkbox"/> Ret
ÜYE	Prof. Dr. Gamze TANRIVERDİ	<input type="checkbox"/> Kabul
		<input type="checkbox"/> Ret

	İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	
ÜYE	Doç. Dr. Bilge ŞADAN SELÇUK İstanbul Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	<input type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
ÜYE (YEDEK)	Prof. Dr. Sibel KÖKTÜRK İstanbul Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	<input type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
ÜYE (YEDEK)	Doç. Dr. Onur BAYKARA İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	<input type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret

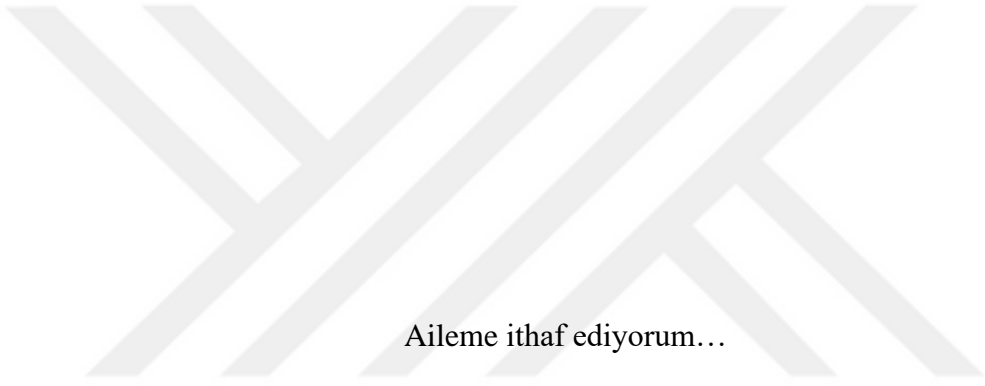
BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve bilimsel etik kuralları içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve her türlü hukuki sorumluluğu aldığımı kabul ederim.

Mahsa HOSEINI

(İmza)





Aileme ithaf ediyorum...

BÜTÇE DESTEKLERİ

FRUKTOZ ve STREPTOZOTOCİN ile OLUŞTURULAN DİYABETİK SIÇAN MODELİNDE RESVERATROLÜN KARACİĞER HASARI ve FERROPTOZ ÜZERİNE ETKİLERİ

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (proje numarası: 37417) ve Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK, proje numarası: 124S443) tarafından desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bana destek olan birinci danışmanım ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı, Sayın Prof. Dr. Ali Nur Turgut ULUTİN'e,

Tezimin tüm aşamalarında bana bilimsel ve manevi destek olan, sabır ve azmi ile tüm sorunlarda yanımda olan, bana yol gösteren ikinci danışmanım Sayın Doç. Dr. Fatma KAYA DAĞISTANLI'ya,

Tecrübesi ve bilgisi ile desteklerini esirgemeyen Sayın Prof.Dr. Melek ÖZTÜRK SEZGİN'e, Tez çalışmamın deneysel modelini oluşturan Sayın Arş. Gör. Merve ANAPALI AYKAÇ'a, Teknik desteklerinden dolayı Koç Üniversitesinden Sayın prof. Dr. Nuray ULUSU'a

Deney sonuçlarımın istatistiksel değerlendirme ve ELISA testleri sürecinde bana yardımcı olan, laboratuvar bilgilerimi ve tecrübelerini benimle paylaşan Koç Üniversitesinden Sayın Dr. Duygu AYDEMİR'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana bilgilerini aktaran tüm Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı hocalarıma,

Her zaman yanımda olan ve beni destekleyen sevgili arkadaşlarım Sayın Aydan İSMAYILZADE, Sayın Aysun DADASHLI, Sayın Javidan ASADOV, Sayın Fardı MAHMUDZADE ve Sayın Dilaver KILIÇ'a,

Hayatamın her aşamasında yanımda olan, maddi ve manevi destekleyen hem anne hem baba gibi olan canım annem Shirin AGHILI'ye,

Bu zorlu süreçte yanımda olan, beni motive eden ve destekleyen canım abim Meisam HOSEINI ve sevgili eşi Sevda MEHDIZADEHASL'e,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ağustos 2024

Mahsa HOSEINI

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ KABUL VE ONAYI.....	ii
BEYAN	iv
BÜTÇE DESTEKLERİ	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ	x
TABLO LİSTESİ.....	xii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xiii
ÖZET	xvi
ABSTRACT	xviii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE	8
2.1. Karaciğer.....	8
2.1.1. Karaciğerin Yapısı.....	8
2.1.2. Karaciğerin Histolojik Yapısı.....	11
2.1.3. Karaciğer Hücreleri	12
2.1.4. Karaciğerin Görevleri.....	14
2.1.5. Karaciğer Hasarı.....	16
2.2. Diabetes Mellitus	17
2.2.1. Tip 1 Diabetes Mellitus	17
2.2.2. Tip 2 Diabetes Mellitus	18
2.2.3. Gestasyonel Diabetes Mellitus (GDM)	19
2.2.4. Deneysel Diabetes Mellitus Modelleri	19
2.3. Fruktoz	22
2.3.1. Fruktoz Metabolizması.....	23
2.3.2. Fruktozun Neden Olduğu Bozukluklar	23
2.4. Resveratrol (RSV).....	24
2.4.1. Resveratrolün Formları	24

2.4.2. Resveratrolün Etkileri	25
2.4.3. Resveratrol ve Karaciğer	26
2.5. Hücre Ölümü.....	27
2.5.1. Ferroptoz	29
3. YÖNTEM	38
3.1. MATERYAL	38
3.1.1. Kullanılan DeneY Hayvanları.....	38
3.1.2. Kullanılan kimyasallar	38
3.1.3. Kullanılan Cihazlar ve Sarf malzemeleri	39
3.1.4. Kullanılan kitler.....	40
3.2. YÖNTEMLER.....	41
3.2.1. DeneY Modelinin Oluşturulması	41
3.2.2. Biyokimyasal Parametrelerin İncelenmesi.....	43
3.2.3. Dokuların İncelenmesi	44
3.2.4. İstatistiksel Analiz	47
4. BULGULAR	48
4.1. Açlık Kan Şekeri, Vücut Ağırlığı ve Günlük Kalori Alımı	48
4.2. Biyokimya Sonuçlarının Değerlendirilmesi	50
4.3. Morfolojik Değerlendirme	51
4.4. İmmünohistokimya Bulguları	53
5. TARTIŞMA.....	66
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	76
KAYNAKLAR.....	78
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	89
ETİK KURUL İZİN YAZISI	90
KURUM İZİNİ YAZILARI.....	92
ÖZGEÇMİŞ	93

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2-1.Karaciğerin yapısı.	9
Şekil 2-2. Karaciğer lobülü ve bölgeleri. [51]	10
Şekil 2-3.Portal alan ve hepatik lobül yapısı.	11
Şekil 2-5. Karaciğerde karbonhidrat metabolizması	15
Şekil 2-6. Protein metabolizması.....	16
Şekil 2-7. Alloksan ve streptozotocin kaynaklı diyabet tipleri.....	21
Şekil 2-8. Streptozotocin'in kimyasal yapısı.....	21
Şekil 2-9. Trans- ve cis- resveratrolün kimyasal yapısı [98].....	25
Şekil 2-10. Trans-resveratrolün cis-resveratrole izomerleşmesi [101].....	25
Şekil 2-11. Hücre ölüm tipleri.	28
Şekil 2-12. Çeşitli hücre ölüm tiplerinin sınıflandırılması	29
Şekil 2-13. Ferroptoz çeşitli hastalıklarda rol oynamaktadır.....	30
Şekil 2-14. Fosfolipid peroksidasyon mekanizmaları [137].....	35
Şekil 4-1. Deney gruplarına ait açlık kan şekeri (mg/dl) ve vücut ağırlıklarının (gr) istatistiksel değerlendirmeleri.....	49
Şekil 4-2. Deney hayvanlarının günlük kalori alımının (kcal/kg) değerleri.....	49
Şekil 4-3. Deney gruplarına ait FASN, ALOX5, GPX4 proteinlerin düzeyleri ve GSH/GSSG oranı.	50
Şekil 4-4.Tüm deney gruplarına ait Hematoksilen Eozin (H + E) boyaması. (Bar: 20µm).....	51
Şekil 4-5. Tüm deney gruplarına ait Van Gieson boyaması ile kollajen lif birikimlerinin gösterilmesi. (Bar: 20µm).....	52
Şekil 4-6. Tüm deney gruplarına ait fibrozis ve yağlı dejenerasyon skorlaması.....	52
Şekil 4-7. Tüm deney gruplarına ait Prusya mavisi boyası ile demir birikiminin gösterilmesi. (Bar: 20µm)	53

Şekil 4-10. Tüm deney gruplarına ait karaciğer dokularında immün pozitif GPX4 ekspresyonunun gösterimi. İmmün boyama: Streptavidin- biotin- peroksidaz. Zıt boya: Hematoksilin. Bar:20 µm.....	54
Şekil 4-11. Tüm deney gruplarına ait GPX4 immün pozitif hücre yüzdeleri.....	54
Şekil 4-14. Tüm deney gruplarına ait karaciğer dokularında 4-HNE ekspresyonunun gösterimi. İmmün boyama: Streptavidin- biotin- peroksidaz. Zıt boya: Hematoksilin. Bar:20 µm.....	55
Şekil 4-15. Tüm deney gruplarına ait 4-HNE immün pozitif hücre yüzdeleri.....	56
Şekil 4-18. Tüm deney gruplarına ait karaciğer dokularında Nrf2 ekspresyonunun gösterimi. İmmün boyama: Streptavidin- biotin- peroksidaz. Zıt boya: Hematoksilin. Bar:20 µm.....	57
Şekil 4-19. Tüm deney gruplarına ait Nrf2 immün pozitif hücre yüzdeleri.....	57
Şekil 4-16. Tüm deney gruplarına ait karaciğer dokularında HO-1 ekspresyonunun gösterimi. İmmün boyama: Streptavidin- biotin- peroksidaz. Zıt boya: Hematoksilin. Bar:20 µm.....	58
Şekil 4-17. Tüm deney gruplarına ait HO-1 immün pozitif hücre yüzdeleri.....	59
Şekil 4-22. Tüm deney gruplarına ait karaciğer dokularında 8-OHdG ekspresyonunun gösterimi (↑Nükleer pozitiflik, ► Sitoplazmi pozitiflik). İmmün boyama: Streptavidin- biotin- peroksidaz. Zıt boya: Hematoksilin. Bar:20 µm.....	60
Şekil 4-23. Tüm deney gruplarına ait 8-OHdG immün pozitif hücre yüzdeleri.....	60
Şekil 4-20. Tüm deney gruplarına ait karaciğer dokularında γH2AX ekspresyonunun gösterimi. İmmün boyama: Streptavidin- biotin- peroksidaz. Zıt boya: Hematoksilin. Bar:20 µm.....	61
Şekil 4-21. Tüm deney gruplarına ait γH2AX immün pozitif hücre yüzdeleri.....	62
Şekil 4-12. Tüm deney gruplarına ait karaciğer dokularında immün pozitif COX-2 ekspresyonunun gösterimi. İmmün boyama: Streptavidin- biotin- peroksidaz. Zıt boya: Hematoksilin. Bar:20 µm.....	63
Şekil 4-13. Tüm deney gruplarına ait COX-2 immün pozitif hücre yüzdeleri.....	63
Şekil 4-8. Tüm deney gruplarına ait karaciğer dokularında SIRT1 ekspresyonunun gösterimi. İmmün boyama: Streptavidin- biotin- peroksidaz. Zıt boya: Hematoksilin. Bar:20 µm.....	64
Şekil 4-9. Tüm deney gruplarına ait SIRT1 immün pozitif hücre yüzdeleri.....	65

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 2-1. Karaciğer hücreleri.....	12
Tablo 2-2. Hücre ölüm tipleri ve farkları.	31
Tablo 3-1. Hayvan deneyinde kullanılan kimyasallar	38
Tablo 3-2. İmmünohistokimya da kullanılan kimyasallar	39
Tablo 3-3. Kullanılan cihazlar.	40
Tablo 3-4. Kullanılan sarf malzemeleri.	40
Tablo 3-5. Deney sırasında kullanılan kitler.	40
Tablo 3-6. Deney düzeneği.....	42
Tablo 3-7. GSH/GSSG testinde standart hazırlama protokolü.....	44
Tablo 3-8.Karaciğer örneklerinde fibrozis ve yağlı dejenerasyon skorlaması.	45
Tablo 3-9. İmmünohistokimya da kullanılan antikorlar ve dilüsyonları.	47

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler Açıklama

Gr	: Gram
Mg	: MiliGram
α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gamma
Kg	: KiloGram

Kısaltmalar Açıklama

4-HNE	: 4-Hidroksi-2-Nanonol
8-OHdG	: 8-Hidroksideoksiguanozin
ACD	: Kazara Hücre Ölümü
ALD	: Akut Karaciğer Hastalığı
ALF	: Akut Karaciğer Yetmezliği
ALI	: Akut Karaciğer Hasarı
ALOX	: Araşidonat Lipoksijenaz
ALX	: Alloxan
AMPK	: Adenozin Monofosfat İle Aktifleştirilen Protein Kinaz
Asetil CoA	: Asetil Koenzim A
CAT	: Katalaz
CCL₄	: Karbon Tetraklorür
CDKN	: Sikline Bağımlı Kinaz İnhibitörü
CLI	: Kronik Karaciğer Hasarı
CO	: Karbon Monoksit
COX-2	: Siklooksijenaz -2
DILI	: İlaça Bağlı Karaciğer Hasarı
DM	: Diabetes Mellitus
DMSO	: Dimetilsülfoksit

DPP	: Dipeptidil Peptidaz
DPP4	: Dipeptidil Peptidaz 4
DSB	: Çift Sarmal Kırılmaları
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
FSP	: Ferroptoz Baskılayıcı Protein
GDM	: Gestasyonel Diabetes Mellitus
GLS	: Glutaminaz
GLUT	: Glukoz Taşıyıcısı
GPX4	: Glutasyon Peroksidaz 4
GSH	: Glutasyon
GST	: Glutasyon S-Transferaz
H + E	: Hematoksilen + Eozin
HCC	: Hepatosellüler Karsinom
HCV	: Hepatit C Virüsü
HDL	: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
HGF	: Hepatosit Büyüme Faktörü
HO-1	: Heme Oksijenaz-1
HSH	: Hepatik Stellat Hücreleri
i.p.	: İntraperitoneal
IDDM	: İnsüline Bağımlı Diyabet
IGF1	: İnsülin Büyüme Faktörü 1
IL	: İnterlökin
IPP	: İzopentenil Pirofosfat
KEAP1	: Kelch ECH-İlişkilendirici Protein 1
KR	: Resveratrol Tedavisi Uygulanan Kontrol Grubu
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
MDA	: Malondialdehit
MVA	: Mevalonat
NAFLD	: Alkole Bağlı Olmayan Yağlı Karaciğer Hastalığı
NASH	: Alkole Bağlı Olmayan Yağlı Karaciğer Hastalığı
NF-κB	: Nükleer Faktör-Kappa B
NH₃	: Amonyak
NIDDM	: İnsüline Bağımlı Olmayan Diyabet
Nrf2	: Nükleer Faktör Eritroid 2

OD	: Optik Yoğunluk
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PCD	: Programlanmış Hücre Ölümü
PPAR	: Proliferatörle Aktive Edilen Reseptörler
PUFA	: Çoklu-Doymamış Yağ Asitleri
RCD	: Düzenlenmiş Hücre Ölümü
RNS	: Reaktif Nitrojen Türleri
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RSV	: Resveratrol
SAT	: Spermidin/Spermin N1-Asetiltransferaz
SIRT 1	: Sirtuin 1
SK	: Sağlıklı Kontrol Grubu
SOD	: Süperoksit Dismutaz
STZ	: Streptozotocin
T1DM	: Tip 1 Diabetes Mellitus
T2DM	: Tip 2 Diabetes Mellitus
TCA	: Trikarboksilik Asit
TGF	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü
TGF- β	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta
TNF-alfa	: Tümör Nekroz Faktörü Alfa
VLDL	: Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
YF	: Diyabet Grubu
YF-R	: Resveratrol Tedavisi Uygulanan Diyabet Grubu
γ-H2AX	: Fosforile H2AX

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FRUKTOZ ve STREPTOZOTOCİN ile OLUŞTURULAN DİYABETİK SIÇAN MODELİNDE RESVERATROLÜN KARACİĞER HASARI ve FERROPTOZ ÜZERİNE ETKİLERİ

Mahsa HOSEİNİ

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tıbbi Biyoloji, Tezli Yüksek Lisans Programı

Danışman : Prof. Dr. Ali Nur Turgut ULUTİN

II. Danışman : Doç. Dr. Fatma KAYA DAĞISTANLI

Bu çalışmada %10'luk yüksek fruktoz ile düşük doz streptozotocin (40mg/kg) uygulanarak modifiye Tip 2 diyabet modeli oluşturuldu ve resveratrol tedavisinin olası karaciğer hasarı ve ferroptoz üzerine etkileri araştırıldı. Deney hayvanları ile 4 deney grubu oluşturuldu. Diyabetik grup (F), Resveratrol tedavisi uygulanan diyabetik grup (FR), Resveratrol tedavisi uygulanan kontrol grubu (KR), Sağlıklı kontrol grubu (K). Deneyin sonunda tüm hayvanlar sakrifiye edilerek karaciğerleri alındı. Deney süresince deney gruplarının kan şekeri, günlük kalori alımı ve vücut ağırlıkları ölçüldü. Karaciğer doku kesitlerine morfolojik değerlendirilmesi için Hematoksilen-Eosin, Prusya Mavisini ve Van Gieson boyamaları, ayrıca SIRT1, COX2, HO-1, GPX4, γ H2AX, 4HNE, 8-OHdG, Nrf2 antikoru kullanılarak immünohistokimyasal boyama yapıldı. ALOX5, FASN, GPX4 protein seviyelerinin ve GSH/GSSG oranı biyokimyasal yöntemler ile ölçülerek tüm sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi. YF grubunda açlık kan şekeri düzeyleri artarken YF-R grubunda açlık kan şekeri düzeyinin azaldı. Deney sonunda YF grubunun vücut ağırlığında düşüş gözlemlendi ($p \leq 0.05$). Dokuların morfolojik değerlendirilmesinde YF grubunda fibrozis ve demir birikmesi gözlemlenirken YF-R gruplarında ise fibrozisin gerilediği ve demir birikimini gözlemlenmediği saptandı. İmmünohistokimya sonuçlarından elde edilen verilerde SIRT1 ($p < 0.0001$), GPX4 ($p < 0.0001$) ve Nrf2 ($p \leq 0.05$) ekspresyonları YF grubunda kontrol grubuna kıyasla azaldığı anlaşıldı. COX2, HO-1, γ H2AX, 4HNE ve 8-OHdG ekspresyonları ise YF grubunda diğer gruplara göre arttığı belirlendi. ELISA sonuçlarına bakıldığında, ALOX5 ve FASN seviyelerinde gruplar arasında anlamlı fark yokken GPX4 seviyeleri YF grubunda diğer gruplara göre daha düşük

olduğu anlaşıldı ($p \leq 0.05$). GSH/GSSG testinde ise bu proteinin düzeylerinin kontrol gruplarına göre YF ($p < 0.01$) ve YF-R ($p < 0.001$) gruplarında arttığı saptandı.

Çalışmada yüksek fruktoz diyeti ve düşük doz STZ uygulamasının kan şekeri düzeylerini arttırdığı, oksidatif stresi uyararak karaciğerde fibrozise, demir birikimine, hücrelerde DNA hasarına ve ferroptoz yolağında görevli proteinlerin ekspresyonunda artışa neden olarak karaciğer hasarına yol açtığı saptandı. Resveratrol uygulamasının kan şekeri düzeylerini düşürdüğü, oksidatif stres üzerinde olumlu etki yaptığı ve hepatositlerde demir birikimini önleyerek karaciğer dokusunu ferroptozdan koruduğu gözlendi. |

Ağustos 2024 , |112| sayfa.

Anahtar kelimeler: | Karaciğer, Fruktoz, Diyabet, Resveratrol, Ferroptoz |



ABSTRACT

[M.Sc. THESIS]

**[THE EFFECTS OF RESVERATROL ON LIVER DAMAGE AND
FERROPTOSIS IN FRUCTOSE AND STREPTOZOTOCIN-INDUCED
DIABETIC MODEL]**

[Mahsa HOSEINI]

İstanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Medical Biology

Medical Biology

[Supervisor : Prof. Dr. Ali Nur Turgut ULUTİN

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Fatma KAYA DAĞISTANLI]

[In this study, a modified Type 2 diabetes model was created by applying low-dose streptozotocin with high fructose, and the effects of resveratrol treatment on possible liver damage and ferroptosis were investigated. 4 Experimental groups were formed. Diabetic group(F), Diabetic group with resveratrol treatment(FR), Control group with resveratrol treatment(KR), Control group(K). At the end of the experiment, all animals were sacrificed and their livers were removed. During the experiment, blood sugar and body weights were measured. For morphological evaluation, Hematoxylin-Eosin, Prussian Blue, Van Gieson and immunohistochemical staining of SIRT1, COX2, HO-1, GPX4, γ H2AX, 4HNE, 8-OHdG, Nrf2 antibodies were performed. ALOX5, FASN, GPX4 protein levels and GSH/GSSG ratio were measured. All results were evaluated statistically. While fasting blood sugar levels increased in the YF group, it was decreased in the YF-R group. At the end of the experiment, the body weight of group YF was decreased ($p \leq 0.05$). Fibrosis and iron accumulation were observed in the YF group, while fibrosis decreased and iron accumulation was not observed in the YF-R groups. The expressions of SIRT1($p < 0.0001$), GPX4($p < 0.0001$) and Nrf2($p \leq 0.05$) were decreased in the YF group. COX2, HO-1, γ H2AX, 4HNE and 8-OHdG expressions were increased in the YF group. There was no significant difference in ALOX5 and FASN levels,

while GPX4 levels were lower in the YF group($p \leq 0.05$) and GSH/GSSG levels increased in the YF ($p < 0.01$) and YF-R ($p < 0.001$) groups.

In the study, it was determined that high fructose and low dose STZ increased blood sugar levels, stimulated oxidative stress and caused liver damage as a result of fibrosis in the liver, iron accumulation, DNA damage and increased expression of proteins involved in the ferroptosis pathway. It is thought that resveratrol reduces blood sugar levels, has a positive effect on oxidative stress, and protects liver tissue from ferroptosis by preventing iron accumulation in hepatocytes. |

August 2024, |112| pages.

Keywords: | Liver, Fructose, Diabetes, Resveratrol, Ferroptosis |



1. GİRİŞ

Diabetes Mellitus (DM) tüm dünyada insidans ve prevalansı artan küresel halk sağlığı sorunudur. Bu hastalık çok sayıda hayati organı etkileyerek patolojik durumlara yol açan komplikasyonlara sebep olabilir [1]. DM, pankreas adacık beta (β) hücrelerinin disfonksiyonu, insülin direnci veya insülin eksikliğinden kaynaklanan yüksek kan glukoz ve lipid seviyeleri, ayrıca karbonhidratların, yağların ve proteinlerin anormal metabolizması ile karakterize edilen karmaşık ve çok faktörlü bir sendrom olarak kategorize edilmiştir [2, 3]. Tip 2 Diabetes Mellitus (T2DM), insülin yetmezliği veya insülin direncinin neden olduğu anormal glukoz ve lipid metabolizması ile karakterize yaygın metabolik bir hastalıktır. T2DM'li hastalarda uzun süreli hiperglisemi kaynaklı yağ ve protein metabolizması bozuklukları, merkezi sistem ve periferik organlarda ciddi patolojik hasara neden olan komplikasyonlara sebep olabilir [4]. Yapılan çalışmalar hiperglisemi, hiperlipidemi, inflamatuvar yanıtlar insülin direnci ve endotelial disfonksiyonunun, T2DM patogenezinin sorumlu olduğu anlaşılmıştır [2]. Hiperglisemi, DNA hasarına neden olabilir, reaktif oksijen türlerinin oluşumunu artırabilir diğer taraftan antioksidan seviyesini azaltabilir. Hiperinsülinemi, güçlü mitojenik ve anti-apoptotik aktivitelere sahip olan insülin benzeri büyüme faktörü 1'in (IGF1) artan lokal seviyeleri yoluyla karsinogenezi teşvik edebilir [5]. Karaciğer hem fizyolojik hem de DM gibi patolojik durumlarda glikoz seviyelerinin düzenlenmesinde hayati bir rol oynar. Ayrıca DM anormal glikojen birikimi, alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı, fibrozis, siroz, hepatoselüler karsinomlar, anormal yüksek hepatik enzimler, akut karaciğer hastalığı ve viral hepatit gibi bir dizi karaciğer anormalliği ile ilişkilidir [1]. Karaciğer hasarına katkıda bulunan diyabetin altında yatan mekanizma, artan oksidatif stres ve anormal bir inflamatuvar yanıtın birleşimidir ve bu durum, proapoptotik genlerin transkripsiyonunu aktive ederek hepatositlere zarar verir [1]. Diyabetik hastalarda insülin direnci hiperglisemi ve hiperinsülinemiye sebep olur ve bunun sonucunda oksidatif stres meydana gelir. Aşırı yağ birikimi insülin direncini kötüleştirir, lipidlerin, karbonhidratların ve proteinlerin metabolizmasını etkileyerek ciddi metabolik işlev bozukluğuna ve alkolsüz yağlı karaciğer hastalığına yol açabilir, bu da daha sonra alkolsüz steatohepatitise, siroza ve son olarak hepatoselüler karsinoma ilerleyebilir. Sonuç olarak yağlı karaciğer ve hiperglisemi birlikte hepatositleri yok edebilir ve diyabetik hastalarda morbidite ve mortalitenin artmasına katkıda bulunabilir [1].

Oksidatif stres, diyabetik komplikasyonların patogeneğinde bilinen bir yol olarak rapor edilmiştir. Hiperglisemik kaynaklı oksidatif stresin, lokal ve sistemik inflamasyona yol açan inflamatuvar sitokinleri salgılayan infiltre makrofajlar ile proinflamatuvar proteinlerin seviyelerini arttırdığı belirlenmiştir. Tümör nekroz faktörü alfanın (TNF-alfa) artan salgılanması, obezite ile ilişkili insülin direnci ile bağlantılı olduğu gözlemlenmiştir. Obezite, T2DM gelişimi için bir risk faktörü olduğu anlaşılmıştır [6]. Karaciğer hastalığı, dünya çapında önemli bir ölüm nedenidir ve hücre ölümü, çeşitli karaciğer hastalığı biçimlerinin ilerlemesini yönlendirmede önemli bir rol oynar. Düzenlenmiş hücre ölümü ile ilgili olarak, ortaya çıkan kanıtlar hem nekroptozun hem de ferroptozun karaciğer hastalığının patogeneğinde önemli roller oynadığını göstermektedir [7].

İlk olarak 2012 yılında küçük molekülü bileşik erastin tarafından uyarılan benzersiz bir hücre ölümü şekli olarak keşfedilen ferroptozda hücrelerde plazma zarı incilmesi, mitokondriyal büzülme, mitokondriyal membran yoğunluğunun artışı, azalmış veya yok olmuş krista, dış mitokondriyal membranın yırtılması olmak üzere anormal mitokondriyal morfoloji sergilemesiyle birlikte tipik bir nekrotik morfoloji gözlenir [8, 9]. Ferroptoz, glutasyon tükenmesi ve glutasyon peroksidaz 4 (GPX4) inaktivasyonundan kaynaklı, demir metabolizmasının dengesizliği sonucunda demir ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikimiyle tanımlanan yeni bir hücre ölüm şeklidir [10].

Ferroptoz karaciğerde çok sayıda patolojik durumlarla ilişkilidir [10]. Ferroptoz için ön koşul olan demir, hepatik stellat hücrelerinde (HSC) bol miktarda bulunur. Hayvan çalışmalarında, ferroptozun karaciğer fibrozunun ve karaciğer hasarına sebep olduğu anlaşılmıştır [11]. Yapılan çalışmalarda, ferroptoz ile hemokromatoz, ALD, HCV, NASH ve HCC'nin yanı sıra DILI dahil olmak üzere farklı kronik karaciğer hastalığı türleri arasında olası bir ilişki olduğu anlaşılmıştır [12]. Demir metabolizmasındaki bir dengesizliğin yanı sıra reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu lipid peroksidasyonu, bu hastalıklarda karaciğer hasarının bir mekanizması olarak kabul edilmiştir [12]. Yapılan çalışmalar, ferroptozun, karaciğer hastalığının farklı deneysel modellerinde çeşitli hepatik hücre popülasyonlarını etkileyen sinyal iletim yollarının aktivasyonunu içeren yeni ve belirleyici bir düzenlenmiş hücre ölümü türü olduğunu göstermektedir. Ferroptoz varlığının daha kesin olarak belirlenmesi, yeni terapötik seçenekler olasılığının yanı sıra karaciğer hastalıklarında yeni spesifik biyobelirteçlerin geliştirilmesini ve fibrozis, siroz veya son aşama karsinogeneze yol açan enflamasyonun başlamasını takip eden karmaşık olaylar dizisinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır [12].

Fruktoz, meyve ve bal gibi birçok besinde bulunan doğal bir şekerdir. Fruktoz ve glukoz, her ikisi de birbirine yakın formülleri olan monosakkarittir fakat olmasına rağmen, metabolize edilme yolları enterositlerde ve hepatositlerde birbirlerinden farklıdır [13]. Fruktozun tatlandırma gücü sükrozun neredeyse 1.7 katıdır, bu nedenle endüstriyel bir tatlandırıcı olarak yiyecek ve içeceklerde sıklıkla kullanılmaktadır [14]. Karaciğer, fruktoz metabolizması için ana organ olarak kabul edilir [13]. Büyük miktarlarda fruktoz alımından sonra, hepatik asetil CoA'daki artışlar, T2DM ilişkili VLDL ve trigliseritlerin üretimini artmasına neden olur. Fruktoz, insülin direnci ve hipertansiyon ile beraber obezite ve tip 2 diyabete neden olabilir [15]. Fruktozun glukozla dönüşümü T2DM riskini artırır. Yüksek fruktozlu bir diyet, aerobik kapasiteyi bozar, diyabet ve yağlı karaciğer hastalığına neden olur. Ayrıca hipertrigliseridemi, hiperglisemi, insülin direnci ve glukoz intoleransını tetikleyerek çeşitli metabolik bozukluklara neden olur. Fruktoz, hepatik *de novo* lipogenezi uyarması nedeniyle karaciğer hücrelerinde yağ birikimini artırır. Bu durumda inflamasyon ve hepatik insülin direncinin gelişimine neden olur [16]. Yapılan çalışmalar fruktozun ROS üretimini artırması ve antioksidan savunma mekanizmalarının aşağı regülasyonu ile ROS dengesizliğini desteklediği ve bunun da sonucunda lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve DNA baz modifikasyonu gibi biyolojik makromoleküllerde hasara sebep olduğunu belirlemiştir [17].

Yüksek fruktoz diyetinin zararlı sonuçlarının altında yatan mekanizmalar net değildir. Bununla birlikte, artan lipid peroksidasyonu, fruktozla beslenme ile ilişkili patolojide rol oynar. Akut fruktoz alımı, Nrf2 yolaklarının ekspresyonunu artırır. Ancak yüksek fruktozlu diyetlerin aşırı tüketimi reaktif oksijen türlerinin ve oksidatif hasarın artmasına ve Nrf2 ile GSH'nin azalmasına neden olur [18, 19]. Oksidatif stres yanıtının merkezi olan Nrf2 (Nükleer faktör E2 ile ilişkili faktör 2), bir oksidatif stres sensörüdür. Oksidatif strese bağlı hücre hasara karşı ilk savunma hattı olarak kabul edilir. Bir transkripsiyon faktörü olan Nrf2, oksidatif stres durumunda hızla sitoplazmadan çekirdeğe yer değiştirir, endojen antioksidan yanıt yolunu düzenleyerek hücreleri oksidatif stresten korur. Oksidatif strese ve diğer olası hasarlara yanıt olarak hücre redoks homeostazını sürdürmek için GSH biyosentezini ve tioredoksin sistemlerini düzenleyerek koruyucu ve antioksidan genlerin ekspresyonunu uyarır. Nrf2, GPX4 protein içeriğini, hücre içi serbest demir içeriğini, mitokondriyal işlevi doğrudan veya dolaylı olarak düzenleyebilir, böylece ferroptoz sürecini düzenleyebilir. Nrf2 aktivasyonunun, hepatik enzimlerin baskılanması yoluyla farelerde metabolik düzensizliği ve insülin direncini önlediği, hipertrigliseridemi ve yağlı karaciğer hastalığına karşı koruduğu da saptanmıştır [20, 21].

Ayrıca Nrf2 aktivasyonu, hücrel demir alımını azaltır ve ROS üretimini sınırlar, böylece ferroptozu negatif olarak düzenler [22].

Hücre membran bütünlüğünü sağlamak ve serbest oksijen radikalleri (ROS) kaynaklı hasarı en aza indirmek için lipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz 4 (GPX4), kofaktör olarak indirgenmiş GSH kullanarak lipid hidroperoksitleri (R-OOH) lipid alkollere (R-OH) dönüştürür. Bu işlem, ferroptozda sitozolik ROS'tan daha toksik olan toksik lipid ROS'un demire (Fe²⁺) bağımlı oluşumunu ve birikmesini önler. Böylece, GPX4 oksidatif hasara karşı koruyucu ve fizyolojik düzenleyici olarak hücrel homeostazda iki önemli görevi üstlenir [23]. GSH'nin tükenmesi GPX4 inaktivasyonuna neden olur ve hücre içi lipid peroksidasyonunu artırır. Yapılan araştırmalarda GPX4, ferroptoz meydana geldiğinde önemli ölçüde azalmıştır ve ferroptozun bir belirteci olarak kabul edilmiştir [24].

4-Hidroksi-2-Nanonol (4-HNE), oksidatif stres ile yüksek oranda ilişkilendirilen bir moleküldür. 4-HNE, malondialdehit (MDA) gibi lipid peroksidasyonunun toksik bir son ürünüdür ve genellikle doku ve hücrelerde oksidatif hasarı tespit etmek için kullanılır. Normal koşullarda, farklı biyolojik dokularda bazik konsantrasyonda bulunur. Ancak yüksek oranda reaktif serbest elektron gruplarına sahip oldukları için zararlı olabilir ve yüksek oksidatif koşullarda hücrel proteinler ve nükleik asitlerle etkileşime girebilirler. Sitotoksikiteye veya hücre ölümüne neden olabilir. 4-HNE'nin diyabet, kanser ve obezite gibi oksidatif strese dayalı çeşitli patofizyolojik süreçlerde etkili olduğu bildirilmiştir [25]. Yapılan çalışmalar sonucunda 4-HNE'nin, Nrf2 ve peroksizom proliferatör ile etkinleştirilen reseptör (PPAR) gibi çeşitli transkripsiyon faktörlerini ve ayrıca hücre döngüsü düzenleyicileri ve kaspazlar gibi diğer sinyal yollarını modüle ederek hücre ölümüne neden olabileceği öne sürülmüştür. Hücrelerin apoptoz veya nekroz geçirmesinin 4-HNE'nin hücrel konsantrasyonuna bağlı olduğu da ileri sürülmüştür [26].

Heme oksijenaz-1 (HO-1), endoplazmik retikulum, nükleus ve mitokondride bulunan transmembran bölgesi ile membrana sabitlenen bir enzimdir. Hem oksijenazları, hem katabolizmasında hız sınırlayıcı enzimlerdir. Hem'in karbon monoksit (CO), serbest demir ve daha sonra bilirubin redüktaz tarafından bilirubine dönüştürülen biliverdine oksidatif bozunmasını katalize ederler. HO-1, anti-kanser, anti-inflamatuar, anti-apoptotik, anti-proliferatif ve antioksidan etkiler içerir. Birçok çalışma, HO-1'in uyarılmasının, enflamatuar süreçlere ve oksidatif doku hasarına karşı önemli bir koruyucu rol oynadığını göstermiştir [27,

28]. HO-1, 'oksidatif stres' altında yukarı regüle edilir ve karaciğeri asetaminofen, karbon tetraklorür ve ağır metaller gibi çeşitli kimyasal bileşiklerin neden olduğu hasara karşı korumaya yardımcı olur. Karaciğer hücrelerinde artan HO-1 aktivitesi, hücrel GSH'yi artırarak onları hasardan korur [29]. Artan pro-oksidan koşullar sırasında, HO-1 tarafından ferritin veya hem'den salınan demir, lipid peroksidasyonunu ve ferroptozu indükleyen ROS seviyelerini artırır. HO-1'in aşırı aktivasyonu, ferroptozu indükleyen demir depolarından kaynaklanan artan hücre içi demir nedeniyle zararlı ve sitotoksik hale gelebilir. Bu hücrel demir ve ROS seviyeleri, HO-1'in dengesini koruyucu bir rolden hücre ölümünün uygulayıcısına kaydırır. Bu nedenle, böbrek hasarı ve nörodejenerasyon gibi bozukluklara yol açmada zararlı olmasına rağmen, HO-1'in tümörlere karşı kemoterapötik bir strateji olarak ferroptoz aracılığı için uygulanması olasılığı vardır [30].

Siklooksijenaz-2 (COX-2), proinflamatuvar sitokinler, büyüme faktörleri ve hormonlar gibi hücre stres faktörlerine yanıt üzerine ifade edilir. Erişkin karaciğerinde, COX-2 ekspresyonu, hepatosit olmayan hücre popülasyonu ile sınırlıdır [31]. COX-2, hepatik fibrojenin ilerlemesinde önemli bir rol oynar. COX-2'nin aşırı ekspresyonu, hepatik fibrozda önemli bir indükleyici olan inflamasyonu tetikler. Yapılan çalışmalar, COX-2'nin inflamasyon, apoptoz ve hücre yaşlanması gibi karaciğer fibrozunun ana patogeneğinde yer aldığını göstermektedir. Ayrıca, alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı veya sirozu olan hastalarda ve hayvan modellerinde COX-2 ekspresyonu değişir [32]. COX-2, baskın enzimdir ve ferroptoz COX-2 ifadesini artırır [8]. Uzun süren kronik inflamasyon sürecinde DNA çift sarmal kırıldığından, ROS türlerinin artmasına ve oksidatif DNA hasarına sebep olur ve böylece DNA onarım sistemindeki moleküller hepatoselüler karsinoma (HCC) ve karaciğer hasarı için biyomarker olarak belirlenir.

Fosforile histon H2AX (γ H2AX), DNA onarımının potansiyel bir düzenleyicisidir ve DNA hasarını saptamak için yararlıdır. DNA hasarı ister endojen ister eksojen olsun, çift sarmal kırılmaları (DSB'ler) oluşturduğunda, bunu her zaman histon H2AX'in fosforilasyonu izler. HCC riskinin öngörülmesi için kullanışlı bir biyobelirteçdir. Genel olarak, H2AX, birçok araştırmacı tarafından indüklenmiş DNA hasarını ölçmek için kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda γ H2AX ekspresyonunun karaciğer hasarı ve hastalıklarında arttığı belirlenmiştir [33, 34].

Nükleer ve mitokondriyal DNA'da, DNA'nın oksitlenmiş bir nükleozidi olan 8-hidroksideoksiguanozin (8-OHdG), oksidatif stres ve karsinogenez için bir biyobelirteçtir. Oksidatif DNA hasarı karaciğer hasarında gözlenir ve bu yüzden de oksidatif stresin neden olduğu DNA hasarını belirlemede bir biyobelirteç olarak kabul edilir. Yapılan çalışmalarla 8-OHdG ekspresyonunun karaciğer hastalıkları ve primer siroz gibi durumlarda arttığı anlaşılmıştır. Alkolik karaciğer hastalığında, alkolik hepatit alanındaki hepatositlerde 8-OHdG'nin nükleer ekspresyonu tespit edilmiştir [35, 36].

Doğal stilben olan resveratrol (RSV), *Polygonum cuspidatum*, dut (Morus türleri), üzüm ve kırmızı şarapta bulunan bir fitoaleksindir. Bu bileşik, farklı farmasötik dozaj formlarında bulunur ve bir besin takviyesi olarak önerilir. Resveratrolün insanlarda ve deneysel obezite ve/veya diyabet modellerinde glikoz düşürücü etkileri gösterilmiştir. RSV, antioksidan, anti-inflamatuar, antifungal, antikanserojen, antimutajenik, kardiyoprotektif ve nöroprotektif dahil olmak üzere çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir [37, 38]. RSV; katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon S-transferaz (GST) gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerini normale getirmek ve kan şekerini düşürme yeteneği gibi çeşitli faydalı etkilere sahiptir. Ayrıca glutatyonda önemli bir artışa neden olur ve dolaşımdaki yüksek lipid seviyelerini düşürür. Bu etkilerin tümü, karaciğer histolojisi ve fonksiyonunun RSV ile indüklenen restorasyonunda yer alabilir [38]. Oyenih ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Resveratrolün DM'deki antidiyabetik etkileri hem insülin düzeylerini hem de pankreatik β hücrelerini olumlu yönde etkilediği ve hastalığın komplikasyonlarını önlediği anlaşılmıştır [39]. Resveratrol'ün glikoz homeostazının düzenlenmesi üzerindeki yararlı etkilerinden bazılarının, AMPK aktivasyonu aracılığıyla sağlandığı gösterilmiştir. AMPK, enerji metabolizması, mitokondriyal fonksiyonlar ve hücrel homeostaz gibi birkaç önemli hücre içi süreci düzenler. Yapılan başka bir çalışmada diyabetik sıçan dokularında resveratrolün oksidatif stres göstergelerinin konsantrasyonunu normalleştirdiği bildirilmiştir [40].

Diyabette resveratrolün etki şekli üzerine yapılan son çalışmalara göre, resveratrolün Sirtuin 1 (SIRT1) yolaklarını aktive ettiği anlaşılmıştır. NAD⁺bağımlı bir protein deasetilaz olan SIRT1, hücrel stres yanıtı ve enerji metabolizmasında önemli bir düzenleyicidir. SIRT1, T2DM'yi etkileyen birçok faktörün önemli bir düzenleyicisi olarak tanımlanmıştır. Çalışmalar, SIRT1 aktivitesinin ve ekspresyonunun, *in vitro* ve *in vivo* DM'nin deneysel modellerinde önemli ölçüde azaldığını ortaya koymuştur [40]. SIRT1, metabolik hastalıkların patofizyolojisinde önemli roller oynayan çeşitli proteinlerin deasetilasyonu yoluyla protein aktivasyonunun

düzenlenmesinden sorumludur. Ayrıca lipid ve glikoz homeostazının düzenlenmesinde, insülin sekresyonunun ve duyarlılığının kontrolünde, anti-inflamatuar etkilerde, oksidatif stresin kontrolünde, artan mitokondriyal biyogenez ve β -oksidasyon kapasitesinden kaynaklanan endotelial fonksiyondaki gelişmelerde kilit roller oynar. SIRT1 aktivasyonunun özellikle metabolik dokulardaki etkileri, NAFLD patogenezi için önemli olan çeşitli yolların inhibisyonuna yol açar. Bu yollar, NAFLD tedavisi için potansiyel terapötik hedefleri temsil eder. SIRT1 aktivasyonunun olumlu etkileri, NAFLD patofizyolojisi ile ilgili metabolik aktivitelerde gösterilmiştir. Moleküler düzeyde yapılan çalışmalar, SIRT1'in karaciğerdeki çeşitli kritik metabolik süreçleri kontrol eden transkripsiyonel ağların düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir [41].

SIRT1'in aktivasyonu karaciğer, hepatik *de novo* lipogenezini inhibe eder, yağ asidi β -oksidasyonunu artırır, hepatik oksidatif stresi savunur ve lokal ve dolaşımdaki inflamasyonu azaltır [42]. SIRT1, GSH düzeylerini artırır, kardiyomiyosit canlılığını artırır ve ferroptik hücre ölümünü azaltır. Wang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada SIRT1'in Nrf2/HO-1 yolunu etkilediğini ve akut karaciğer hasarında lipid birikimi üzerinde etkisi olduğunu anlaşılmıştır. Memeli hücrelerinde resveratrol, SIRT1 proteininin hücresel ekspresyonunu teşvik eder ve SIRT1 aktivitesini önemli ölçüde uyarır [24].

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda, yüksek fruktoz ve düşük doz streptozotocin (STZ) uygulaması ile oluşturduğumuz T2DM modelinde karaciğer hasar oluşumunda ferroptozun rolünü ve resveratrol uygulamasının olası ferroptoz üzerindeki etkilerini değerlendirmeyi ve ilişkili potansiyel moleküler mekanizmalarını araştırmayı amaçladık. Hedefimiz doğrultusunda DNA hasarı ve çift zincir kırılmaları belirteçleri olan γ H2AX, 8-OHdG, oksidatif stres belirteci olan 4-HNE, oksidatif hasara karşı korunma da rolleri olan Nrf2, antioksidan etkileri olan HO-1, inflamasyonda görev alan COX-2, ferroptoz belirteci olan GPX4 ve endojen stres sensörü olan SIRT1 gibi proteinlerin ekspresyonlarını immünohistokimya ve aynı zamanda ALOX-5, FASN, GPX4 protein seviyelerini ve GSH/GSSG oranını oluşturduğumuz modifiye T2DM modelinde karaciğer dokusunda kontrol grubuna kıyasla belirlemeyi amaçladık.

2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

2.1. Karaciğer

Vücudun en büyük bezi olarak bilinen karaciğer, metabolitlerin atımı için bir merkez olarak işlev görmektedir ve mikroorganizmalara karşı savunmada en hayati organlardan biri olarak bilinmektedir [43, 44]. Karaciğer karın boşluğunun sağ üst kadranını kaplayarak sol üst kadranına doğru uzanmaktadır ve vücut ağırlığının yaklaşık %2.5'ini oluşturmaktadır. Sağ ve sol lobları içeren iki büyük lob ve kaudrat ve kaudat lobları içeren iki küçük loba sahiptir. Fibroz bağ dokusundan oluşan Glisson kapsülü ile sarılmış olup aynı zamanda kapsülün etrafı visseral periton kılıfı ile çevrelenmiştir [45].

Karaciğer vücudun homeostazisini korumak için çok çeşitli işlevleri yerine getiren önemli ve karmaşık bir organdır. Glikoz ve lipid metabolizmasının düzenlenmesi, protein sentezi ve safra sentezi dahil olmak üzere çok çeşitli temel işlevlere sahip merkezi bir metabolik koordinatör olarak hizmet eder [46]. Aynı zamanda vücut homeostazisi için temel bir biyokimyasal dönüştürücüdür. Karaciğer emilen maddeleri depolama, eliminasyon, diğer organik kimyasal türlere dönüştürme veya tüm vücut kullanımını amacıyla kan dolaşımına paketlenmiş taşıma için bağırsaktan ayırmaktadır [47]. Besinler ve vitaminlerin alınması, depolanması ve dağıtılmasında, lipoproteinler ve glikoproteinler gibi plazma proteinlerinin üretilmesinde, demir depolanması, metabolizması ve homeostazisinde önemli rol oynamaktadır. Aynı zamanda toksik maddelerin ve ilaçların indirgenmesinde önemli bir role sahiptir ve bu nedenle ana detoksifikasyon organı olarak tanımlanmaktadır. Ancak, toksik maddelerin aşırı yüklenmesi durumunda karaciğer hasara uğrayabilir [45].

2.1.1. Karaciğerin Yapısı

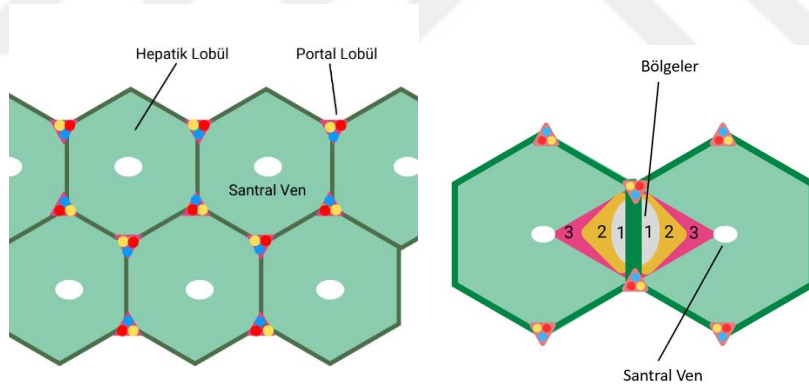
Hepatik lobül karaciğerin anatomik birimidir. Anatomik modelde karaciğer lobülleri bağ dokusu ile sınırlanmış düzensiz çokgenler halinde organize edilmiştir ve santral venden portal triadlara doğru yayılan hepatosit plaklarından oluşur [48].

Lobüllerin merkezinde santral ven bulunmaktadır ve her köşesinde hepatik arter, portal ven ve safra kanalını içeren bir sistem bulunmaktadır. Bu kompleks yapı *portal triad* olarak

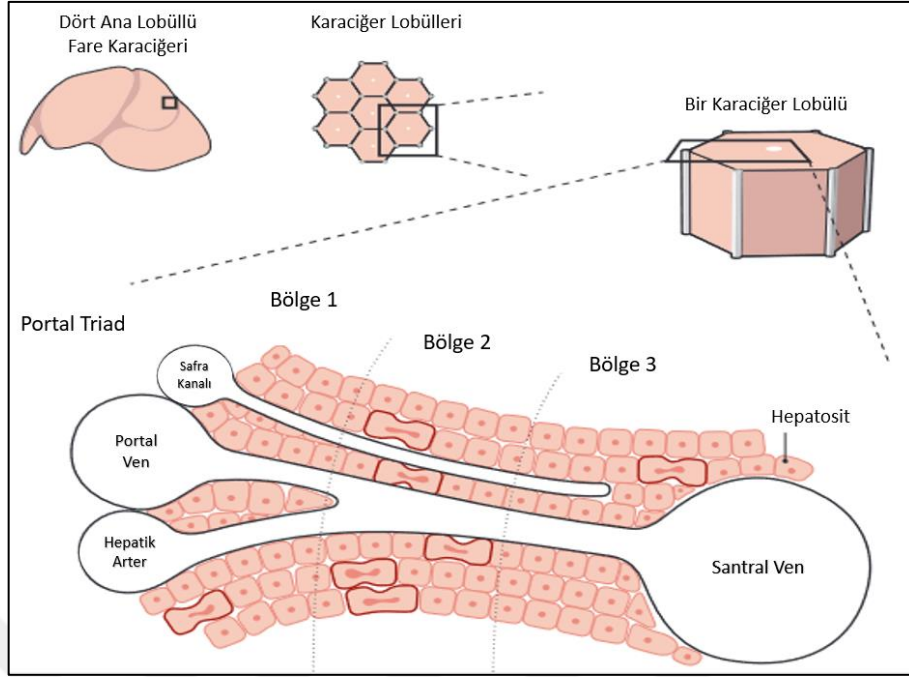
adlandırılır. İnsan karaciğerinde yaklaşık 50,000-100,000 arasında hepatik lobül bulunmaktadır [43, 49, 50].

Eşkenar dörtgen şeklinde olan hepatik asinüsü, karaciğer parankiminin en küçük işlevsel birimini temsil etmektedir. Sinüzoidal boşluklar boyunca oksijensiz ve oksijenli kanın zon gradyan dağılımına dayanmaktadır [45, 50].

Asinüs, arteriyel kan kaynağına olan mesafeye karşılık gelen üç bitişik bölgeye (1, 2 ve 3) ayrılmıştır. Asteriollere en yakın olan hepatositler (bölge 1) en fazla oksijen içeriğini alırlar ama bağırsaktan portal vene taşınan toksinlerden ilk etkilenenlerdir. Bölge 3 hepatositleri, merkezi damara yakın asinüsün çevresinde yer alır ve bölge 2 hepatositleri bölge 1 ve bölge 3 hepatositleri arasında serpiştirilmiştir. Anatomik model belki de anlaşılması daha kolaydır, ancak işlevsel model karaciğer patolojisini anlamak için daha iyi bir temel görevi görür. Her iki modelde de portal venöz ve arteriyel kan merkezi damara doğru akarken, safra merkezi damardan uzağa akar. Hepatositler, sırasıyla portal ve arteriyel perfüzyondan besin ve oksijeni alırlar ve hepatositlerden safra kanalcıklarına ve kanallara taşınan safra asitleri ve diğer safra bileşenlerini üretirler [48].



Şekil 2-1. Karaciğerin yapısı.

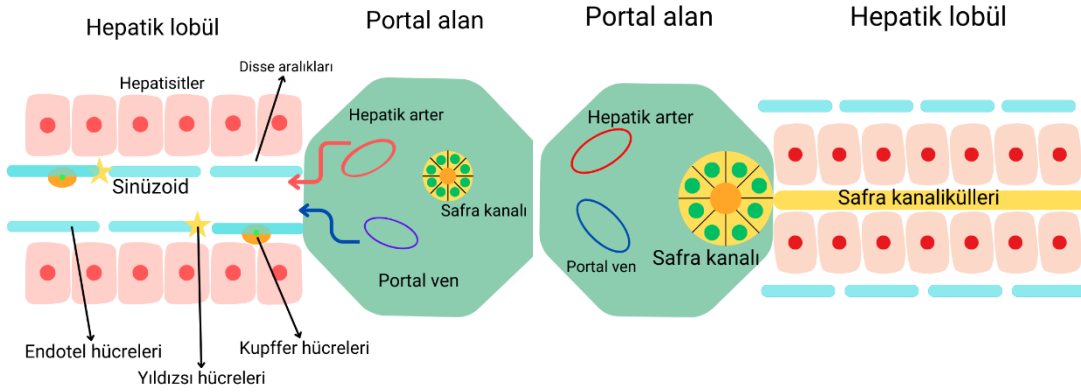


Şekil 2-2. Karaciğer lobülü ve bölgeleri. [51]

Karaciğere iki farklı damardan kan taşınmaktadır:

- **Hepatik arter:** Kan hacminin %20-%25'ini oluşturur ve oksijenli kan içermektedir. Bu arter karaciğere oksijen ve besin maddeleri taşımaktadır ve sağlıklı hücre fonksiyonları için önemlidir [50].
- **Portal ven:** Kan hacminin %75-%80'i bu damar aracılığıyla taşınmaktadır. Karaciğer, portal ven yoluyla splanknik dolaşımdan bağırsak tarafından emilen besinlerle zenginleştirilmiş portal kanı alır. Portal kan ayrıca pankreas, bağırsak ve dalak tarafından salgılanan maddeleri de içerir. Portal ven ve hepatic arterden gelen kan karaciğer lobüllerinin sinüzoidlerinde karışır ve santral ven de birleşir [43, 50].

Bu sistem sayesinde karaciğer oksijenli kan almakla birlikte bağırsaktan gelen besin maddelerini de işler. Ayrıca, karaciğerin ekzokrin ürünü olan safra, intrahepatik safra kanalı tarafından toplanır ve hepatic kanallar aracılığıyla boşaltılarak safra kesesinde biriktirilir. Bu süreç, sindirim sisteminin düzenli çalışması ve besinlerin etkili bir şekilde işlenmesi için kritik bir role sahiptir [50].



Şekil 2-3. Portal alan ve hepatic lobül yapısı.

2.1.2. Karaciğerin Histolojik Yapısı

Karaciğerin yapısal organizasyonu dört temel gruptan oluşmaktadır:

- 1- **Parankim:** Yetişkinlerde tek hücre kalınlığında olan ve sinüzoid kapillerle birbirinden ayrılan organize hepatosit plaklarından oluşmaktadır ve karaciğerin temel fonksiyonlarını yerine getiren ana hücreleri içermektedir.
- 2- **Bağ dokusu yapısındaki storma:** Glisson kapsülü ile devamlılık göstermektedir ve aynı zamanda içinde sinirler, safra kanalları, kan ve lenf damarları gibi çeşitli yapılar bulunmaktadır.
- 3- **Sinüzoidal kapillerler (Sinüzoidler):** Vasküler kanallardır ve hepatosit plakları arasında bulunmaktadır. Karaciğerin büyük bir kısmını kaplayarak oksijenli kanın ve besin maddelerinin hepatositlere ulaşımını sağlamaktadır.
- 4- **Perisinüzoidal aralıklar (Disse aralıkları):** Hepatositler ve sinüzoid endotel hücreleri arasında bulunmaktadır. Bu aralıklar, hücreler arası iletişimi ve metabolik etkileşimleri kolaylaştırmaya yardımcı olmaktadır [45].

2.1.3. Karaciğer Hücreleri

Karaciğer, parankimal hücreler ve birçok farklı tipte parankimal olmayan hücrelerden oluşmaktadır.[43] Bu hücrelerin yaklaşık %80'i hepatositlerden oluşurken, geriye kalan %20'si hepatik stellat hücreleri, endotel hücreleri, kupffer hücreleri ve lenfositler gibi parankimal olmayan hücrelerden oluşmaktadır (Tablo 2-2) [43, 49]. Parankimal olmayan hücrelerin hepsi sinüzoidlerde bulunmaktadır ve “hepatik sinüzoidal hücreler” olarak adlandırılır. Hücre dışı boşluk, karaciğer dokusu hacminin yaklaşık %16'sını oluşturmaktadır [49].

Parankimal hücreler (%80)	Hepatositler
	Endotel hücreleri
Parankimal olmayan hücreler (%20)	Hepatik stellat hücreleri
	Kupffer hücreleri
	Hepatik dendritik hücreler
	Pit hücreleri (NK hücreleri)
	Safra epitel hücreleri

Tablo 2-1. Karaciğer hücreleri

2.1.3.1. Hepatositler

Hepatositler, karaciğerin toplam hücre kütesinin yaklaşık %80'ini temsil etmektedirler. Hepatositler karaciğerin metabolik işlevlerinde önemli rollere sahiptir ve karaciğer lobülünün hücre plaklarını oluştururlar. Çok kenarlı ve 20-30µm büyüklüğünde olan hepatositler, birçok yüzeye sahip olmalarına rağmen 6 yüzeyli olarak tanımlanmaktadır. Bu yüzeylerinden ikisi perisinüzoidal aralığa bakmaktadır. Diğer yüzeyler ise komşu hücreler ve safra kanaliküllerine bakmaktadır. Hepatosit nükleusları geniş ve küre şeklindedir, hücre merkezinde bulunmaktadır. Hepatositlerin ana işlevi lipid, karbonhidrat ve protein metabolizmasına katılmaktır. Ayrıca albümin ve pıhtılaşma faktörleri gibi serum proteinleri üretiminde de görev almaktadırlar. Yetişkin karaciğerinde birçok hepatosit hücresinde çift nükleus bulunmaktadır ve hücrelerin çoğu tetraploiddir. Bu hücreler, sindirim sistemi ile ilişkili hücreler arasında en uzun ömürlü hücreler olarak bilinmekte ve ortalama yaşam süreleri 5 aydır [44, 45, 49].

2.1.3.2. Hepatik Stellat Hücreleri (HSH)

Hepatik stellat hücreler (HSH), mezenkimal kökenli hücrelerdir ve A vitamininin retinil esterleri şeklinde depolanması ve hücre dışı matrisin üretimi dahil olmak üzere çeşitli işlevleri

olduğu bilinmektedir. Bu hücreler disse aralığında bulunurlar ve genellikle birkaç sinüzoidle temas etmektedirler. Ayrıca sitoplazmaları içindeki lipid damlacıklarında büyük miktarlarda retinol ve retinil palmitat içermektedirler. Patolojik durumlarda HSH ler miyofibroblastlara dönüşebilir ve kolajen sentezleyerek fibrozise neden olabilirler. Bu fibrotik durum ilerlediğinde siroz gibi ciddi karaciğer hasarına yol açmaktadır [44, 45, 49].

2.1.3.3. Endotel Hücreleri

Endotel hücreleri, damarlar ve sinüzoidlerde geniş yüzey alanı sağlar ve besin emilimi için önemli bir rol oynamaktadır [49]. Bu hücreler ayrıca hücre dışı matris bileşenleri ve bağışıklık kompleksleri için büyük endositik kapasite göstermektedirler. Endotel hücrelerinin geniş uzantıları, çözünen maddelerin Disse'nin perisinüzoidal boşluğunda serbestçe hareket edebildiği gözeneklere veya fenestrasyonlara sahiptir. Genel olarak daha küçük boyutlu parçacıkları yutarlar ve virüslerin temizlenmesinde rol oynamaktadırlar, ancak fagositik fonksiyona sahip olmazlar. Ayrıca antijen sunan hücreler olarak işlev görebilirler, belirli sitokinleri ve eikosanoitleri salgılayabilirler [43, 44].

2.1.3.4. Kupffer Hücreleri

Karaciğer, vücudun en büyük doku yerleşik makrofaj popülasyonunu temsil eden büyük miktarlarda Kupffer hücrelerini içermektedir [44]. Kupffer hücreleri mononükleardir ve monositlerden köken almaktadır. Bu hücreler sinüzoidlerde bulunur ancak endotel hücreleriyle doğrudan bağlantı kurmazlar. Kupffer hücreleri, nispeten büyük partikülleri dolaşımdan uzaklaştıran intravasküler doku makrofajlarıdır. Yabancı partiküllerin ve enfekte edici organizmaların fagositozu ile birlikte sitokin üretimi için gereklidirler. Ayrıca, dalaktan karaciğere gelen hasarlı ya da yaşlanmış kırmızı kan hücrelerinin yıkımında önemli rolleri olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, Kupffer hücreleri sitoplazmalarında kırmızı kan hücreleri fragmanları ve ferritin formunda demir bulunmaktadır [43, 45, 49].

2.1.3.5. Lenfositler

Lenfositler enfeksiyona direnmeye yardımcı olmak için karaciğerde bulunan bağışıklık sisteminin bir parçası olarak işlev görmektedir [49].

2.1.3.6. Pit Hücreleri

Hepatosit dışı karaciğer hücrelerinin küçük bir kısmını oluşturan pit hücreleri, endotel hücrelerinin ve fibroblastların altında yer alan doğal öldürücü hücreler olarak bilinmektedirler [43].

2.1.3.7. Safra Sistemi ve Safra Epitel Hücreleri

Hepatositler safra, safra kanaliküllerine salgılamaktalar. Akışları sinüzoidlere paraleldir, ancak kan akış yönünün tersidir. Karaciğer safra salgısı yoluyla maddeleri dışkıyla dışarı atar ve safra asitlerini sağlayarak yağların bağırsaktan emilmesi gibi bağırsak işlevlerine katılır. Safra kanaliküllerinin uçlarında safra, epitel hücreleriyle kaplı gerçek kanallar olan safra kanallarına akar. Safra hücreleri, safra kesesine ve ince bağırsağa taşıyan kanallar (safra sistemi) oluşturur ve safra, hepatik venül yakınındaki hepatositlerden portal yol safra kanallarına akar. Safra kanalı hücreleri de safra oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Biliyer epitel hücreleri karaciğer nükleer popülasyonunun yaklaşık %3,5'ini temsil etmektedir [43].

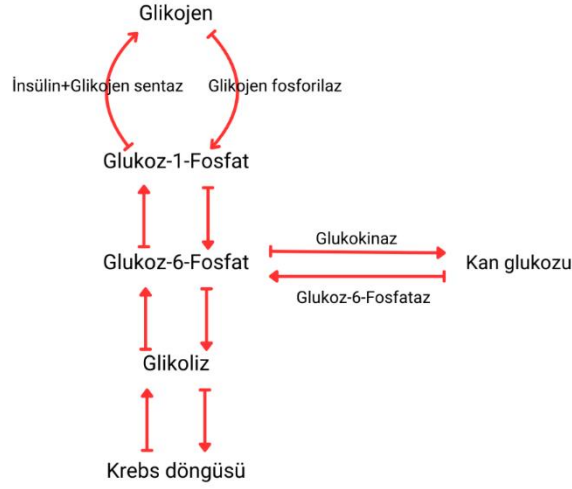
2.1.4. Karaciğerin Görevleri

Karaciğerin çeşitli işlevlerde görev almaktadır. Bu işlevler genel olarak metabolik işlevler, vasküler işlevler, immünolojik işlevler, salgı ve boşaltma işlevleri kategorilerinde sınıflandırılabilir [52].

Ancak karaciğerin ana metabolik fonksiyonları genel olarak üç ana kategoride tartışılabilir:

2.1.4.1. Karbonhidrat Metabolizması

Karaciğer karbonhidrat metabolizmasında kan glukoz seviyelerinin düzenlemesi gibi önemli rollere sahiptir. Karaciğer tokluk durumunda fazla olan glukozu karbonhidratın karaciğerde depolanan formu olan glikojene dönüştürür ve depolar (*Glikojenez*). Karaciğer açlık durumunda ise depolanan glikojeni enerji üretmek için parçalayarak glukozla dönüştürür (*Glikojenoliz*). Elde edilen glukoz kana verilerek kan glukoz değerlerinin düzenlenmesini sağlar. Karaciğer aynı zamanda açlık sırasında hepatik glikojen tükendiğinde amino asitlerden ve karbonhidratlardan glikoz sentezleyebilir (*Glukoneogenez*) [52].



Şekil 2-4. Karaciğerde karbonhidrat metabolizması

2.1.4.2. Lipid Metabolizması

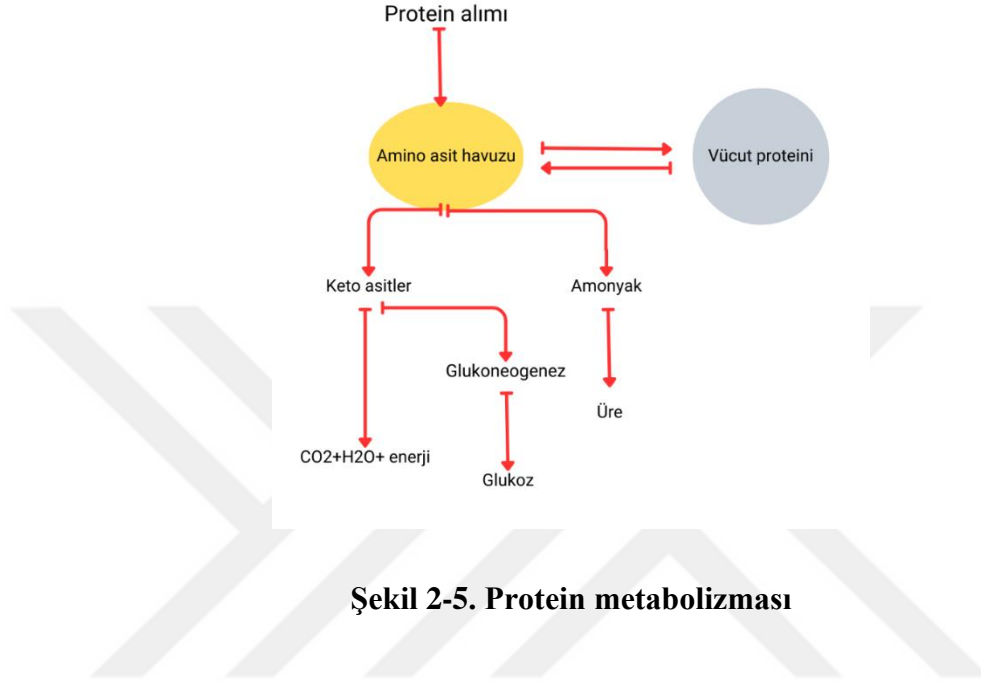
Karaciğer, kolesterol ve fosfolipidler gibi plazma lipidlerinin metabolizmasında önemli rol oynamaktadır. Karaciğer vücudun acil enerji ihtiyacında yağ asitleri ve karbonhidratların katabolizmasından türetilen asetil koenzim A (asetil CoA) molekülünü sentezleyebilir. Bu süreç *lipogenez* olarak adlandırılır. Daha sonra asetil CoA'dan kolestrol sentezlenir ve karaciğerde depolanır. Depolanan kolestrol ihtiyaç durumunda tekrar kullanılabilir. Lipidlerin hücrelere taşınıp çözünebilmeleri için lipoproteinlere dönüşmeleri gerekmektedir. Lipoproteinler ise yoğunluk farklarına göre çeşitli gruplara ayrılmaktadır. Karaciğer, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL), çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL) ve yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) gibi lipoproteinleri sentezlemekte görev alır [52].

2.1.4.3. Protein Metabolizması

Karaciğer, albümin ve transferrin gibi birçok proteinin, çeşitli pıhtılaşma faktörlerinin sentezinde ve metabolizmasında da görev almaktadır. Amino asitler, protein moleküllerinin yapı birimleridir ve bir amino grubu (-NH₂) ile bir karboksil grubu (-COOH) içerirler. Amino asitler birbirlerine bağlanarak proteinleri oluştururlar. Ayrıca karaciğer, amino asitlerin metabolizmasında da görev almaktadır [52].

Transaminasyon sürecinde hepatositlerde transaminaz enzimleri aracılığında bir amino asidin amino grubu reaktan bir α -keto aside transfer edilir ve bunun sonucunda bir amino asit ve bir α -keto asit oluşur. Deaminasyon sürecinde ise amino asitten bir amino grubu çıkarılır ve bunun

sonucunda amonyak (NH_3) meydana gelir. Karaciğer ise insan vücudu için toksik olan amonyağı üreye çevirir ve kanın pH'sının dengede kalmasını sağlar. Üre sonuçta böbrekler yoluyla atılır. Amino asitlerin geri kalanı ise enerji üretimi için kullanılır [52].



Şekil 2-5. Protein metabolizması

2.1.5. Karaciğer Hasarı

Karaciğer vücudun birçok metabolik sürecinde rol oynamaktadır, ancak hasara uğraması metabolizma, immün yanıt, detoksifikasyon ve antimikrobiyal savunmanın bozulması gibi ciddi durumlara neden olur [53]. Çeşitli ajanların neden olduğu doku hasarı, inflamasyon, nekroz ve fibrozis sonucunda normal karaciğer yapısının bozulur, siroz ve fonksiyonel bozulma ile sonuçlanabilir [43]. Karaciğer hastalıkları dünya çapında yılda yaklaşık iki milyon ölüme sebep olmakta ve hücre ölümünün çeşitli karaciğer hastalıklarının ilerlemesini yönlendirmede önemli rolü bulunmaktadır [7].

Karaciğer hasarı, hasarın süresine veya kalıcılığına bağlı akut ve kronik olarak ikiye ayrılır [54].

2.1.5.1. Akut Karaciğer Hasarı

Akut karaciğer hasarı (ALI) ve akut karaciğer yetmezliği (ALF), daha önceden karaciğer hastalığı olmayan bir hastada hızlı hepatosit fonksiyon kaybıyla karakterize, sıklıkla yaşamı

tehdit eden klinik sendromlardır. ALI/ALF, uzun süreli iskemi, toksin veya toksik maddeye maruz kalma, kendine özgü veya doza bağımlı ilaç reaksiyonu, neoplazi, metabolik bozukluklar, enfeksiyöz ve immün aracılı süreçlerin bir sonucu olarak ortaya çıkabilir [55]. Akut hasarlar çoğunlukla, zararlı ajanın ortadan kaldırılması ile normal karaciğer mimarisinin ve fonksiyonunun, önceki hasara dair kalıcı bir kanıt olmadan tamamen eski haline getirilmesi üzerine hızlı bir çözümle aşılabılır [54].

2.1.5.2. Kronik Karaciğer Hasarı

Kronik karaciğer hasarı, altı ay veya daha uzun bir süre boyunca proteinlerin sentezi, metabolizmanın zararlı ürünlerinin detoksifikasyonu ve safranın atılması gibi karaciğer fonksiyonlarının bozulmasına neden olan ilerleyici bir durumdur. Bu hasar; toksinler, uzun süreli alkol kullanımı, enfeksiyon, otoimmün hastalıklar, genetik ve metabolik bozukluklar gibi çeşitli sebepler sonucunda meydana gelebilir. Kronik karaciğer hasarı, karaciğer parankiminin iltihabı, yıkımı ve rejenerasyonunu içerir. Bu durum karaciğer fibrozu veya sirozu ile sonuçlanabilir [56].

2.2. Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus, dünya çapında 20 ila 79 yaş arasındaki tahmini olarak 537 milyon yetişkini etkileyen endokrin bir hastalıktır [57]. Pankreastaki insülin eksikliği sonucunda kanda glikoz seviyelerinin regülasyon bozulur. Yüksek kan şekeri, sık idrara çıkma, artan susuzluk ve artan açlık semptomları ile saptanır. Hastalık ilerledikçe kan damarları, gözler, böbrekler, kalp ve sinirler olmak üzere birçok vücut sistemi zarar görebilir ve retinopati, nöropati, nefropati, kardiyovasküler komplikasyonlar ve ülserasyon gibi ciddi diyabetik komplikasyonlara yol açabilir [58, 59].

Diyabet genel olarak, insüline bağımlı diyabet (IDDM, Tip I), insüline bağımlı olmayan diyabet (NIDDM, Tip II) ve gestasyonel diyabet olmak üzere üç tipe ayrılmıştır [58].

2.2.1. Tip 1 Diabetes Mellitus

Tip 1 Diabetes Mellitus (T1DM), pankreatik adacık β hücrelerinin seçici olarak immün sistem hücreleri tarafından yok edilmesi sonucu insülinin azalmasına bağlı yüksek kan şekeri (hiperglisemi) ile tanımlanan kronik otoimmün bir hastalıktır [60]. β hücrelerinin immün aracılı yıkımı, bu bozukluğun ayırt edici özelliği olarak bilinmektedir ve hiperglisemi yalnızca β

hücrelerinin yaklaşık %90'ı kaybolduğunda ortaya çıkmaktadır. Bu bozukluk, diyabetin etiopatolojiye göre yeniden sınıflandırılmasına kadar daha önce insüline bağımlı diyabet (IDDM) olarak biliniyordu [61]. Genellikle çocuklukta ve erken yetişkinlikte (<35 yaş) ortaya çıkan en yaygın endokrin ve metabolik durumlardan biri olarak bilinmektedir. Aynı zamanda bu tip diyabette genetik ve çevresel faktörler de etkilidir [59, 62].

2.2.2. Tip 2 Diabetes Mellitus

Tip 2 Diabetes Mellitus (T2DM), karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmasının düzensizliği, yetersiz insülin sentezi, salgılanması ve pankreatik β hücre yetmezliğinin bir sonucu olarak insülin duyarlılığı ile karakterizedir. Bu bozukluk aynı zamanda karaciğer, kas hücreleri ve yağ hücrelerine glikoz taşınmasında azalmaya yol açar. Normalde yaşamın dördüncü on yılından sonra teşhis edilir. Üç ana diyabet türünden T2DM, T1DM'den veya gebelik diyabetinden çok daha yaygındır. Dünya çapındaki tüm diyabetlerin yaklaşık %90-%95'ini oluşturmaktadır [58, 61-63]. Obezite ve yaş, T2DM için önemli risk faktörleridir [64]. Tip 2 diyabet ayrıca ketoza dirençli diyabet veya insüline bağımlı olmayan diyabet olarak da adlandırılır ve genetik, çevresel ve davranışsal risk faktörleri arasındaki etkileşimden kaynaklanır [59, 65].

T2DM'de hipergliseminin başlangıcında üç temel kusur vardır: Hepatik glikoz üretiminde artış, insülin sekresyonunda azalma ve insülin etkisinde bozulma. İnsülin direnci, insüline karşı bastırılmış veya gecikmiş yanıtları ve aynı zamanda hücre tarafından insülin alımındaki sorunu ifade etmektedir [66].

T2DM, genetik yatkınlık ve yaşam tarzına bağlıdır. Fiziksel hareketsiz yaşam, sigara kullanımı ve aşırı alkol tüketimi gibi bir dizi yaşam tarzı faktörünün T2DM gelişiminde önemlidir [65]. Obezite ve metabolik faktörlerdeki anormallikler T2DM görülme sıklığının merkezinde yer aldığından, gelişmekte olan ülkelerde diyet ve yaşam tarzındaki dikkate değer değişiklikler, bu ülkelerde en yüksek diyabet prevalansının ortaya çıktığını desteklemektedir [62].

İnsülin, metformin ve sülfonilüreler gibi T2DM'ye yönelik ilaçların çoğu öncelikle kan şekeri düzeylerini düşürmeyi amaçlamaktadır, ancak şu ana kadar T2DM'nin ilerleyici seyrini değiştirmeyi veya diyabetle ilişkili geç dönem komplikasyon riskini yeterince azaltmayı başaramamıştır [64].

2.2.3. Gestasyonel Diabetes Mellitus (GDM)

Gestasyonel diyabet (GDM), diyabetin gebelik sırasında yüksek kan şekeri düzeyi geliştirmesiyle ortaya çıkan ve gebelik dönemi sonunda düzelmesi anlamına gelen karbonhidrat intoleransı olarak bilinmektedir ve daha sonra Tip II diyabetine de dönüşebilir [58, 61, 62]. GDM şu anda hamileliğin en sık görülen tıbbi komplikasyonlarından biri olarak bilinmektedir. Genç kadınlarda tanı konmamış hiperglisemi ve hatta aşikâr diyabet prevalansı artmaktadır. Annede aşırı kilo ve obezite, ileri yaşta çocuk doğurma, ailede T2DM öyküsü ve etnik köken başlıca GDM risk faktörlerindedir [67]. Hamilelik ve gebelik dönemi sırasında, organizma büyük miktarda glikoz dalgalanmasından geçer ve sıklıkla hızlandırılmış açlık yaşarlar. Bu, plasentanın insülin salgısındaki artış ve ilk üç aylık dönemin sonunda insülin duyarlılığındaki azalmayla birleştiğinde, geçici bir insülin direnci durumuyla sonuçlanmaktadır [62].

2.2.4. Deneysel Diabetes Mellitus Modelleri

Hipergliseminin diyabetin başlangıcında birincil faktör olduğu varsayılmaktadır, ancak hiperlipidemi de rol oynamaktadır. Kan şekerinin düzenlenmesinde aktif olan başlıca organlar pankreas, karaciğer, iskelet kası, yağ dokusu, bağırsak ve böbrektir. Yeni anti-diyabetik ilaçların geliştirilmesi ve insanlarda klinik denemeler yapılmadan önce herhangi bir maddenin aktivitesinin açıklanması için çeşitli deneysel hayvan modelleri kritik öneme sahip olmaktadır [68].

T2DM, insülin direnci ve beta hücresinin bunu yeterince telafi edememesi ile karakterize olduğundan, hayvan modelleri, insülin direnci modellerini ve/veya beta hücre yetmezliği modellerini içermeye eğilimindedir [69].

Hayvanlarda deneysel Tip 2 diyabet modeli oluşturmak için kimyasal ajanlar, ilaçlar, çeşitli diyetler ve cerrahi uygulamalar kullanılmaktadır. Bir hastalığın deneysel hayvan modelinin varlığı, bu hastalığın hem patofizyolojisinin anlaşılmasına, aynı zamanda tedavisine yönelik ilaçların geliştirilmesine de yardımcı olur.

2.2.4.1. Spontan Diabetes Mellitus Modelleri

Tip 2 diyabetin spontan hayvan modelleri oldukça heterojendir. Spektrumun bir ucunda obezite ve hiperinsülinemi ile ilişkili hafif bir hiperglisemi vardır. Diğer uçta, Tip 2 diyabetin hayvan modelleri, yaygın beta hücre dejenerasyonu ile birlikte ciddi bir diyabet formu geliştirebilir ve ekzojen insülin gereksinimi ile sonuçlanır [70].

Kendiliğinden Tip 2 diyabetli hayvanlar, nesilden nesile aktarılan bir veya daha fazla genetik mutasyona sahip hayvanlardan (ob/ob, db/db fareler) veya birkaç nesil boyunca tekrarlanan üreme yoluyla diyabetik olmayan, aynı şekilde yetiştirilmiş hayvanlardan seçilerek elde edilebilir [71].

2.2.4.2. Genetiği Değiştirilmiş Diyabet Modelleri

Bu durumda kemirgenler, glikoz metabolizmasında önemli bir rol oynadığı düşünülen proteinleri fazla (transgenik) veya az (nakavt) eksprese edecek şekilde üretilebilir [72]. Genetik olarak indüklenen bu modellerde her zaman tipik bir diyabet profili görülmez ve insan T2DM'sinde gözlemlenen patogenezi kesinlikle taklit etmezler [73].

2.2.4.3. Hormon Kaynaklı Diabetes Mellitus

Uzun etkili bir glukokortikoid olan deksametazon, NIDDM üretmek için kullanılır. Deksametazon sıçanlarda birkaç gün boyunca günde iki kez 2-5 mg/kg i.p. dozunda uygulandığında diyabetin NIDDM formu oluşur [68].

2.2.4.4. Cerrahi Kaynaklı Diabetes Mellitus Modelleri

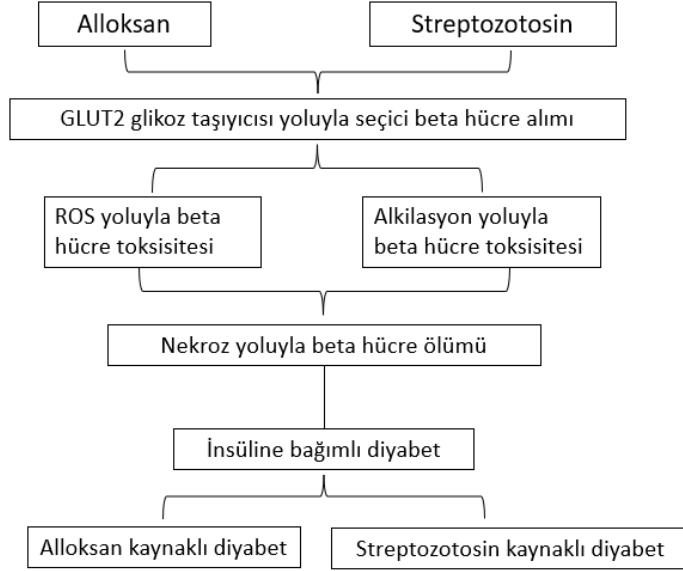
Pankreasın tamamının veya bir kısmının cerrahi olarak çıkarılmasıyla diyabetin tetiklenmesi sağlanabilir ve Tip 1 veya Tip 2 diyabet modeli oluşturulabilir. Parsiyel pankreatektomide diyabet oluşması için organın %90'ından fazlasının çıkarılması gerekir. Sağlam pankreas hücrelerinin miktarına bağlı olarak diyabetin süresi birkaç günden birkaç aya kadar değişebilir [68, 71, 72]. Pankreatektominin alloxan ve STZ gibi kimyasal ajanlarla kombinasyon halinde kullanılması, kedi ve köpek gibi hayvanlarda her prosedür bağımsız olarak uygulandığında oluşmayan stabil bir Diabetes Mellitus formu üretir [68].

2.2.4.5. Kimyasal Kaynaklı Diabetes Mellitus

Kimyasal olarak indüklenen diyabet modelleri, endokrin pankreatik yıkıcı süreçlerde ve ardından diyabet gelişiminde rol oynayan çevresel faktörlerin olası rolünün aydınlatılmasında yaygındır [71]. Kimyasal kaynaklı diyabet oluşturmak için Streptozotocin (STZ) ve Alloxan (ALX) kullanılan en yaygın ajanlar olarak bilinmektedir.

Hem alloxan hem de streptozotosin insülin eksikliğine neden olmaktadır. GLUT2 glikoz taşıyıcısı yoluyla seçici β hücre alım mekanizmaları ve bunun sonucunda nekrotik beta hücre ölümü ayıdır. Ancak ALX uygulandığında ROS ve STZ uygulandığında ise DNA alkilasyonu, bu glikoz analoglarının toksik etkisine aracılık etmektedir [74]. Öte yandan, bu glukoz

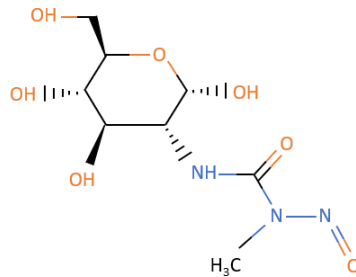
taşıyıcısının tübüler hücreler ve hepatositler gibi diğer organlarda da eksprese edilmesi, ALX ve STZ kaynaklı böbrek ve karaciğer hasarının nedeninide açıklamaktadır [74].



Şekil 2-6. Alloksan ve streptozotocin kaynaklı diyabet tipleri.

2.2.4.5.1. Streptozotocin Kaynaklı Diabetes Mellitus

Streptozotocin (STZ) *Streptomyces achromogenes*, üretilen geniş spektrumlu bir antibiyotik ve aynı zamanda kemoterapötik alkilleyici bir madde olarak bilinmektedir [68, 74]. STZ, yapısal olarak nitrosourea'nın glukozamin türevidir [71]. 1963 yılında Rakieten ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada streptozotocinin diyabetojenik olduğunu bildirmişlerdir [74-76].



Şekil 2-7. Streptozotocin'in kimyasal yapısı.

Streptozotocin, insülin sekresyonunu inhibe ederek insüline bağımlı diyabet durumuna neden olmaktadır [74]. Aynı zamanda alloksan gibi, pankreatik beta hücreleri üzerine doğrudan sitotoksik etkisi nedeniyle hiperglisemiye neden olmaktadır. Ayrıca, STZ'nin DNA zincirinin alkilasyonuna veya kırılmasına neden olduğu ve bunun sonucunda beta hücrelerinde NAD tüketen bir enzim olan poli-ADP-riboz sentetazın aktivitesinde bir artışa neden olarak enerji yoksunluğuna ve beta hücrelerinin ölümüne yol açtığı anlaşılmıştır [71].

STZ neredeyse tüm hayvan türlerinde diyabete neden olabilir. STZ, çoğunlukla sıçanlarda ve farelerde diyabet oluşturmak için kullanılmaktadır [68, 77].

Çoklu düşük dozda STZ uygulanması sıçanlarda immün aracılı pankreas insüline neden olarak diyabeti tetikler [68]. Yetişkin sıçanlarda T1DM oluşturabilen tek yüksek doz STZ enjeksiyonunun aksine, neonatal dönemde veya doğumdan hemen sonra yüksek doz STZ enjekte edildiğinde yenidoğan sıçanların yetişkin döneminde T2DM gelişir [71].

STZ'nin yarı ömrü, karaciğerdeki hızlı metabolizma ve renal atılım nedeniyle kısadır. STZ vücuttan atıldıktan sonra karaciğer veya böbrekte ortaya çıkan hasar diyabetik hipergliseminin etkilerine bağlanabilir [76].

Noman D. Ve arkadaşları (2014) tarafından yapılan çalışma sonucunda STZ kaynaklı diyabet, fare karaciğerinin biyokimyasal fonksiyonunu önemli ölçüde etkilediği, karaciğer aktivitesinde birçok rahatsızlığa neden olduğu ve karaciğer enzim belirteçlerinin ve diğer parametrelerin çoğu, STZ uygulamasından sonra çeşitli zaman aralıklarında en yüksek seviyelerde olduğu anlaşılmıştır [78].

2.3. Fruktoz

Fruktoz balda, meyvelerde ve sebzelerde bulunan endüstriyel bir tatlandırıcıdır. Fruktoz aynı zamanda bir glikoz izomeridir ancak yapısal, kimyasal ve metabolik yönleri bakımından farklılıkları vardır. Fruktoz ve glikoz altı karbonlu bir moleküler formüle ($C_6H_{12}O_6$) sahiptirler [14]. Bir keto-heksoz olan fruktoz enerji yoğunluğu ve indirgeyici özelliklere sahip olmaktadır. Bu tatlandırıcının tüketimindeki artışın, obezite ile yakından ilişkili olduğu anlaşılmıştır [79].

2.3.1. Fruktöz Metabolizması

Fruktozun hepatik metabolizması, hem glikoz hem de lipid metabolizması üzerinde önemli etkilere sahiptir [80]. Fruktöz metabolizması ile glikoz metabolizması arasında birçok farklılık bulunmaktadır. Fruktöz, duodenum ve jejunumun daha aşağı kısımlarında emilir [81]. GLUT5, glikoz veya galaktoz taşıma yeteneği olmayan fruktoza özgül tek taşıyıcıdır ve fruktozu bağırsak hücrelerine taşımaktadır. Bu işlem sodyuma bağımlı değildir ve enerji gerektirmemektedir [82]. GLUT-5'in pankreas β hücrelerinde ve beyinde bulunmaması, fruktozun bu dokulara sınırlı girişinin göstergesidir. Fruktözün yeteri kadar beyne taşınmaması sonucu beyne tokluk sinyalleri ulaşmamaktadır [80, 81]. Bağırsak hücresine taşınan fruktoz, GLUT-2 taşıyıcı protein yardımı ile portal dolaşıma aktarılır ve hedef organı karaciğerdir. Karaciğere taşınan fruktoz, GLUT-2 yoluyla hepatositlere alınmaktadır [83, 84]. Fruktöz hücre içine taşındıktan sonra fruktokinaz katalizatorlüğünde adenzin trifosfat yardımı ile fosforile olarak fruktoz-1-fosfatı oluşturmaktadır. Daha sonra fruktoz-1-fosfat, aldolaz B tarafından kolaylıkla parçalanarak gliseraldehit ve dihidroksiaseton fosfat oluşturulur [80, 81]. Her ikisi de gliseraldehit-3-fosfata dönüştürülebilir. Böylece fruktoz molekülü, glikolizdeki ana hız kontrol basamağı olan 6-fosfofruktokinazı atlayan 2 trioz fosfata metabolize olur [80]. Fruktöz, hız sınırlayıcı olan fosfofruktokinaz basamağını geçerek glikolitik yola geçmektedir. Bu aşamada metabolizma düzenlenemediğinden, yağ asitlerinin sentezi artar ve bunun sonucunda hem dolaşımda ve depolanan yağ miktarı artış gösterir. Adipoz doku dışındaki dokularda lipotoksisite meydana gelebilir [84].

2.3.2. Fruktözün Neden Olduğu Bozukluklar

Yüksek şeker alımı diyet kaynaklı sağlık sorunlarıyla bağlantılıdır. Tüketilen şekerlerdeki fruktoz içeriği de sağlığı etkileyebilir [85]. Fruktözün yüksek göreceli tatlılık, yüksek termojenik etki ve düşük glisemik indeks gibi bazı olumlu etkilerine rağmen, yüksek fruktozlu diyet, oksidatif stres, glikoz intoleransı, insülin direnci, T2DM, karaciğer hastalığı, hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalık dahil olmak üzere çok sayıda patolojik değişikliğe neden olmaktadır [85, 86]. Fruktöz büyük miktarlarda kullanıldığında insanlar için toksik olabilir. Bunun sonucunda hepatik asetil CoA'daki artışlar, T2DM ile ilişkili olan çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL) ve trigliseritlerin üretimini artmasına yol açar. Ayrıca fruktoz alımının artması, oksidatif ve endoplazmik retikulum stresi ile karakterize hepatik stres

tepkisine yol açmaktadır [16, 80]. Yapılan çalışmalarda, reaktif oksijen türlerinin (ROS) yüksek seviyeleri ve antioksidan savunma mekanizmalarının azalması, doku fonksiyon bozukluğuna, karaciğer, böbrek, beyin ve testis gibi çeşitli organların hasarına yol açtığı saptanmıştır [16, 87, 88].

Yüksek miktarda fruktoz alımı T2DM ile ilişkilendirilmiştir. Kan şekeri seviyesinde artışa neden olmak için fruktozun karaciğerde glikoza dönüştürülmesi gerekir. Fruktozun glikoza dönüşümü zaman aldığından ve aynı zamanda fruktozun bir kısmının glikoz oluşturduğundan, kan şekerini benzer glikoz seviyelerine göre daha az arttırmaktadır. Bunun sonucunda pankreatik B hücrelerinin uyarılmaması, fruktoz alımından sonra glikoza kıyasla daha düşük insülin salgısına neden olmaktadır [84, 85].

Yüksek fruktozlu diyetler sıçanlarda ve ördeklerde karaciğer yağlanmasına neden olmuştur. Bu tür diyetler aynı zamanda hepatik lipid peroksidasyonunda artışlara ve sıçanların karaciğerindeki inflamatuvar yolların aktivasyonuna neden olmuştur [89-91].

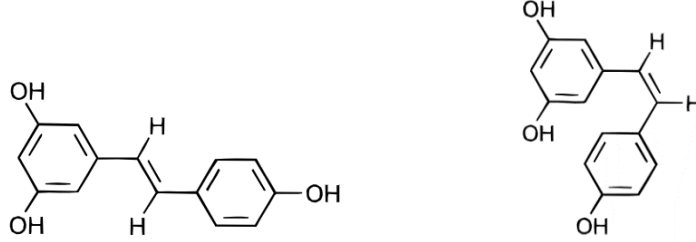
2.4. Resveratrol (RSV)

Resveratrol (3,5,4'-trihidroksi-trans-stilben), çok sayıda bitki tarafından bakteri veya mantar kolonizasyonuna ve çevresel strese yanıt olarak üretilen flavonoid olmayan bir fenoldür [92-94]. Stres faktörlerinin varlığı stilben sentaz enziminin hızlı aktivasyonunu tetikler, bu da öncüsü fenilalanin üzerine etki ederek resveratrolün biyosentezini kolaylaştırır [95]. Doğal olarak oluşan bir fitoaleksinin olan resveratrolün en zengin *Vitis vinifera L.* (Vitaceae)'dir, ayrıca *Polygonum cuspidatum* bitkisinin kökündende izole edilir. Resveratrol yer fıstığı, Itadori çayı, üzüm ve kırmızı şarapta da önemli miktarda bulunmaktadır [94, 96]. Bu bileşik farklı farmasötik dozaj formlarında bulunur ve besin takviyesi olarak tavsiye edilir [96]. Klinik öncesi çalışmalardan elde edilen bilgiler sonucunda, resveratrolün çeşitli insan hastalıklarını etkileme potansiyeline sahip olduğu anlaşılmıştır [97].

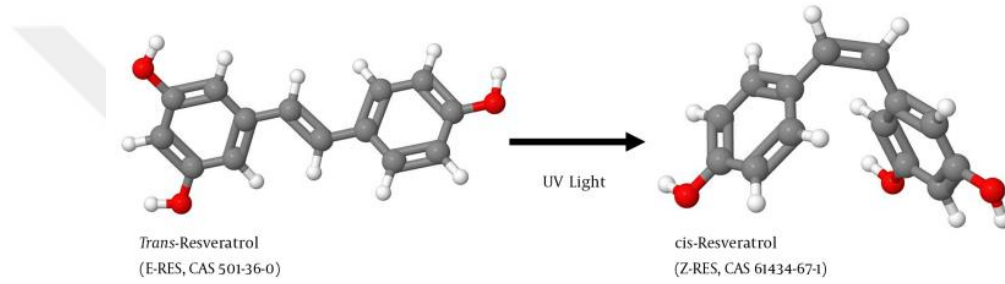
2.4.1. Resveratrolün Formları

Resveratrol (RSV) cis ve trans izomerik formlarda bulunmaktadır [98] ve yüksek düzeyde hidrofobiktir. RSV, ethanol ve DMSO gibi organik çözücülerde yüksek çözünürlük göstermesine rağmen, suda zayıf çözünürlüğüne sahiptir ve lipofilitesi nedeniyle yüksek membran geçirgenliği göstermektedir [95]. Trans-izomer, cis-izomerden daha yaygın ve biyolojik olarak aktiftir. Ancak trans-resveratrol, güneş ışığına, yüksek yoğunluklu beyaz ışığa

veya 360 ve 254 nm'deki ultraviyole (UV) ışığa maruz kaldığında kolaylıkla cis-izomerine izomerleşebilir [95, 99, 100].



Şekil 2-8. Trans- ve cis- resveratrolün kimyasal yapısı [98].



Şekil 2-9. Trans-resveratrolün cis-resveratrole izomerleşmesi [101].

2.4.2. Resveratrolün Etkileri

Resveratrol, antioksidan [102], kardiyoprotektif [103], anti-inflamatuar [104], antiviral, antimikrobiyal, nöroprotektif [105], östrojenik ve antikanser [106] özelliklere sahiptir. [100, 107] Resveratrolün antikanser aktivitesini, aşağı yönlü sinyal yollarını tetikleyen ROS seviyelerinin düzenlenmesi yoluyla gösterdiğine inanılmaktadır [95]. Son yıllarda insanlarda ve kemirgenlerde obezite ve/veya diyabet modellerinde glikoz düşürücü etkileri olduğu anlaşılmıştır [94, 96]. Resveratrolün kan glikoz seviyesini düşürmesi, kandaki insülin seviyesinin artmasıyla ilişkilidir. Antioksidan aktivitesi ile resveratrolün pankreas β hücrelerini koruduğu anlaşılmıştır. Aynı zamanda resveratrol iskelet kası üzerinde farklı mekanizmalar ile etkili olduğu ve T1DM hayvanlarda iskelet kası fonksiyon bozukluğunu hafiflettiği anlaşılmıştır [107]. Resveratrolün hem Tip 1 hem de Tip 2 diyabetik hayvan modellerinde nefropati [108], diyabetik nöropati [109], diyabetik retinopati [110], kardiyovasküler hastalıklar [111], karaciğer hasarı [38] ve Tip 1 diyabetin neden olduğu serebovasküler bozukluğunun [112] biyokimyasal ve klinik parametrelerini iyileştirdiğini gösteren çalışmalar vardır [40].

Resveratrolün faydalı etkilerinin altında yatan mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır, ancak karaciğer, böbrek ve beyin gibi dokuları oksidatif stresin neden olduğu çeşitli hasarlara karşı koruyucu etkisinin antioksidan özelliği ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [92]. Resveratrol, hücreler üzerinde, büyümenin durdurulmasından, farklılaşmanın tetiklenmesine ve/veya programlanmış hücre ölüm kaskadının aktivasyonuna kadar değişen karmaşık bir dizi etkiyi uyarmaktadır [93].

2.4.3. Resveratrol ve Karaciğer

Resveratrol, karaciğer hasarının önlenmesinde ve tedavisinde önemli bir rol oynayabilir. Yapılan çalışmalarda, resveratrolün farklı hepatit modellerinde antioksidan özellikleri doğrulanmış ve hepatik fibrozun azalmasına yol açtığı anlaşılmıştır. Ayrıca resveratrol, hayvanlarda insülin direncini ve lipid profilini modüle ederek hepatik steatozu azaltabilir [92, 113]. Resveratrol hepatik glutatyon (GSH) içeriğini arttırdığı, serbest radikalleri temizlediği ve hepatik metabolizma enzimlerini indüklediği gösterilmiştir [113]. Aynı zamanda inflamatuvar kaskadını indükleyen transkripsiyon faktörü nükleer faktör-kappa B'yi (NF- κ B) de inhibe eder ve nükleer translokasyonunu azaltarak transkripsiyonuna müdahale etmektedir [114-116]. Ek olarak resveratrol, birçok pro-inflamatuvar sitokinin de önemli bir azalma sağlamaktadır [117].

RSV, adenosin monofosfatla aktifleştirilen kinazın (AMPK) ve sirtuin 1'in (SIRT1) bir aktivatörü olarak bilinmektedir. Bu iki protein, fibrozis ve siroz gibi karaciğer hastalıklarıyla ilişkili yağın parçalanmasına ve karaciğerden uzaklaştırılmasına yardımcı olmada kritik bir role sahiptir [118].

Resveratrol, asetaminofen, etanol ve karbon tetraklorür (CCl₄) gibi iyi bilinen birçok hepatotoksin tarafından üretilen karaciğer hasarına karşı koruma sağlar [119-122].

2.4.3.1. Resveratrol ve NAFLD

Alkolsüz yağlı karaciğer hastalığının (NAFLD) prevalansı yüksektir. NAFLD obezite, diyabet ve hipertrigliseridemi ile bağlantılıdır [123]. Resveratrolün NAFLD üzerindeki etkileri, LDL reseptörlerinin düzenlenmesiyle ilişkili olduğu bilinmektedir [113]. Resveratrol, karaciğer hücrelerinde AMPK ve SIRT1'in aktivasyonu, antioksidan ve anti-inflamatuvar etkileri yoluyla, karaciğer hasarını önleyerek NAFLD'nin ilerlemesini engeller [124].

Resveratrolün çok çeşitli hepatik bozukluklarda ilgili antioksidan özellikleri olduğu anlaşılmıştır. Etkisi esas olarak ROS/reaktif nitrojen türleri azaltılması, doğrudan serbest

radikallerin ortadan kaldırılması ve endojen antioksidan enzim aktivitesinde (örn. SOD, CAT, GSH) bir iyileşme ile sağlanır. Ayrıca RSV, antioksidan moleküllerin sentezini ve mitokondriyal enerjinin biyogenezinde yer alan ilgili genlerin ekspresyonunu teşvik eder [113]. Abir Kasdallah ve arkadaşlarının (2007) yaptığı bir çalışmada, kronik etanol maruziyetinin neden olduğu karaciğer hasarında resveratrolün, lipid peroksidasyonunu inhibe ederek ve antioksidan enzimlerin aktivitesini iyileştirerek bu toksisiteyi önlediği anlaşılmıştır [125].

2.5. Hücre Ölümü

Ölüm, tüm canlı organizmalar için geçerli olduğu gibi, bireysel hücreler için de geçerlidir. Çok hücreli organizmaların büyümesi, gelişmesi ve varlığını sürdürmesi yalnızca hücre çoğalmasına değil aynı zamanda onları yok edecek mekanizmalara da bağlıdır [126, 127].

Hücre ölümü, onarılamaz yapısal hasarla birlikte hayati hücresel işlevlerin geri döndürülemez şekilde zarar görmesi olarak tanımlanabilir. Hücreler hasar gördüklerinde veya enfekte olduklarında ölürlere, bu da organizmanın sağlığını tehdit etmeden ortadan kaldırılmasını sağlar. Bu nedenle, hücre ölümü, çeşitli fizyolojik veya fizyolojik olmayan nedenler (örneğin, iskemi, hipoksi, ilaçlar ve kimyasallar, bağışıklık reaksiyonları, enfeksiyöz ajanlar ve yüksek sıcaklık veya radyasyon) tarafından uyarılabilir [126].

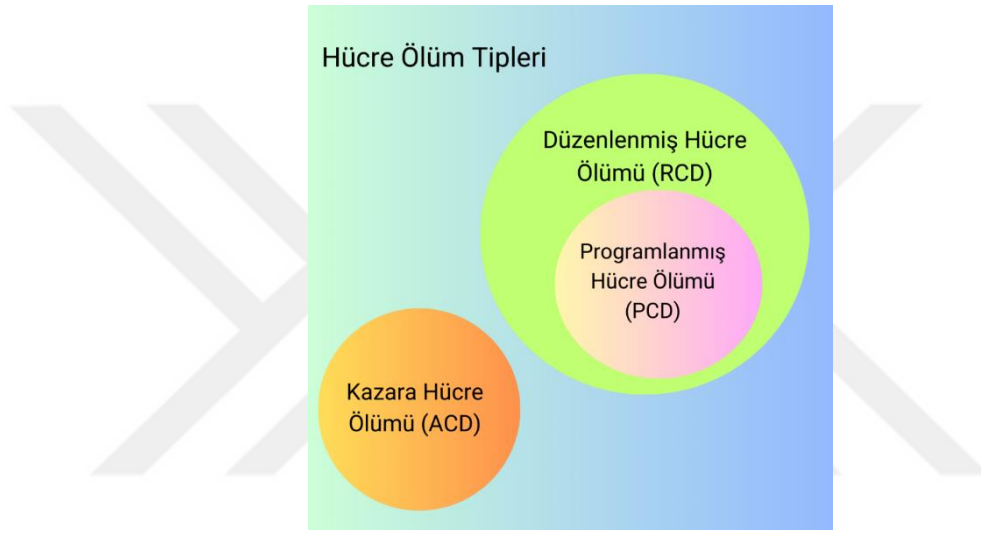
Ayrıca hücre ölümü nörodejeneratif hastalıklar, kanser, gelişimsel ve immünolojik bozukluklar dahil olmak üzere birçok patolojik durumlarla ilişkili olabilir [128, 129].

Uluslararası Hücre Ölüm Terminaloji Komitesi (2015) temel olarak hücre ölüm mekanizmalarını

- *Kazara hücre ölümü* ve
- *Düzenlenmiş (Regüle) hücre ölümü* olarak gruplandırmıştır.

Kazara hücre ölümü (ACD), yüksek sıcaklık, yüksek basınç gibi fiziksel, güçlü deterjanlar ya da pH'ta ani yüksek değişimler gibi kimyasal ve mekanik uyarıların neden olduğu hasarlardan kaynaklanır ve neredeyse anında gerçekleşir. Bu hücre ölüm tipi hücrenin parçalanmasına sebep olur ve her türlü farmakolojik veya genetik müdahaleye karşı duyarsızdır ve kontrol edilemez.

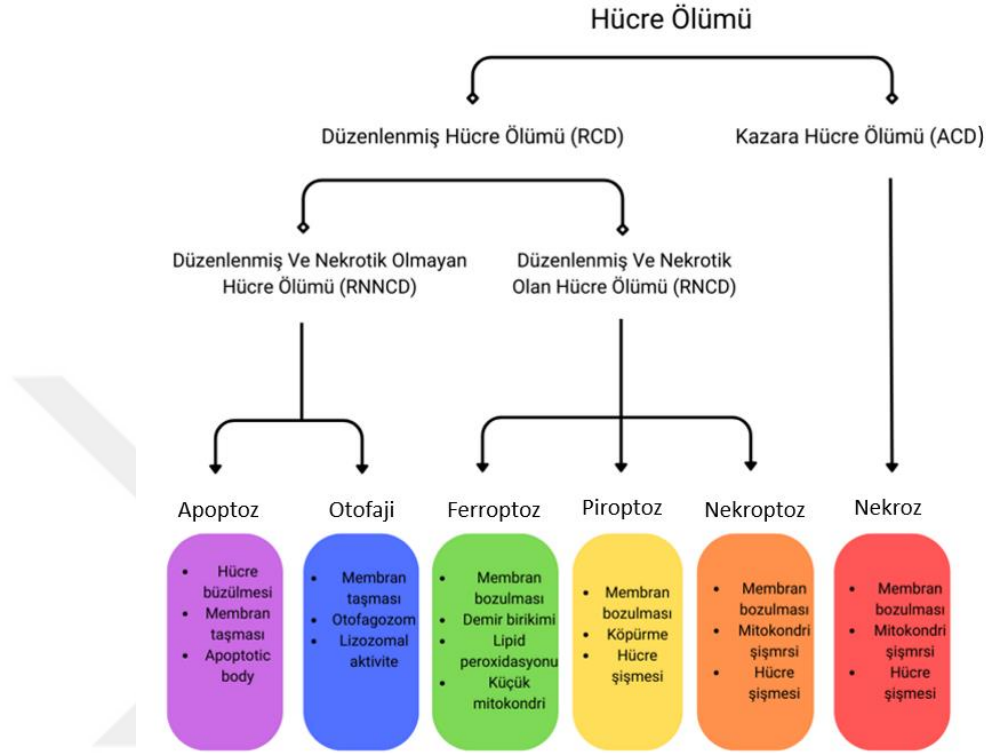
Düzenlenmiş hücre ölümü (RCD), özel moleküler mekanizmalara dayanır. Farmakolojik veya genetik olarak düzenlenebilir ve sıklıkla nispeten gecikmeli bir şekilde ortaya çıkmaktadır. Bu hücre ölüm tipi sadece çok hücreli yaşam formlarına özgü değildir. Hücresel homeostaziye yeniden sağlamaya çalışan adaptif yanıtlar bağlamında başlatılır. Başlatıcı uyarana bağlı olarak bu tür tepki bir organeli içerebilir veya otofaji gibi hücre çapında bir seviyede çalışabilir. RCD yalnızca mikro çevresel bozulmaların bir sonucu olarak değil aynı zamanda post-embriyonik gelişim, doku homeostazisi ve immün yanıt sırasında da ortaya çıkabilir. Bu tür fizyolojik RCD örnekleri genellikle 'programlanmış hücre ölümü' (PCD) olarak adlandırılır [130-132].



Şekil 2-10. Hücre ölüm tipleri.

RCD, tek hücreli ökaryotların (maya ve *Dictyostelium discoideum*) yanı sıra bazı prokaryotların (*Escherichia coli*) gelişimi veya yenilenmesi sırasında da meydana gelir. Bu durumlar, RCD'nin tamamen fizyolojik formlarını ifade eden programlanmış hücre ölümü (PCD) olarak da bilinir [131]. PCD, metazoan hücreleri için önemli terminal yollardan biridir ve morfogenez, doku homeostazisinin korunması ve zararlı hücrelerin ortadan kaldırılmasını içeren çeşitli biyolojik olaylarda rol oynamaktadır. PCD'nin işlev bozukluğu insanlarda kanser ve çeşitli dejeneratif hastalıklar dahil olmak üzere bazı hastalıklara yol açtığı bilinmektedir [133]. PCD morfolojik olarak hücrenin yuvarlaklaşması, kromatinin yoğunlaşması (piknoz), çekirdeğin parçalanması (karyoreksis), apoptotik cisimciklerin oluşumu ve apoptotik cisimlerin çevredeki makrofajlar tarafından fagositozu gibi özellikleri içermektedir [132]. Geleneksel olarak hücre ölümü apoptoz ve nekroz olarak ikiye ayrılır. Ancak yapılan son çalışmalarda, nekroz ve apoptozun yanı sıra, kendine özgü biyolojik süreçlere ve patofizyolojik özelliklere sahip başka yeni

programlanmış ölüm modellerinin de bulunduğunu göstermiştir [134]. Örneğin nekroptoz ve ferroptoz, hassas genetik kontrol altında olan ve çeşitli fizyolojik ve patolojik bağlamlarda işlev görebilen iki ayrı düzenlenmiş nekroz yolu olarak bilinmektedir [135].



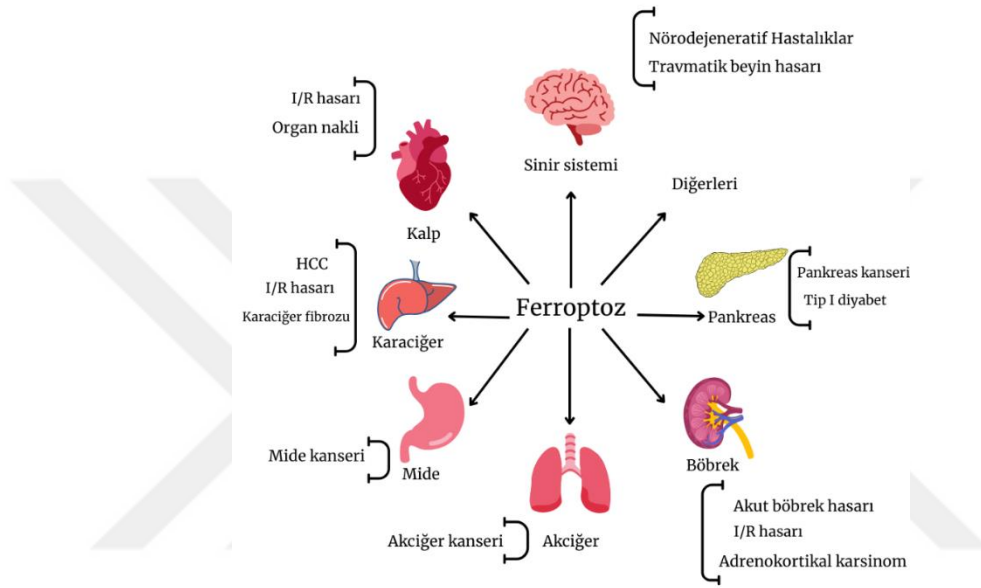
Şekil 2-11. Çeşitli hücre ölüm tiplerinin sınıflandırılması

2.5.1. Ferroptoz

Ferroptoz, 2012 yılında Dixon tarafından keşfedilen, apoptotik olmayan, yeni bir hücre ölüm tipi olarak bilinmektedir. Bu hücre ölüm tipi düzenlenmiş nekrozun demire bağımlı bir şeklidir ve bazı temel sitolojik değişikliklerle karakterize edilir. Ferroptoz, hücrel homeostazisinin kaybından kaynaklanır. Biyokimyasal olarak ferroptoz geçiren hücrelerde, hücre içi glutatyon (GSH) tükenmesi ve glutatyon peroksidaz 4'ün (GPX4) aktivitesinde azalma vardır. Lipid peroksitleri, GPX4 ile katalize edilen indirgeme reaksiyonu ile metabolize edilemez ve Fe^{2+} , lipidleri fenton benzeri bir şekilde oksitleyerek büyük miktarda, ferroptozu teşvik eden reaktif oksijen türlerinin (ROS) artmasına sebep olur [134-136].

Demire bağımlı fosfolipid peroksidasyonu tarafından yönlendirilen bu benzersiz hücre ölümü şekli, redoks homeostazisi, demir kullanımı, mitokondriyal aktiviteye bağımlıdır, ayrıca amino asit, lipid ve şeker metabolizması dâhil olmak üzere birçok hücrel metabolik yol tarafından

düzenlenir [137]. Yapılan araştırmalar sonucu ferroptozun sinir sistemi hastalıkları, böbrek hasarı, kan hastalıkları, iskemik organ hasarı ve kanser de dahil olmak üzere birçok hastalıkla ilişkili olduğu anlaşılmıştır. Ferroptotik hücre ölümü, lipofilik antioksidanlar, demir şelatörleri, lipid peroksidasyon inhibitörleri ve ölümcül lipid peroksidasyonunu yönlendiren ana substratlar olan çoklu doymamış yağlı asil fosfolipidlerin (PUFA-PL'ler) tükenmesi ile inhibe edilebilir [138].



Şekil 2-12. Ferroptoz çeşitli hastalıklarda rol oynamaktadır.

2.5.1.1. Ferroptozun Morfolojisi

Ferroptoz morfolojik, biyokimyasal, genetik ve fonksiyonel olarak diğ er hücre ölüm tiplerinden farklıdır. Morfolojik olarak ferroptoz, mitokondrinin bariz büzülmesi, artan mitokondri membran yoğunluğu ve mitokondriyal kristallerin azalması veya yok olmasıyla kendini gösterir; ancak hücre membranı sağlamdır, nükleusun büyüklüğü normaldir ve kromatin kondensasyonu gözlenmez [134, 139, 140]. Bu hücre anormallikleri, yoğun membran lipid peroksidasyonu ve oksidatif stresin ortaya çıkması nedeniyle plazma membranının seçici geçirgenliğinin kaybından kaynaklanmaktadır [136].

	Tanımı	Morfolojisi	Biyokimyasal
Apoptoz	<ul style="list-style-type: none"> Mitokondri geçirgenliğinin değişmesi. Sonlandırıcı kaspaz (3) aktivasyonu. 	<ul style="list-style-type: none"> Hücre ve nuklear hacim azalması Nuklear fragmentasyon Plazma membranında tomurcuklanma 	<ul style="list-style-type: none"> Mitokondri içeriğinin sitoplazmaya sızması DNA fragmentasyonu
Nekroptoz	<ul style="list-style-type: none"> Kaspaz bağımsız. Siklofilin D bağımlı. RIP1 , RIP3 ,MLKL proteinleri ile regülasyon 	<ul style="list-style-type: none"> Plazma membran bozulması Sitoplazma ve organel şişmesi ,kromatin kümelenmesi Hücre içeriğinin çevreye sızması 	<ul style="list-style-type: none"> ATP azalması NADPH oksidaz aktivasyonu Kaspaz inhibisyonu
Piroptoz	<ul style="list-style-type: none"> Plazma membranında por oluşumu İnflamatuar kaspaz aktivasyonu 	<ul style="list-style-type: none"> Plazma iç membranın dış yüzeye dönmesi Membranlar arası iyon geçişi Sitoplazmik şişme Ozmotik lizis 	<ul style="list-style-type: none"> Kaspaz 1 ve 7 aktivasyonu IL1b ve IL18 salınımı
Ferroptoz	<ul style="list-style-type: none"> GPX4 tarafından düzenlenir. Hücre içi oksidatif dengenin bozulması ile başlar. Demir şelatorleri ve lipofilik antioksidanlar ile baskılanır. 	<ul style="list-style-type: none"> Mitokondriyal membran yoğunluğunun artışı Kristalin azalması Dış mitokondri ve nukleus membranında yırtılmalar 	<ul style="list-style-type: none"> Demir birikimi Lipid peroksidasyonu

Tablo 2-2. Hücre ölüm tipleri ve farkları.

Ferroptoz Duyarlılığını Kontrol Eden Yolaklar

Sistem Xc⁻

Sistem Xc⁻, fosfolipid çift katmanlarında geniş çapta dağılmış bir amino asit anti taşıyıcı (transporter) olarak bilinmektedir. Hücrelerdeki önemli bir antioksidan sistemin parçasıdır. SLC7A11 ve SLC3A2 olmak üzere iki alt birimden oluşan bir heterodimerdir. Hücre içerisinde bulunan glutamat hücre dışına gönderilirken sistin, Xc⁻ sistemi tarafından 1:1 oranında hücre içine alınır. Alınan sistin hücrelerde GSH sentezinde rol alan sisteine indirgenir. GSH, glutatyon peroksidazların (GPX'ler) etkisi altında ROS'u ve reaktif nitrojeni azaltır Sistem Xc⁻ aktivitesinin engellenmesi, sistin emilimini engelleyerek GSH sentezini etkiler. Bu da GPX aktivitesinde ve hücre antioksidan kapasitesinde bir azalmaya, lipid ROS birikimine ve sonuçta oksidatif hasar ve ferroptozun oluşmasına yol açar [134, 141, 142].

GPX4

GPX ailesinin bir üyesi olan GPX4, ferroptozun meydana gelmesinde kilit rol oynar. Bir selenoprotein olan GPX4, memeli hücrelerinde fosfolipid hiperoksitlerin (PLOOH) azaltılmasını ve dolayısıyla detoksifikasyonunu katalize eden ana enzimdir. GPX4, GSH'yi oksitlenmiş glutatyon (GSSG) haline dönüştürür ve sitotoksik lipid peroksidleri (L-OOH) ilgili alkollere (L-OH) indirger [134, 137]. GPX4'ün etkisizleştirilmesi ferroptozla sonuçlanabilir.

GPX4'ün aşırı ifadesi ise ROS üretimini azaltabilir [141]. Ferroptozun ayrı bir hücre ölüm tipi olarak tanınmasından önce Conrad ve arkadaşlarının fare embriyonik fibroblastları üzerinde yaptıkları deneysel çalışma sonucunda, GPX4 kaybının lipid peroksidasyonuna bağı olarak beynin hipokampus ve kortikal bölgelerinde apoptotik olmayan hücre ölümüne ve nörodejenerasyona neden olduğu anlaşılmıştır [134, 137].

GPX4, PLOOH'yi nötralize eden ana enzim olduğundan, erastin/RSL3 kaynaklı ferroptozun altında yatan genel bir mekanizma anlaşılmıştır: her iki bileşik de GPX4'ü etkisiz hale getirir. RSL3 bunu doğrudan yapar ve elastin bunu dolaylı olarak sistin alımını engelleyerek yapar. Böylece hücreleri GSH'nin temel bir hücresel yapı taşı olan sisteinden mahrum bırakır. Sonuç olarak, PLOOH'lar birikerek muhtemelen membranlarda hızlı ve onarılamaz hasara neden olarak hücre ölümüne yol açar [137].

Kükürt Transfer Yolu

Kükürt içeren bir amino asit olan metiyonin, kükürt transfer yoluyla S-adenosil homosistein ve sisteine katalize edildikten sonra GSH sentezine katılabilir. Sistein eksikliğinde homosistein sistatyonine (sistein öncüsü) dönüştürülebilir ve daha sonra sistein havuzunu yenilemek için sisteine dönüştürülerek GSH sentezine hazırlanır. Yeterli GSH üretimi ile hücreler oksidatif hasardan korunabilir [141].

P53

P53 geni önemli bir tümör baskılayıcı gendir. P53 aracılı hücre döngüsü inhibisyonu, yaşlanma, apoptoz, tümör oluşumu ve gelişiminde önemli rol oynar. Yapılan araştırmalar, p53'ün ferroptoz üzerindeki transkripsiyon veya translasyon sonrası mekanizmalar yoluyla ikili etkileri ortaya çıkmıştır. P53, SLC7A11'in transkripsiyonel baskılayıcısıdır ve sistin alımını inhibe ederek GPX4 aktivitesini etkileyerek antioksidan kapasitenin, ROS birikiminin ve ferroptozun azalmasına yol açar. P53 ayrıca GLS2 (glutaminaz 2) ve SAT1 (spermidin/spermin N1-asetiltransferaz 1) ekspresyonunu artırarak ferroptozu duyarlı hale getirebilir. GLS2, glutatyonu azaltarak ve hücresel ROS seviyelerini artırarak ferroptozun düzenlenmesine katılır. SAT1, p53'ün transkripsiyonel hedefidir ve poliamin katabolizması için önemli bir hız sınırlayıcı enzimdir. SAT1, PUFA oksidasyonunu ve lipid peroksidasyonunu artıran demir bağlayıcı bir enzim olan 15-LOX'un ekspresyonunu ve aktivasyonunu destekleyebilir. Öte yandan, p53, DPP4'ün (dipeptidil peptidaz 4) aktivitesini doğrudan kısıtlayarak veya CDKN1A/p21'in

(sikline bağımlı kinaz inhibitörü 1A) ekspresyonunu teşvik ederek ferroptozu inhibe edebilir. Bu nedenle p53, ferroptozu iki yönlü bir yolla düzenleyebilir, ancak spesifik mekanizmanın hala daha fazla çalışmaya ihtiyacı vardır [134, 141, 143].

Demir Metabolizması

Normal demir metabolizması organizmanın hayatta kalması için çok önemlidir. Esas olarak oksijen taşınmasında, DNA biyosentezinde, trikarboksilik asit (TCA) döngüsünde, koenzim olarak elektron taşıma zincirinde ve ATP sentezinde rol oynamaktadır [131]. Vücuttaki demirin anormal dağılımı ve içeriği normal fizyolojik süreçleri etkileyebilir [134]. Hücrelerdeki aşırı demir iyonu seviyeleri, Fenton reaksiyonu yoluyla metabolik toksisite sergileyen ROS oluşumunu katalize ederek hücre hasarına veya ölüme yol açabilir. Ek olarak demir, lipid peroksidasyonundan ve oksijen homeostazisinden sorumlu enzimler olan lipoksijenaz (ALOX) veya EGLN prolin hidroksilazların (PHD) aktivitesini artırabilir. Bu nedenle demirin hem akışı hem de depolanması ferroptoz oluşumunu etkileyebilir [131, 140].

Ferroptoz adından anlaşıldığı üzere, demire bağlıdır. İlk olarak, enzimatik olmayan, demire bağımlı Fenton zincir reaksiyonu ferroptoz için gereklidir. GPX4 inhibe edildiğinde, PLOOH'lar daha uzun süre varlığını sürdürebilir ve ferroptozun ayırt edici özelliği olan PLOOH'ları hızla yükseltmek için Fenton reaksiyonunu başlatır. PLOOH'lar hem ferröz hem de ferrik iyonlarla reaksiyona girerek sırasıyla PLO• ve PLOO• serbest radikallerini oluşturabilir ve hasar verici peroksidasyon zincir reaksiyonunu tetikleyebilir. Muhtemelen birçok hücresel süreç, hücresel kararsız demir içeriğini değiştirerek hücrelerin ferroptozu karşı duyarlılığını değiştirir. Ayrıca, hem-oksijenaz 1 (HO-1) aracılı hem degradasyonu yoluyla demirin serbest bırakılmasının da ferroptozda rol oynadığı gösterilmiştir. Ancak bir dizi çelişkili veri, HO-1'in ferroptozu teşvik ettiğini veya bastırdığını ileri sürmektedir [144].

Yapılan bir çalışmada, farelerde hepatosit spesifik transferrin kodlayan genin nakavt edilmesi sonucunda bu farelerin demir açısından zengin bir diyetle beslenmesi, hepatositlerdeki demir yükünü arttırdığı anlaşılmıştır. Bu bulgu, farelerin karaciğer fibrozuna karşı daha duyarlı hale geldiklerini ve karaciğer patolojisinde ferroptozun da rol oynadığını düşündürmüştür. Araştırmacılar bu çalışmada ayrıca transferrin ekspresyonunun yokluğunda hepatositlerin, bir metal taşıyıcı olan SLC39A14'ün ekspresyonunu telafi edici şekilde yukarı regüle ettiğini, bunun da daha sonra ferroptozu tetikleyen aşırı demir alımına yol açtığını göstermişlerdir [144].

Nrf2

Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (NRF2), hücrel antioksidan aktivitede önemli bir rol oynayan, GSH antioksidan sistemlerinin bileşenlerinin transkripsiyonunu düzenleyen, ekzojen ve endojen ürünlerin faz I ve faz II detoksifikasyonunda ve demir ve lipid metabolizmasında rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür. Normal koşullar altında hücre içi Nrf2 homeostazisi, sitoplazmada Nrf2'yi ubiquitinleştiren ve 26S proteazomu tarafından parçalanmak üzere hedefleyen E3 ubiquitin ligaz Keap1 (Kelch ECH-ilişkilendirici protein 1) tarafından düşük tutulur. Oksidatif stres koşulları altında veya elektrofilik xenobiyotiklerin varlığında, Keap1'in aktivitesi azalır içi Nrf2 ve KEAP1 birbirinden ayrılır; daha sonra Nrf2 çekirdeğe transloke edilir ve KEAP 1 bozulurken antioksidan ve ferroptoz ile ilgili genlerin transkripsiyonunu başlatır. Böylece, Nrf2'nin aktivasyonu demir alımını kısıtlayabilir, demir depolamasını artırabilir, oksidatif stresi ve ferroptozu önleyebilir [145].

HO-1

Önemli bir antioksidan enzim olan HO-1, esas olarak hem'i ferröz demir (Fe^{2+}), karbon monoksit ve biliverdin'e katalize eder [146]. Bu enzim ferroptozun düzenlenmesinde ikili rol oynadığı düşünülmektedir. HO-1'in anti-inflamatuar, antikanser, antiproliferatif, antiapoptotik, antioksidan ve sitoprotektif olarak görev yaptığı bildirilmiştir. HO-1'in aşırı ekspresyonu böbrek hücrelerinde ferroptozu azaltır ve HO-1'in nakavt edilmesi bu hücrelerde erastin kaynaklı ferroptozu artırır. Bununla birlikte, HO-1'in aşırı aktivasyonu aynı zamanda hücre içi aşırı demir birikimini artırarak ferroptozu indükleyebilir. Gelişmiş pro-oksidan koşullar altında, hemden kaynaklanan çok sayıda Fe^{2+} , ROS oluşumunu teşvik edebilir, lipid peroksidasyonunu artırabilir ve son olarak ferroptozu indükleyebilir. HO-1'in aşırı ekspresyonu, Fe^{2+} sunarak HT-1080 fibrosarkom hücrelerinde erastin kaynaklı ferroptozu ağırlaştırır. Bu nedenle HO-1, ferroptozun düzenlenmesinde karmaşık bir rol oynar [141].

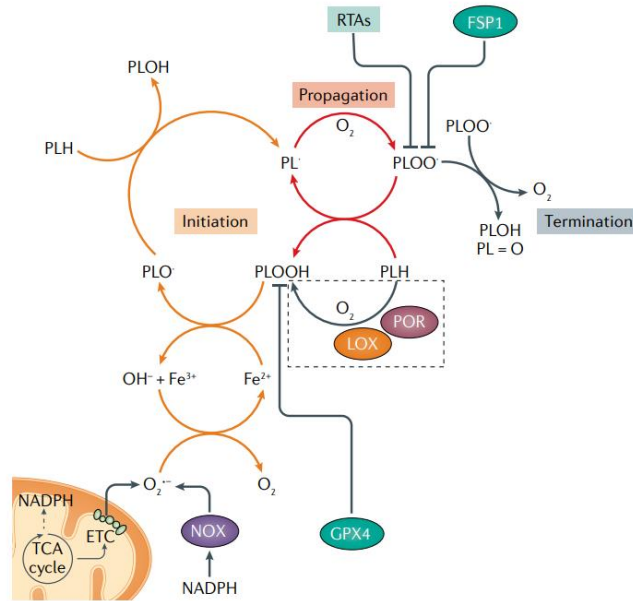
Lipid metabolizması

Dislipidemi hücre ölümünün bir sinyalidir ve lipid metabolizması da ferroptoz ile yakından ilişkilidir [131]. Lipid peroksidasyonu, esas olarak hücre zarındaki doymamış yağ asitlerini etkileyen, serbest radikallerin yönlendirdiği bir reaksiyondur [140]. Çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA'lar) lipid peroksidasyonuna duyarlıdır ve ferroptoz için temel unsurlardan biri olarak bilinmektedir [134]. Lipid peroksidasyonu üç aşamadan oluşmaktadır: başlatma,

yayıma ve sonlandırma. Lipid peroksidasyonunu başlatan mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılammıştır ancak potansiyel olarak hem enzimatik hem de enzimatik olmayan işlemlerle meydana gelebilir. Enzimatik olmayan lipid peroksidasyonu, teorik olarak, bir zincir reaksiyonu katalize etmek için demir ve oksijeni kullanan ve fosfolipid peroksidasyonunun yayılmasına yol açan fenton reaksiyonu tarafından yönlendirilir [137].

Lipid peroksidasyonunun enzimatik mekanizmasında, Lipoksijenazların (LOX'ler) ve/veya sitokrom P450 oksidoredüktazın (POR), lipidlerin dioksijenasyonunu uyardığı anlaşılmıştır, ancak lipoksijenazların ferroptotik süreçte rol oynadığına dair kesin kanıtlar bulunmamaktadır. Ancak biyolojik membranlardaki PUFA'ları ve PUFA içeren lipidleri doğrudan oksijenleyebilir olduklarından, ferroptoz indüksiyonuna aracılık edebileceği ihtimalini artırır [137].

Sonunda bu, lipid peroksitlerin (4-hidroksinonenal ve malondialdeyde gibi) parçalanma ürünleri ve oksitlenmiş ve değiştirilmiş proteinler dahil olmak üzere sayısız ikincil ürünün oluşumuna yol açacaktır. Bu zincirleme reaksiyon sonunda membran bütünlüğünün bozulmasına ve sonuçta organel ve/veya hücre membranlarının yırtılmasına yol açabilir. Bu nedenle, yüksek PUFA-PL içeriğine sahip membranlar, nöronlarda kanıtlandığı gibi, peroksidasyona karşı özellikle savunmasız olmalıdır. Mitokondri, endoplazmik retikulum, peroksizomlar, lizozomlar ve plazma zarındaki zarlar gibi ferroptoz sırasında meydana gelen lipid peroksidasyonu ile ilgili kesin hücresel membranlar henüz belirsizdir [137].



Şekil 2-13. Fosfolipid peroksidasyon mekanizmaları [137].

Mevalonat Yolu

Çeşitli araştırmalar, mevalonat (MVA) yolunun yanı sıra FSP1/CoQ10/-NAD(P)H yolunun, lipid peroksidasyonunu ve ferroptozu inhibe etmek için GPX4 ile sinerji oluşturan bağımsız paralel mekanizmalar olarak hizmet edebildiğini bulmuştur. İzopentenil pirofosfat (IPP) ve antioksidan CoQ10, MVA yolunun iki hayati ürünüdür. IPP, GPX4'ün etkili translasyonu için gerekli bir düzenleyici olan selenosistein tRNA'nın olgunlaşmasını stabilize ederek GPX4 sentezini modüle edebilir. CoQ10, bir oksidoredüktaz olan ferroptoz baskılayıcı protein 1 (FSP1) tarafından azaltılabilir ve aynı zamanda lipid peroksidasyonunu engelleyen lipofilik radikal yakalayıcı bir antioksidan olarak da işlev görür. FSP1 nakavtına sahip hücreler, ferroptotik indükleyicilere karşı daha duyarlıdır ve bu ferroptotik süreç, FSP1'in aşırı ekspresyonuyla kurtarılabilir. Ayrıca FSP1, GPX4 delesyonunun neden olduğu ferroptozu karşı koruyucudur [141].

2.5.1.2. Ferroptoz ve Karaciğer

Demir metabolizması, T2DM, karaciğer fonksiyonu ve karaciğer hasarı arasındaki ilişkiler karmaşıktır [147]. Hepatositler, plazmada stabil glikoz ve lipoprotein konsantrasyonlarının korunmasına yardımcı olan karaciğer hücrelerindedir. Aynı zamanda hepatositler, demir depolamanın ana bölgesi olarak görev yapar ve bağırsak epitel hücrelerinde ve makrofajlarda dolaşımdaki demir transferrine bağlanarak plazma demir içeriğini kontrol eden hepsidin gibi düzenleyici hormonları salgılayarak kandaki demir içeriğini düzenler.

Aşırı demir yükü ve oksidatif stres, çoğu karaciğer hastalığında karaciğer hasarına ve hastalığın ilerlemesine yol açan en önemli iki tetikleyiciyi oluşturur [11]. Karaciğer hasarı ile kalıtsal ve edinsel aşırı demir yükü arasında net bir ilişki bulunmaktadır. Ferroptoz aşırı demir yükünü belirleyebilir çünkü ferritinofajinin indüksiyonu hücrel demirin aktif mobilizasyonunu uyarır. Sonuç olarak, kontrolsüz serbest demir, karaciğer üzerinde toksik bir etki yaparak, karaciğer hastalıklarının ilerlemesini teşvik eder ve ciddi ikincil etkilere yol açar [148]. Kronik karaciğer hastalığının nedenlerinden olan NAFLD'nin görülme sıklığı hızla artmaktadır [11]. NAFLD, basit yağlı karaciğerden karaciğer sirozuna kadar metabolik stresin neden olduğu çok çeşitli karaciğer hastalıklarını temsil eder. Alkolsüz steatohepatit (NASH), NAFLD'nin bir ara aşamasıdır. NAFLD patogeneğinde, lipid peroksidasyonunun neden olduğu oksidatif stres önemli bir başlangıç faktörü olarak kabul edilir ve metabolik bozukluğun neden olduğu demir birikimi de hepatosit genişlemesi, inflamasyon ve fibrozis riskini artırarak NASH'ı ağırlaştırıcı

bir faktör olarak görev yapar. Bu nedenle, ferroptozun NAFLD'de hepatik lezyonların gelişimini hızlandırdığı anlaşılmıştır [149]. NAFLD hastalarının tipik özellikleri olan obezite ve insülin direncinde demir dengesizliği de söz konusudur [11].



3. YÖNTEM

3.1. MATERYAL

3.1.1. Kullanılan Deneysel Hayvanları

Çalışmada kullanılan karaciğer dokuları, İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan izin alınarak 2017-2018 yıllarında yapılan “*Fruktoz ve streptozotocin ile oluşturulan diyabet modelinde resveratrol ve vitamin D tedavisinin karaciğer ve endoplazmik retikulum stresine etkileri*” başlıklı projeye ait arşiv dokulardır.

Bu çalışma da kullanılan karaciğer dokularının arşiv doku materyali olduğundan, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı tarafından (İUC-HADYEK) **22.01.2023-599966** sayılı kararla etik kurulu onayına gerek olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

3.1.2. Kullanılan kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar ilgili tablolarda bulunmaktadır. (Tablo 3-1, Tablo 3-2)

Kullanılan kimyasallar	Marka
Streptozotocin (STZ)	Adipogen LifeScience AG-CN2-0046
Resveratrol (C ₄ H ₁₂ O ₃)	Glentham Life Sciences GP5884
D-(-)-Fruktoz	Glentham Life Sciences GC9966
Ksilazin	Rompun %2 Bayer
Steril Apirojen İzotonik NaCl çözeltisi	Medifleks Eczacıbaşı
Ketamin	Ketalar Pfizer

Tablo 3-1. Hayvan deneyinde kullanılan kimyasallar

Kullanılan kimyasallar	Marka
Fosfat Tamponu (PBS Tablet)	Thermo Scientific
Antibody Diluent, 125ml	Thermo Scientific

Large Volume AEC Substrate System, 125ml	Thermo Scientific
Sitrat Tamponu (pH:6), 1L	Thermo Scientific
Hematoxylin solution 500 ml (Mayer's modified)	Abcam
Toluen Gr For Analysis, 2,5 L	Merck
Ethanol, 5L	
Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂), 1L	Merck
Tween 20	Aldrich
Methanol, 2.5L	Riedel-de Haen

Tablo 3-2. İmmünohistokimyada kullanılan kimyasallar

3.1.3. Kullanılan Cihazlar ve Sarf malzemeleri

Çalışma sürecinde kullanılan cihazlar ve sarf malzemeleri ilgili tablolarda bulunmaktadır. (Tablo 3-3, Tablo 3-4)

Kullanılan Cihazlar	Marka
Etüv	Elektro-Mag M420B
Sterilazatör	Elektro-Mag M420
Mikrotom	Reichert 390965
Distile su cihazı	Millipore, Elix3
Işık Mikroskobu	Leica (DM 2500)
Işık mikroskobu kamerası	Leica (DFC 280)
Vorteks	Elektro-Mag M16
Isıtcılı manyetik karıştırıcı	Elektro-Mag M221
Hassas terazi	Ohaus Galaxy 4000
Mikrodalga fırın	Kenwood
Mikropipetler	MediSis, Ependorf
Buzdolabı	İndesit
Derin dondurucu	(-20) Bosch

Santrifüj cihazı	Hettich Zentrifugen, D-78532
Çeker ocak	
Ultra Turrax homojenizatör	IKA, Könjgswinter, Almanya
Synergy H1	BIOTEK, USA

Tablo 3-3. Kullanılan cihazlar.

Kullanılan Sarf Malzemeler
Pozitif Yüklü Lam (72'li Kutu)
Pipet uçları
Pastör pipeti
Cam malzemeler (Şale, Beher, Mezur)
Lamel (24x60 mm, 24x32 mm)
Hidrofobik kalem
Mikrotom Bıçağı
İmmünohistokimya boyama kabı (Chamber)

Tablo 3-4. Kullanılan sarf malzemeleri.

3.1.4. Kullanılan kitler

Deney sırasında kullanılan kitler ilgili tabloda bulunmaktadır. (Tablo 3-5)

Kullanılan Kitler	Marka
UltraVision Detection System LargeVolume Anti-Polyvalent, HRP	REF: TP-125-HL, Thermo Scientific, UK
Ultravision Detection System Large Volume AEC Substrate System	REF: TA-125-HA- 125 ml, Thermo Scientific, UK
H&E Staining Kit (Hematoxylen Eosin)	ab245880; Abcam, USA
Van Gieson Trichrome Kit (100 testlik)	VG-100; BioGnost, Croatia

Tablo 3-5. Deney sırasında kullanılan kitler.

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Deney Modelinin Oluşturulması

Çalışmada, İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Laboratuvar Hayvanları Anabilim Dalı'ndan temin edilen 24 adet 8 haftalık erkek *Sprague-Dawley* sıçanlar kullanıldı. Deney gruplarında bulunan tüm hayvanlar, deneye başlamadan bir gece öncesi aç bırakıldı ve sabah glukometre cihazı ile açlık kan glukozu ölçümü yapıldı.

Deneyin başlangıcında deney hayvanları rastgele diyabetik ve sağlıklı kontrol gruplarına ayrıldı, ardından resveratrol tedavisi uygulanan ve resveratrol tedavisi uygulanmayan olmak üzere 4 deney grubu oluşturuldu. Kontrol gruplarına deney süresince çeşme suyu ve standart yem verildi. Diyabetik gruplarda ise, kontrol gruplarından farklı olarak, %10'luk fruktozlu su ve standart yem verildi. Diyabetik gruba deneyin 2. Haftasında tek doz streptozotocin (40 mg/kg, ip) enjeksiyonu yapıldı. 5 haftanın sonunda 4 haftalık resveratrol (1 mg/kg/gün) tedavi süreci başlatıldı. Bu süreçte diyabetik gruplara %10'luk fruktozlu su verilmesi bırakıldı ve kontrol grupları gibi içme suyu ve standart yem verildi. Deney grupları aşağıdaki gibi oluşturulmuştur (Tablo 3-6):

1. **Kontrol Grubu (K):** Deney süresince deney hayvanlarına standart yem ve çeşme suyu verildi. Deneyin 4. Haftasından itibaren günlük tek doz ip serum fizyolojik uygulaması yapıldı.
2. **Kontrol Resveratrol Grubu (KR):** Deney süresince deney hayvanlarına standart yem ve çeşme suyu verildi. Deneyin 5. haftasının tamamlanmasından sonra 4 hafta süre ile günlük 1mg/kg/gün dozunda ip resveratrol uygulaması yapıldı. (*Resveratrol, DMSO içerisinde çözüldü ve ardından PBS ile dilüe edilerek hazırlandı.*)
3. **Diyabetik Grup (YF) :** Deneyin ilk 5 haftasında deney hayvanları %10'luk fruktozlu su ve standart yem ile beslendi. Deneyin 2. haftasında tek doz streptozotocin (40 mg/kg) ip olarak uygulandı. Deneyin 5.haftasının sonundan itibaren deney hayvanlarına 4 hafta süresince her gün tek doz i.p. PBS enjeksiyonu yapıldı. Ayrıca 5. haftanın sonundan itibaren deney hayvanlarına standart yem ve çeşme suyu verilmeye başlandı.
4. **Resveratrol Tedavisi Uygulanan Diyabetik Grup (YF-R):** Deneyin ilk 5 haftasında deney hayvanları %10'luk fruktozlu su ve standart yem ile beslendi. Deneyin 2. haftasında tek doz streptozotocin (40 mg/kg) ip olarak uygulandı. Deneyin 5. haftasının

tamamlanmasından sonra 4 hafta süre ile günlük 1mg/kg/gün dozunda ip resveratrol uygulaması yapıldı. (*Resveratrol, DMSO içerisinde çözüldü ve ardından PBS ile dilüe edilerek hazırlandı.*) Ayrıca 5. haftanın sonundan itibaren deney hayvanlarına standart yem ve çeşme suyu verilmeye başlandı.

Deney hayvanlarının açlık kan glukozu ölçümü 2, 5 ve 9. haftaların sonunda tekrarlandı. Her hafta deney hayvanlarının ağırlıkları ve günlük tüketilen yem ve su miktarları ölçüldü. Aşağıdaki formüle göre günlük alına kalori miktarları hesaplandı.

Alınan günlük kalori miktarı: (Günlük tüketilen standart yem miktarı x2,6) + (Günlük içilen fruktozlu su miktarı x40) / 100 formülü ile hesaplandı. (1gr standart yem: 2,6 kalori; 1gr fruktoz: 4 kalori olarak alındı.) (Standart yem içeriği: % 5 yağ, %25 protein ve % 70 karbonhidrat)

9. haftanın sonunda ketamin/ksilazin (60 mg/kg/ 10 mg/kg) anestezisi altında deney hayvanları sakrifiye edildi. Alınan karaciğer dokularının bir kısmı parafine gömüldü ve bir kısmı ise -80°C'de saklandı.

Gruplar	0-2 Hafta	2.Haftanın sonu	2-5 Hafta	5-9 Hafta
Sağlıklı kontrol grubu (K)	Standart yem + İçme suyu	Serum Fizyolojik Enjeksiyonu	Standart yem + İçme suyu	Standart yem + İçme suyu
Resveratrol tedavisi uygulanan kontrol grubu (KR)	Standart yem+ İçme suyu	Serum Fizyolojik Enjeksiyonu	Standart yem + İçme suyu	Standart yem + İçme suyu + Resveratrol 1 mg/kg/gün
Diyabet grubu (YF)	Standart yem+ Fruktozlu su (%10'luk)	40 mg/kg, ip, tek doz STZ enjeksiyonu	Standart yem+ Fruktozlu su (%10'luk)	Standart yem + İçme suyu
Resveratrol tedavisi uygulanan diyabetik grup (FR)	Standart yem+ Fruktozlu su (%10'luk)	40 mg/kg, ip, tek doz STZ enjeksiyonu	Standart yem+ Fruktozlu su (%10'luk)	Standart yem + İçme suyu + Resveratrol 1 mg/kg/gün

Tablo 3-6. Deney düzeneği.

3.2.2. Biyokimyasal Parametrelerin İncelenmesi

3.2.2.1. *Doku lizatlarının hazırlanması:*

30-50 mg karaciğer dokusu hassas terazide tartıldı ve 1:3 oranında pH değeri 7.4 olan sodyum fosfat (Na_2PO_4) çözeltisi içerisinde S18N-10G problu Ultra Turrax homojenizatör (IKA, Königswinter, Germany) ile homojenize edildi. Proteaz inhibitör kokteyl tableti homojenizasyondan hemen önce NaPO_4 çözeltisine eklenerek, karaciğer örnekleri içerisindeki protein degradasyonu engellendi. Homojenizasyon sonrası örnekler soğutmalı santrifüjde 14.000 rpm'de 30 dakika 4°C 'de santrifüj edildi. Daha sonra süpernatant toplanılarak -80°C 'de Saklandı [150].

3.2.2.2. *Örneklerde çözünebilir protein konsantrasyonunun belirlenmesi:*

Karaciğer lizatları içerisindeki çözünebilir protein konsantrasyonu sıçan GSH/GSSG (E-BC-K097, ELABSCIENCE, USA), sıçan glutatyon peroksidaz 4 (GPX4, SL1771Ra, SUNLONG BIOTECH, China), sıçan Araşidonat 5-lipoksijenaz (ALOX-5, SL0301Ra, SUNLPNG BIOTECH, China), sıçan yağ asidi sentezi (FASN, SL0402Ra, SUNLONG BIOTECH, China) kitleri ile belirlendi.

GPX4 (glutatyon peroksidaz 4), ALOX-5 (araşidonat 5-lipoksijenaz), FASN (yağ asidi sentezi) testleri için standart olarak kit içerisinde çıkan seyreltmeler kullanılarak standart eğri çizildi. 50 μl protein standardı 96 kuyucuklu ELISA plaklarına eklendi. Karaciğer örnekleri kuyucuklarına ise 10 μl karaciğer örneği ve 40 μl örnek dilüenti ilave edilerek 37°C 'de 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra dilüe edilen yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı ve kit içinde bulunan horseradish peroksidaz (HRP) eklenerek 37°C 'de 30 dakika inkübe edildi. Tekrar yıkama yapıldı ve kromojen eklenerek 15 dakika inkübasyon yapıldı. Son olarak 50 μl durudurma solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu. GPX4, ALOX-5, FASN absorbansları 450 nm'de Synergy H1, (BIOTEK, USA) cihazında ölçüldü. Örnekler içerisindeki protein konsantrasyonu standartlar ile karşılaştırmalı olarak hesaplandı [150].

GSH/GSSG (glutatyon) testi için 20 mg karaciğer dokusu homojenize edilerek 23 dakika 15000 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatant kullanılmak üzere alındı. Total GSH ve GSSG ölçümü için 2 numaralı solüsyon ile 10 mL çifte distile su karıştırıldı. Hazırlanan solüsyondan 1mmol/L alınarak 3 numaralı solüsyon ile 1:49 oranında seyreltildi ve standart solüsyonu hazırlandı. Bu solüsyon kullanılarak kit içerisinde önerilen miktarlara göre 8 farklı konsantrasyonda standartlar hazırlandı. (Tablo 3-7) Total GSH ölçümü için, standartlardan ve karaciğer

örneklerinden 10 μ L alınarak plaktaki ilgili kuyucuklara eklendi. 150 μ L reaktif çalışma solüsyonu tüm kuyucuklara eklenerek 25 °C’de 5 dakika inkübe edildi. Daha sonra 50 μ L 9 numaralı solüsyon eklenerek 5 saniye karıştırıldı. 25 °C’de 5 dakika inkübe edildikten sonra 412 nm’de OD (*Optikal Density*) değeri ölçümü yapıldı. GSSG ölçümü için her bir standarttan 100 μ L alındı ve 20 μ L 7 numaralı solüsyon ile karıştırıldı. Örneklerden GSH uzaklaştırılması için her bir örnekten 100 μ L alındı ve 20 μ L 7 numaralı solüsyon ile karıştırıldı. Daha sonra 100 μ L her birinden alınarak eppendorf tüplerine aktarıldı. 4 μ L 8 numaralı solüsyon eklendi ve 25 °C’de 1 saat inkübe edildi. Standartlardan ve elde edilen örneklerden 10 μ L alınarak ilgili kuyucuklara eklendi ve total GSH ölçümü için yapılan aşamalar tekrarlanarak 412 nm’de OD değeri ölçümü yapıldı.

Standart	Standart Konsantrasyonu	20 μ mol/L Standart Solüsyonu (μ L)	3 Numaralı Solüsyon (μ L)
1	0	0	400
2	0.5	10	390
3	1	20	380
4	2	40	360
5	5	100	300
6	8	160	240
7	10	200	200
8	15	300	100

Tablo 3-7. GSH/GSSG testinde standart hazırlama protokolü.

3.2.3. Dokuların İncelenmesi

Alınan karaciğer doku örnekleri, %10’luk tamponlanmış nötral formalin ile +4°C’de bir gece fikse edildi. Ardından sırasıyla yükselen alkol serisinden (%70 →%100 alkol) geçilip, parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklarından pozitif şarjlı lamalar üzerine alınan kesitler bir gece 37°C etüvde bekletildi. Hazırlanan karaciğer kesitleri, dokunun genel morfolojik incelenmesi için Hematoksilen+Eozin, kolajen artışının gösterilmesi için Van Gieson boyası ve demir birikiminin incelenmesi için ise Prusya mavisi ile boyandı [16, 151].

3.2.3.1. Hematoksilen+Eozin (H+E) Protokolü

Doku kesitleri deparafinizasyon işleminin ardından rehidratasyon için üçer dakika sırasıyla %100-%96-%70'lik azalan alkol serisinden geçirildi Karaciğer dokusunun genel morfolojisini gösterebilmek için H+E boyama kiti (Hematoxylen ve Eosin, ab245880, Abcam, USA) kullandı. Hematoksilen ile nükleuslar maviye, sitoplazma ise pembeye boyandı. Boyama için kit içerisindeki protokol takip edildi.

3.2.3.2. Van Gieson Boyama Protokolü

Karaciğer doku kesitleri deparafinizasyon ve rehidratasyonun ardından olası fibrozisi göstermek için Van Gieson Trichrome Kiti (REF: VG-X BioGnost, Croatia) kullanılarak kolajenler yoğun kırmızıya boyandı. Boyama için kit içerisindeki protokol takip edildi.

3.2.3.3. Prusya Mavisi Boyama Protokolü

1. Karaciğer doku kesitleri sırasıyla ksilen, aseton ve azalan alkol serisinden geçirilerek deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemleri uygulandı.
2. Dokuların üzerine potasyum ferrisiyanid-hidroklorik asit karışımından oluşan solüsyon eklenerek 1 saat cam önünde bekletildi.
3. Doku kesitleri yıkanarak akan çeşme suyunun altında bekletildi.
4. Kesitlere bazik fuksin eklendi ve 2 dakika bekletildi.
5. Suyla yıkandıktan sonra aseton ve ksilenden geçirilerek entellan ile kapatıldı.

H + E, Prusya mavisi ve Van Gieson boyaları ile boyanan karaciğer doku kesitleri ışık mikroskobu altında x200 büyütmede değerlendirildi. Kesit üzerinde rastgele 10 alanda fibrozis ve yağlı dejenerasyon skorlaması yapıldı. (Tablo 3-8)

0	Sağlam karaciğer
1	Sentrilobüler nekroz ve yağlı dejenerasyon
2	Sentrilobüler ve ortolobüler yağlı dejenerasyon, Perivenüler fibrozis
3	Septal fibroz, Psödolobül oluşumu
4	Rejeneratif nodül oluşumu, Siroz

Tablo 3-8. Karaciğer örneklerinde fibrozis ve yağlı dejenerasyon skorlaması.

3.2.3.4. İmmünohistokimya Boyama Protokolü

Karaciğer doku kesitlerinde, Glutasyon peroksidaz 4 (GPX4, pAb, 1:300, Cat no: 1933, Abclonal, USA), Sirtuin 1 (Sirt 1, pAb, 1:200, Cat no: A0230, Abclonal, USA), 8-hidroksi2'-deoksiguanozin (8-OHdG, mAb, 1:30, Cat no: sc-66036, Santa Cruz, USA) Hemioksijenaz (HO-1, pAb, 1:100, Cat no: A1346, Abclonal, USA), Siklooksijenaz 2 (Cox-2, pAb, 1:50, Cat no: A13409, Antibodies, USA), Fosforile H2AX (γ H2AX, mAb, 1:50, Cat no: AP0687, Abclonal, USA), 4 Hidroksinonenal (4-HNE, pAb, 1:200, Cat no: bs-6313R-TR, Bioss, USA), Fosforile nükleer faktör eritroid 2-ilişkili faktör 2 (Phospho-Nrf2, mAb, 1:300, Cat no: AP1133, Abclonal, USA) primer antikorları kullanıldı. İmmünohistokimya boyama sürecinde UltraVision Detection System Large Volume AntiPolyvalent, HRP Kiti (TP-125-HL, Thermo Scientific, UK) kullanılmıştır.

Parafine gömülü karaciğer kesitlerine aşağıdaki işlem dizine göre Streptavidin-Biotin-Peroksidaz yöntemi ile immünohistokimyasal boyama uygulanmıştır. Alınan parafin doku kesitleri toluolde deparafinize edilip dereceli alkollerden geçirilerek rehidrate edildi. Mikrodalgada antijen iyileştirme işleminden sonra %3'lük H₂O₂ çözeltisinde bekletildi. Kesitlerin tümü hidrofobik kalem ile sınırlanarak her bir kesit kullanılacak kitin prosedürüne uygun olacak şekilde bloklama solüsyonunda bekletildi. Bloklama solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra optimal dilüsyonda primer antikorlar kullanılarak (Tablo 3-8) oda ısısında 60 dakika (dk) ya da 4°C' de nemli ortamda bir gece inkübe edilmiştir. Kesitler daha sonra PBS (0.01 M *Phosphate buffered saline*) ile yıkanıp 15 dk sekonder antikorda, ardından da yine PBS ile yıkanıp 15 dk HRP streptavidin-kompleks ile muamele edildi. Dokular peroksidaz aktivitesi için AEC ile inkübe edilerek renk reaksiyonu elde edildi. PBS ile yıkama sonrası Mayer's hematoksilen (Katalog no: ab220365, Abcam, USA) ile nükleus boyaması yapılarak kapama solüsyonu ile kapatıldı. Spesifik immün işaretlenmenin varlığı negatif ve pozitif kontrol boyamaları ile karşılaştırmalı olarak mikroskop altında incelendi. Negatif kontrol için seçilen doku örneğinde bütün prosedür aynen uygulandı, ancak primer antikör yerine PBS kullanıldı. GPX4, HO-1, 4HNE, COX2, Sirt1, Nrf2 ve 8-OHdG antikörlerinin pozitif immün işaretlenme gösteren hücreleri ışık mikroskobu altında (x200 büyütme) rastgele seçilen 10 alanda immün pozitif hücre yüzdesi ile analiz edilmiştir. γ H2AX antikörü immün pozitif hücre yüzdesi ise ışık mikroskobu altında (x400 büyütme) rastgele seçilen 20 alanda analiz edilmiştir.

İmmün pozitif hücre yüzdesi : $(\text{immün pozitif hücre sayısı} / \text{total hücre sayısı}) \times 100$

Antikor	Marka	Katalog numarası	Dilüsyon
GPX4	Abclonal	A1933	1:300
Sirt-1	Abclonal	A0230	1:200
8-OHdG	Santa Cruz	sc- 66036	1:30
Cox2	Antibodies	A13409	1:50
HO-1	Abclonal	A1346	1:100
γ H2AX	Abclonal	AP0687	1:50
4-HNE	Bioss	bs-6313R-TR	1:200
Nrf2	Abclonal	AP1133	1:100

Tablo 3-9. İmmünohistokimya da kullanılan antikorlar ve dilüsyonları.

3.2.4. İstatistiksel Analiz

Tüm veriler, GraphPad Prism yazılımı (9.0) kullanılarak tek yönlü veya çift yönlü varyans analizi (ANOVA) ve çoklu karşılaştırmalar için Tukey'in post hoc testi kullanılarak analiz edildi. Sonuçlar, her bir setin üç tekrarının ortalaması \pm Standart sapma (SD) olarak alındı ve anlamlılık için $p \leq 0.05$ değeri kabul edildi.

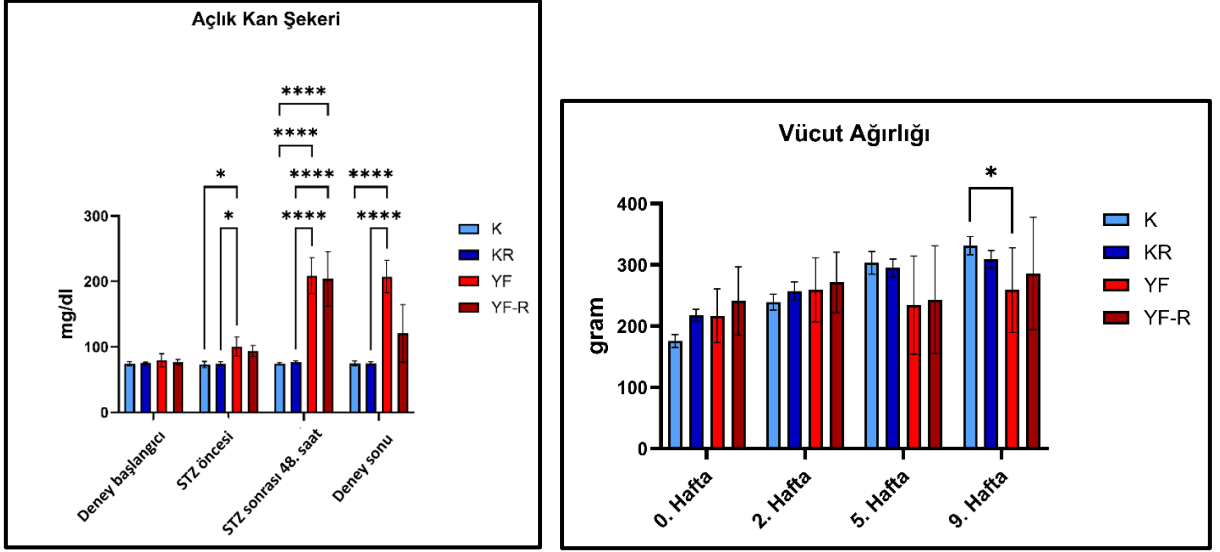
4. BULGULAR

4.1. Açlık Kan Şekeri, Vücut Ağırlığı ve Günlük Kalori Alımı

Deney hayvanlarının açlık kan şekeri değerleri, deney başlangıcında, STZ uygulamasından önce, STZ uygulamasından 48 saat sonra ve deney sonunda ölçüldü, elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi (Şekil 4-1). Deney başlangıcında yapılan açlık kan şekeri ölçümlerinde, deney grupları arasında anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$). STZ uygulamasından önce yapılan ölçümlerde, YF grubu ile K ve KR grupları açlık kan şekeri seviyeleri arasında anlamlı fark bulundu ($p<0.05$). STZ uygulamasından 48 saat sonra yapılan ölçümlerde, YF ve YF-R grubunun açlık kan şekeri düzeylerinin K ve KR gruplarına göre arttığı ve aralarında çok ileri düzeyde anlamlı fark olduğu saptandı ($p<0.0001$). Deney sonunda yapılan ölçümlerde ise YF grubu ile K ve KR grupları arasında anlamlı fark saptandı ($p<0.05$).

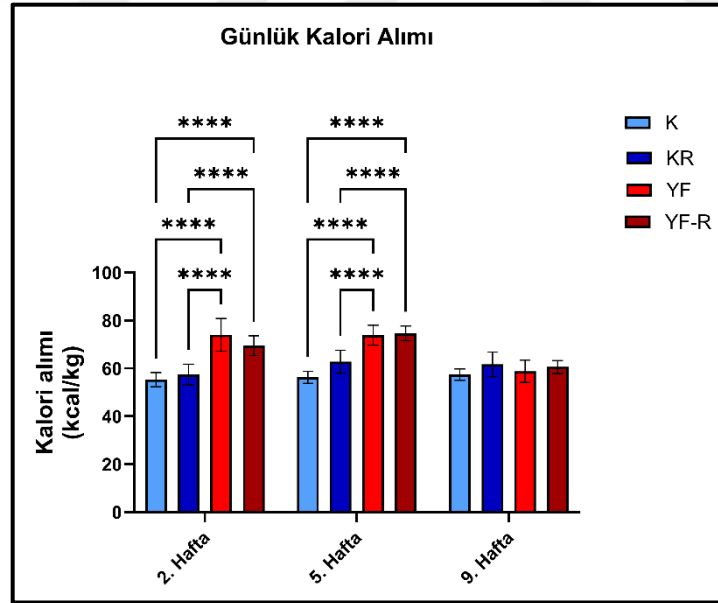
Deney hayvanlarının vücut ağırlık ölçümleri deney başlamadan önce, deneyin 2,5 ve 9. haftalarında yapılmıştır. Elde edilen verilere göre deney başlangıcı ve deneyin 2 ve 5'inci haftalarında yapılan ağırlık ölçümlerinde, deney gruplarının ağırlık düzeyi arasında anlamlı fark bulunamadı ($p>0.05$). Deney sonunda (9. hafta) yapılan ölçümlerde ise YF grubunda bulunan hayvanların vücut ağırlıklarının K grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldığı saptandı ($p<0.05$) (Şekil 4-1).

Deney hayvanlarının günlük kalori alımı, tükettiği fruktozlu su miktarı ve yem ağırlık ölçümleri yapılarak 2, 5 ve 9'uncu haftalarda hesaplandı. Deneyin 2 ve 5. haftalarında yapılan ölçümlere göre YF ve YF-R grubunda kalori alımının arttığı, K ve KR grupları ile kıyaslandığında istatistiksel olarak çok ileri düzeyde anlamlı fark olduğu saptandı ($p<0.0001$) (Şekil 4-2). Deneyin 9. haftasında yapılan ölçümlerde ise gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı.



Şekil 4-1. Deney gruplarına ait açlık kan şekeri (mg/dl) ve vücut ağırlıklarının (gr) istatistiksel değerlendirmeleri.

(K: Sağlıklı kontrol grubu, KR: Sağlıklı kontrol + Resveratrol uygulanan grup, YF: Diyabetik Grup, YF-R: Diyabetik + Resveratrol uygulanan Grup) $*p \leq 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$.

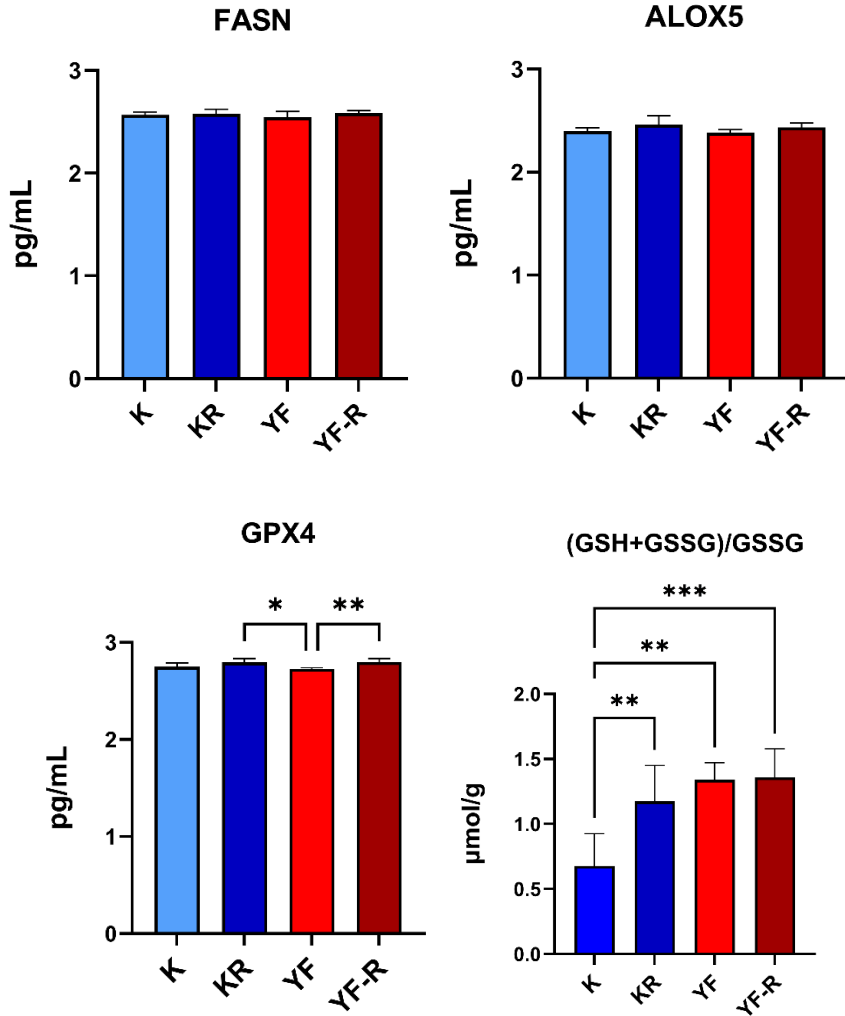


Şekil 4-2. Deney hayvanlarının günlük kalori alımının (kcal/kg) değerleri.

(K: Sağlıklı kontrol grubu, KR: Sağlıklı kontrol + Resveratrol Uygulanan grup, YF: Diyabetik Grup, YF-R: Diyabetik + Resveratrol Uygulanan Grup) $*p \leq 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$

4.2. Biyokimya Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Deney gruplarının karaciğer dokusundaki GPX4, ALOX-5, FASN protein seviyeleri ve GSH/GSSG oranı ölçüldü (Şekil 4-3). ALOX5 ve FASN testlerinden elde edilen verilerde, deney grupları arasında anlamlı fark saptanmadı ($p > 0.05$). Ancak GPX4 protein seviyesinde YF grubunda YF-R ($p < 0.01$) ve KR ($p < 0.05$) gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş olduğu saptandı (Şekil 4-3). GSH/GSSG testinden elde edilen verilere göre ise K grubunda GSH/GSSG oranının daha düşük olduğu, KR ve YF grupları ile kıyaslandığında ileri düzeyde anlamlı fark saptandı ($p < 0.01$). Aynı zamanda K grubu ile YF-R grupları arasında çok ileri düzeyde anlamlı fark saptanmıştır ($p < 0.001$).

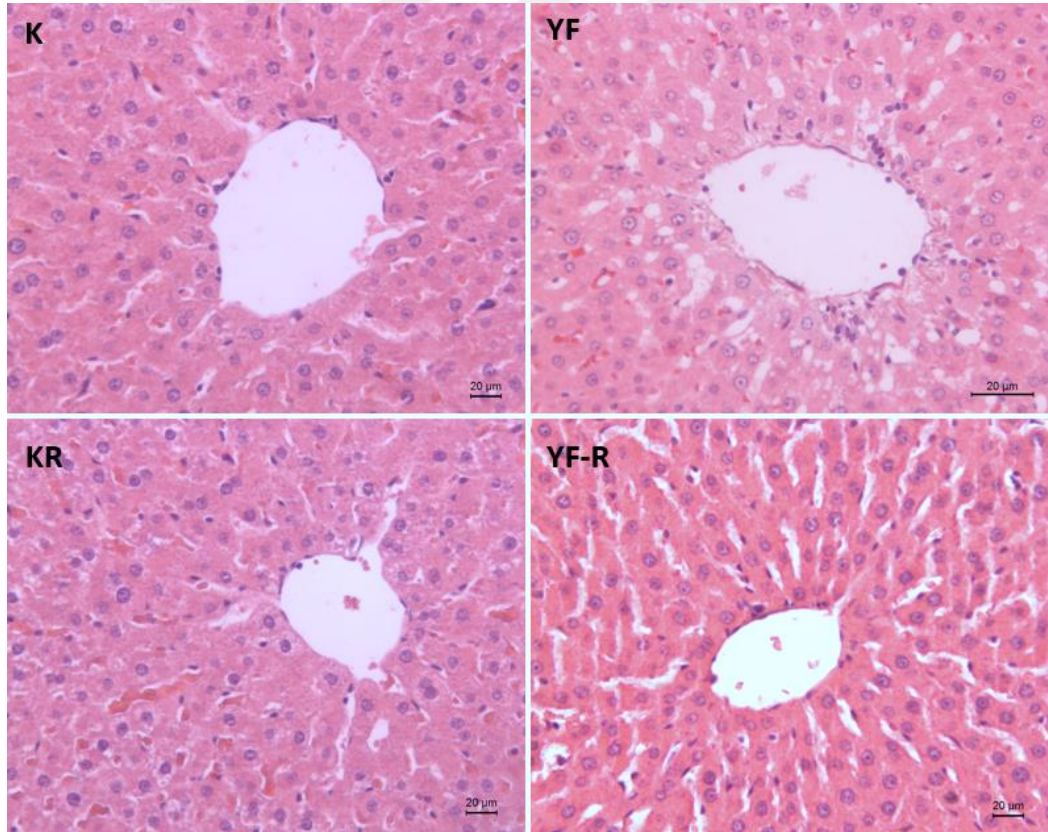


Şekil 4-3. Deney gruplarına ait FASN, ALOX5, GPX4 proteinlerin düzeyleri ve GSH/GSSG oranı.

(K: Sağlıklı Kontrol Grubu, KR: Resveratrol Tedavisi Uygulanan Kontrol Grubu, YF: Diyabetik Grup, YF-R: Resveratrol Tedavisi Uygulanan Diyabetik Grup) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

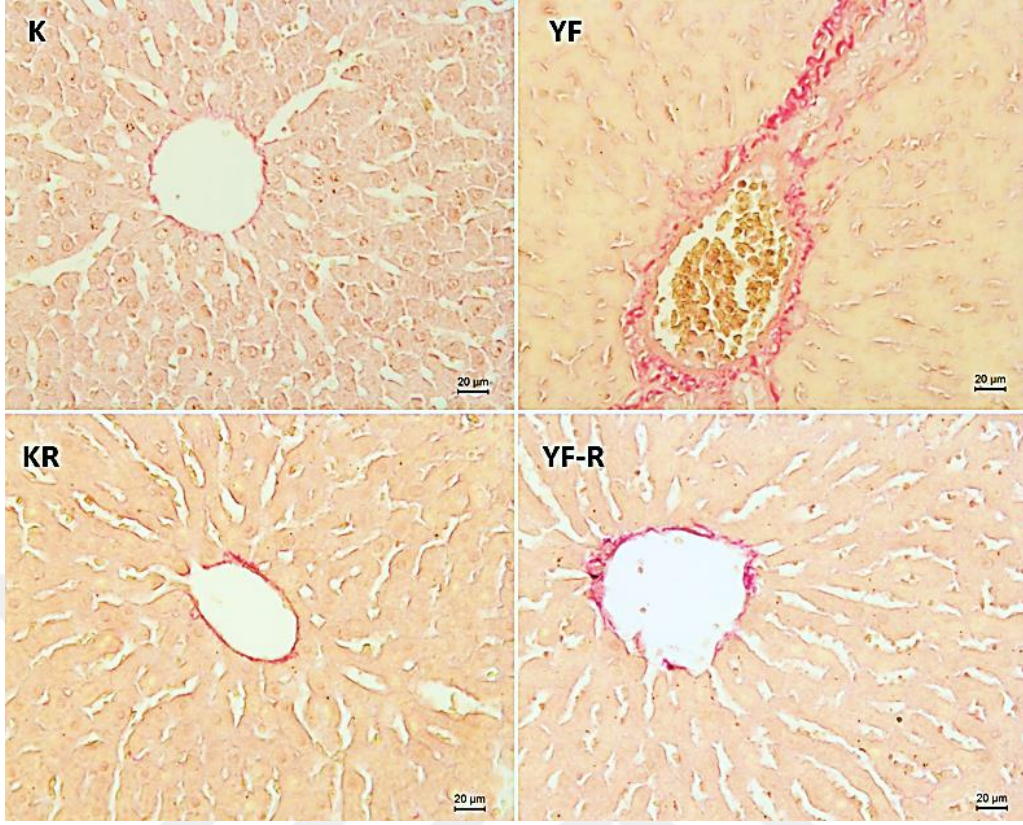
4.3. Morfolojik Değerlendirme

Karaciğer doku kesitlerine genel morfolojiyi değerlendirebilmek için Hematoksilen+Eozin (H+E), kolajen artışını gösterebilmek için Van Gieson boyaması yapıldı. Bu iki boyamanın sonuçları dikkate alınarak fibrozis ve yağlı dejenerasyon skorlaması yapıldı. H + E boyaması değerlendirildiğinde F grubuna ait hepatositlerde diğer gruplara kıyasla belirgin vakuolleşme olduğu (Şekil 4-4) ve santral ven çevresinde kolajen birikiminin arttığı (Şekil 4-5) saptandı. Yapılan skorlama ile YF grubunda fibrozis ve dejenerasyonun arttığı diğer gruplarla arasında çok ileri düzeyde anlamlı fark olduğu saptandı ($p<0.0001$) (Şekil 4-6). Resveratrol tedavisi uygulanan YF-R grubunda, YF grubuna kıyasla fibrozisin gerilediği, ancak K ve KR gruplarına göre fibrozis ve yağlı dejenerasyon skorunun yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0.0001$). Doku kesitlerine ayrıca hücre içi demir birikimini göstermek için ise Prusya mavisi boyaması yapıldı. YF grubuna ait karaciğer doku kesitlerinde ferroptoz belirteci olarak kabul edilen demir birikimleri gözlemlendi (Şekil 4-7).



Şekil 4-4. Tüm deney gruplarına ait Hematoksilen Eozin (H + E) boyaması. (Bar: 20µm)

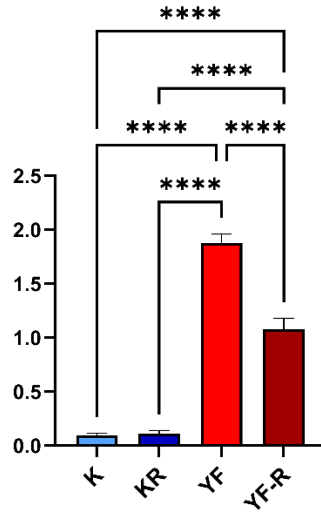
(K: Sağlıklı Kontrol Grubu, KR: Resveratrol Tedavisi Uygulanan Kontrol Grubu, YF: Diyabetik Grup, YF-R: Resveratrol Tedavisi Uygulanan Diyabetik Grup)



Şekil 4-5. Tüm deney gruplarına ait Van Gieson boyaması ile kollajen lif birikimlerinin gösterilmesi. (Bar: 20µm)

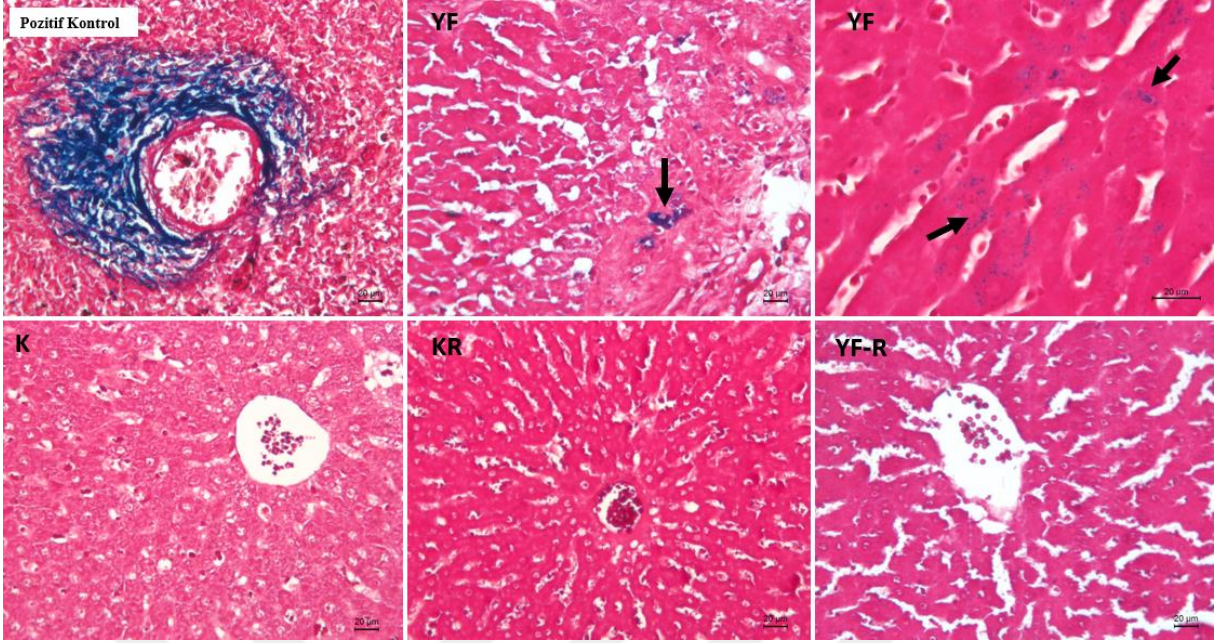
(K: Sağlıklı Kontrol Grubu, KR: Resveratrol Tedavisi uygulanan Kontrol Grubu, YF: Diyabetik Grup, YF-R: Resveratrol Tedavisi uygulanan Diyabetik Grup)

Fibrozis ve Yağlı Dejenerasyon Skorlaması



Şekil 4-6. Tüm deney gruplarına ait fibrozis ve yağlı dejenerasyon skorlaması.

(K: Sağlıklı Kontrol Grubu, KR: Resveratrol Tedavisi Uygulanan Kontrol Grubu, YF: Diyabetik Grup, YF-R: Resveratrol Tedavisi Uygulanan Diyabetik Grup) *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001



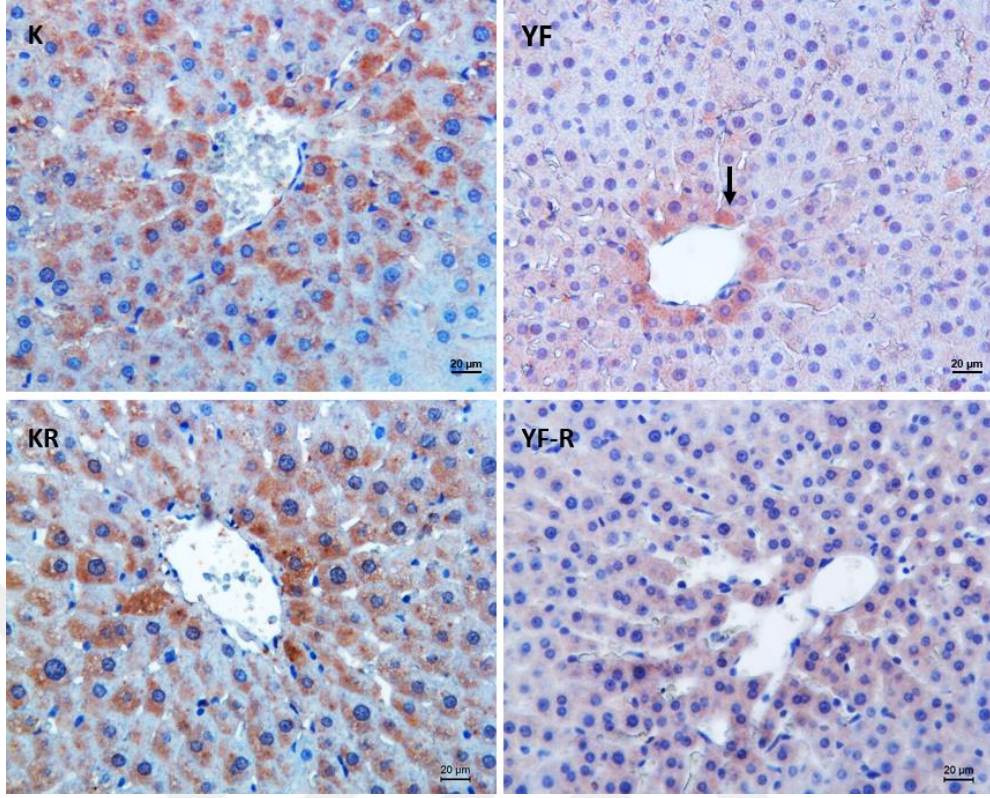
Şekil 4-7. Tüm deney gruplarına ait Prusya mavisi boyası ile demir birikiminin gösterilmesi. (Bar: 20µm)

(K: Sağlıklı Kontrol Grubu, KR: Resveratrol Tedavisi Uygulanan Kontrol Grubu, YF: Diyabetik Grup, YF-R: Resveratrol Tedavisi Uygulanan Diyabetik Grup)

4.4. İmmünohistokimya Bulguları

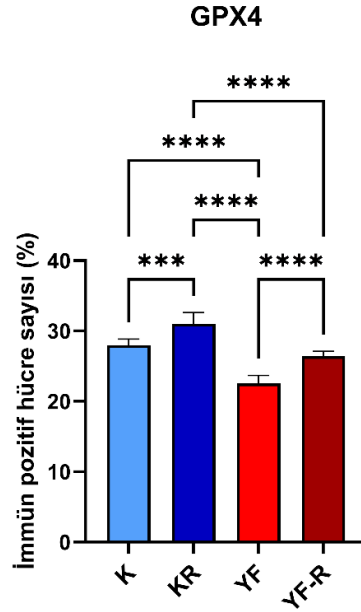
GPX4

GPX4, antioksidan özelliklere sahip ve lipid peroksidlerinin indirgeme reaksiyonunu katalize edebilen anahtar bir enzimdir. GPX4 antikoru kullanılarak immünohistokimya boyaması yapılan karaciğer doku kesitlerinde sitoplazmaları boyanan hücreler GPX4 pozitif hücreleri olarak değerlendirildi (Şekil 4-10). GPX4 immün pozitif hücreler genel olarak santral ven etrafında gözlendi. Veriler değerlendirildiğinde, GPX4 seviyesinin YF grubunda azaldığı ve resveratrol uygulanan YF-R grubuyla kıyaslandığında çok ileri düzeyde anlamlı fark saptandı ($p < 0.0001$). Aynı zamanda GPX4 seviyesi resveratrol uygulanan KR grubunda arttığı ve K grubuna kıyasla çok ileri düzeyde anlamlı fark saptandı ($p < 0.001$) (Şekil 4-11).



Şekil 4-8. Tüm deney gruplarına ait karaciğer dokularında immün pozitif GPX4 ekspresyonunun gösterimi. İmmün boyama: Streptavidin- biotin- peroksidaz. Zıt boya: Hematoksilen. Bar:20 µm.

(K: Sağlıklı Kontrol, KR: Resveratrol Tedavisi Uygulanan Kontrol Grubu, YF: Diyabetik Grup, YF-R: Resveratrol Tedavisi Uygulanan Diyabetik Grup)

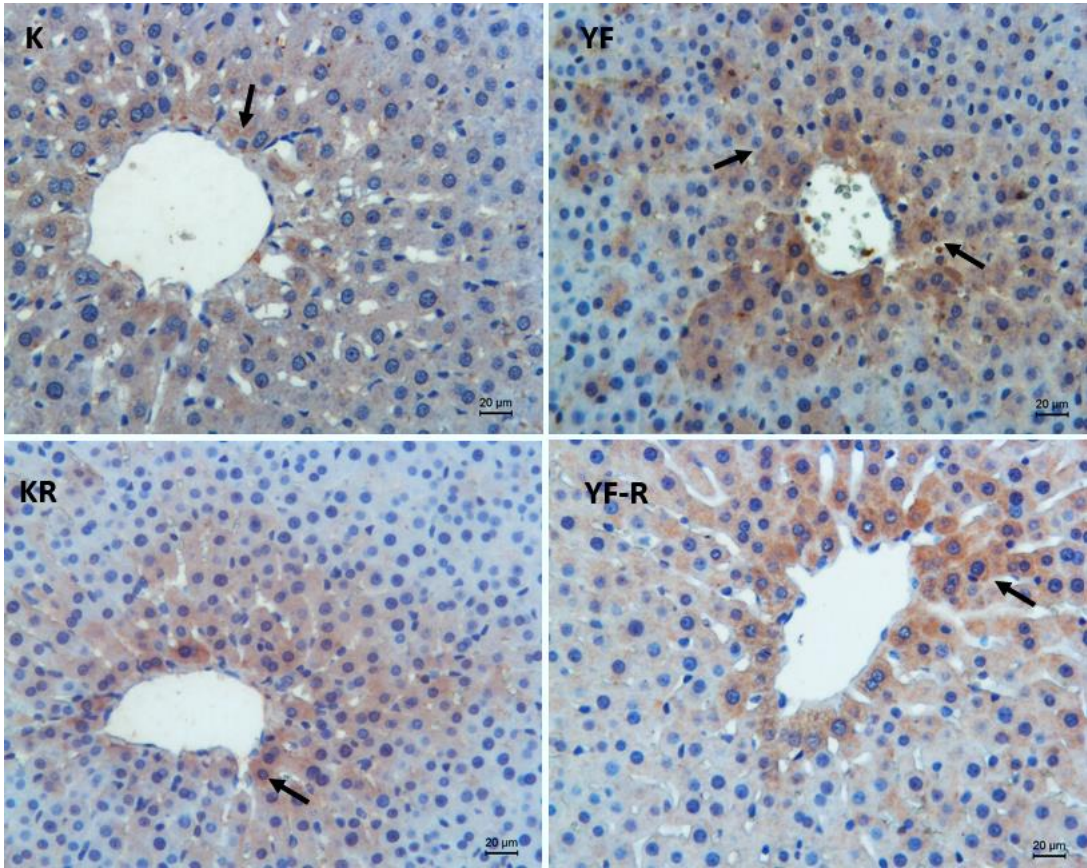


Şekil 4-9. Tüm deney gruplarına ait GPX4 immün pozitif hücre yüzdeleri.

(K: Sağlıklı Kontrol Grubu, KR: Resveratrol Tedavisi Uygulanan Kontrol Grubu, YF: Diyabetik Grup, YF-R: Resveratrol Tedavisi Uygulanan Diyabetik Grup) *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001

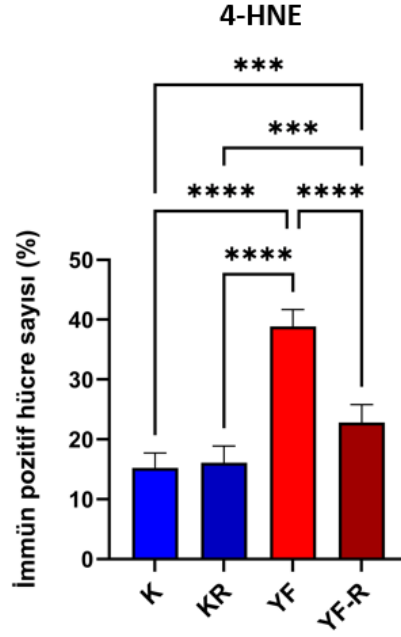
4-HNE

Lipid peroksidasyonunun toksik son ürünlerinden ve oksidatif hasarın göstergesi olan 4-HNE antikoru kullanılarak immünohistokimya boyaması yapıldı. Sitoplazmaları boyanan hücreler 4-HNE pozitif hücreleri olarak değerlendirildi (Şekil 4-14). Karaciğer dokularında 4-HNE pozitif hücre yüzdeleri değerlendirildiğinde, YF grubu ile K, KR ve YF-R grupları arasında çok ileri düzeyde anlamlı fark saptandı ($p<0.0001$). Aynı zamanda resveratrol tedavisi uygulanan YF-R grubu ile K ve KR grupları arasında çok ileri düzeyde anlamlı fark saptanmıştır ($p<0.001$) (Şekil 4-15).



Şekil 4-10. Tüm deney gruplarına ait karaciğer dokularında 4-HNE ekspresyonunun gösterimi. İmmün boyama: Streptavidin- biotin- peroksidaz. Zıt boya: Hematoksilen. Bar:20 μ m.

(K: Sağlıklı Kontrol Grubu, KR: Resveratrol Tedavisi Uygulanan Kontrol Grubu, YF: Diyabetik Grup, YF-R: Resveratrol Tedavisi Uygulanan Diyabetik Grup)

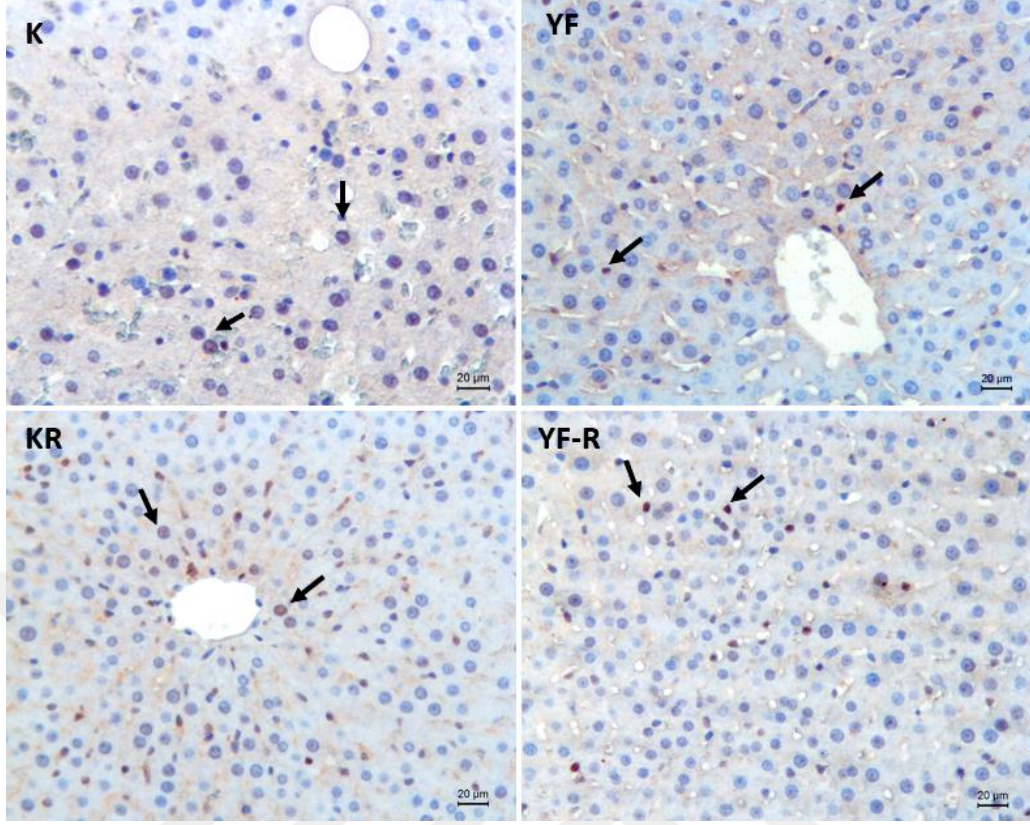


Şekil 4-11. Tüm deney gruplarına ait 4-HNE immün pozitif hücre yüzdeleri.

(K: Sağlıklı Kontrol grubu , KR: Resveratrol Tedavisi Uygulanan Kontrol Grubu, YF: Diyabetik Grup, YF-R: Resveratrol Tedavisi Uygulanan Diyabetik Grup) *p <0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001

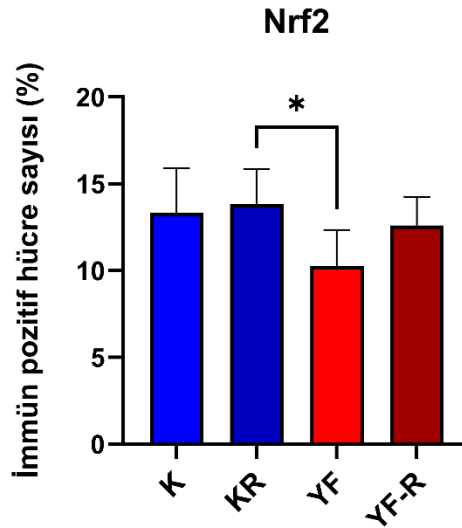
Nrf2

Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf2), oksidatif hasara karşı korunmada önemli rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür. Normal koşullar altında sitoplazmada yerleşik olarak bulunan Nrf2 oksidatif stres koşullarında nükleusa geçer. Nrf2 antikoru kullanılarak immünohistokimya boyaması yapılan doku kesitlerinde nükleer pozitifliği olan hücreler, Nrf2 pozitif hücreleri olarak değerlendirildi (Şekil 4-18). Karaciğer dokularındaki Nrf2 immün pozitifliği değerlendirildiğinde, K ve KR grubunda Nrf2 ekspresyonunun daha yüksek olduğu ve KR ile YF grubu arasında anlamlı fark saptanmıştır (p<0.05) (Şekil 4-19).



Şekil 4-12. Tüm deney gruplarına ait karaciğer dokularında Nrf2 ekspresyonunun gösterimi. İmmün boyama: Streptavidin- biotin- peroksidaz. Zıt boya: Hematoksilen. Bar:20 µm.

(K: Sağlıklı Kontrol Grubu, KR: Resveratrol Tedavisi Uygulanan Kontrol Grubu, YF: Diyabetik Grup, YF-R: Resveratrol Tedavisi Uygulanan Diyabetik Grup)



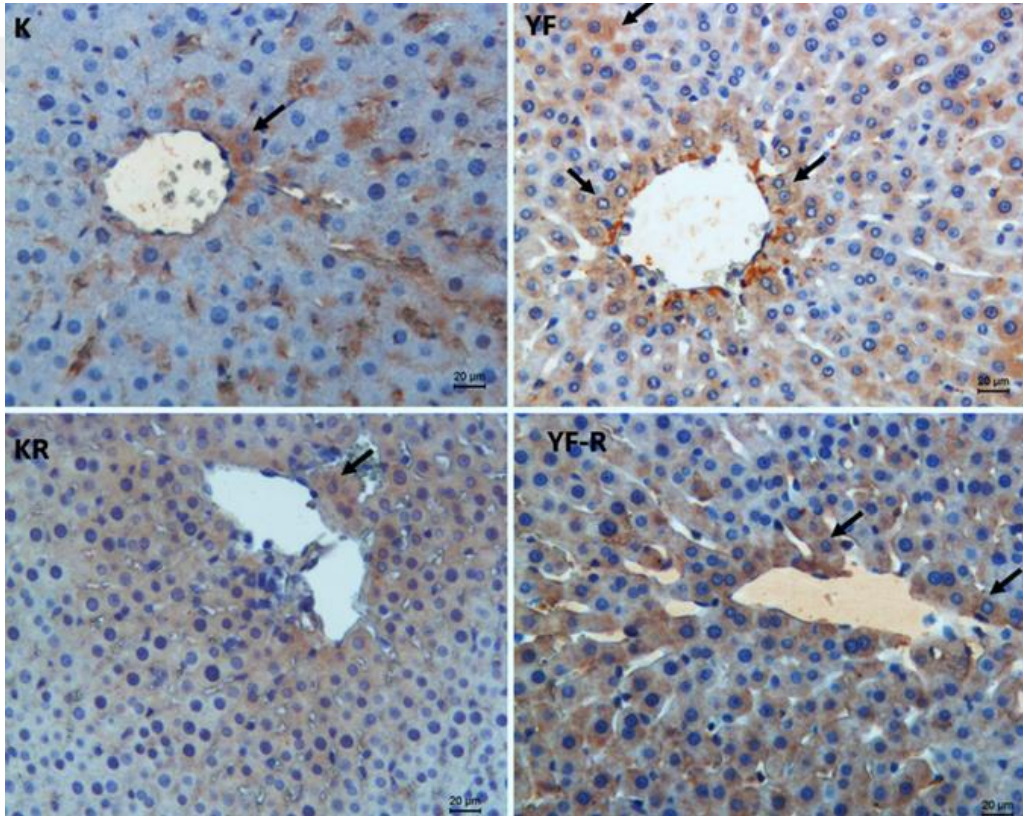
Şekil 4-13. Tüm deney gruplarına ait Nrf2 immün pozitif hücre yüzdeleri.

(K: Sağlıklı Kontrol Grubu, KR: Resveratrol Tedavisi Uygulanan Kontrol Grubu, YF: Diyabetik Grup, YF-R:

Resveratrol Tedavisi Uygulanan Diyabetik Grup) *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001

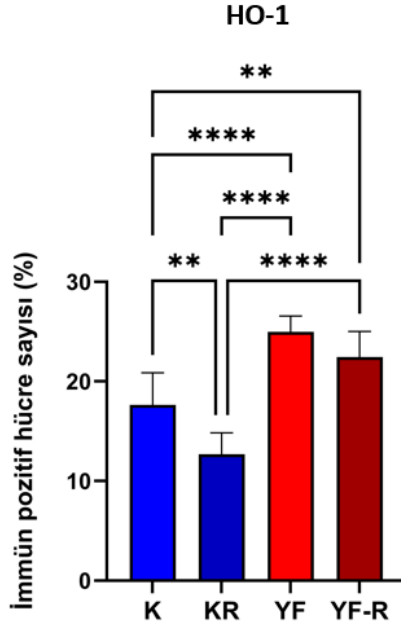
HO-1

HO-1, oksidatif hasara direnmek için ROS'u temizleyebilen önemli bir hücre içi antioksidan enzimdir. Karaciğer doku kesitlerine HO-1 antikoru kullanılarak immünohistokimya boyaması yapıldı. Sitoplazmaları boyanan hücreler HO-1 pozitif hücreleri olarak değerlendirildi (Şekil 4-16). Karaciğer dokularında HO-1 immün pozitifliği olan hücreler değerlendirildiğinde, YF grubu ile K ve KR grupları arasında çok ileri düzeyde anlamlı fark saptandı ($p<0.0001$). Aynı zamanda sağlıklı K grubu ile KR ve YF-R grupları arasında ileri düzeyde anlamlı fark saptanırken ($p<0.01$), YF-R ve KR grupları arasında çok ileri düzeyde anlamlı fark saptanmıştır ($p<0.0001$) (Şekil 4-17).



Şekil 4-14. Tüm deney gruplarına ait karaciğer dokularında HO-1 ekspresyonunun gösterimi. İmmün boyama: Streptavidin- biotin- peroksidad. Zıt boya: Hematoksilen. Bar:20 μm.

(K: Sağlıklı Kontrol Grubu, KR: Resveratrol Tedavisi Uygulanan Kontrol Grubu, YF: Diyabetik Grup, YF-R: Resveratrol Tedavisi Uygulanan Diyabetik Grup)

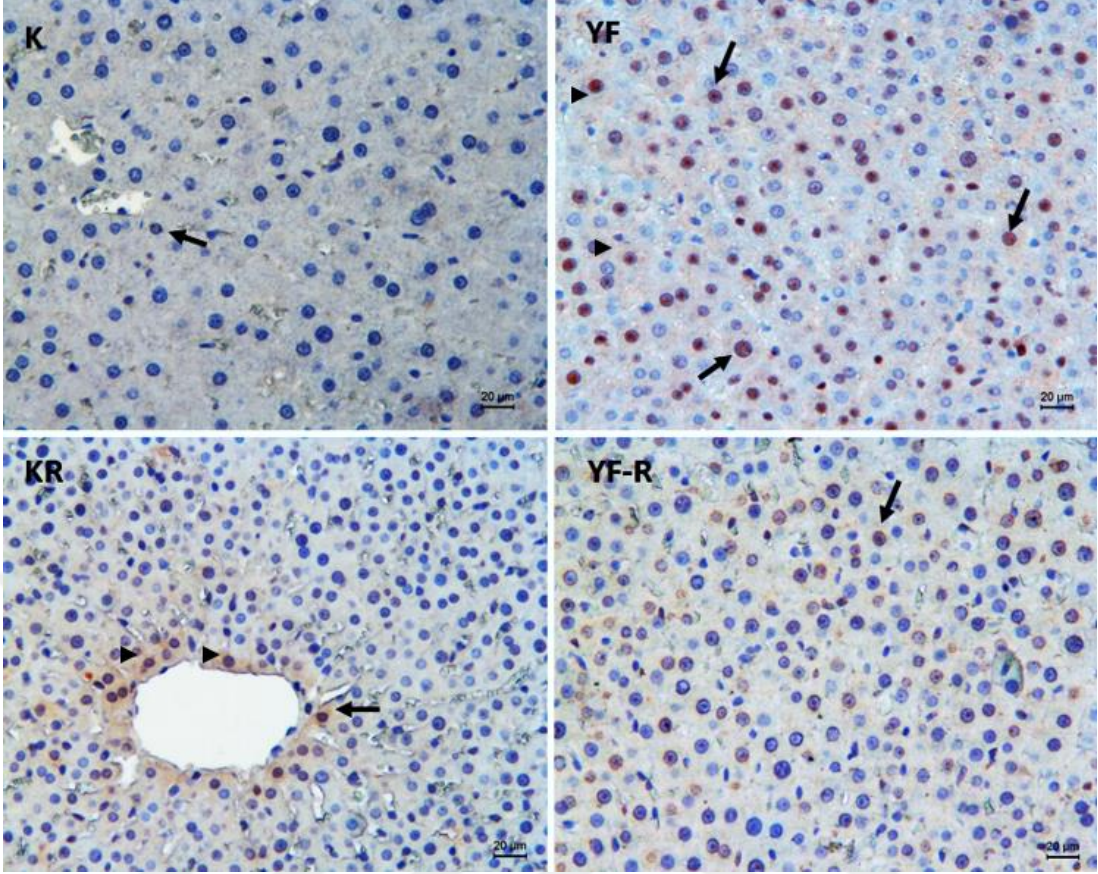


Şekil 4-15. Tüm deney gruplarına ait HO-1 immün pozitif hücre yüzdeleri.

(K: Sağlıklı Kontrol Grubu, KR: Resveratrol Tedavisi Uygulanan Kontrol Grubu, YF: Diyabetik Grup, YF-R: Resveratrol Tedavisi Uygulanan Diyabetik Grup) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

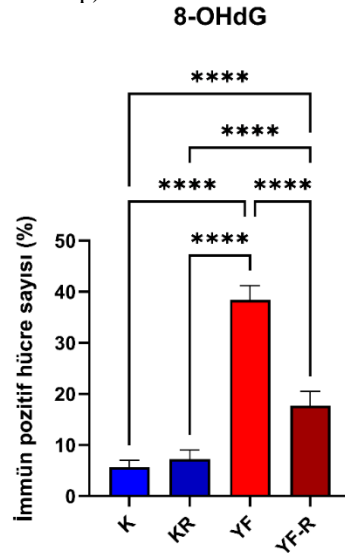
8-OHdG

8-Hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG), hem nükleus hem de mitokondrideki nükleik asit oksidasyonunun en iyi bilinen ve yaygın olarak kullanılan biyobelirteçdir. 8-OHdG antikorunu kullanarak immünohistokimya boyaması yapıldı ve nükleer ve/veya sitoplazmik pozitifliği olan hücreler 8-OHdG pozitif hücreleri olarak değerlendirildi (Şekil 4-22). Pozitif hücrelerin özellikle santral ven çevresinde bulunduğu gözlemlendi. Karaciğer dokularında 8-OHdG immün pozitif hücreleri değerlendirildiğinde, DNA hasarının YF grubunda daha yüksek olduğu ve diğer deney grupları kıyaslandığında, gruplar arasında çok ileri düzeyde anlamlı fark saptanmıştır ($p < 0.0001$). Aynı zamanda YF-R grubu ile K ve KR grupları arasında çok ileri düzeyde anlamlı fark saptanmıştır ($p < 0.0001$) (Şekil 4-23).



Şekil 4-16. Tüm deney gruplarına ait karaciğer dokularında 8-OHdG ekspresyonunun gösterimi (↑Nükleer pozitiflik, ▶Sitoplazmi pozitiflik). İmmün boyama: Streptavidin-biotin- peroksidaz. Zıt boya: Hematoksilen. Bar:20 µm.

(K: Sağlıklı Kontrol Grubu, KR: Resveratrol Tedavisi Uygulanan Kontrol Grubu, YF: Diyabetik Grup, YF-R: Resveratrol Tedavisi Uygulanan Diyabetik Grup)

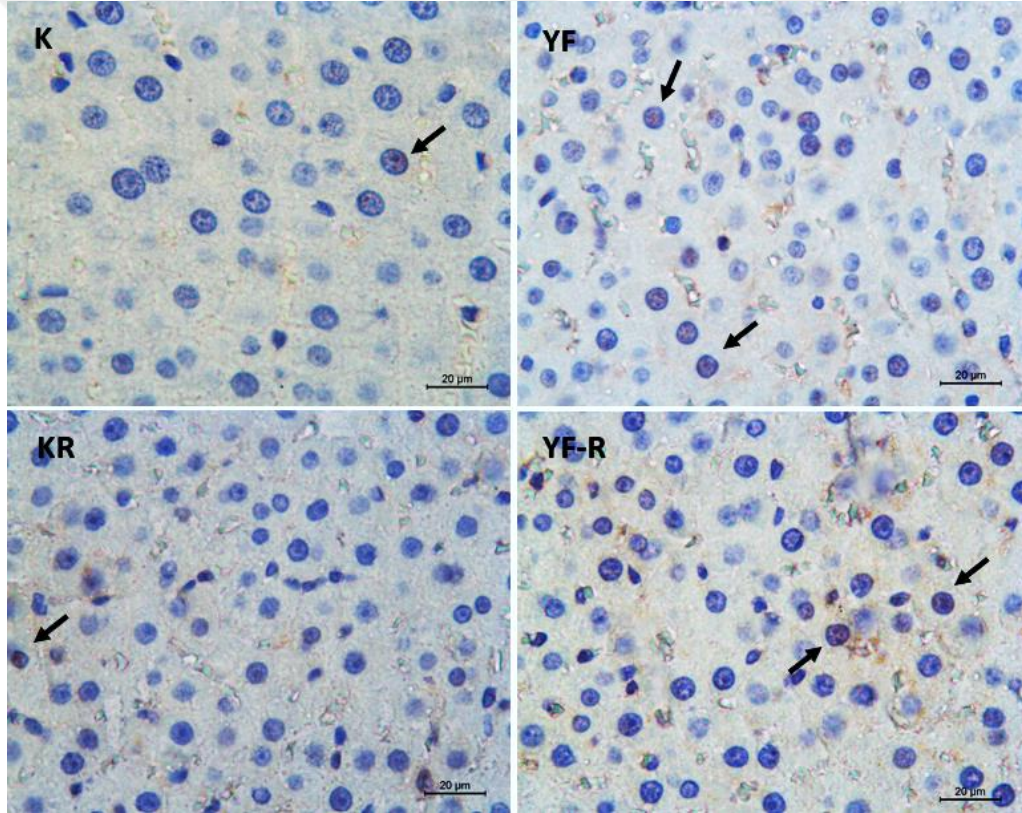


Şekil 4-17. Tüm deney gruplarına ait 8-OHdG immün pozitif hücre yüzdeleri.

(K: Sağlıklı Kontrol, KR: Resveratrol Tedavisi Uygulanan Kontrol Grubu, YF: Diyabetik Grup, YF-R: Resveratrol Tedavisi Uygulanan Diyabetik Grup) *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001

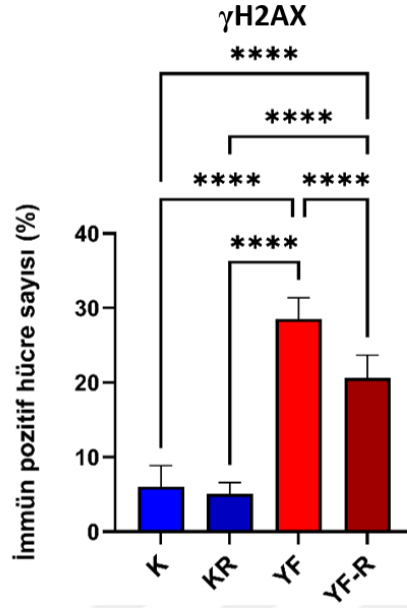
γ H2AX

Fosforile H2AX (γ H2AX), DNA çift zincir kırıklarının varlığı için spesifik bir gösterge olarak kabul edilir. Karaciğer doku kesitlerine γ H2AX antikorunu kullanılarak yapılan immünohistokimya boyamasında nükleusları boyanan hücreler pozitif olarak değerlendirildi. Nükleer pozitifliği olan hücreler γ H2AX pozitif hücreleri olarak değerlendirildi (Şekil 4-20). Karaciğer dokularındaki γ H2AX immün pozitifliği değerlendirildiğinde, YF grubunda DNA hasarının arttığı ve YF-R, K ve KR grupları ile kıyaslandığında gruplar arasında çok ileri düzeyde anlamlı fark olduğu saptanmıştır ($p < 0.0001$). Aynı zamanda YF-R grubu ile K ve KR grupları arasında çok ileri düzeyde anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.0001$) (Şekil 4-21).



Şekil 4-18. Tüm deney gruplarına ait karaciğer dokularında γ H2AX ekspresyonunun gösterimi. İmmün boyama: Streptavidin- biotin- peroksidad. Zıt boy: Hematoksilen. Bar:20 μ m.

(K: Sağlıklı Kontrol Grubu, KR: Resveratrol Tedavisi Uygulanan Kontrol Grubu, YF: Diyabetik Grup, YF-R: Resveratrol Tedavisi Uygulanan Diyabetik Grup)



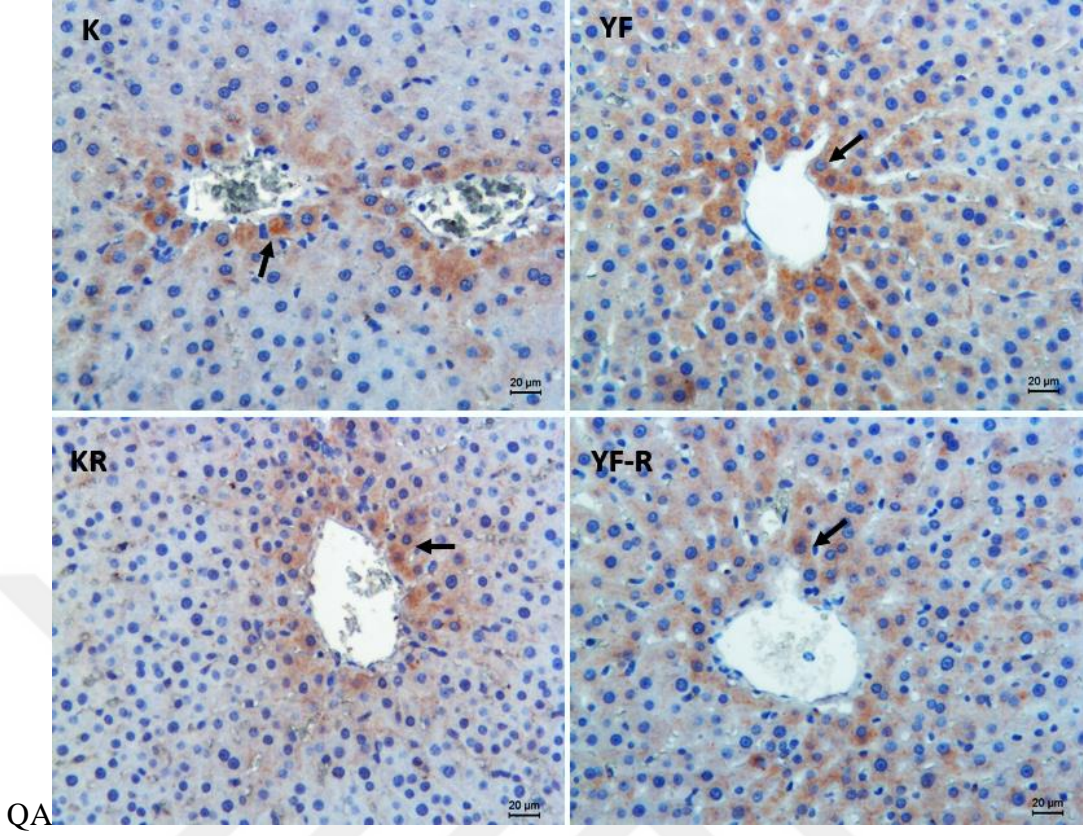
Şekil 4-19. Tüm deney gruplarına ait γ H2AX immün pozitif hücre yüzdeleri.

(K: Sağlıklı Kontrol, KR: Resveratrol Tedavisi Uygulanan Kontrol Grubu, YF: Diyabetik Grup, YF-R:

Resveratrol Tedavisi Uygulanan Diyabetik Grup) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

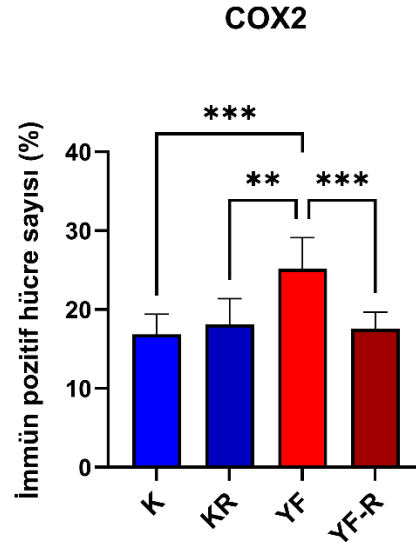
COX-2

Siklooksijenaz (COX), çeşitli inflamasyon faktörleri tarafından uyarıldıktan sonra inflamasyonu başlatabilen ve prostaglandin sentezini destekleyebilen güçlü bir enzimdir. COX-2 antikoru kullanılarak immünohistokimya boyaması yapılan karaciğer doku kesitlerinde sitoplazmaları boyanan hücreler COX-2 immün pozitif hücreler olarak değerlendirildi (Şekil 4-12). Karaciğer dokularında COX-2 immün pozitiflik gösteren hücreler değerlendirildiğinde, YF grubu ile K ve YF-R grupları arasında çok ileri düzeyde anlamlı fark saptandı ($p < 0.001$). Aynı zamanda YF grubu ile KR grubu arasında ileri düzeyde anlamlı fark saptandı ($p < 0.01$) (Şekil 4-13).



Şekil 4-20. Tüm deney gruplarına ait karaciğer dokularında immün pozitif COX-2 ekspresyonunun gösterimi. İmmün boyama: Streptavidin- biotin- peroksidaz. Zıt boya: Hematoksilen. Bar:20 µm

(K: Sağlıklı Kontrol, KR: Resveratrol Tedavisi Uygulanan Kontrol Grubu, YF: Diyabetik Grup, YF-R: Resveratrol Tedavisi Uygulanan Diyabetik Grup)

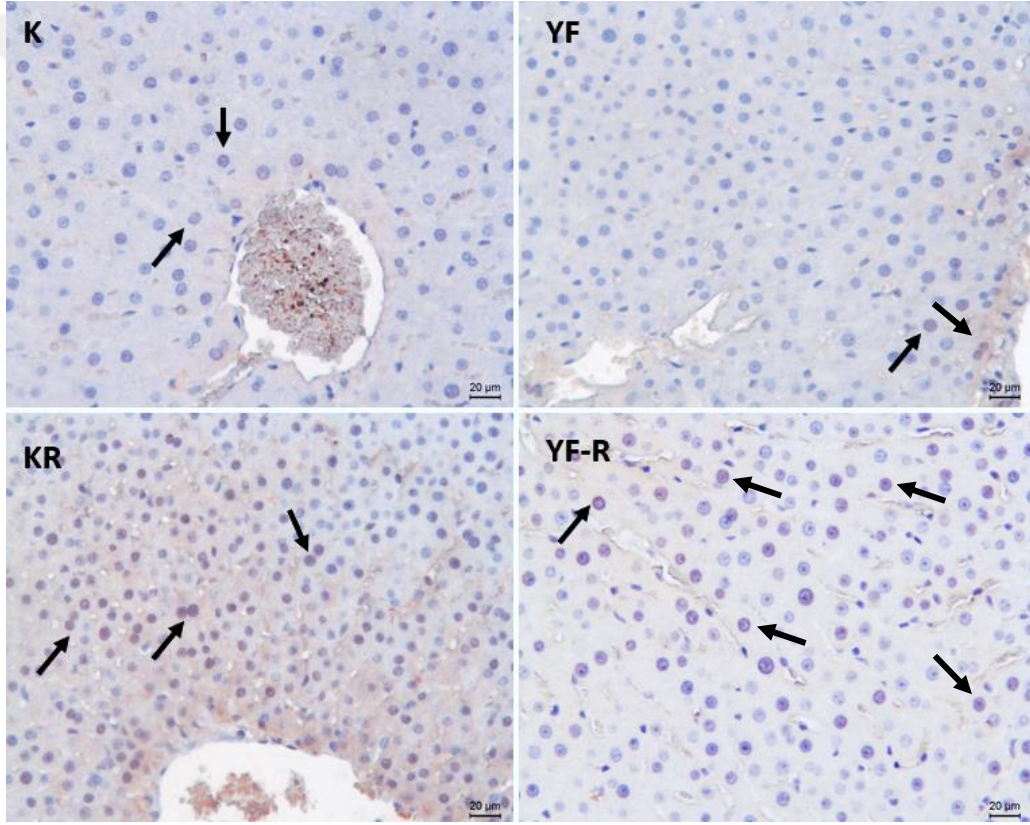


Şekil 4-21. Tüm deney gruplarına ait COX-2 immün pozitif hücre yüzdeleri.

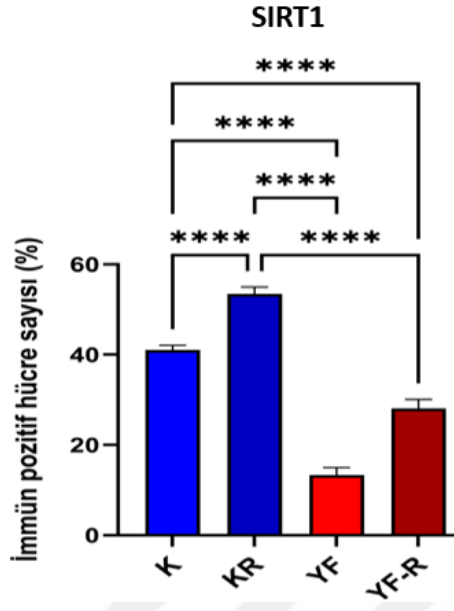
(K: Sağlıklı Kontrol Grubu, KR: Resveratrol Tedavisi Uygulanan Kontrol Grubu, YF: Diyabetik Grup, YF-R: Resveratrol Tedavisi Uygulanan Diyabetik Grup) *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001

SIRT1

Endojen stres sensörü olan SIRT1, sirtuin ailesinden NAD^+ -bağımlı protein lizin deasetilazdır. SIRT1 antikorunu kullanılarak immünohistokimya boyaması yapılan karaciğer doku kesitlerinde nükleus pozitifliği olan hücreler değerlendirildi (Şekil 4-8). SIRT1 immün pozitif hücre yüzdeleri değerlendirildiğinde, YF grubunda pozitif hücre sayısının azaldığı ve K, KR ve YF-R grupları arasında çok ileri düzeyde anlamlı fark olduğu saptandı ($p < 0.0001$). Aynı zamanda resveratrol tedavisi uygulanan YF-R grubu ile K ve KR grupları arasında çok ileri düzeyde anlamlı fark saptandı ($p < 0.0001$) (Şekil 4-9).



Şekil 4-22. Tüm deney gruplarına ait karaciğer dokularında SIRT1 ekspresyonunun gösterimi. İmmün boyama:Streptavidin- biotin- peroksidad. Zıt boy: Hematoksilen.Bar:20μm. (K: Sağlıklı Kontrol Grubu, KR: Resveratrol Tedavisi Uygulanan Kontrol Grubu, YF: Diyabetik Grup, YF-R: Resveratrol Tedavisi Uygulanan Diyabetik Grup)



Şekil 4-23. Tüm deney gruplarına ait SIRT1 immün pozitif hücre yüzdeleri.

(K: Sağlıklı Kontrol, KR: Resveratrol Tedavisi Uygulanan Kontrol Grubu, YF: Diyabetik Grup, YF-R: Resveratrol Tedavisi Uygulanan Diyabetik Grup) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

5. TARTIŞMA

Diyabet, hiperglisemi ile karakterize edilen metabolik bir bozukluktur. [16]. Tip 2 Diabetes Mellitus (T2DM), diyabetin en yaygın türüdür ve tüm diyabet vakalarının yaklaşık %90'ını oluşturur. Son yıllarda dünyadaki yetişkinlerde diyabet ve prediyabetin yaygınlığı hızla artmaktadır. Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF), 2021 yılı istatistiklerine göre, 20-79 yaş arası yetişkin nüfusun %10.5'inin (yaklaşık 537 milyon kişi) diyabet hastası olduğu ve neredeyse yarısının bu durumla yaşadığının farkında olmadığı bildirmiştir. IDF'in verilerine göre 2045 yılına gelindiğinde dünya çapında yaklaşık 783 milyon kişinin diyabet hastası olacağı tahmin edilmektedir.

Diyabetle ilgili sayısal veriler hastalığın bireyler, aileler ve ülkeler için küresel boyuttaki artan yükünü de göstermektedir. Kentleşme, yaşlanan nüfus, azalan fiziksel aktivite, aşırı kilo ve obezite yaygınlığının artması Tip 2 diyabetin artışına katkıda bulunmaktadır [152]. Diyabetin kalıcı hiperglisemisi, kronik komplikasyonlarının temelidir. Kalp (kardiyovasküler hastalık), böbrekler (diyabetik nefropati), karaciğer (alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı, NAFLD), sinirler (diyabetik nöropati) ve gözler (diyabetik retinopati), pankreas, beyin ve ince bağırsak gibi birçok organı etkileyebilir ve ciddi hastalıklara yol açabilir [153, 154]. Bu nedenle diyabet, uzun vadede hastanın sağlığını ve yaşam kalitesini etkiler. Diyabet tedavisinde oral hipoglisemik ajanlar ve ekzojen insülin takviyesi yaygın olarak kullanılmaktadır, ancak bu tedaviler yalnızca geçici glisemik kontrol sağlar ve diyabetik komplikasyonların oluşumunu etkili bir şekilde önleyemez. Bu sebeple diyabet ve komplikasyonlarına yönelik etkili tedavi stratejilerini keşfetmek ve araştırmak için acilen daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır [155].

Prevalansı artmakta olan bu hastalığın daha iyi anlaşılması ve tedavi seçeneklerinin geliştirilebilmesi için çeşitli hayvan modelleri ile çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmada Wilson ve Islam (2012) çalışmasından yola çıkarak yüksek fruktoz ve düşük STZ ile T2DM modeli oluşturuldu [156]. Çalışmada STZ uygulaması sonrası deney hayvanlarına, Wilson ve Islam'ın oluşturduğu modelden farklı olarak 3 hafta daha fruktoz verilmeye devam edildi [16]. 5. Haftanın sonunda resveratrol tedavisi uygulanarak resveratrolun karaciğer hasarı ve ferroptoz üzerine etkileri araştırıldı.

Wilson ve Islam'ın 2012 yılında yaptığı çalışmada, farklı oranlarda fruktoz (%10, %20, %30, %40) ve 40 mg/kg STZ uygulaması ile yeni bir T2DM modeli oluşturdu. 11 haftanın sonunda elde edilen sonuçlarla %10 fruktoz ve STZ uygulanan grubun T2DM için yeni alternatif bir model olabileceğini bildirmiştir. Araştırmacılar geliştirdikleri yeni model ile yaptıkları çalışmalarda, diyabetik grupların kontrol gruplarına kıyasla kalori alımı ve kan glikozlarının arttığını, vücut ağırlıklarının ise azaldığını saptanmışlardır [156, 157]. Bu modeli kullanan birçok çalışma benzer sonuçları bildirmiştir. [158-160]. Bu çalışmada Wilson ve Islam'ın modeli kullanıldı. İki hafta %10 fruktozlu su verilen hayvanlara 2. haftanın sonunda 40mg/kg STZ uygulandı. 48 saatin sonunda kan şekeri yüksek çıkanlar (180mg/dl ve üzeri) diyabetik olarak ayrıldılar. Deney sonunda, benzer model ile yapılan diğer çalışmalarla paralel olarak diyabetik grubun kan şekeri seviyelerinin artması ve vücut ağırlıklarının düşmesi, ayrıca kalori alımının artması saptamamız sonucunda modelimizin önerilen Tip 2 diyabet modeline uygun olduğu sonucuna vardık.

Resveratrol, yaban mersini, birçok kırmızı üzüm çeşidi ve fıstık gibi farklı bitki türlerinde bulunan fenolik maddedir. Resveratrolün kemirgen diyabet modellerinde oral yolla verildiğinde güçlü antidiyabetik etkiler gösterdiği anlaşılmıştır [161]. Çeşitli insan ve hayvan çalışmalarında resveratrol uygulamasının, hiperglisemiyi düzenlediği, insülin duyarlılığını arttırdığını ve antioksidan etkileri olduğu gösterilmiştir [162]. Bunun yanında resveratrol tedavisinin insan klinik çalışmalarında bir etkinliğinin olmadığını söyleyen çalışmalar da bulunmaktadır [163, 164]. Yapılan meta-analizler sonucunda resveratrolün diyabet üzerine olumlu etkileri gösterilmiştir [165, 166]. Bu çalışmada Tip 2 diyabet oluşturulan sıçanlara 4 hafta süre ile resveratrol uygulamasının kan şekerini diyabetik gruba göre anlamlı olarak düşürdüğünü saptadık, bu sonuç da resveratrolün kan şekeri üzerine düzenleyici etkisini desteklemektedir.

Hepatosit ölümü, diyabetle ilişkili karaciğer patolojisine ve karaciğer hasarının ilerlemesine katkıda bulunan en önemli faktörlerden biridir [167]. Çok sayıda çalışma, ferroptozun T2DM ve komplikasyonların gelişimi ve ilerlemesinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir [168]. Ferroptoz, aşırı lipid peroksidasyonu ile karakterize edilen ve karaciğerdeki çok sayıda patolojik durumla ilişkili olan apoptotik olmayan hücre ölümünün demir bağımlı biçimidir [7]. Demir; oksijen taşınması, enerji metabolizması, nükleotid sentezi ve elektron taşınması gibi bir dizi metabolik süreçte yer aldığından canlı organizmalar için önemli bir eser elementtir [169]. Hayati öneme sahip olmasına rağmen, aşırı miktarda demir toksik olabilir, bu nedenle konsantrasyonunun ideal bir aralıkta tutulması gerekir. Demir metabolizmasının insülin

salgılanması ve yağ metabolizması gibi insan glikoz metabolizmasının farklı süreçlerinde yer aldığı ve birden fazla organ ve dokuda kan şekeri homeostazını koruduğu gösterilmiştir. Son zamanlarda, bilim insanları demir metabolizması ile glikoz homeostazisi arasında giderek artan bir ilişki buldular [170-172].

Karaciğer vücuttaki demirin ana rezervuarıdır. Karaciğerde depolanan aşırı demir, glikoz metabolizmasına müdahale ederek hem azalmış insülin hem de bozulmuş insülin sinyalleme yoluyla hiperinsülinemiye neden olur [173]. Öte yandan hiperinsülinemik durum, demirin intrahepatik birikimini destekler. Bazı insülin dirençli hastalarda hafif demir metabolizması anormallikleri görülür. Genellikle hastalar obezdirler, diyabetleri vardır, metabolik sendrom (MetS) ve/veya alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) tanıları bulunmaktadır [147, 172]. Bu çalışmada olası demir birikimini göstermek için Prusya mavisini kullanıldı. Diyabetik gruba ait karaciğer doku kesitlerinde yaygın dağılmış demir birikimleri gözlemlendi. Bu da diyabetin neden olduğu karaciğer hasarında demire bağımlı bir yol olan ferroptotik hücre ölümünde etkili olabileceğini düşündürdü.

Hiperglisemi, reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimine yol açar ve ardından oksidatif stresi artırır [155]. Oksidatif stres dokudaki antioksidan metabolizma ile reaktif oksijen ürünlerinin üretimi arasındaki dengenin bozulmasından kaynaklanmaktadır. Doku ya da hücredeki oksidatif stresin seviyesini bize gösteren enzimler glukoz 6 fosfat dehidrogenaz (G6PD), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon-s transferaz (GST), 6-fosfoglukanat dehidrogenaz (6-PGD) ve glutatyon peroksidazdır (GPx). Bu enzimler hep birlikte çalışıldığında dokudaki ya da hücredeki oksidatif stres düzeyine dair bilgi vermektedir [16]. GR, GST ve GPx enzimleri glutatyon metabolizmasını düzenleyen enzimlerdir ve temel olarak detoksifikasyon, antioksidant yanıt ve oksidatif stres metabolizmasını düzenlenmesinden sorumludurlar. İndirgenmiş glutatyon (GSH) hücredeki en önemli antioksidan moleküllerinden biridir ve detoksifikasyon, ilaç direnci, antioksidan metabolizması ve yaşlanma gibi birçok hayati mekanizmada kullanılır, bu işlemler sırasında GSH okside glutatyona (GSSG) dönüşür [16, 150].

GSH/GSSG oranı hücre ya da dokudaki oksidatif stres durumunu belirten en önemli biyobelirteç olarak kabul edilir. GST ve GPx enzimi GSH molekülünü kullanarak antioksidant yanıt ilişkili metabolizmalarda göre alırlar. GR enzimi NADPH ile birlikte GSH'ın GSSG'ye dönüşümünü katalize eder. NADPH ise pentoz fosfat yolağında görevli G6PD ve 6-PGD enzimleri tarafından üretilir. Bu neden ile G6PD, 6-PGD, GR, GST ve GPx enzimleri beraber hücrenin

oksidatif metabolizmasının glikoliz, antioksidant yanıt ve detoksifikasyon üzerinden değerlendirilmesinde hayati önem taşımaktadır [16, 150]. GSH, GSSG, GPx, GR ve GST gibi antioksidant enzimlerde bozulmalar hücre ya da dokunun oksidatif stres düzeyinin artışı ve ROS birikimi ile direkt olarak ilişkilidir. Hücre içinde biriken ROS ise hücrede DNA, protein ve yağlara saldırarak ilgili moleküllerin okside olmalarına neden olur.

Hücre membran bütünlüğünü sağlamak ve ROS kaynaklı hasarı en aza indirmek için lipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz 4 (GPX4), kofaktör olarak indirgenmiş GSH kullanarak lipid hidroperoksitleri (R-OOH) lipid alkollere (R-OH) dönüştürür. Bu işlem, ferroptozda sitozolik ROS'tan daha toksik olan toksik lipid ROS'un demire (Fe^{2+}) bağımlı oluşumunu ve birikmesini önler. Böylece, GPX4 oksidatif hasara karşı koruyucu ve fizyolojik düzenleyici olarak hücre homeostazda iki önemli görevi üstlenir [23]. Azalan GSH miktarı GPX4 aktivitesinde azalmaya neden olur ve hücre içi lipid peroksidasyonunu artırır. Yapılan araştırmalarda GPX4, ferroptoz meydana geldiğinde önemli ölçüde azalmıştır ve ferroptozun bir belirteci olarak kabul edilmiştir [24]. Çalışmamızda GPX4 protein seviyesi ve GSH/GSSG oranı biyokimyasal olarak ölçüldü. GPX4 protein seviyesinde YF grubunda YF-R ve KR gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş olduğu saptandı. Antioksidan özelliği birçok çalışma ile gösterilmiş olan resveratrolün çalışmamızda diyabetik ve kontrol gruplarına uygulandığında GPX4 protein miktarında artışa sebep olduğu hem ELISA hem de immünohistokimya yöntemi ile gösterilmiş oldu.

Karaciğerde bozulan oksidatif stres metabolizması GSH'ın azalması GSSG'in artmasına neden olur ve redoks homeostazı için önemli olan GSH/GSSG oranının karaciğerde artmasına neden olur. Hücredeki GSH miktarı, GSH/GSSG oranı, GPX4 seviyesi, hücre içi Fe miktarı, GR ve GST enzim seviyeleri hücre ya da dokudaki oksidatif stres ve antioksidan yanıt ile doğrudan ilişkili olduğundan ferroptoz biyobelirteci olarak kabul edilmektedir [174, 175]. Resveratrol tedavisinin, hepatositleri oksidatif stresten etkili bir şekilde koruyarak glutatyon (GSH) ve GSSG içeriğini arttırdığı, serbest radikalleri temizlediği, katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), GSH peroksidaz (GPx), NADPH ve GST aktivitelerini arttırdığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir [92, 119]. GSH+GSSG/GSSG oranının ise K grubunda daha düşük olduğu, KR ve YF grupları ile kıyaslandığında ileri düzeyde anlamlı fark saptandı. Aynı zamanda K grubu ile YF-R grupları arasında çok ileri düzeyde anlamlı fark saptanmıştır ($p < 0.001$).

ALOX ailesi, ferroptoz sırasında lipid peroksidasyonundan sorumlu demir içeren enzimlerden oluşmaktadır. ALOX'lar, fosfolipid peroksidasyon ürünlerinin oluşumunu teşvik ederek, ROS

üretimini artırarak ve lipid peroksidasyonuna katılarak ferroptozun oluşumunda ve düzenlenmesinde önemli bir rol oynayabilir. Hücredeki artan ROS yağlara saldırarak lipoksigenaz (ALOX) enzimi ile lipid peroksidasyonuna neden olmaktadır, bu da hücre membran yapısının bozulması ile ilişkilidir [149]. Plazma membranının ana bileşenleri olan fosfolipidlerde aşırı lipid peroksidasyonunun meydana gelmesi membran bütünlüğünün bozulmasına ve hücre ölümüne neden olur. ALOX5'in inflamatuvar reaksiyonları aktive ettiği ve apoptoz, ferroptoz ve piroptoz dahil olmak üzere çeşitli hücre ölümü yollarını tetiklediği bulunmuştur. Farklı hücre ve doku ekspresyon paternlerine sahip altı üye arasında ALOX5, lipid peroksidasyonuna bağlı ferroptozun düzenlenmesinde önemli bir rol oynar [176, 177]. Ayrıca ALOX5'in demir içeren bir enzim olması ve ferroptozda sıklıkla demir birikiminin meydana gelmesi ALOX5'in ferroptozdaki önemi göstermektedir [8].

Yağ metabolizması hücrede temel olarak FASN enzimi ile kontrol edilmektedir ve lipidlerin *de novo* sentezi için tek sitoplazmik enzimdir. FASN yağ asidi (FA) biyosentezindeki son adımı katalize eder ve *de novo* lipogenez yoluyla FA üretmek için maksimum hepatik kapasitenin ana belirleyicisi olduğu düşünülmektedir. FASN, primer olarak asetil-CoA, karbon donörü olarak malonil-CoA ve uzun zincirli FA'ları sentezler. Normal koşullar altında fazla karbonhidratlar FA'ya dönüştürülür, ardından gerektiğinde beta-oksidasyon yoluyla enerji sağlayan triasilgliserollere esterifikasyon yapılır. FASN, SLC7A11 ifadesini arttırarak lipid peroksidasyonunun birikmesi ve ferroptozu engelleyebildiği anlaşılmıştır [178, 179]. Bu enzimin hedeflenmesinin ferroptozu indükleyebileceği bazı makalalarda tartışılmıştır. Ancak diyabet modelinde FASN seviyesi diğer belirtilen ferroptoz biyobelirteçleri ile birlikte karaciğerde bizden başka çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda ALOX5 ve FASN protein seviyeleri ölçüldü ve deney grupları arasında anlamlı fark saptanmadı. Fruktoz alımı plazma trigliserit düzeylerini artırır ve yüksek fruktozlu diyetler hepatik *de novo* lipogenez destekler. Hepatik *de novo* lipogenez, insan NAFLD'sinde intrahepatik lipidlere önemli bir katkıda bulunur, bu da uzun vadeli fruktoz aşırı tüketiminin NAFLD gelişimini destekleyebileceğini düşündürmektedir [180]. Ayrıca yüksek fruktoz tüketimi, fruktozdan gelen aşırı kalori tüketimi ile kilo alımına da katkıda bulunur [181]. Bu çalışmada kullandığımız modelde deney hayvanlarını 5 hafta süre ile yüksek fruktoz ile beslendi ve ardından standart diyet ile beslenmeye devam edildi. Çalışmamızda fruktoz ile beslenen diyabetik hayvanların kontrol gruplarına göre ağırlıkları azalmış olarak bulundu. Uygulanan fruktozun süresinin kısa olması ve fruktoz diyetinin devam etmemesi nedeni ile diyabetik grupların ağırlıklarının artmamış

olabileceğine, ayrıca *de novo* lipogenezde ve lipid peroksidasyonunda görev alan FASN ve ALOX5 enzimlerin aktivasyonunun uyarılmamış olabileceği öngörülmüştür.

4-hidroksi-2-Nanonal (4-HNE), oksidatif stresle yüksek oranda ilişkilendirilen, malondialdehid (MDA) gibi lipid peroksidasyonunun toksik bir son ürünüdür. Genellikle doku ve hücrelerdeki oksidatif hasarı tespit etmek için kullanılır. Reaktif serbest elektron gruplarına sahip olması ve yüksek oksidatif koşullarda hücresel proteinler ve nükleik asitlerle etkileşime girebilmesi nedeniyle zararlı olabilir, sitotoksisite veya hücre ölümüne sebep olabilirler. Aynı zamanda 4-HNE'nin diyabet, kanser ve obezite gibi oksidatif strese dayalı çeşitli patofizyolojik süreçlerde etkili olduğu anlaşılmıştır [25]. NAFLD'li hastalarda [182] ve diyabetik sıçanlarda MDA ve 4-HNE seviyeleri artmış olduğu bildirilmiştir [183]. Yapılan çeşitli çalışmalarda oksidatif stres koşullarında resveratrol uygulamasının 4-HNE ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir [184, 185]. Bu çalışmada oksidatif stresin neden olduğu hasar sonucu 4-HNE seviyelerinin yüksek fruktoz ve STZ uygulaması sonucunda diyabetik grupta arttığı ve resveratrol uygulanan diyabetik grupta bu hasarın gerilemiş olması, resveratrolün oksidatif hasar üzerinde düzenleyici etkilerini desteklemektedir.

Önemli bir transkripsiyon faktörü olan Nrf2, hücrelerde oksidatif stresi düzenler, ROS'un neden olduğu hücre hasarını azaltıp vücudun redoks homeostazını korur. Aynı zamanda antioksidan proteinlerin ekspresyonunu artırır ya da düzenleyebilir [186, 187]. Normal fizyolojik koşullarda Nrf2, sitoplazmada proteazom tarafından parçalanması için kendisini ubikitinleştiren E3 ubikitin ligaz Keap1 (Kelch ECH-ilişkilendirici protein 1) ile bağlı durumda bulunur. Oksidatif stres koşulları altında Keap1'in aktivitesi azalır, Nrf2 ve Keap1 birbirinden ayrılır. Daha sonra Nrf2 çekirdeğe transloke olarak Hem oksijenaz-1 (HO-1)'in transkripsiyonunu başlatır. HO-1, oksidatif strese karşı koruyucu rol oynayan Nrf2 tarafından düzenlenen bir antioksidan enzimdir. HO-1, hem'i karbon monoksit, serbest demire ve biliverdine parçalar. Biliverdin de antioksidan özelliklere sahip bilirubine daha fazla parçalanır [188]. Böylece Nrf2'nin aktivasyonu oksidatif stresi ve ferroptozu önleyebilir [145]. Son yıllarda HO-1'in aşırı ekspresyonunun hücre için zararlı etkileri olabileceğini gösteren çalışmalar vardır. Artan pro-oksidan koşullar sırasında, HO-1, ferritin veya hem'den salınan demiri, lipid peroksidasyonunu ve ferroptozu uyararak ROS seviyelerini artırır. HO-1'in aşırı aktivasyonu, hücre içinde artarak ferroptozu uyaran demir nedeniyle zararlı ve sitotoksik hale gelebilir. Bu hücresel demir ve ROS seviyeleri, HO-1'in dengesini koruyucu bir rolden hücre ölümünün uygulayıcısına kaydırır [30, 189, 190]. Nrf2'nin diyabet gibi oksidatif koşullarda artması beklenirken Stancic ve

arkadaşlarının (2022) yaptığı bir çalışmada Nrf2 sinyal yolağının bozulduğunu, Nrf-2 ve HO-1 ekspresyonunun azalarak diyabetik karaciğerde ortaya çıkan genel inflamatuvar ve oksidatif durumunun önemli bir parçası olduğu bildirilmiştir. Diyabetik hayvanlara yapılan bir ferroptoz inhibitörü olan Fer-1 tedavisi sonrasında Nrf-2 aktivasyonunun tekrar sağlandığını saptanmıştır [191]. Bir başka çalışmada diyabetik koşullarda, Nrf2 sinyallesinin inaktivasyonunun *in vitro* ve *in vivo* β hücreleri ferroptozuna yol açtığını bildirilmiştir [192]. Mevcut çalışmamızda diyabetik grupta benzer biçimde Nrf-2 ekspresyonunun azaldığını buna karşılık HO-1 ekspresyonunun arttığını gözlemledik. Birçok sinyal yolu HO-1 ekspresyonunu düzenler, ancak MAPK'ler en yaygın olarak rapor edilenlerdir [193]. Bu sebeple HO-1'in diyabetik grupta aşırı ekspresyonu, Nrf2 aktivasyonu sonucunda olmadığı ve başka sinyal yollarının uyarımı sonucunda oluştuğunu düşünmekteyiz. Resveratrol tedavisinin diyabet kaynaklı Nrf2 nükleer immünopozitifliğindeki azalmayı Nrf-2 aktivasyonunu tekrar sağlayarak attırdığını saptadık. Bu da bize bozulmuş Nrf2 sinyallesinin diyabetik karaciğer hepatositlerinin ferroptozunda önemli olduğunu düşündürdü.

Reaktif oksijen türleri tarafından üretilen, DNA bazı modifiye edilmiş bir ürünü olan 8-Hidroksideoksiguanozin (8-OHdG), DNA replikasyonunda G-C'den T-A'ya transversiyonu indüklemeye eğilimli olduğu bilinmektedir. 8-OHdG'nin oksidatif DNA hasarının iyi bir belirteci olduğu anlaşılmıştır [194]. Hem deneysel hem de klinik çalışmalarda artan kanıtlar, oksidatif stresin her iki diyabet tipinin (I ve II) patogenezinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Oksidatif stres, diyabetik komplikasyonların altında yatan patojenik faktör gibi görünmektedir. 8-OHdG'nin diyabette *in vivo* oksidatif DNA hasarının duyarlı bir biyobelirteci olarak hizmet ettiği öne sürülmüştür [195]. Lee ve arkadaşları tarafından yaptığı bir çalışmada pankreatik adacıklarda 8-OHdG seviyelerinin diyabetik grupta arttığı ve resveratrol tedavisinin bu seviyeleri normaleştirdiği ve kontrol grubunun değerlerine yakınlştırması gözlemlendi [196]. Ayrıca db/db farelerde yapılan bir çalışmada idrarla 8-OHdG atımının belirgin bir biçimde yüksek olduğunu ancak resveratrol tedavisinden sonra düştüğünü göstermişler. Böbreklerden izole edilen mitokondriyal DNA da 8-OHdG içeriğinin fazla olduğunu, ancak resveratrol ile tedavi edilen farelerin böbreklerinde gözlenmediğini bildirmişlerdir [197]. Çalışmamızda diyabeti hayvanların karaciğer dokularında 8-OHdG'nin hem sitoplazmik hem de nükleer immün pozitifliğinin arttığını, resveratrol tedavisi ile bu artışın gerilediğini saptadık. Bu da resveratrolün ROS temizleme yoluyla oksidatif stresi azaltarak DNA hasarını engellemiş olabilir.

Fosforile H2AX (γ H2AX), hasarlı DNA'nın onarım sürecinde önemli bir faktördür. Hasar bölgelerine görevlendirilir ve böylece diğer DNA onarım sistemlerini aktiveştirir. H2AX, birçok araştırmacı tarafından indüklenen DNA hasarını ölçmek için bir araç olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır [198]. DNA hasarı tepkisi, fizyolojik süreçler sırasında karşılaşılan çeşitli stres sinyallerine yanıt olarak veya iyonlaştırıcı radyasyon veya DNA'ya zarar veren terapötik ajanlara yanıt olarak başlatılabilir [199]. DNA hasarı oluşuktan sonra H2AX fosforile olur ve DNA onarım proteinlerinin hasarlı bölgeye toplanmasına sağlayarak hasar onarılır. DNA hasarı onarıldıktan sonra H2AX tekrar defosforile olur. Böylece H2AX, DNA hasar tespiti için bir biyobelirteç olarak kullanılmaktadır [200]. Yapılan bir çalışmada DNA kırıkları işaretleyicisi olan H2AX ekspresyonunun, diyabetik hayvanların miyokardiyal hücrelerinde güçlü bir şekilde arttığı saptanmıştır [201]. Genetik olarak diyabetik olan db/db farelerde yapılan bir çalışmada karaciğer, böbrek ve akciğer dokularında DNA hasarı belirteci olan γ -H2AX'in ekspresyonu ile birlikte doku fibrozisinde arttığını göstermişlerdir [141]. Yapılan bir başka çalışmada γ H2AX'i tespit edilerek resveratrolün iyonize radyasyon (IR) nedenli DNA hasarına karşı etkilerini değerlendirdi. Resveratrol tedavisinin hücre canlılığını arttırdığını ve keratinositlerde IR uygulamasının neden olduğu DNA hasarını baskılayabildiği anlaşıldı [202]. Bu çalışma T2DM modelinde, yüksek fruktoz ve STZ uygulamasının sonucunda diyabetik grupta DNA hasarının artmasına bağlı olarak γ H2AX ekspresyonunun arttığını, ayrıca Tao ve arkadaşlarının çalışmasına benzer olarak karaciğerde fibrozisinde arttığını saptadık. Resveratrol uygulanan diyabetik grupta ise γ H2AX ekspresyonunun azaldığı ve fibrozisin gerilediğini tespit ettik. Resveratrolün antioksidan etkisi ile oksidatif stresin neden olduğu olumsuz koşulları ortadan kaldırmasına ve daha önce bildirilen resveratrolün DNA hasarı üzerinde düzenleyici etkileri nedeni ile olduğunu düşündük. Bizim modelimize benzer yüksek fruktoz ve düşük STZ ile oluşturulan diyabette resveratrol tedavisinin γ H2AX ekspresyonu üzerine etkilerini gösteren hiçbir çalışmaya rastlamadık. Bizim çalışmamız bu konuda yapılan ilk çalışmadır.

Siklooksijenaz-2 (COX-2), çeşitli uyananlarla aktiveşen prostaglandinlerin (PG'ler) sentezinde önemli bir hız sınırlayıcı enzimdir. COX-2, normal dokularda ekspresyonu düşük olan veya hiç olmayan, ancak hücrelerde inflamasyon, sitokinler, büyüme faktörleri, mekanik uyarılar ve kanserojenler gibi çeşitli uyananlarla ekspresyonu artan bir enzimdir [203]. COX-2, fibroz ve kanser dahil olmak üzere karaciğer patogenezi ile ilişkilidir. Cheng ve arkadaşları (2002), kronik hepatitli 45 hastanın karaciğer biyopsi dokularında immünohistokimya ve western blot analizi yoluyla COX-2 ekspresyonunu araştırmış ve COX-2 ekspresyonunun karaciğer fibrozisinin şiddetiyle arttığını bulmuşlardır [204]. Daha önce yapılan çalışmalarda COX-2'nin,

karaciğer fibrozunun sitolojik temeli olan hepatik stellat hücrelerin (HSC'ler) çoğalmasını ve apoptozunu düzenleyerek hepatik fibrozun oluşumunda ve gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir [205]. COX-2'nin baskılanmasının, HSC'lerin çoğalmasını baskıladığı ve apoptozu düzenleyerek fibrozisi önlediği bildirilmiştir [206]. Bizim çalışmamızda da diyabetik hayvanlarda COX-2 ekspresyonunun arttığı ve dokularda fibrozis yaygın olarak saptandı. COX-2, makrofajları veya diğer inflamatuvar hücreleri aktive etme işlevi gören, PTGS2 tarafından kodlanan indüklenmiş bir enzimdir. Normal koşullarda düşük dozda eksprese edilirken, ferroptoz sırasında ekspresyonunun arttığı anlaşılmıştır. COX-2'nin aşırı ekspresyonu, hepatik fibrozda önemli bir indükleyici olan inflamasyonu tetikler. Ayrıca COX-2, apoptoz ve hücre yaşlanması gibi çeşitli durumlarda rol oynamaktadır [32, 209]. COX-2, ferroptozun işaretleyici geni olarak kabul edilir ve ekspresyonunun artması, ferroptozun önemli bir işareti olarak kabul edilir [210]. Bui Thanh Tung ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada COX-2 seviyelerinin yaşlı farelerde arttığı ancak resveratrol uygulaması ile bu oranın normaleştiği anlaşılmıştır [211]. COX-2'nin etkileri modelimize benzer modellerde çalışılmamıştır. Bizim çalışmamızda diyabetle artan COX-2 ekspresyonunun resveratrol tedavisi ile azaldığını, ayrıca fibrozisinde gerilediğini gösterdik. COX-2'nin birçok farklı yoldan karaciğer patolojisinde etkili olduğunu, resveratrolün COX-2 ekspresyonu üzerine inhibitör etkisinin olabileceği sonucuna vardık.

NAD bağımlı histon deasetilaz ailesinin bir üyesi olan SIRT1, çok sayıda fizyolojik olayı düzenler. Histonların deasetilasyonu ile gen ekspresyonunun düzenlenmesi, DNA onarımı, doku rejenerasyonu, hücrenin hayatta kalması, inflamasyon, mitokondriyal biyogenez ve nöronal sinyalleme de rol oynamaktadır. SIRT1, lipogenez kontrol etmeye yönelik olaylara da aracılık eder ve ROS oluşumunu doğrudan engeller. Aynı zamanda SIRT1, lipid peroksidasyonunun artması ve mitokondriyal fonksiyonların iyileşmesi ile mevcut oksidatif stresi hafifletmek için çeşitli sinyal basamaklarını aktive etmektedir [207]. SIRT1 genel olarak nükleus da bulunur, ancak hücre içi lokalizasyonu hücrenin durumuna ve moleküler etkileşimlere de bağlıdır. Koşullara göre nükleus ile sitozol arasında yer değişebilir [8]. SIRT1'in aktivasyonu, SREBP-1c ve ChREBP'yi deasetilleyerek hepatik *de novo lipogenez*i engeller [42]. SIRT1'in ekspresyonu ve aktivitesi resveratrol tarafından allosterik bir şekilde artırılabilir [208]. SIRT1'in resveratrol tarafından doğrudan bağlanma yoluyla aktivasyonu, oksidatif stresin çeşitli deneysel modellerinde koruyucu etkileri olduğunu desteklemektedir [209]. Yapılan birçok çalışmada, SIRT1 azalmasının pankreas β hücrelerinde apoptoza yol açabileceğini göstermiştir [210, 211]. SIRT1 ifadesinin veya aktivitesinin azalması, insülin

salgısının azalmasına ve T2DM katkıda bulunur. Ayrıca SIRT1 ifadesi bir inhibitör tarafından engellendiğinde resveratrolün koruyucu etkilerinde ortadan kalktığı gösterilmiştir. Bozulmamış SIRT1 aktivitesinin resveratrolün karaciğerde koruyucu etkileri için çok önemli olduğu doğrulanmıştır. SIRT1 inhibe edilirse, resveratrolün sağlık yararları da eş zamanlı olarak engellenir [212]. Çalışmamızda T2DM modelinde, diyabetik grupta SIRT1 seviyelerinin azalması ve resveratrol uygulanan diyabetik ve kontrol gruplarında daha yüksek olmasının, resveratrolün SIRT1 aktivasyonu üzerine olumlu etkilerini göstermekle beraber karaciğer üzerine koruyucu etkileri için de SIRT1'in aktivasyonunun gerekli olduğunda bir kez daha gösterilmiştir.

SIRT1 ayrıca antioksidan stres yanıtının merkezi düzenleyicisi olan Nrf2'yi aktive ederek anti-ferroptoz etkileri de gösterebilir [213]. Demir metabolizmasının ve ferroptozisin ana düzenleyicisi olarak görev yapan Nrf2, ferroptozla ilişkili genlerin çoğunu düzenler [214]. Nrf2 serbest demir depolanmasını artırır, hücre içi demir içeriğini azaltır ve hücrel serbest demir birikimini engeller [215]. Ayrıca, Nrf2, GPX4 geninin transkripsiyonunu aktive ederek lipid peroksidasyonunu engeller [216]. Bu bilgiler göz önüne alındığında Nrf2'nin ferroptozu etkili bir şekilde inhibe edebileceğini göstermektedir. SIRT1-Nrf2'nin ferroptoz üzerindeki baskılayıcı etkisi çeşitli hastalıklarda doğrulanmıştır. SIRT1 aktive edildiğinde karaciğer ve kaslarda lipid peroksidlerin belirteci olan 4-HNE'nin sentezininin azalttığı gösterilmiştir [217]. SIRT1 ferroptozun ilerlemesini birden fazla yolla düzenleyebilir. Bu nedenle ferroptozla ilişkili hastalıkların tedavisi için postansiyel bir hedef olduğu düşünülmektedir. Bizim çalışmamızda da resveratrol tedavisi sonucunda SIRT1 ekspresyonunun arttığını, Nrf2 aktivasyonu sonucunda HO-1'in ekspresyonunun düzenlendiğini ve GPX4'ün aktive olarak lipid peroksidasyonunu engelleyip ferroptozu engellemekte önemli bir rol oynadığını düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Wilson ve Islam (2012) geliştirmiş olduğu T2DM modeli modifiye edilerek kullanıldı. Yüksek fruktoz ve STZ uygulaması sonrası diyabet olduğu tespit edilen hayvanlara 3 hafta daha fruktoz uygulamasına devam edilerek diyabetik kişilerde yüksek fruktoz alımı nedeniyle oluşabilecek hasarın ne boyuta ulaşabileceği ve tedavi sonrası ortaya çıkan hasarın ne kadar geri döndürülebileceği araştırıldı. Oluşturduğumuz modelde yüksek fruktozun ferroptoz ile ilişkisi ve resveratrol uygulamasının diyabetin neden olabileceği olası ferroptoz üzerine etkilerine etkilerini araştıran benzer bir çalışmaya rastlanmadı, bu konuda yapılmış ilk çalışmadır.

Diyabetik grupta, STZ uygulamasından itibaren yükselmiş olan kan şekerinin deney sonuna kadar yüksek seyretmesi ve ağırlıklarının kontrol grubuna kıyasla düşük olması modelimizin önerilen Tip 2 diyabet modeline uygun olduğunu gösterdi. Yapılan morfolojik değerlendirme sonucunda diyabetik grupta karaciğer doku morfolojisinin bozulduğu, hepatositlerde vakuolizasyon, santral ven ve portal alanda fibrozis gözlemlendi. Aynı zamanda bu gruba ait dokularda hücre içerisinde demir birikimleri de saptandı. Resveratrol tedavisi uygulanan diyabetik grupta ise açlık kan şekeri seviyelerinin düştüğü, fibrozisin gerilediği ve demir birikimlerinin neredeyse hiç olmadığı gözlemlendi.

Biyokimya sonuçlarında ise GPX4 proteini seviyesinin diyabetik grupta düştüğü saptanırken GPX4ekspresyonundaki bu azalma immünohistokimya ile de doğrulandı. GPX4'in aktivasyonu için önemli olan SIRT1 ve Nrf2 protein ekspresyonlarındaki azalmada hipergliseminin neden olduğu oksidatif hasarda antioksidan sistemin neden yetersiz kaldığına açıklama yapıldı. Diyabetik gruplara SIRT1 aktivatörü olarak bilinen resveratrol uygulamasının antioksidan mekanizmanın yeniden düzenlenmesinde önemli olduğunu düşündürdü. Hiperglisemi ve fruktoz metabolizmasının neden olduğu oksidatif stres sonucu oluşan lipid peroksidasyonunun belirteci olan 4-HNE ve inflamasyon artması ile ilişkili COX-2'nin diyabetik gruplardaki artışının resveratrol ile gerilediği gösterildi. Diyabetik gruplarda dikkat çekici bir başka sonuçta oksidatif stresin nükleer ve mitokondriyal DNA'daki meydana getirdiği hasarın belirteci olan 8-OHdG immün pozitif hücrelerin sayısının arttığı, çift zincirli DNA kırıklarının olduğu alanlarda tamir sürecinde görev alacak olan faktörlerin bağlanması için bir belirteç olan fosforile H2AX immün pozitifliğinde artmış olduğu görüldü. Resveratrol tedavisinin ise bu hasarın gerilemesine yardımcı olduğu anlaşıldı.

Elde ettiğimiz bu sonuçlar ışığında resveratrolün diyabet kaynaklı hiperglisemiyi iyileştirerek ve antioksidan etkisi ile karaciğer dokusunu hem hiperglisemi hem de oksidatif stres kaynaklı hasardan koruduğu saptandı. Hiperglisemi sonucunda ortaya çıkan oksidatif stres nedeniyle aktifleşen ferroptik hücre ölüm yolunun resveratrolün SIRT1/Nrf2/GPX4 yolağını aktive etmesi ile ferroptoz ve karaciğer hasarını engellediği anlaşılmıştır. Ancak ferroptoz ve resveratrolün bu yolaktaki etkileri üzerine daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.



KAYNAKLAR

1. Mohamed, J., et al., *Mechanisms of Diabetes-Induced Liver Damage: The role of oxidative stress and inflammation*. Sultan Qaboos Univ Med J, 2016. **16**(2): p. e132-41.
2. Cole, J.B. and J.C. Florez, *Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications*. Nat Rev Nephrol, 2020. **16**(7): p. 377-390.
3. Rehman, K. and M.S.H. Akash, *Mechanism of Generation of Oxidative Stress and Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus: How Are They Interlinked?* J Cell Biochem, 2017. **118**(11): p. 3577-3585.
4. Goyal, R., M. Singhal, and I. Jialal, *Type 2 Diabetes*, in *StatPearls*. 2024, StatPearls Publishing

Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).

5. Tomic, D., J.E. Shaw, and D.J. Magliano, *The burden and risks of emerging complications of diabetes mellitus*. Nat Rev Endocrinol, 2022. **18**(9): p. 525-539.
6. Oguntibeju, O.O., *Type 2 diabetes mellitus, oxidative stress and inflammation: examining the links*. Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol, 2019. **11**(3): p. 45-63.
7. Chen, J., et al., *The multifaceted role of ferroptosis in liver disease*. Cell Death Differ, 2022. **29**(3): p. 467-480.
8. Sun, Y., et al., *The emerging role of ferroptosis in inflammation*. Biomed Pharmacother, 2020. **127**: p. 110108.
9. Wu, J., et al., *Ferroptosis in liver disease: new insights into disease mechanisms*. Cell Death Discovery, 2021. **7**(1): p. 276.
10. Feng, G., et al., *Ferroptosis and metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: Is there a link?* Liver Int, 2022. **42**(7): p. 1496-1502.
11. Wu, J., et al., *Ferroptosis in liver disease: new insights into disease mechanisms*. Cell Death Discov, 2021. **7**(1): p. 276.
12. Macías-Rodríguez, R.U., et al., *Reclassifying Hepatic Cell Death during Liver Damage: Ferroptosis-A Novel Form of Non-Apoptotic Cell Death?* Int J Mol Sci, 2020. **21**(5).
13. Taskinen, M.R., C.J. Packard, and J. Borén, *Dietary Fructose and the Metabolic Syndrome*. Nutrients, 2019. **11**(9).
14. Marriott, B.P., N. Cole, and E. Lee, *National estimates of dietary fructose intake increased from 1977 to 2004 in the United States*. J Nutr, 2009. **139**(6): p. 1228s-1235s.
15. Ang, B.R.G. and G.F.B. Yu, *The Role of Fructose in Type 2 Diabetes and Other Metabolic Diseases*. Journal of Nutrition and Food Sciences, 2018. **8**: p. 1-4.
16. Anapali, M., et al., *Combined resveratrol and vitamin D treatment ameliorate inflammation-related liver fibrosis, ER stress, and apoptosis in a high-fructose diet/streptozotocin-induced T2DM model*. Histochem Cell Biol, 2022. **158**(3): p. 279-296.
17. Cioffi, F., et al., *Fructose-Rich Diet Affects Mitochondrial DNA Damage and Repair in Rats*. Nutrients, 2017. **9**(4).
18. Muriel, P., P. López-Sánchez, and E. Ramos-Tovar, *Fructose and the Liver*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(13).

19. García-Berumen, C.I., et al., *The severity of rat liver injury by fructose and high fat depends on the degree of respiratory dysfunction and oxidative stress induced in mitochondria*. *Lipids Health Dis*, 2019. **18**(1): p. 78.
20. He, F., X. Ru, and T. Wen, *NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020. **21**(13): p. 4777.
21. Song, X. and D. Long, *Nrf2 and Ferroptosis: A New Research Direction for Neurodegenerative Diseases*. *Front Neurosci*, 2020. **14**: p. 267.
22. Xu, T., et al., *Molecular mechanisms of ferroptosis and its role in cancer therapy*. *J Cell Mol Med*, 2019. **23**(8): p. 4900-4912.
23. Lei, P., T. Bai, and Y. Sun, *Mechanisms of Ferroptosis and Relations With Regulated Cell Death: A Review*. *Front Physiol*, 2019. **10**: p. 139.
24. Li, D., et al., *Ferroptosis and its role in cardiomyopathy*. *Biomed Pharmacother*, 2022. **153**: p. 113279.
25. Tanriverdi, B., et al., *The Fat Pat Tissue Expresses A Pathogenic Profile Of Inflammatory Mediators and 4-Hne in Patients With Osteoarthritis*. 2021.
26. Feng, H. and B.R. Stockwell, *Unsolved mysteries: How does lipid peroxidation cause ferroptosis?* *PLoS Biol*, 2018. **16**(5): p. e2006203.
27. Liu, B. and J.M. Qian, *Cytoprotective role of heme oxygenase-1 in liver ischemia reperfusion injury*. *Int J Clin Exp Med*, 2015. **8**(11): p. 19867-73.
28. Kwon, M.Y., et al., *Heme oxygenase-1 accelerates erastin-induced ferroptotic cell death*. *Oncotarget*, 2015. **6**(27): p. 24393-403.
29. Nussler, A.K., et al., *Protective role of HO-1 for alcohol-dependent liver damage*. *Dig Dis*, 2010. **28**(6): p. 792-8.
30. Kajarabille, N. and G.O. Latunde-Dada, *Programmed Cell-Death by Ferroptosis: Antioxidants as Mitigators*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(19).
31. Martín-Sanz, P., et al., *COX-2 in liver, from regeneration to hepatocarcinogenesis: what we have learned from animal models?* *World J Gastroenterol*, 2010. **16**(12): p. 1430-5.
32. Yang, H., et al., *COX-2 in liver fibrosis*. *Clinica Chimica Acta*, 2020. **506**: p. 196-203.
33. Matsuda, Y., et al., *DNA damage sensor γ -H2AX is increased in preneoplastic lesions of hepatocellular carcinoma*. *ScientificWorldJournal*, 2013. **2013**: p. 597095.
34. Kuo, L.J. and L.X. Yang, *Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks*. *In Vivo*, 2008. **22**(3): p. 305-9.
35. Kitada, T., et al., *In situ detection of oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in chronic human liver disease*. *J Hepatol*, 2001. **35**(5): p. 613-8.
36. Valavanidis, A., T. Vlachogianni, and C. Fiotakis, *8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis*. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 2009. **27**(2): p. 120-139.
37. Öztürk, E., et al., *Resveratrol and diabetes: A critical review of clinical studies*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017. **95**: p. 230-234.
38. Hamadi, N., et al., *Ameliorative effects of resveratrol on liver injury in streptozotocin-induced diabetic rats*. *J Biochem Mol Toxicol*, 2012. **26**(10): p. 384-92.
39. Oyenih, O.R., et al., *Antidiabetic Effects of Resveratrol: The Way Forward in Its Clinical Utility*. *Journal of Diabetes Research*, 2016. **2016**(1): p. 9737483.
40. Öztürk, E., et al., *Resveratrol and diabetes: A critical review of clinical studies*. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 2017. **95**: p. 230-234.
41. Colak, Y., et al., *SIRT1 as a potential therapeutic target for treatment of nonalcoholic fatty liver disease*. *Med Sci Monit*, 2011. **17**(5): p. Hy5-9.

42. Ding, R.B., J. Bao, and C.X. Deng, *Emerging roles of SIRT1 in fatty liver diseases*. Int J Biol Sci, 2017. **13**(7): p. 852-867.
43. Ishibashi, H., et al., *Liver architecture, cell function, and disease*. Semin Immunopathol, 2009. **31**(3): p. 399-409.
44. Ozougwu, J.C., *Physiology of the liver*. International Journal of Research in Pharmacy and Biosciences, 2017. **4**(8): p. 13-24.
45. Michael H. Ross, W.P., *Histology : A Text And Atlas 6/E*. Vol. 18. 2014: Lippincott Williams & Wilkins/Wolters Kluwer Health.
46. Michalopoulos, G.K. and M.C. DeFrances, *Liver regeneration*. Science, 1997. **276**(5309): p. 60-6.
47. Michalopoulos, G.K., *Liver regeneration*. The liver: biology and pathobiology, 2020: p. 566-584.
48. Washabau, R.J., et al., *Liver*. Canine and Feline Gastroenterology, 2012: p. 849-957.
49. Taub, R., *Liver regeneration: from myth to mechanism*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(10): p. 836-47.
50. Abraham L. Kierszenbaum, L.L.T., *Histology and cell biology :an introduction to pathology 5/E*. Fifth ed. 2020: Elsevier.
51. Andersson, E.R., *In the zone for liver proliferation*. Science, 2021. **371**(6532): p. 887-888.
52. Mitra, V. and J. Metcalf, *Metabolic functions of the liver*. Anaesthesia & Intensive Care Medicine, 2009. **10**(7): p. 334-335.
53. Losser, M.R. and D. Payen, *Mechanisms of liver damage*. Semin Liver Dis, 1996. **16**(4): p. 357-67.
54. Malhi, H. and G.J. Gores, *Cellular and molecular mechanisms of liver injury*. Gastroenterology, 2008. **134**(6): p. 1641-54.
55. Thawley, V., *Acute Liver Injury and Failure*. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 2017. **47**(3): p. 617-630.
56. Sharma, A. and S. Nagalli, *Chronic Liver Disease*, in *StatPearls*. 2024, StatPearls Publishing

Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).

57. Kumar, A., et al., *Prevalence of Diabetes in India: A Review of IDF Diabetes Atlas 10th Edition*. Curr Diabetes Rev, 2024. **20**(1): p. e130423215752.
58. Deshmukh, C. and A. Jain, *Diabetes Mellitus: A Review*. 2021. **3**: p. 224-230.
59. Kumar, R., et al., *A REVIEW ON DIABETES MELLITUS: TYPE1 & TYPE2*. 2020. **09**: p. 838-850.
60. Katsarou, A., et al., *Type 1 diabetes mellitus*. Nat Rev Dis Primers, 2017. **3**: p. 17016.
61. Alam, U., et al., *General aspects of diabetes mellitus*. Handb Clin Neurol, 2014. **126**: p. 211-22.
62. Kaul, K., et al., *Introduction to diabetes mellitus*. Adv Exp Med Biol, 2012. **771**: p. 1-11.
63. DeFronzo, R.A., et al., *Type 2 diabetes mellitus*. Nat Rev Dis Primers, 2015. **1**: p. 15019.
64. Flannick, J., S. Johansson, and P.R. Njølstad, *Common and rare forms of diabetes mellitus: towards a continuum of diabetes subtypes*. Nat Rev Endocrinol, 2016. **12**(7): p. 394-406.
65. Olokoba, A.B., O.A. Obateru, and L.B. Olokoba, *Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends*. Oman Med J, 2012. **27**(4): p. 269-73.
66. Lin, Y. and Z. Sun, *Current views on type 2 diabetes*. J Endocrinol, 2010. **204**(1): p. 1-11.

67. McIntyre, H.D., et al., *Gestational diabetes mellitus*. Nat Rev Dis Primers, 2019. **5**(1): p. 47.
68. Maqbool, M. and S. Mir, *Animal Models in Diabetes Mellitus: An Overview*. 2019. **09**: p. 472-475.
69. King, A.J., *The use of animal models in diabetes research*. Br J Pharmacol, 2012. **166**(3): p. 877-94.
70. Arulmozhi, D.K., A. Veeranjanyulu, and S.L. Bodhankar, *Neonatal streptozotocin-induced rat model of Type 2 diabetes mellitus: A glance*. Indian Journal of Pharmacology, 2004. **36**(4): p. 217-221.
71. Srinivasan, K. and P. Ramarao, *Animal models in type 2 diabetes research: an overview*. Indian J Med Res, 2007. **125**(3): p. 451-72.
72. Etuk, E., *Animals models for studying diabetes mellitus*. Agriculture and Biology Journal of North America, 2010. **1**: p. 130-134.
73. Islam, M.S. and T. Loots du, *Experimental rodent models of type 2 diabetes: a review*. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 2009. **31**(4): p. 249-61.
74. Lenzen, S., *The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes*. Diabetologia, 2008. **51**(2): p. 216-26.
75. Rakieten, N., M.L. Rakieten, and M.V. Nadkarni, *Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917)*. Cancer chemotherapy reports, 1963. **29**: p. 91-98.
76. Akinlade, O.M., B.V. Owoyele, and A.O. Soladoye, *Streptozotocin-induced type 1 and 2 diabetes in rodents: a model for studying diabetic cardiac autonomic neuropathy*. Afr Health Sci, 2021. **21**(2): p. 719-727.
77. Furman, B.L., *Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats*. Curr Protoc, 2021. **1**(4): p. e78.
78. Salih, N., *The effect of streptozotocin induced diabetes mellitus on liver activity in mice*. Global Journal on Advances in Pure and Applied Sciences, 2014. **3**: p. 67-75.
79. Tappy, L., *Fructose-containing caloric sweeteners as a cause of obesity and metabolic disorders*. J Exp Biol, 2018. **221**(Pt Suppl 1).
80. Elliott, S.S., et al., *Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome*. Am J Clin Nutr, 2002. **76**(5): p. 911-22.
81. Bray, G.A., S.J. Nielsen, and B.M. Popkin, *Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity*. Am J Clin Nutr, 2004. **79**(4): p. 537-43.
82. Douard, V. and R.P. Ferraris, *Regulation of the fructose transporter GLUT5 in health and disease*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008. **295**(2): p. E227-37.
83. Sarı, E. and O. Babacan, *Fruktoz; Bir Halk Sağlığı Sorunu mu?* TAF Preventive Medicine Bulletin, 2014. **13**(5): p. 401-404.
84. Arslan, S. and N. Şanlıer, *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2016. **9**(3): p. 150-158.
85. Kolderup, A. and B. Svihus, *Fructose Metabolism and Relation to Atherosclerosis, Type 2 Diabetes, and Obesity*. J Nutr Metab, 2015. **2015**: p. 823081.
86. Ross, A.P., et al., *A high fructose diet impairs spatial memory in male rats*. Neurobiol Learn Mem, 2009. **92**(3): p. 410-6.
87. Aydemir, D., et al., *Impact of the Amyotrophic Lateral Sclerosis Disease on the Biomechanical Properties and Oxidative Stress Metabolism of the Lung Tissue Correlated With the Human Mutant SOD1(G93A) Protein Accumulation*. Front Bioeng Biotechnol, 2022. **10**: p. 810243.

88. Aydemir, D., et al., *Impact of the surface modifications and cell culture techniques on the biomechanical properties of PDMS in relation to cell growth behavior*. International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials, 2022. **71**(12): p. 886-897.
89. Nandhini, A.T., S.D. Balakrishnan, and C.V. Anuradha, *Response of liver antioxidant system to taurine in rats fed high fructose diet*. Indian J Exp Biol, 2002. **40**(9): p. 1016-9.
90. Tuovinen, C.G. and A.E. Bender, *Some metabolic effects of prolonged feeding of starch, sucrose, fructose and carbohydrate-free diet in the rat*. Nutr Metab, 1975. **19**(3-4): p. 161-72.
91. Gaby, A.R., *Adverse effects of dietary fructose*. Altern Med Rev, 2005. **10**(4): p. 294-306.
92. Faghihzadeh, F., A. Hekmatdoost, and P. Adibi, *Resveratrol and liver: A systematic review*. J Res Med Sci, 2015. **20**(8): p. 797-810.
93. Cucciolli, V., et al., *Resveratrol: from basic science to the clinic*. Cell Cycle, 2007. **6**(20): p. 2495-510.
94. Szkudelska, K. and T. Szkudelski, *Resveratrol, obesity and diabetes*. European Journal of Pharmacology, 2010. **635**(1): p. 1-8.
95. Summerlin, N., et al., *Resveratrol nanoformulations: challenges and opportunities*. Int J Pharm, 2015. **479**(2): p. 282-90.
96. Öztürk, E., et al., *Resveratrol and diabetes: A critical review of clinical studies*. Biomed Pharmacother, 2017. **95**: p. 230-234.
97. Patel, K.R., et al., *Clinical trials of resveratrol*. Ann N Y Acad Sci, 2011. **1215**: p. 161-9.
98. Trela, B. and A. Waterhouse, *Resveratrol: Isomeric Molar Absorptivities and Stability*. Journal of Agricultural and Food Chemistry - J AGR FOOD CHEM, 1996. **44**.
99. Augustin, M.A., L. Sanguansri, and T. Lockett, *Nano- and micro-encapsulated systems for enhancing the delivery of resveratrol*. Ann N Y Acad Sci, 2013. **1290**: p. 107-12.
100. King, R.E., J.A. Bomser, and D.B. Min, *Bioactivity of Resveratrol*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2006. **5**(3): p. 65-70.
101. Weiskirchen, S. and R. Weiskirchen, *Resveratrol: is it really good for liver health?* Hepatitis Monthly, 2017. **17**(8).
102. Frombaum, M., et al., *Antioxidant effects of resveratrol and other stilbene derivatives on oxidative stress and *NO bioavailability: Potential benefits to cardiovascular diseases*. Biochimie, 2012. **94**(2): p. 269-76.
103. Zordoky, B.N., I.M. Robertson, and J.R. Dyck, *Preclinical and clinical evidence for the role of resveratrol in the treatment of cardiovascular diseases*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1852**(6): p. 1155-77.
104. Poulsen, M.M., et al., *Resveratrol and inflammation: Challenges in translating pre-clinical findings to improved patient outcomes*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 2015. **1852**(6): p. 1124-1136.
105. Bastianetto, S., C. Ménard, and R. Quirion, *Neuroprotective action of resveratrol*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1852**(6): p. 1195-201.
106. Carter, L.G., J.A. D'Orazio, and K.J. Pearson, *Resveratrol and cancer: focus on in vivo evidence*. Endocr Relat Cancer, 2014. **21**(3): p. R209-25.
107. Szkudelski, T. and K. Szkudelska, *Resveratrol and diabetes: from animal to human studies*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1852**(6): p. 1145-54.
108. Xu, F., et al., *Resveratrol Prevention of Diabetic Nephropathy Is Associated with the Suppression of Renal Inflammation and Mesangial Cell Proliferation: Possible Roles*

- of *Akt/NF- κ B Pathway*. International Journal of Endocrinology, 2014. **2014**(1): p. 289327.
109. Bastianetto, S., C. Ménard, and R. Quirion, *Neuroprotective action of resveratrol*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 2015. **1852**(6): p. 1195-1201.
 110. Soufi, F.G., D. Mohammad-Nejad, and H. Ahmadiéh, *Resveratrol improves diabetic retinopathy possibly through oxidative stress - nuclear factor κ B - apoptosis pathway*. Pharmacol Rep, 2012. **64**(6): p. 1505-14.
 111. Mohammadshahi, M., F. Haidari, and F. Soufi, *Chronic resveratrol administration improves diabetic cardiomyopathy in part by reducing oxidative stress*. Cardiology Journal, 2014. **21**(1): p. 39-46.
 112. Hussein, M. and H. Ali, *Biochemical effects of Resveratrol and Curcumin combination on obese diabetic rats*. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 2013. **4**: p. 1-10.
 113. Izzo, C., et al., *The Role of Resveratrol in Liver Disease: A Comprehensive Review from In Vitro to Clinical Trials*. Nutrients, 2021. **13**(3): p. 933.
 114. Baur, J.A. and D.A. Sinclair, *Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(6): p. 493-506.
 115. Muriel, P., *NF-kappaB in liver diseases: a target for drug therapy*. J Appl Toxicol, 2009. **29**(2): p. 91-100.
 116. Tsai, S.H., S.Y. Lin-Shiau, and J.K. Lin, *Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NFkappaB in macrophages by resveratrol*. Br J Pharmacol, 1999. **126**(3): p. 673-80.
 117. Wadsworth, T.L. and D.R. Koop, *Effects of the wine polyphenolics quercetin and resveratrol on pro-inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages*. Biochem Pharmacol, 1999. **57**(8): p. 941-9.
 118. Theodotou, M., et al., *Effect of resveratrol on non-alcoholic fatty liver disease*. Exp Ther Med, 2019. **18**(1): p. 559-565.
 119. Bishayee, A., et al., *Resveratrol and liver disease: from bench to bedside and community*. Liver International, 2010. **30**(8): p. 1103-1114.
 120. Sener, G., et al., *Protective effects of resveratrol against acetaminophen-induced toxicity in mice*. Hepatol Res, 2006. **35**(1): p. 62-8.
 121. Kasdallah-Grissa, A., et al., *Protective effect of resveratrol on ethanol-induced lipid peroxidation in rats*. Alcohol Alcohol, 2006. **41**(3): p. 236-9.
 122. Chávez, E., et al., *Resveratrol prevents fibrosis, NF-kappaB activation and TGF-beta increases induced by chronic CCl4 treatment in rats*. J Appl Toxicol, 2008. **28**(1): p. 35-43.
 123. Bujanda, L., et al., *Resveratrol inhibits nonalcoholic fatty liver disease in rats*. BMC Gastroenterology, 2008. **8**(1): p. 40.
 124. Shang, J., et al., *Resveratrol improves non-alcoholic fatty liver disease by activating AMP-activated protein kinase*. Acta Pharmacol Sin, 2008. **29**(6): p. 698-706.
 125. Kasdallah-Grissa, A., et al., *Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates ethanol-induced oxidative stress in rat liver*. Life Sciences, 2007. **80**(11): p. 1033-1039.
 126. Ray, S., *Apoptosis*. 2005. p. 153-167.
 127. Bustin, S., *Molecular Biology of the Cell, Sixth Edition; ISBN: 9780815344643; and Molecular Biology of the Cell, Sixth Edition, The Problems Book; ISBN 9780815344537*. International Journal of Molecular Sciences, 2015. **16**(12): p. 28123-28125.
 128. Kist, M. and D. Vucic, *Cell death pathways: intricate connections and disease implications*. Embo j, 2021. **40**(5): p. e106700.

129. Skenderi, F., S. Vranic, and I. Damjanov, *Regulated cell death in diagnostic histopathology*. The International Journal of Developmental Biology, 2015. **59**(1-2-3): p. 149-158.
130. Galluzzi, L., et al., *Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015*. Cell Death Differ, 2015. **22**(1): p. 58-73.
131. Pu, F., et al., *Ferroptosis as a novel form of regulated cell death: Implications in the pathogenesis, oncometabolism and treatment of human cancer*. Genes Dis, 2022. **9**(2): p. 347-357.
132. Radi, Z.A., Z.S. Stewart, and S.P. O'Neil, *Accidental and Programmed Cell Death in Investigative and Toxicologic Pathology*. Current Protocols in Toxicology, 2018. **76**(1): p. e51.
133. Tsujimoto, Y. and S. Shimizu, *Another way to die: autophagic programmed cell death*. Cell Death Differ, 2005. **12 Suppl 2**: p. 1528-34.
134. Li, J., et al., *Ferroptosis: past, present and future*. Cell Death Dis, 2020. **11**(2): p. 88.
135. Gao, M., et al., *Ferroptosis is an autophagic cell death process*. Cell Res, 2016. **26**(9): p. 1021-32.
136. Mou, Y., et al., *Ferroptosis, a new form of cell death: opportunities and challenges in cancer*. J Hematol Oncol, 2019. **12**(1): p. 34.
137. Jiang, X., B.R. Stockwell, and M. Conrad, *Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2021. **22**(4): p. 266-282.
138. Hirschhorn, T. and B.R. Stockwell, *The development of the concept of ferroptosis*. Free Radical Biology and Medicine, 2019. **133**: p. 130-143.
139. Ju, J., Y.N. Song, and K. Wang, *Mechanism of Ferroptosis: A Potential Target for Cardiovascular Diseases Treatment*. Aging Dis, 2021. **12**(1): p. 261-276.
140. Tang, D., et al., *Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications*. Cell Research, 2021. **31**(2): p. 107-125.
141. Tao, N., K. Li, and J. Liu, *Molecular Mechanisms of Ferroptosis and Its Role in Pulmonary Disease*. Oxid Med Cell Longev, 2020. **2020**: p. 9547127.
142. Cao, J.Y. and S.J. Dixon, *Mechanisms of ferroptosis*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2016. **73**(11): p. 2195-2209.
143. Liu, P., et al., *Ferroptosis: Mechanisms and role in diabetes mellitus and its complications*. Ageing Research Reviews, 2024. **94**: p. 102201.
144. Jiang, X., B.R. Stockwell, and M. Conrad, *Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021. **22**(4): p. 266-282.
145. Canning, P., F.J. Sorrell, and A.N. Bullock, *Structural basis of Keap1 interactions with Nrf2*. Free Radic Biol Med, 2015. **88**(Pt B): p. 101-107.
146. Wang, S., et al., *Dioscin Protects against Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury by Reducing Ferroptosis and Apoptosis through Activating Nrf2/HO-1 Signaling*. Antioxidants, 2022. **11**(12): p. 2443.
147. Miao, R., et al., *Iron metabolism and ferroptosis in type 2 diabetes mellitus and complications: mechanisms and therapeutic opportunities*. Cell Death & Disease, 2023. **14**(3): p. 186.
148. Capelletti, M.M., et al., *Ferroptosis in Liver Diseases: An Overview*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(14).
149. Chen, S., et al., *The Emerging Role of Ferroptosis in Liver Diseases*. Front Cell Dev Biol, 2021. **9**: p. 801365.
150. Aydemir, D., et al., *Effects of the in-utero dicyclohexyl phthalate and di-n-hexyl phthalate administration on the oxidative stress-induced histopathological changes in*

- the rat liver tissue correlated with serum biochemistry and hematological parameters.* Front Endocrinol (Lausanne), 2023. **14**: p. 1128202.
151. Kaya-Dagistanli, F., et al., *The effects of alpha lipoic acid on liver cells damages and apoptosis induced by polyunsaturated fatty acids.* Food and Chemical Toxicology, 2013. **53**: p. 84-93.
 152. Sun, H., et al., *IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045.* Diabetes Res Clin Pract, 2022. **183**: p. 109119.
 153. Galicia-Garcia, U., et al., *Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus.* International Journal of Molecular Sciences, 2020. **21**(17): p. 6275.
 154. Guo, T., et al., *Liraglutide attenuates type 2 diabetes mellitus-associated non-alcoholic fatty liver disease by activating AMPK/ACC signaling and inhibiting ferroptosis.* Mol Med, 2023. **29**(1): p. 132.
 155. Deng, Q., et al., *Ferroptosis as a potential new therapeutic target for diabetes and its complications.* Endocr Connect, 2023. **12**(3).
 156. Wilson, R.D. and M.S. Islam, *Fructose-fed streptozotocin-injected rat: an alternative model for type 2 diabetes.* Pharmacol Rep, 2012. **64**(1): p. 129-39.
 157. Wilson, R.D. and M.S. Islam, *Effects of white mulberry (Morus alba) leaf tea investigated in a type 2 diabetes model of rats.* Acta Pol Pharm, 2015. **72**(1): p. 153-160.
 158. Kale, O.E., et al., *Five traditional Nigerian Polyherbal remedies protect against high fructose fed, Streptozotocin-induced type 2 diabetes in male Wistar rats.* BMC Complementary and Alternative Medicine, 2018. **18**(1): p. 160.
 159. Udumula, M.P., et al., *High fructose and streptozotocin induced diabetic impairments are mitigated by Indirubin-3-hydrazone via downregulation of PKR pathway in Wistar rats.* Scientific Reports, 2021. **11**(1): p. 12924.
 160. Patel, R., et al., *Fructose diet and low dose streptozotocin treatment induces the development of diabetic nephropathy in rats.* Oriental Pharmacy and Experimental Medicine, 2015. **15**(4): p. 305-312.
 161. Ramadori, G., et al., *Central administration of resveratrol improves diet-induced diabetes.* Endocrinology, 2009. **150**(12): p. 5326-33.
 162. Liu, K., et al., *Effect of resveratrol on glucose control and insulin sensitivity: a meta-analysis of 11 randomized controlled trials.* Am J Clin Nutr, 2014. **99**(6): p. 1510-9.
 163. Bo, S., et al., *Six months of resveratrol supplementation has no measurable effect in type 2 diabetic patients. A randomized, double blind, placebo-controlled trial.* Pharmacological research, 2016. **111**: p. 896-905.
 164. Thazhath, S.S., et al., *Administration of resveratrol for 5 wk has no effect on glucagon-like peptide 1 secretion, gastric emptying, or glycemic control in type 2 diabetes: a randomized controlled trial.* The American journal of clinical nutrition, 2016. **103**(1): p. 66-70.
 165. Zhang, T., et al., *Efficacy and Safety of Resveratrol Supplements on Blood Lipid and Blood Glucose Control in Patients with Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials.* Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2021. **2021**(1): p. 5644171.
 166. Liu, K., et al., *Effect of resveratrol on glucose control and insulin sensitivity: a meta-analysis of 11 randomized controlled trials.* The American journal of clinical nutrition, 2014. **99**(6): p. 1510-1519.

167. Luedde, T., N. Kaplowitz, and R.F. Schwabe, *Cell death and cell death responses in liver disease: mechanisms and clinical relevance*. *Gastroenterology*, 2014. **147**(4): p. 765-783.e4.
168. Yang, X.D. and Y.Y. Yang, *Ferroptosis as a Novel Therapeutic Target for Diabetes and Its Complications*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022. **13**: p. 853822.
169. Ganz, T., *Systemic iron homeostasis*. *Physiol Rev*, 2013. **93**(4): p. 1721-41.
170. Gao, H., et al., *Aberrant iron distribution via hepatocyte-stellate cell axis drives liver lipogenesis and fibrosis*. *Cell Metab*, 2022. **34**(8): p. 1201-1213.e5.
171. Zhang, Z., et al., *Adipocyte iron levels impinge on a fat-gut crosstalk to regulate intestinal lipid absorption and mediate protection from obesity*. *Cell Metab*, 2021. **33**(8): p. 1624-1639.e9.
172. Fernández-Real, J.M., D. McClain, and M. Manco, *Mechanisms Linking Glucose Homeostasis and Iron Metabolism Toward the Onset and Progression of Type 2 Diabetes*. *Diabetes Care*, 2015. **38**(11): p. 2169-76.
173. Niederau, C., et al., *Hyperinsulinaemia in non-cirrhotic haemochromatosis: impaired hepatic insulin degradation?* *Diabetologia*, 1984. **26**(6): p. 441-4.
174. Proneth, B. and M. Conrad, *Ferroptosis and necroinflammation, a yet poorly explored link*. *Cell Death Differ*, 2019. **26**(1): p. 14-24.
175. Chen, X., et al., *Ferroptosis: machinery and regulation*. *Autophagy*, 2021. **17**(9): p. 2054-2081.
176. Kuang, F., et al., *MGST1 is a redox-sensitive repressor of ferroptosis in pancreatic cancer cells*. *Cell Chem Biol*, 2021. **28**(6): p. 765-775.e5.
177. Zhang, X.-D., et al., *Mechanisms and regulations of ferroptosis*. *Frontiers in Immunology*, 2023. **14**.
178. Dorn, C., et al., *Expression of fatty acid synthase in nonalcoholic fatty liver disease*. *Int J Clin Exp Pathol*, 2010. **3**(5): p. 505-14.
179. Li, Y., et al., *Targeting fatty acid synthase modulates sensitivity of hepatocellular carcinoma to sorafenib via ferroptosis*. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2023. **42**(1): p. 6.
180. Ter Horst, K.W. and M.J. Serlie, *Fructose Consumption, Lipogenesis, and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*. *Nutrients*, 2017. **9**(9): p. 981.
181. Sievenpiper, J.L., et al., *Effect of fructose on body weight in controlled feeding trials: a systematic review and meta-analysis*. *Ann Intern Med*, 2012. **156**(4): p. 291-304.
182. Loguercio, C., et al., *Non-alcoholic fatty liver disease in an area of southern Italy: main clinical, histological, and pathophysiological aspects*. *J Hepatol*, 2001. **35**(5): p. 568-74.
183. Liu, G., et al., *4-HNE expression in diabetic rat kidneys and the protective effects of probucol*. *Journal of Endocrinological Investigation*, 2016. **39**(8): p. 865-873.
184. Siddiqui, M.A., et al., *Protective potential of trans-resveratrol against 4-hydroxynonenal induced damage in PC12 cells*. *Toxicol In Vitro*, 2010. **24**(6): p. 1592-8.
185. Jeon, B.T., et al., *Resveratrol attenuates obesity-associated peripheral and central inflammation and improves memory deficit in mice fed a high-fat diet*. *Diabetes*, 2012. **61**(6): p. 1444-54.
186. Pillai, R., et al., *NRF2: KEAPing Tumors Protected*. *Cancer Discov*, 2022. **12**(3): p. 625-643.
187. Ulasov, A.V., et al., *Nrf2/Keap1/ARE signaling: Towards specific regulation*. *Life Sci*, 2022. **291**: p. 120111.

188. Doré, S., et al., *Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 2445-50.
189. Chang, L.-C., et al., *Heme oxygenase-1 mediates BAY 11-7085 induced ferroptosis*. Cancer Letters, 2018. **416**: p. 124-137.
190. Wang, Y., et al., *Activation of Nrf2/HO-1 signaling pathway exacerbates cholestatic liver injury*. Communications Biology, 2024. **7**(1): p. 621.
191. Stancic, A., et al., *Involvement of Ferroptosis in Diabetes-Induced Liver Pathology*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(16).
192. Stancic, A., et al., *Ferroptosis as a Novel Determinant of β -Cell Death in Diabetic Conditions*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2022. **2022**(1): p. 3873420.
193. Medina, M.V., et al., *Regulation of the Expression of Heme Oxygenase-1: Signal Transduction, Gene Promoter Activation, and Beyond*. Antioxid Redox Signal, 2020. **32**(14): p. 1033-1044.
194. Kitada, T., et al., *In situ detection of oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in chronic human liver disease*. Journal of Hepatology, 2001. **35**(5): p. 613-618.
195. Wu, L.L., et al., *Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics*. Clin Chim Acta, 2004. **339**(1-2): p. 1-9.
196. Lee, Y.E., et al., *Chronic resveratrol treatment protects pancreatic islets against oxidative stress in db/db mice*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e50412.
197. Kitada, M., et al., *Resveratrol improves oxidative stress and protects against diabetic nephropathy through normalization of Mn-SOD dysfunction in AMPK/SIRT1-independent pathway*. Diabetes, 2011. **60**(2): p. 634-43.
198. KUO, L.J. and L.-X. YANG, *γ -H2AX - A Novel Biomarker for DNA Double-strand Breaks*. In Vivo, 2008. **22**(3): p. 305-309.
199. Sharma, A., K. Singh, and A. Almasan, *Histone H2AX Phosphorylation: A Marker for DNA Damage*, in *DNA Repair Protocols*, L. Bjergbæk, Editor. 2012, Humana Press: Totowa, NJ. p. 613-626.
200. Dickey, J.S., et al., *H2AX: functional roles and potential applications*. Chromosoma, 2009. **118**(6): p. 683-92.
201. Rostoka, E., et al., *Antimutagenic 1,4-Dihydropyridine AV-153 Normalizes Expression of GLUT1, GLUT4, INOS, PARP1, and Gamma H2AX Histone in Myocardium of Rats with Streptozotocin Model of Diabetes Mellitus*. Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences., 2023. **77**(2): p. 96-101.
202. Jin, Y., et al., *Resveratrol rescues cutaneous radiation-induced DNA damage via a novel AMPK/SIRT7/HMGB1 regulatory axis*. Cell Death & Disease, 2023. **13**(10): p. 847.
203. Cheng, J. and T. Hada, *The Significance of COX-2 and COX-2 Inhibitors in Liver Fibrosis and Liver Cancer*. Current Medicinal Chemistry - Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents, 2005. **4**(2): p. 199-206.
204. Cheng, J., et al., *Expression of cyclooxygenase 2 and cytosolic phospholipase A(2) in the liver tissue of patients with chronic hepatitis and liver cirrhosis*. Hepatol Res, 2002. **23**(3): p. 185-195.
205. Planagumà, A., et al., *The selective cyclooxygenase-2 inhibitor SC-236 reduces liver fibrosis by mechanisms involving non-parenchymal cell apoptosis and PPARgamma activation*. Faseb j, 2005. **19**(9): p. 1120-2.
206. Hu, Y., et al., *COX-2 Regulates the Proliferation and Apoptosis of Activated Hepatic Stellate Cells through CDC27*. Journal of Nanomaterials, 2021. **2021**: p. 1-16.
207. Yan, T., et al., *The Beneficial Roles of SIRT1 in Drug-Induced Liver Injury*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2019. **2019**(1): p. 8506195.

208. García-Martínez, B.I., et al., *Effect of Resveratrol on Markers of Oxidative Stress and Sirtuin 1 in Elderly Adults with Type 2 Diabetes*. International Journal of Molecular Sciences, 2023. **24**(8): p. 7422.
209. Ma, S., et al., *SIRT1 activation by resveratrol alleviates cardiac dysfunction via mitochondrial regulation in diabetic cardiomyopathy mice*. Oxidative medicine and cellular longevity, 2017. **2017**(1): p. 4602715.
210. Lafontaine-Lacasse, M., G. Doré, and F. Picard, *Hexosamines stimulate apoptosis by altering SIRT1 action and levels in rodent pancreatic β -cells*. J Endocrinol, 2011. **208**(1): p. 41-9.
211. Prud'homme, G.J., et al., *GABA protects pancreatic beta cells against apoptosis by increasing SIRT1 expression and activity*. Biochem Biophys Res Commun, 2014. **452**(3): p. 649-54.
212. Farghali, H., M.K. Kemelo, and N.K. Canová, *SIRT1 Modulators in Experimentally Induced Liver Injury*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2019. **2019**(1): p. 8765954.
213. Bellezza, I., et al., *Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress*. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2018. **1865**(5): p. 721-733.
214. Anandhan, A., et al., *Breakdown of an Ironclad Defense System: The Critical Role of NRF2 in Mediating Ferroptosis*. Cell Chem Biol, 2020. **27**(4): p. 436-447.
215. Kerins, M.J. and A. Ooi, *The Roles of NRF2 in Modulating Cellular Iron Homeostasis*. Antioxid Redox Signal, 2018. **29**(17): p. 1756-1773.
216. Dodson, M., R. Castro-Portuguez, and D.D. Zhang, *NRF2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis*. Redox Biol, 2019. **23**: p. 101107.
217. Zeng, J., et al., *The roles of sirtuins in ferroptosis*. Front Physiol, 2023. **14**: p. 1131201.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

FRUKTOZ ve STREPTOZOTOCİN ile OLUŞTURULAN DİYABETİK SIÇAN MODELİNDE RESVERATROLÜN KARACİĞER HASARI ve FERROPTOZ ÜZERİNE ETKİLERİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 10 BENZERLİK ENDEKSİ	% 7 İNTERNET KAYNAKLARI	% 5 YAYINLAR	% 3 ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
----------------------------------	-----------------------------------	------------------------	--------------------------------

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Marmara University Öğrenci Ödevi	% 1
2	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 1
3	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 1
4	tvj.cumhuriyet.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
5	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	<% 1
6	www.bilginyayinevi.com İnternet Kaynağı	<% 1
7	9lib.net İnternet Kaynağı	<% 1
8	Submitted to Saglik Bilimleri Universitesi Öğrenci Ödevi	<% 1

www.utsakcongress.com