



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FRANSIZ SAHİL ÇAMI (*Pinus maritima*) EKSTRESİ'NİN
YÜKSEK YAĞ İÇERİKLİ DİYET VE DÜŞÜK DOZ
STREPTOZOTOSİNLE DİYABET OLUŞTURULMUŞ
SIÇANLARDA ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

BEDİRHAN AY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

PROF.DR. ERCÜMENT ÖLMEZ

MANİSA, 2016



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FRANSIZ SAHİL ÇAMI (*Pinus maritima*) EKSTRESİ'NİN
YÜKSEK YAĞ İÇERİKLİ DİYET VE DÜŞÜK DOZ
STREPTOZOTOSİNLE DİYABET OLUŞTURULMUŞ
SIÇANLARDA ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

HAZIRLAYAN: BEDİRHAN AY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

PROF.DR. ERCÜMENT ÖLMEZ

(Tez Danışmanı)

DOÇ. DR. KAMİL VURAL

(Jüri Üyesi)

PROF.DR. BAŞAR SIRMAGÜL

(Jüri Üyesi)

MANİSA, 2016

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar 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 olmadığı beyan ederim.

Bedirhan AY

TEŞEKKÜR

2015-046 proje numarası ile bu çalışmayı destekleyen Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Bu çalışmanın hazırlanması aşamasında akademik bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, katkı ve yorumlarıyla tezimin şekillenmesinde büyük emeği olan, tez danışmanım, Prof. Dr.ERCÜMENT ÖLMEZ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmanın sürdürülmesi aşamasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Doç. Dr. Kamil VURAL'a, Doç. Dr. Tuğba ÇAVUŞOĞLU'na, Prof. Dr. M. İbrahim TUĞLU'ya ve Prof. Dr. Ahmet VAR'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Çok değerli aileme ve hayatımın her aşamasında, sevgi, destek ve güveniyle yanımda olan eşim, Tuğba AY'a teşekkür ederim.

Ayrıca, tez çalışmam süresince, her türlü desteği sağlayan, değerli mesai arkadaşlarım, Arş. Gör. Serkan BAŞTEMİR'e, Uzman Biyolog Işıl AYDEMİR'e teşekkür ederim.

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1: IDF bölgeleri ve bu bölgelerdeki diyabetli kişi sayısı ve prevalansı	17
Tablo 2: IDF bölgeleri ve bu bölgelerdeki 2014 yılı diyabetli kişi sayısı ve 2035 yılına kadar beklenen diyabetli kişi sayısı.....	18
Tablo 3: Türkiye’deki erişkin nüfus, diyabetli birey sayısı, Türkiye ve Dünya prevalansı ve tanı konulmayan diyabetli birey sayısı	19
Tablo 4: IDF bölgeleri ve bu bölgelerde 2014 yılında diyabet ve tedavisine harcanan maliyet ve 2035 yılına kadar tahmin edilen maliyet	20
Tablo 5: Türkiye’deki yıllara göre sağlık harcamaları ve diyabete ve tedavi harcamalarına ayrılan pay	21
Tablo 6: WHO ve ADA’ya göre Diabetes Mellitus ve glukoz metabolizmasının diğer bozukluklarında kullanılan tanı kriterleri	23
Tablo 7: Diabetes Mellitusa bağlı meydana gelen komplikasyonların altında yatan risk faktörleri ve markırlar	26
Tablo 8: Farklı hayvan türlerine göre kullanılan Alloxan ve STZ dozu aralığı.....	35
Tablo 9: Fare ve sıçanlarda alloxan ve STZ’nin kullanım şekilleri ve uygulanan dozları.....	36
Tablo 10: Tip 2 Diabetes Mellitus’u taklit eden modeller	38
Tablo 11: Endotel hücrelerinden salgılanan ve eksprese edilen mediyatörler	39
Tablo 12: İnsanda endotel disfonksiyonu durumunda değişen parametreler	42
Tablo 13: Serbest radikallerin sınıflandırılması	51
Tablo 14: Nitrik oksit sentezleyen enzimlerin sınıflandırılması	53
Tablo 15: Hücre içi kalsiyum düzeyini artıran bileşikler	54
Tablo 16: En yaygın endojen antioksidanlar ve molekül ağırlıklarına göre sınıflandırılması	59
Tablo 17: En yaygın ekzojen antioksidanlar ve molekül ağırlıklarına göre sınıflandırılması	60
Tablo 18: Oluşturulan deney grupları, gerekli ve kullanılacak toplam hayvan sayısı	70
Tablo 19: Standart ya da yüksek yağlı yem ile beslenen gruplarda çalışmanın başlangıcında ve sonundaki vücut ağırlığı (VA) değerleri	85
Tablo 20: Deney hayvanlarının açlık kan şekeri, açlık insülin, HbA1c ve HOMA-IR değerleri.....	87

Tablo 21: Standart ya da yüksek yağlı yem ile beslenen gruplarda uygulamaların sıçanların torasik aortalarında fenilefrin kasılmalarının, EC50 değerlerine etkisi.....	89
Tablo 22: Standart ya da yüksek yağlı yem ile beslenen gruplarda uygulamaların sıçanların serum kolesterol, LDL-kolesterol, HDL- kolestrol ve trigliserid değerlerine etkisi	92
Tablo 23: Standart ya da yüksek yağlı yem ile beslenen gruplarda uygulamaların sıçanların serum kan üre azotu ve kreatinin düzeylerine etkisi.....	93
Tablo 24: Standart ya da yüksek yağlı yem ile beslenen gruplarda uygulamaların sıçanların CRP ve MDA düzeylerine etkisi	94
Tablo 25: Standart ya da yüksek yağlı yem ile beslenen gruplarda uygulamaların sıçanların nitrit/nitrat düzeylerine etkisi.....	94

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1:Kardiyovasküler hastalıkların patogenezinde endotel disfonksiyon' un rolü ..	41
Şekil 2:ADMA'nın hiperglisemi ve endotel disfonksiyonu ile ilişkisi.....	44
Şekil 3:Hiperglisemi indüklü diyabetik vasküler komplikasyonların mekanizması.....	45
Şekil 4:Protein kinaz C (PKC)'nin sentezinin ve aktivasyonunun biyolojik hedefi....	47
Şekil 5:Moleküler oksijenin suya indirgenmesi ve serbest radikal oluşumu.....	52
Şekil 6:L- arjininden NOS aracılığıyla NO oluşumu.....	53
Şekil 7:Nitrik oksit'in, üretimi, metabolizması ve fonksiyonel hedefleri.....	55
Şekil 8:Antioksidanların sınıflandırılması	57
Şekil 9:Hiperglisemi ve oksidatif stres ilişkisi	64
Şekil 10:FSC ekstresi'nin serbest radikal yakalayıcı etkisi	67
Şekil 11:Standart ya da yüksek yağlı yem ile beslenen gruplarda uygulamaların sıçanların torasik aortalarında fenilefrin kasılmalarının maksimum kasılma değerlerine etkisi.	88
Şekil 12:Deney gruplarındaki sıçanların torasik aortalarındaki fenilefrin kasılmalarının karşılaştırılması	89
Şekil 13:Deney gruplarındaki sıçanların torasik aortalarındaki endotele bağımlı asetilkolin gevşeme yanıtlarının karşılaştırılması	90
Şekil 14:Deney gruplarındaki sıçanların torasik aortalarındaki endotelden bağımsız sodyum nitroprusid gevşeme yanıtlarının karşılaştırılması.	91

RESİM DİZİNİ

Resim 1: Diabetes Mellitus'un uzun dönem komplikasyonları.....	25
Resim 2: Hiperglisemik polyol yolağı.....	48
Resim 3: Oksidan- Antioksidan dengesi.....	56
Resim 4: Serbest Radikallerin oluşumu ve enzimatik detoksifikasyonu.....	59
Resim 5: Diyabet ve Oksidatif Stres.....	62
Resim 6: FSÇ kabuğu ekstresi' nin kimyasal bileşenleri.....	65
Resim 7: FSÇ kabuğundan elde edilen ekstre'nin toz görüntüsü.....	66
Resim 8: Deney hayvanlarının üçerli gruplar halinde oluşturulması.....	71
Resim 9: Bir kafeste bulunan boyasız, başı ve kuyruk kısmı boyalı sıçanlar.....	71
Resim 10: Oral gavaj yoluyla ekstre ve ilaçların verilmesi.....	73
Resim 11: Anestezi sonrası kalpten kan alınması.....	74
Resim12: Sıçanlardan deney esnasında izole edilen torasik aorta ve sabitlenmesi.....	75
Resim 13: Sıçanlardan deney esnasında izole edilen torasik aorta' nın çevre bağ dokulardan temizlenmesi.....	75
Resim 14: İzole organ banyosuna temizlenen torasik aortanın asılması.....	76
Resim 15: Sandwich ELİSA Yöntemiyle İnsülin Seviyesi Ölçümü.....	81
Resim 16: Nitrit/Nitrat ölçümünün genel prensibi.....	82
Resim 17: Deneyssel gruplarda oluşan hasara ve yapılan tedaviye pankreasın verdiği cevapların histolojik görüntüleri. Langerhans adacıkları, hücreleri, asinus ve interlobinel kanallarda oluşan değişikliklerin HE boyamaları.....	96
Resim 18: Deneyssel gruplarda oluşan hasara ve yapılan tedaviye pankreasın verdiği cevapların histolojik görüntüleri. Langerhans adacıkları, hücreleri, asinus ve interlobinel kanallarda oluşan değişikliklerin HE boyamaları.....	97
Resim 19: Deneyssel gruplarda beta hücrelerinin belirteci olarak kullanılan insülin antikor boyamasının immünohistokimyasal görüntüleri.....	99
Resim 20: Deneyssel gruplarda beta hücrelerinin belirteci olarak kullanılan insülin antikor boyamasının immünohistokimyasal görüntüleri.....	100
Resim 21: Deneyssel gruplarda böbrek korteksinin HE ile boyama görüntüleri...101	
Resim 22: Deneyssel gruplarda böbrek korteksinin HE ile boyama görüntüleri...102	

Resim 23: Deneysel gruplarda böbrek medullasının HE ile boyamasının görüntüleri.....	104
Resim 24: Deneysel gruplarda böbrek medullasının HE ile boyamasının görüntüleri.....	105
Resim 25: Deneysel gruplarda böbrek korteksinin megalin antikoru ile boyamasının immünohistokimyasal görüntüleri.....	106
Resim 26: Deneysel gruplarda böbrek korteksinin megalin antikoru ile boyamasının immünohistokimyasal görüntüleri.....	107
Resim 27: Deneysel gruplarda böbrek medullasının megalin antikoru ile boyamasının immünohistokimyasal görüntüleri.....	109
Resim 28: Deneysel gruplarda böbrek medullasının megalin antikoru ile boyamasının immünohistokimyasal görüntüleri.....	110
Resim 29: Deneysel gruplarda böbrek korteksinin TGF beta 1 antikoru ile boyamasının immünohistokimyasal görüntüleri.....	111
Resim 30: Deneysel gruplarda böbrek korteksinin TGF beta 1 antikoru ile boyamasının immünohistokimyasal görüntüleri.....	112
Resim 31: Deneysel gruplarda böbrek medullasının TGF beta 1 antikoru ile boyamasının immünohistokimyasal görüntüleri.....	113
Resim 32: Deneysel gruplarda böbrek medullasının TGF beta 1 antikoru ile boyamasının immünohistokimyasal görüntüleri.....	114

KISALTMA VE SİMGELER

ADA:	Amerikan Diyabet Derneği
ADMA:	Asimetrik Dimetil Arjinin
AGEs:	İleri Glikasyon Son Ürünü
AKŞ:	Açlık Kan Şekeri
cGMP:	Siklik 3'5' Guanozin Monofosfat
CRP:	C- Reaktif Protein
CV:	Varyasyon Katsayısı
DAG:	DiaçilGliserol
DM:	Diabetes Mellitus
DN:	Diyabetik Nefropati
eNOS:	Endotelial Nitrik Oksit Sentetaz Enzimi
FSC:	Fransız Sahil Çamı
GDM:	Gestasyonel Diabetes Mellitus
GPx:	Glutasyon Peroksidaz
H ₂ O ₂ :	Hidrojen Peroksit
HbA1C:	Plazma Glikozile Alfa Hemoglobin
HDL:	Yüksek Dansiteli Lipoprotein
HO [•] :	Hidroksil Radikali
IDDM:	İnsülin Bağımlı Diyabet
IDF:	Uluslararası Diyabet Federasyonu
iNOS:	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentetaz Enzimi
LDL:	Düşük Dansiteli Lipoprotein
L-NAME:	N ^G - Nitro- L- Arjinin Metil Ester
MDA:	Malondialdehit
MODY:	Gencin Erişkin Tipte Başlayan Diyabeti
NAD:	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADPH:	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NIDDM:	İnsülin Bağımsız Diyabet
nNOS:	Nöronal Nitrik Oksit Sentetaz Enzimi
NO:	Nitrik Oksit

O₂: Süperoksit Anyonu
OPS: Oligomerik Proantosiyanidin
PKC: Protein Kinaz C
RNS: Reaktif Nitrojen Türleri
ROS: Reaktif Oksijen Türleri
SOD: Süperoksit Dismutaz
SOR: Serbest Oksijen Radikalleri
STZ: Streptozotosin
TG: Trigliserid
THSK: Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Tip 1 DM: Tip 1 Diabetes Mellitus
Tip 2 DM: Tip 2 Diabetes Mellitus
TK: Total Kolesterol
TKŞ: Tokluk Kan Şekeri
TNF- Alfa: Tümör Nekrozis Faktör
TURDEP: Türk Diyabet Epidemiyoloji Çalışma Grubu
WHO: Dünya Sağlık Örgütü
YYD: Yüksek Yağlı Diyet

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	I
TEŞEKKÜR	II
TABLOLAR DİZİNİ	III
ŞEKİL DİZİNİ	V
RESİM DİZİNİ.....	VI
KISALTMA VE SİMGELER	VIII
İÇİNDEKİLER	X
ÖZET	1
ABSTRACT	2
I. GİRİŞ.....	3
II. GENEL BİLGİLER.....	7
2.1. DİABETES MELLİTUS'UN TANIMI.....	7
2.2. DİABETES MELLİTUS'UN TARİHTEKİ YERİ	8
2.3.DİABETES MELLİTUS'UN SINIFLANDIRILMASI	10
2.3.1. Tip 1 Diabetes Mellitus.....	10
2.3.2. Tip 2 Diabetes Mellitus.....	11
2.3.3. Diğer Spesifik Tipler	11
2.3.3.1. Beta hücre fonksiyonlarında meydana gelen bozukluklar	11
2.3.3.2 İnsülin etkinliğinde genetik bozukluklar	12
2.3.3.3 Ekzokrin Pankreas Hastalıkları	12
2.3.3.4 Endokrinopatiler.....	12
2.3.3.5 İlaç veya kimyasal nedenlere bağlı durumlar	13
2.3.3.6.Enfeksiyonlar	13
2.3.3.7.İmmüneracılıklı diyabetin yaygın olmayan şekilleri	13
2.3.3.8.Diyabetle ilişkili olan diğer genetik sendromlar	14

2.3.4. Gestasyonel Diabetes Mellitus	14
2.4.DÜNYA'DA VE TÜRKİYE'DE DİABETES MELLİTUS'UN EPİDEMİYOLOJİSİ	15
2.5. DİABETES MELLİTUS'UN EKONOMİK BOYUTU	19
2.6. DİABETES MELLİTUS'UN TANI KRİTERLERİ.....	22
2.7. DİYABET VE KOMPLİKASYONLAR.....	25
2.7.1. Akut Komplikasyonlar	27
2.7.1.1. Diyabetik Ketoasidoz	27
2.7.1.2. Non-Ketotik Hiperosmolar Koma	28
2.7.1.3. Laktik Asidoz:	28
2.7.1.4. Hipoglisemik Koma:	29
2.7.2. Kronik Seyirli Komplikasyonlar	29
2.7.2.1. Makrovasküler Komplikasyonlar	29
2.7.2.1.1. Koroner Arter Hastalığı:	30
2.7.2.1.2. Serebrovasküler Hastalıklar:	30
2.7.2.1.3.Periferik Arter Hastalığı.....	30
2.7.2.2. Mikrovasküler Komplikasyonlar	31
2.7.2.2.1. Diyabetik Nefropati	31
2.7.2.2.2. Diyabetik Nöropati	31
2.7.2.2.3. Diyabetik Retinopati	32
2.8. DENEYSEL DİYABET MODELLERİ.....	33
2.8.1. Tip 1 Diyabet Modelleri	37
2.8.1.1 Diyabetojenik Kimyasal Maddelerle Oluşturulan Modeller.....	37
2.8.1.2 Spontan Tip 1 Diyabet Modelleri	37
2.8.1.3.Virüs Yardımıyla Oluşturulan Tip 1 Diyabet Modelleri	37
2.8.1.4.Transgenik Tip 1 Diyabet Modelleri.....	37

2.8.2. Tip 2 Diyabet Modelleri	37
2.9.ENDOTEL, ENDOTEL DİSFONKSİYONU VE DİYABET	39
2.10. OKSİDATİF STRES	50
2.10.1. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri	50
2.10.2. Antioksidanlar	55
2.10.2.1 Primer veya Doğal Antioksidanlar	57
2.10.2.2 Sekonder veya Sentetik Antioksidanlar	58
2.10.3. Oksidatif Stres	60
2.10.4.Diyabet ve Oksidatif stres	61
2.11.FRANSIZ SAHİL ÇAMI EKSTRESİ'NİN GENEL ÖZELLİKLERİ	64
2.11.1. Fransız Sahil Çamı'nın Genel Özellikleri.....	64
2.11.2. Fransız Sahil Çamı Kabuğu Ekstresi.....	65
III. GEREÇ-YÖNTEM.....	70
3.1. Deney Hayvanlarının Gruplandırılması	70
3.2. Kan ve Doku Örneklerinin Ölçüme Hazır Hale Getirilmesi ve Saklanması	73
3.3. Damar Yanıtlarının İncelenmesi	74
3.4.Homojenizasyon işlemleri	77
3.5. Protein tayini.....	78
3.6. Böbrekte MDA Ölçümü	79
3.7.Kanda Açlık Kan Şekeri, HbA1C, Total Kolesterol, Trigliserid, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol, Üre ve Kreatinin Seviyelerinin Ölçümü.....	79
3.8 İnsülin Seviyelerinin Ölçümü	80
3.9. Serumda MDA Seviyelerinin Ölçümü	81
3.10. Serum CRP Seviyelerinin Ölçümü	81
3.11. Serum Nitrat/Nitrit Seviyelerinin Ölçümü	81
3.12. Histopatolojik Çalışmalar	82
3.12.1. Parafin doku takibi	83
3.12.2. Hemotoksilen-eozin boyaması.....	83
3.12.3. İndirekt immunohistokimya boyaması	83
3.13. İstatiksel Analizler	84

IV. BULGULAR.....	85
4.1. Deney Hayvanlarında Gözlenen Bulgular	85
4.2. Deney Hayvanlarının Açlık Kan Şekeri, Açlık İnsülin, HbA1c ve HOMA-IR Seviyelerine Ait Bulgular	86
4.3. Damarda Kasılma ve Gevşeme Yanıtlarına Ait Bulgular	88
4.4. Deney Hayvanlarının Serumlarında Lipit Profiline Ait Bulgular	91
4.5. Deney Hayvanlarının Kan Üre Azotu (BUN) ve Kreatinin Seviyelerine Ait Bulgular	92
4.6. Deney Hayvanlarının Serum CRP ile Serum ve Böbrekte MDA Seviyelerine Ait Bulgular.....	93
4.7. Deney Hayvanlarının Serumlarında Nitrit/nitrat Seviyelerine Ait Bulgular	94
4.8. Deney Hayvanlarının Pankreas ve Böbrek Histopatolojisi Üzerine Elde Edilen Bulgular.....	95
V. TARTIŞMA	115
VI. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	123
VII. KAYNAKLAR.....	124
EK 1: ETİK KURUL ONAY KARARI.....	142
EK 2: ÖZGEÇMİŞ.....	143

Tezin Başlığı: Fransız Sahil Çamı (*Pinus maritima*) Ekstresi'nin Yüksek Yağ İçerikli Diyet ve Düşük Doz Streptozotosinle Diyabet Oluşturulmuş Sıçanlarda Etkinliğinin Araştırılması

Öğrencinin Adı: Bedirhan AY

Danışmanı: Prof. Dr. Ercüment ÖLMEZ

Anabilim Dalı: Farmakoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Bu projenin amacı, Fransız sahil çamı (FSC) kabuğu ekstresinin, yüksek yağlı diyet (YYD) ve düşük doz streptozotosinle (STZ) tip 2 diyabet modeli oluşturulan sıçanlardaki etkinliğinin araştırılmasıdır. Tip 2 diabetes mellitus (Tip 2 DM), çağımızın en hızlı büyüyen epidemik hastalıkların biri olup, insülin direnciyle karakterize kronik metabolik bir hastalıktır. DM'un başlıca komplikasyonları arasında, kardiyovasküler komplikasyonlar, nöropati, retinopati, nefropati ve vasküler patolojiler bulunmaktadır. Diyabete bağlı artmış oksidatif hasar, oluşan komplikasyonlarda önemli rol oynamaktadır. DM'taki morbitide ve mortalitenin başlıca nedeni kardiyovasküler bozukluklardır. Diyabetik nefropati ve bunun sonucunda gelişen böbrek yetmezliği de, diyabete bağlı morbitide ve mortalitenin ana nedenlerinden birisidir. Mevcut tedavi yaklaşımları ise, böbrek yetmezliği gelişimini engellemede yetersiz kalmaktadır. Öte yandan, FSC ekstresi, biyoflavonoidlerin bir karışımı olup, esas olarak oligomerik proantosiyandini (OPS) içerir. OPS'nin birçok antioksidanlar içerisinde, en güçlü serbest radikal yakalayıcı ajanlardan biri olduğu bildirilmiştir. Bu bitkisel ekstrenin, diabetes mellitus üzerine yararlı etkileri de birkaç deneysel ve klinik çalışmada rapor edilmiştir.

Bu çalışmada, diyabet oluşturmak amacıyla, 4 hafta süreyle YYD ile beslenen sıçanlara düşük doz intraperitoneal STZ enjeksiyonu (35 mg/kg) uygulandı. Deney hayvanları rastgele olarak; kontrol grubu (standart diyet), YYD grubu, YYD ve STZ ile indüklenen diyabetik gruplara ayrıldı. Ayrıca, diyabetik gruplar da alt gruplara ayrıldı: Bu gruplara 4 hafta süreyle oragastrik olarak; serum fizyolojik (SF, diyabetik kontrol) veya metformin (300 mg/kg/gün, pozitif kontrol) veya farklı konsantrasyonda (10, 50 ve 100 mg/kg/gün) FSC ya da FSC ekstresi (50 mg/kg/gün) ile (300 mg/kg/gün) metformin kombinasyonu verildi.

Çalışma sonunda, sıçanların serumlarında, açlık kan şekeri, insülin, total kolesterol, LDL-kolesterol, HDL-kolesterol, trigliserid, HbA1c, üre, kreatinin, C-reaktif protein (CRP), serum nitrit/nitrat ve malondialdehid (MDA) düzeyleri tayin edildi. Ayrıca, sıçanların böbrek örneklerinde, lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak MDA düzeyi ölçüldü. Sıçanların torasik aortalarında endotel fonksiyonunun belirlenmesi amacıyla, endotele-bağımlı gevşeme yanıtları değerlendirildi. İlave olarak, pankreas ve böbreklerde histopatolojik değerlendirmeler yapıldı.

FSC ekstresi, diyabetik sıçanlardaki artmış olan açlık kan şekeri, HbA1C ve HOMA-IR değerlerinde anlamlı iyileştirme göstermiştir. Serum CRP ve MDA değerleri ve böbrekte MDA düzeyleri diyabetik sıçanlarda artmış olup, istatistiksel olarak anlamlı farklılık sadece serum MDA düzeyleri için bulunmuştur. Tedavi uygulamaları ise, artmış olan bu parametrelerde azalmaya neden olmuştur. Pankreas ve böbrek histopatolojisi üzerine yapılan çalışmalarda da, diyabete bağlı gelişen hasar üzerine tedavi uygulamalarının olumlu etkileri tespit edilmiştir.

Bu çalışma sonucunda elde edilen olumlu etkiler, FSC ekstresinin, diyabetin komplikasyonlarının önlenmesi amacıyla, tek başına ya da diğer antidiyabetik ilaçlarla kombine olarak kullanılmasına katkı sağlayabilir.

Anahtar Kelimeler: Fransız sahil çamı ekstresi, diabetes mellitus, diyabetik nefropati, endotel fonksiyonu, metformin, streptozotosin, sıçan

Title: Evaluation of Efficiency of French Maritime Pine Bark (*Pinus maritima*) Extract in High-fat Diet and Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats

Student Name: Bedirhan AY

Supervisor: Prof. Dr. Ercüment ÖLMEZ

Department: Pharmacology Department

ABSTRACT

The aim of this project is to investigate the effectiveness of French maritime pine bark extract (PBE) in type 2 diabetic rat model induced by high-fat diet (HFD) and low dose streptozotocin (STZ). Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a chronic metabolic disorder characterized by insulin resistance and one of the fastest-growing epidemics of our time. Cardiovascular complications, neuropathy, retinopathy, nephropathy and vascular pathologies are the major complications of DM. Increased oxidative damage due to diabetes plays an important role in complications. The main reason of morbidity and mortality of DM is the cardiovascular disorders. Renal failure following diabetic nephropathy is also one of the main causes of morbidity and mortality in DM. Current treatment approaches is inadequate in preventing the development of renal failure. On the other hand, PBE is a complex mixture of bioflavonoids, with oligomeric proanthocyanidins (OPC) as the major constituents. OPC has been reported to be one of the strongest quenchers of reactive oxygen species among the various antioxidants. This herbal medication has been reported to have beneficial effects on diabetes mellitus in a few experimental and clinical studies.

In this study, DM was induced with HFD (for 4 weeks) and following low-dose intraperitoneal injection of STZ (35 mg/kg) in rats. The animals were randomly divided to one of the experimental groups as follow: Control group (standard diet), high-fat diet (HFD) group, HFD and STZ-induced diabetic groups. Diabetic groups were also divided subgroups: Rats were given orally either serum physiologic (SF, diabetic control) or metformin (300 mg/kg/day, positive control) or PBE (10, 50 or 100 mg/kg/day) or combination of PBE (50 mg/kg/day) and metformin (300 mg/kg/day) for 4 weeks.

At the end of the study, fasting glucose, insulin, total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglyceride, HbA1c, urea, creatinine, C-reactive protein (CRP), serum nitrite/nitrate and malondialdehyde (MDA) levels in the serum of rats were analyzed. Endothelial functions of isolated thoracic aortas, lipid peroxidation (MDA levels) in kidneys and histopathologic evaluations of pancreas and kidneys were also evaluated.

PBE improved the increased fasting blood glucose, HbA1c and HOMA-IR levels in diabetic rats significantly. Serum CRP, MDA levels and kidney MDA levels were also increased in diabetic rats, but only serum MDA levels reached statistically significance. Treatment applications led to decrease in these increased parameters. Beneficial effects of treatment applications on diabetic injury were also determined in histopathologic studies of pancreas and kidneys.

Beneficial effects of PBE obtained from this study may contribute to using PBE, alone or in combination with other antidiabetic agents, in order to prevent the complications of diabetes mellitus.

Keywords: French maritime pine bark, diabetes mellitus, diabetic nephropathy, endothelial function, metformin, streptozotocin, rat

I. GİRİŞ

Diabetes mellitus (DM), kan şekerinin yüksekliğiyle karakterize, pankreastan insülin hormonu salgılanmasındaki veya salgılanan insülinin etkisindeki yetersizlik sonucu ortaya çıkan, karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasında bozukluklarla seyreden bir hastalıktır (Kahn ve ark., 2005; Larner, 1985).

DM, günümüz insanının yaşam şartlarından dolayı tüm dünyada hızla yayılan, yüksek morbidite ve mortalite riski olan ve birden çok sayıda etiyolojiye sahip metabolik bir hastalıktır. Tip 1 veya insüline bağımlı tipi ve tip 2 veya insüline bağımlı olmayan tipi olmak üzere iki farklı DM tipi bulunmaktadır (Satman ve ark., 1998).

Tip 1 diyabet (Tip 1 DM, Juvenil tip diyabet, insüline bağımlı diyabet), insülin salgılanmasının eksikliği nedeniyle kendini gösteren, pankreas beta hücrelerinin, viral bir hasar, toksik veya otoimmün yıkımı nedeniyle gelişmektedir (Madsbad, 1983).

Dünya’da 285 milyon diyabetik insan bulunurken, bunun genel prevalansı’nın %6,6 olduğu bildirilmiştir (Colagiuri, 2010). 2013 yılında yayınlanan Diyabet Atlası’nda, 387 milyon diyabet hastasının olduğu (20-79 yaş arası) ve dünyadaki genel prevalansının %8,3 olduğu ve 2030 yılına kadar bu sayının üzerine yaklaşık olarak 205 milyon kişinin daha ekleneceği ve 592 milyon diyabetli insana ulaşacağı tahmin edilmektedir (IDF, 2014). Özellikle diyabetik popülasyonda 65 yaş üstü hasta oranının artışı dikkat çekicidir (Wild ve ark., 2004).

Tip 2 DM, dünya nüfusu’nun yaklaşık olarak %5’ini etkilemekle birlikte, tüm diyabet hastalarının %80-90’ını oluşturan ciddi bir sağlık sorunudur. Tip 2 DM, insülin’in dokularda etkisinin yetersizliği ve bozulmuş insülin sekresyonu sonucunda hiperglisemi ile karakterize olan dejeneratif bir hastalıktır.

DM’nin, birçok akut ve kronik komplikasyon’a, yüksek morbidite ve mortaliteye sebep olmasının yanı sıra hastaların yaşam süresi ve yaşam kalitesinde de olumsuz etkilere sebep olur (Kurçer ve ark., 2012). Uzun süreli sosyo-ekonomik yükü de gün geçtikçe artan bir rahatsızlıktır

(Altuntaş, 2001). 2013 yılında yayınlanan verilere göre, dünya genelinde diyabete harcanan miktarın 548 milyar dolar olduğu ve 2035 yılında tahminlere göre maliyetin yaklaşık 627 milyar dolara kadar yükselebileceği bildirilmektedir (IDF, 2014). Bu maliyetlerin, artışının altında genel olarak, DM'ye bağlı makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonların olduğu belirtilmektedir (Keskek ve ark., 2014).

Diyabette dolaşımdaki kanın glukoz seviyesinin yüksek olduğu düşünülürse, kalp ve damarlar başta olmak üzere, aslında tüm organ ve sistemlerin ilgilendiren bir patoloji söz konusudur. Böbrek yetmezliğinin, erişkin körlüklerin ve travma dışı alt ekstremité amputasyonlarının altında yatan sebep, yapılan birçok çalışmaya göre DM'dir (Özata ve Yöntem, 2006). Diyabette, aterosklerozun ileri bir formu olan makroanjiopati; koroner, karotis ve periferik arterleri etkileyerek miyokard enfarktüsü riskini artırır, inme ve diyabetik ayak gelişimine neden olur. Hastalığın seyretmesiyle beraber, gözlerde, böbreklerde, sinirlerde, kalpte ve kan damar sisteminde kronik komplikasyonların görülmesine yol açar ve bunun sonucunda diyabetik nöropati, retinopati ve nefropati gibi durumlar oluşmaktadır. (Kahn ve ark., 2005; Goldberg, 2003; Duby ve ark., 2004).

DM'deki morbitide ve mortalitenin temel nedeni, hipertansiyon ve koroner kalp hastalıkları gibi kardiyovasküler bozukluklardır (Fox ve ark., 2004; Stamler ve ark., 1993). Kardiyovasküler olayların görülme riski, diyabetik hastalarda diyabetik olmayanlara göre 3-5 kat daha fazladır (Stamler ve ark., 1993).

DM'de hiperglisemi, insülin direnci, dislipidemi ve hipertansiyonla indüklenen oksidatif stres gibi çeşitli risk faktörleri, endotel fonksiyonlarını bozabilir. Endotel fonksiyon bozukluğu aterosklerotik sürecin ilk basamağı olarak kabul edilir. Özellikle son dönemde yapılan çalışmalar endotel fonksiyon bozukluğunun kardiyovasküler hastalıklarla doğrudan ilişkili olduğunu göstermiştir (Yoshida ve ark., 2006). Bu nedenle diyabette kardiyovasküler komplikasyonların öngörülmesinde ve takibinde endotel fonksiyonlarının değerlendirilmesi büyük bir öneme sahiptir.

Serbest radikal oluşumunun aşırı artması ve buna karşılık olarak vücudumuzun endojen ve ekzojen kaynaklı savunma mekanizmalarından olan antioksidanların, yetersiz kalmasından dolayı diyabete bağlı oksidatif stres meydana gelmektedir. Oksidatif stresin meydana getirdiği hasar da, diyabete bağlı komplikasyonların oluşmasında önemli rol oynamaktadır (Bonnefont-Rousselot ve ark., 2000; Brownlee, 2001).

DM’de reaktif oksijen türlerinin (ROS) rolü uzun yıllardan beri geniş çapta tartışılan bir konu olmuştur (Maritim, 2003; Stehouwer, 1997). Ayrıca artan serbest radikaller; canlılığın devamı için önemli olan, lipit, protein ve nükleik asitlerle etkileşime geçerek, membran bütünlüğünün bozulmasına, proteinlerde yapısal veya fonksiyonel değişikliklere ve genetik mutasyonlara yol açabilmektedir (Altan ve ark., 2006; Halliwell, 1991).

DM ve komplikasyonlarının reaktif oksijen türleri ile olan ilişkisini gösteren çalışmalarda, enzimatik olmayan glikasyon, enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stres, sorbitol yol aktivitesi, hipoksi ve iskemi-reperfüzyon sonucu oluşan doku hasarının serbest radikal üretimini arttırdığı ve antioksidan savunma sistemini değiştirdiği belirtilmektedir (Patel ve ark., 1994; Tesfamariam, 1994; Memisogullari ve ark., 2003).

Pankreas adacık hücrelerinde, süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonlarının ve antioksidan kapasitenin, karaciğer, böbrek, iskelet kası ve adipoz doku gibi diğer dokularla kıyaslandığında en düşük düzeyde olduğu bilinmektedir (Memisogullari ve ark., 2003; Altan ve ark., 2006). Oksidatif strese en duyarlı yapılardan biri olduğu bilinen beta hücrelerinde gözlenen oksidatif hasarın, hipergliseminin toksik etkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Lipinski, 2001; Coskun ve ark., 2005).

DM tedavisinde günümüzde temel yaklaşım, kandaki glukoz düzeyini düzenlemeye yönelik olarak, insülin, insülin sekresyonu veya insüline duyarlılığı arttıran ilaçların kullanılması ile glukozun emilimini veya vücutta oluşumunun azaltılmasını sağlayan ilaçlarla yapılmaktadır (Kayaalp, 2012). Ancak, tüm bu kullanılan ilaçlara rağmen, diyabete bağlı

komplifikasyonların yeterince azaltılamamış olması, hipoglisemik bileşikler ile birlikte antioksidanların kombine kullanımı gibi yeni tedavi yaklaşımlarına yönelik çalışmaları tetiklemektedir (Prabhakar ve ark., 2013; Fu ve ark., 2012).

Birçok çalışma doğal antioksidanların oksidatif hasarı önleyebileceğini göstermektedir. Doğal antioksidanlar arasında bulunan Fransız sahil çamı (FSC) ekstresi, reaktif oksijen ve nitrojen türlerine karşı serbest radikalleri kuvvetli temizleyici etkisinden dolayı dikkate alınmaktadır. Reaktif oksijen ve nitrojen türleri; kanser, aterosklerozis ve diyabet gibi dejeneratif hastalıkların gelişiminde önemli role sahip olduğu bildirilmektedir (Iravani ve ark, 2011). Bu nedenle antioksidan bileşikler bu hasarları önleyerek hastalıkların ilerlemesini ve komplifikasyonlarını önleyebilmektedir.

FSC ekstresi, biyoflavonoidlerin bir karışımı olup, esas olarak oligomerik proantosiyanidinleri (OPS) içerir. OPS'nin güçlü antioksidanlardan biri olduğu bildirilmiştir. FSC ekstresi, zengin OPS içeriği nedeniyle, kronik ve dejeneratif hastalıklara karşı potansiyel olarak farklı koruyucu etkiler gösterme kapasitesine sahiptir. Bu bitkisel ekstrenin vasorelaksan aktivite, Anjiotensin dönüştürücü enzim (ADE) inhibisyonu ve kapillerin permeabilitesini artırarak mikrosirkülasyonu geliştirme yeteneği gibi kardiyovasküler yararları da sahip olduğu rapor edilmiştir (Iravani ve ark, 2011, Maritim ve ark., 2003). FSC kabuğu ekstresinin, yüksek antioksidan kapasitesinin yanı sıra anti-inflamatuvar etkilerinin de olması nedeniyle, patogenezinde inflamasyonun önemli olduğu diyabetin oluşma risklerini de azaltabilir (Bang ve ark., 2014).

Besin ve destek ürünü şeklinde yaygın olarak kullanılmakta olan FSC ekstresi; kardiyovasküler ve kolesterol düşürücü yararları, kapillerin permeabilitesini artırarak mikrosirkülasyonu yükseltme ve reaktif oksijen ve nitrojen türlerine karşı serbest radikalleri temizleme yeteneğine sahip olmasının yanı sıra, Gulati ve ark., askorbil radikallerini yeniden üretme potansiyeli olduğunu ve böylece, oksidatif strese glutasyon ve endojen E vitamini koruduğunu göstermişlerdir (Gulati, 2005). Ayrıca, Ni ve ark,

FSC ekstresi'nin, serbest radikalleri nötralize etme bakımından, C ve E vitaminlerine göre yaklaşık olarak 20-50 kat daha güçlü olduğu bildirilmiştir (Ni ve ark., 2002).

FSC ekstresinin DM' de yararlı olabileceğine yönelik bir takım deneysel çalışmalar bulunmaktadır. Öte yandan, bu çalışmaların tamamına yakını yüksek doz STZ kullanılarak oluşturulan tip 1 diyabet çalışmalarıdır. Çalışmamızda kullanılan yöntemle benzer düşük doz STZ kullanılarak yapılan bir çalışmada karaciğer hasarı üzerine koruyucu etkisi bildirilmiştir (Parveen ve ark., 2010). FSC ekstresinin, mikroangiopatiye bağlı gelişen diyabetik retinopatide etkili olabileceğini bildiren bir çalışma (Steigerwalt ve ark, 2009) bulunmakla beraber, diyabetik nefropatideki olası yararlı etkilerine yönelik çalışma bulunmamaktadır. Proantosiyanidinlerin diyabetik nefropatideki olası yararlı etkilerine yönelik yapılan birkaç deneysel çalışma da ise, yüksek doz STZ'in kullanıldığı Tip 1 DM modelini taklit eden çalışmalar olup, doza bağlı etki araştırılmamıştır (Mansouri ve ark, 2011; Sayed, 2012; Zhang ve ark., 2013).

Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda yüksek yağlı diyet ve düşük doz streptozotosinle deneysel olarak Tip 2 DM oluşturulmuş sıçanlarda, FSC ekstresinin meydana getirdiği olası etkilerini araştırdık.

II. GENEL BİLGİLER

2.1. DİABETES MELLİTUS'UN TANIMI

Diyabetes mellitus (DM) sık görülen kronik seyirli, metabolik bir hastalık olup; karbonhidrat, yağ, protein ve elektrolit metabolizmasında bozukluklara yol açan (Kahn ve ark., 2005), kronik hiperglisemiyle seyreden, pankreastan insülin salgılanmasının eksikliği veya insülin etkisinin yetersizliği sonucu oluşan (Larner, 1985) ve dünyada hızlı bir şekilde yaygınlaşan kronik bir sendrom olarak tanımlanabilir (Alberti, 1998).

İnsülin hormonu, pankreas'ta bulunan langerhands adacıklarındaki β hücreler tarafından salgılanır ve kan şekerini düşürmesinin yanı sıra karbonhidrat, lipid ve aminoasit metabolizmasını da düzenler. DM, açlık

kan şekeri konsantrasyonu'nun 7 mmol/L (126 mg/dL)'den veya herhangi bir andaki plazma glikoz konsantrasyonunun 11.1 mM (200 mg/dL)'dan büyük olduğu durumdur (Goodman&Gilman, 2009) ve insülinin yokluğu veya eksikliği sonucu yada insüline karşı bir direnç sonucu oluşur (James M Ritter ve ark, 2008). DM, kan şekerinin kronik olarak yüksek seyretmesiyle beraber, birçok organda (göz, sinir, böbrek ve damarlar vb.) fonksiyonel ve yapısal bozukluklara sebep olur ve zamanla nöropati, retinopati, nefropati ve vasküler komplikasyonlar gelişir (Baynes ve ark, 1999; Malaisse, 1982).

Diyabetin, birçok akut ve kronik komplikasyon'a, yüksek morbidite ve mortaliteye sebep olmasının yanı sıra hastaların yaşam süresi ve kalitesini de olumsuz etkiler (Kurçer ve ark., 2012).

DM' de insülin eksikliğine bağlı olarak, kan glikoz seviyesinin yüksek seyretmesiyle birlikte; hücrelerinin glikozdan yararlanmasının düşmesi, yağ depolarından yağ mobilizasyonunun belirgin olarak artması ve bundan dolayı ateroskleroza yol açan damar duvarlarında lipidlerin depolanması ile oluşan lipid bozukluğu ve dokulardan protein yıkımının artması gibi üç önemli majör etki meydana gelmektedir (Guyton, 1986).

2.2. DİABETES MELLİTUS'UN TARİHTEKİ YERİ

DM'nin ilk tarifi, milattan önce 1550 yıllarına ait Mısır'da bulunan eski çağ hekimliğini yansıtan Ebers Tıp Papirüsünde yer almaktadır. Bu yazıtta bol su içme ve bol idrara çıkmadan bahsedilmektedir (Hatemi,1996).

Hindularda Vedalar çağında; böcek, sinek ve karıncaların, bazı insanların idrarının yapıldığı yerlerde toplandığı bildirilmektedir. Milattan önce 600'lü yıllarda toplanan 'Charak Samhia' isimli kitapta 'Madhume' isimli bir hastalık tarif edilmekte, günümüzün diyabet tanımına benzer bir tanımlama yapılmaktadır. Bu hastaların genellikle şişman, çok su içip çok idrara çıktıkları, hızla zayıfladıkları ve idrarlarına karıncaların toplandığı yazılmaktadır. Ayrıca hastaların kuruyarak ve ağızları kokarak öldükleri belirtilmektedir. M.Ö. 400'lü yıllarda yaşamış olan Dhanvantari'nin kitabında "tatlı idrar hastalığı" olarak geçtiği bildirilmektedir. Milattan sonra 2. yüzyılda Areateus, ilk "Diyabetes" kelimesini kullanmıştır ve

DM'yi idrar miktarında artma, aşırı susama ve kilo kaybının olduğu bir hastalık olarak betimlemiştir (Hatemi, 1996; Bağrıaçık, 1997).

Diabetes, Yunanca'da 'akıp gitmek' anlamına gelmekte ve aşırı idrar yapımını anlatmaktadır. Mellitus ise Yunanca'da 'bal' ya da 'bal kadar tatlı' anlamına gelen 'mel' sözcüğünden türetilmiştir (Sodeman ve ark.,1992; Yılmaz ,1997).

Milattan Önce 9. yy.'da Zekeriya Er-Razi ve 10.-11. yy'da İbn-i Sina, hastaların idrarının tatlı olduğundan ve susuzluk hissinden söz etmektedirler. 17. yy'da Thomas Willis, DM'li hastaların idrarının tatlı olduğunu belirtmiştir.

18. yy' da William Cullen, "diyabetes" kelimesinin yanına tatlı anlamında kullanılan "mellitus" u eklemiştir. 1815'te Chevreul, idrardaki şekerin, glikoz olduğunu açıklamıştır.

1869'da bir Paul Langerhans, pankreasın; sindirim enzimlerinin salınmasında görevli olan asinar hücreler ve ikinci bir fonksiyona sahip olduğunu düşündüğü adacıklarda kümelenmiş hücreler veya adacıklar olarak iki farklı grup hücre içerdiğini belirtmiştir. 1889'da Minkowski ve Von Mering, pankreası çıkarılmış köpeklerde, insanlarda DM' ye benzer bir sendrom oluştuğu bildirilmektedir.

1900'lerin başında Gurg Zuelzer bir diyabet hastasını, pankreastan elde edilen ekstreler ile tedavi etmeye çalışmıştır. 1916-1920 yılları arasında Fizyolog Nicolas Paulesco, pankreas ekstrelerinin, diyabet modeli oluşturulan köpeklerde, idrarda şeker ve ketonların azaldığını bulmuştur (Goodman&Gilman, 2009).

Frederich G. Banting ve Charles H. Best, 1921 yılında diyabet oluşturulmuş köpeklerde kan şekeri konsantrasyonu'nu azaltabilen pankreatik insülin'i izole etmişlerdir. Elde edilen insülin, 1922 yılında diyabetli bir hastada kullanılmış ve başarılı olunmuştur.

James B. Collip ve J.J.R. Macleod; Frederich G. Banting ve Charles H. Best'le beraber dayanıklı ekstreler elde edip ve Kuzey Amerika'nın birçok bölgesindeki diyabetik hastaları domuz ve sığırdan elde edilen insülin

James B. Collip ve J.J.R. Macleod 1923 yılında Tıp ve Fizyoloji dalında Nobel Ödülü almışlardır (Goodman&Gilman, 2009).

1926 yılında Prof. Dr. Erich Frank diyabet tedavisinde oral ilaç kullanımı için ilk çalışmayı yapmıştır. Sanger and coworkers, 1955 yılında insülinin iki amino asit zinciri yapısında olduğunu bulmuş ve bu çalışma ile 1955 yılında Nobel Tıp ödülü almıştır (Brown ve ark.,1955; Sanger, 1959).

1973 yılında saflaştırılmış ve antikor oluşturmeyan insülin tipleri geliştirilmiştir. Günümüzde rekombinant DNA teknolojisi insan insülini üretilmektedir (Gürler, 2009).

İnsülin geni, 1980 yılında Prof.G. Bell tarafından saptanmıştır. 1992'den beri 14 Kasım, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF) tarafından Diyabet Günü olarak kabul edilmiştir.

2.3.DİABETES MELLİTUS'UN SINIFLANDIRILMASI

DM; genetik, çevresel faktörler, ve yaşam tarzı değişikliklerinin etkileşimi ile ortaya çıkan ve çeşitli tipleri bulunan bir hastalıktır. Bütün tipleri hiperglisemiyle karakterizedir; ancak hipergliseminin ortaya çıkma nedenleri birbirinden farklılık göstermekte ve bu sebeple farklı tiplere ayrılmaktadır (Harrison, 2004). DM, birçok kaynakta genel olarak insüline bağımlı (IDDM) veya tip 1 ve insüline bağımsız (NIDDM) veya tip 2 diyabet olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Guyton, 2006). Ancak, DM'nin nedeni ve patogenezi hakkında bilgilerin daha da artmasına bağlı olarak, sadece tedavi yaklaşımına göre diyabeti sınıflandırma yerine, etiyolojiye dayanan sınıflandırma çalışmalarının hız kazanmasıyla, bazı kaynaklarda (Andreoli ve ark., 2008) ve 2010 yılında Amerikan Diyabet Birliği (ADA) tarafından 4 farklı kategoride sınıflandırılmıştır.

ADA'ya göre sınıflandırılma aşağıdaki şekildedir:

2.3.1. Tip 1 Diabetes Mellitus

Bu diyabet tipindeki hastaların (diyabetik hastaların %5-10'u) büyük çoğunluğun da sebep, insülin salınımını sağlayan pankreas langerhans adacıklarında bulunan beta hücrelerin otoimmünolojik olarak tahribe uğramasıdır. Tip 1 DM hastalarının az bir kısmında, idiyopatik sebep

yatmaktadır (Andreoli ve ark., 2008). Bu diyabete ‘insülin bağımlı diyabet’ ya da çocukluk çağında sık görüldüğü için ‘juvenil diabetes mellitus’ da denilmektedir (Guyton, 2006).

Tip 1 DM; Tip 1A DM ve Tip 1B DM olarak kendi içinde de ikiye ayrılabilir. Tip 1A DM, genellikle insülin yetersizliğine sebep olan otoimmün beta hücre yıkımıyla meydana gelir. Tip 1B DM’ de ise insülin yetersizliği bulunmakta ve bu hastalarda ketoza yatkınlık söz konusu olmaktadır. Ayrıca, bu bireylerde beta hücresinin yıkıma uğrama sürecinin immünolojik göstergeleri bulunmamakta ve tam olarak mekanizmada bilinmemektedir. Tip 1 DM’ li hastaların çok azı Tip 1B DM alt sınıfına girmekte ve Afrika, Amerika ve Asya kökenli insanlarda yaygınlık göstermektedir (Harrison, 2004).

2.3.2. Tip 2 Diabetes Mellitus:

Diyabetin bu grubu, tüm diyabetik hastaların %90’ını oluşturmaktadır. Tip 2 DM’ nin başlaması, genelde 30 yaşından sonra meydana gelmekte, 50-60 yaşları arasında sık görülmektedir ve hastalık yavaş yavaş gelişir. Bu yüzden bu sendrom, erişkin diyabeti olarak ta tanımlanmaktadır. Fakat son yıllarda 20 yaşından küçük genç bireylerde (9-19 yaş)’de, obezitenin artması ve fiziksel aktivite de azalma gibi risk faktörleriyle ilişkili olarak, tanısı konmuş diyabet vakalarının %25-33’ünü, Tip 2 DM oluşturmaktadır (Guyton, 2006; Andreoli ve ark.,2008). Tip 2 DM, insülin sekresyonunda bozulma ile ilişkili olarak kombine bir şekilde insülinin etkisine karşı doku tarafından direnç gösterilmesiyle karakterize edilir (Trevor ve Katzung, 2015). İnsülin etkisi veya sekresyonundaki genetik ve metabolik defektler kan glikoz seviyesinin yükselmesine yol açarak Tip 2 diyabeti meydana getirmektedir (Harrison, 2004).

2.3.3. Diğer Spesifik Tipler: Bu diyabet tipleri nadir olarak seyreder (TDÖKP, 2011) ve tüm diyabetli hastaların yaklaşık %1’lik kısmında görülür. Bazı hastalıklar, bu diyabet tipinin oluşmasına yol açmaktadır (Triplitt ve ark., 2015).

2.3.3.1. Beta hücre fonksiyonlarında meydana gelen bozukluklar: Bu tip diyabetli hastalarda hiperglisemi genellikle 25 yaş altı genç bireylerde

görülmektedir. Bu yüzden bu diyabet tipine, gencin erişkin tipte başlayan diyabeti anlamına gelen “MODY” de denmektedir

- Kromozom 20q, HNF-4 a (MODY1,)
- Kromozom 7p,glukokinaz (MODY2)
- Kromozom 12q,HNF-1 a (MODY3)
- Kromozom 13q, insülin promoter faktör-1 (MODY4)
- Kromozom17q, HNF-1 b (MODY5)
- Kromozom 2q, Nörolojik diferansiyasyon 1 (MODY6)
- Kromozom 9, Karboksil ester lipaz (MODY7)
- Geçici Neonatal Diyabet
- Kalıcı Neonatal Diyabet
- Mitekondriyal DNA
- Diğerleri

2.3.3.2 İnsülin etkinliğinde genetik bozukluklar

- Tip A insülin direnci
- Leprekaunizm
- Rabson-Mendenhall Sendromu
- Lipoetrofik diyabet
- Diğerleri

2.3.3.3 Ekzokrin Pankreas Hastalıkları

- Pankreatitis
- Pankreatektomi/Trauma
- Neoplazia
- Sistik fibrozis
- Hemokromatozis
- Fibrocalculouspankreatopati
- Diğerleri

2.3.3.4 Endokrinopatiler

- Akromegali

- Cushing Sendromu
- Glukagonoma
- Feokromositoma
- Hipertiroidizm
- Somatostatinoma
- Aldosteronoma
- Diğerleri

2.3.3.5 İlaç veya kimyasal nedenlere bağlı durumlar: Bu maddelerden bazıları, direkt olarak beta hücre fonksiyonunu etkilerken, bazıları insülinin etkisini bozabilirler.

- Vacor
- Pentamidin
- Nikotinik asit
- Glukokortikoidler
- Tiroit Hormonu
- Diazoksit
- Beta-adrenerjikagonistleri
- Tiazidler
- Dilantin (Fenitoin)
- Alfa-interferon
- Diğerleri

2.3.3.6.Enfeksiyonlar

- Konjenital Rubella
- Sitomegalovirüs
- Diğerleri

2.3.3.7.İmmüneracılıklı diyabetin yaygın olmayan şekilleri

- “Stiff-man” sendromu
- Anti-insülin reseptör antibody
- Diğerleri

2.3.3.8.Diyabetle ilişkili olan diğer genetik sendromlar

- Down Sendromu
- Klinefelter Sendromu
- Turner sendromu
- Wolfram sendromu
- Friedreich ataksi
- Huntington hastalığı
- Laurence-Moon-Bieldelsendromu
- Miyotonikdistrofi
- Porfira
- Prader-Willi sendromu
- Diğerleri

2.3.4. Gestasyonel Diabetes Mellitus: Gebelik sırasında ilk kez kan şekeri seviyesinde görülen anormallik olarak tanımlanabilir (Harrison, 2004). Bu diyabet türü, tüm gebelerin %8-9'unda teşhis edilmiştir (Triplitt ve ark, 2015). Gebelik diyabeti, Tip 2 DM' ye benzer olup bu tip DM' de insülin direnciyle ilgilidir. Gebelerde insulin direnci, gebelik hormonları nedeniyle ortaya çıkmaktadır.

Gebelik sırasında plasenta ve plasental hormonlar, doğuma üç ay kala, insüline karşı, belirgin bir şekilde bir direnç yaratmaktadır (Trevor ve Katzung, 2015). Gebeliğin ilerleyen dönemlerinde metabolizmada meydana gelen değişikliklerle ilişkili olarak oluşan insülin direnci, insüline olan ihtiyacı artırır ve hiperglisemi veya bozulmuş glukoz toleransına sebep olabilir (Harrison, 2004).

Gebelik sırasında ortaya çıkan diyabetin, %90'ını gestasyonel diyabet oluşturmaktadır. Genellikle kan glikoz seviyesi, gebelikten sonra normal düzeye dönmektedir (Andreoli ve ark.,2008). Ancak, hayatın ilerleyen dönemlerinde diyabet gelişme riski %30-60 düzeyinde yükseklik göstermektedir (Harrison, 2004). Bu nedenle bu hastalar ilerleyen yaşlarda DM açısından takip edilmelidirler.

2.4.DÜNYA'DA VE TÜRKİYE'DE DİABETES MELLİTUS'UN EPİDEMİYOLOJİSİ

Dünya'da DM hasta sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Bu sayının yanlış beslenme alışkanlıklarına ve artan obezite (Wild, 2004) oranına bağlı olarak gün geçtikçe yükseleceği tahmin edilmektedir. Gelecekte daha da önemli bir sağlık problemi olacak olan DM, üzerinde en çok araştırma yapılan konulardan biridir (Aslan ve ark., 2010).

DM prevalansı, tüm dünyada ve ırka göre farklılık göstermektedir. Diyabet görülme sıklığı Papua Yeni Gine'de yaşamını sürdüren kabilelerde veya Çin'de %1 iken, Avustralya yerlilerinde ve Arizona'daki Kızılderililerde %20-45'e kadar artabilmektedir.

Amerika Birleşik Devletlerinde (ABD) ve İngiltere'de tüm DM'li hastaların yaklaşık %5-10'unu Tip 1 DM oluşturmaktadır. Avrupa'da durum değişmekle beraber, Tip 1 DM Kuzey Avrupa'da insidansı en yüksektir (43/100.000) ve Güney Avrupa'da insidansı en düşük olarak (8/100.000) görülmektedir. DM'li hastaların büyük çoğunluğunu (yaklaşık olarak % 90) Tip 2 DM oluşturmaktadır. Bu tipin insidansı yaş ile artmaktadır. Bu artışın sebebi genetik faktörlerin yanı sıra, uzayan ömür, obezite, şehirleşmenin yaygınlaşmasıyla beraber ortaya çıkan sedanter yaşam biçimi ve düşük doğum ağırlığı gibi diğer faktörlerde bu artıştan sorumlu olabilmektedir (Goodman & Gilman, 2009).

1976 ve 1994 yılları arasında Amerika'da yaşayan erişkinlerde DM prevalansı %8,9'dan %12,3'e yükselmiştir. Yine aynı dönemde bozulmuş açlık glikozu prevalansı %6,5'tan %9,7'ye yükselmiştir (Harrison, 2004). Yakın gelecekte DM'li bireylerin sayısı artmaya devam edeceği öngörülmektedir.

1997 yılında yapılan bir çalışmada Dünya'da 125 milyon'dan fazla DM'li hastanın olduğu ve bu sayının 2010 yılında 220 milyona ulaşacağı belirtilmiştir (Amos ve ark,1997). 1998 de ABD'de yaklaşık 16 milyon DM'li hasta bulunmaktadır ve bunların %90'ı tip 2 DM'li hastalardır (Harrison, 2004).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre, 2007 yılında yaklaşık 220 milyon DM'li hasta olduğu ve 2030 yılına kadar bu sayının iki kata kadar artacağı tahmin edilmektedir. Hastalık günden güne artmakta ve bu artış ekonomik açıdan gelişmekte olan ülkelerde daha da fazla olmaktadır (TDÖKP, 2011).

Avrupa'da ölüme neden olan sebeplerden bir tanesi de DM dir. DM'nin, artan makro ve mikrovasküler komplikasyonlarıyla beraber prevelansı ve DM'ye harcanan maliyette günden güne artmaktadır. 2013 yılında 56 farklı ülkede yapılan bir araştırma da, Avrupa'da DM'li insan sayısı yaklaşık 56 milyondur ve dünya prevelansının %8,5'ini kapsamaktadır. Yine aynı çalışma da DM prevelansı Moldova'da %2,4 ve Türkiye'de %14,9 olduğu ve ayrıca 2035 yılına kadar bu sayının 10 milyon daha artacağı öngörülmektedir.

Avrupa'daki düşük gelirli ülkelerde 2013 yılında tanısı konulmamış DM'li sayısı %29,3 iken, Danimarka Finlandiya ve İngiltere gibi yüksek gelirli ülkelerde %36,6 olduğu görülmektedir (Tamayo, 2013).

Uluslararası Diyabet Federasyonu'nun yayınladığı Diabetes Atlas'ın ilk baskısında, 2000 yılında Dünya'da 151 milyon DM'li insan varken bunun küresel olarak prevelansı %4,6 olarak belirtilmişken, 2010 yılında yapılan revizyonda, 285 milyon insanda DM bulunurken bunun genel prevelansı'nın %6,6 olduğu bildirilmiştir (Colagiuri, 2010).

2013 yılındaki son düzenlemede (6. Baskı) 387 milyon DM hastası (20-79 yaş arası) varken dünyadaki prevelansının da %8,3 olduğu ve 2030 yılına kadar bu sayının üzerine yaklaşık olarak 205 milyon kişinin daha ekleneceği ve 592 milyon DM'li insana ulaşacağı tahmin edilmektedir. Son Diabetes Atlas'ında, Dünya'nın bazı bölgelerindeki DM'li kişi sayısı ve prevelansı aşağıda gösterilmiştir (Tablo 1, IDF, 2014).

Tablo 1: IDF bölgeleri ve bu bölgelerdeki diyabetli kişi sayısı ve prevalansı

IDF Bölgeleri	Diyabetik İnsan Sayısı (Milyon)	Prevelansı (%)	Tanı Konulmayan (%)
Kuzey Amerika ve Karaipler	39	11,4	27,1
Avrupa	52	7,9	33,1
Güney ve Orta Amerika	25	8,1	27,4
Afrika	22	5,1	62,5
Güney-Doğu Asya	75	8,3	52,8
Batı Pasifik	138	8,5	138
Orta Doğu ve Kuzey Afrika	37	9,7	48,6
Dünya Geneli	387	8,3	46,3

2013 yılı itibarıyla belirlenmiş ve 2035 yılına kadar tahmin edilen toplam nüfus, erişkin nüfus Dünya’da bölgesel olarak DM’li insan sayısı aşağıda belirtilmektedir (Tablo 2, IDF, 2014).

Tablo 2: IDF bölgeleri ve bu bölgelerdeki 2014 yılı diyabetli kişi sayısı ve 2035 yılına kadar beklenen diyabetli kişi sayısı

Bölgeler	Toplam Nüfus (Milyon)		Erişkin Nüfus (Milyon)		Diyabetik İnsan Sayısı (Milyon)	
	2014	2035	2014	2035	2014	2035
Kuzey Amerika ve Karaippler	501	586	339,2	404,5	38,8	50,4
Avrupa	910	928	660,6	668,7	52	68,9
Güney ve Orta Amerika	481	568	305,6	394,2	24,8	38,5
Afrika	924	1,511	425,5	775,5	22	41,5
Güney-Doğu Asya	1.478	1.777	900,3	1.216,9	75	123
Batı Pasifik	2.294	2.476	1.630,8	1.818,2	137,8	201,8
Orta Doğu ve Kuzey Afrika	656	896	378,3	583,7	37	67,9

Türkiye’de DM prevelansı ile ilgili ilk çalışmalar 1960’lı yılların başında Türk Diyabet Cemiyeti tarafından başlamıştır. O dönemde 18 yaşın üzerindeki bireylerde DM prevelansının yaklaşık %1,5-2 olduğu gösterilmiştir.

1997-1998 yıllarında Türk Diyabet Epidemiyoloji Çalışma Grubu (TURDEP-1), ülke genelinde bir araştırma yaparak, Tip 2 DM’nin o dönemde prevelansı’ nın %7,2 ve bozulmuş glukoz toleransı (BGT) prevelansı’ nın ise %6,7 olduğunu bildirmiştir.

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) tarafından 2007 yılında yayınlanan nüfus rakamlarına göre, Türkiye’de 2,85 milyonun üzerinde Tip

2 DM'li kişi olduğu ve 2,6 milyon civarında da BGT'li bireyin yaşadığı hesaplanmıştır (TDÖKP, 2011). 33. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Kongresi'nde sonuçları açıklanan 2010 yılında TURDEP' in yaptığı ikinci araştırmaya göre, Türkiye'deki diyabet prevelansı'nın yaklaşık 12 yılda %90 artarak, %13'e ulaştığı bildirilmiştir (Satman ve ark., 2011).

2014 yılı itibariyle Türkiye'de ise DM prevelansının, 2030 yılına dair hedeflerinin de çok üzerinde, Dünya nüfus dağılımına göre %14,8 olduğu ve ülke genelinde %14,71 olarak bildirilmektedir (Tablo 3, IDF, 2014).

Tablo 3: Türkiye'deki erişkin nüfus, diyabetli birey sayısı, Türkiye ve Dünya prevelansı ve tanı konulmayan diyabetli birey sayısı

ÜLKE	TÜRKİYE
Erişkin Populasyon (20-79 yaş) (1000 Kişide)	49,125
Diyabetli Sayısı (20-79yaş) (1000 Kişide)	7.227,4
Türkiye Prevelansı (%)	14,7
Dünyadaki Genel Prevelansı (%)	14,8
Tanı Konulmayan (%) (20-79 yaş) (1000 Kişide)	2.191,4

2.5. DİABETES MELLİTUS'UN EKONOMİK BOYUTU

Diyabetik hastaların yaşam süresi ve kalitesinde olumsuz etkiler olmasının yanı sıra tanı ve komplikasyonların tedavisinin, hastalara, ailelerine ve devletlere artan ekonomik yükü de çok dikkat çekmektedir (TDÖKP, 2011; Huber ve ark., 2014).

Avrupa'da ve tüm dünyada obezite, fiziksel inaktivite, sigara, çevre kirliliğı, psiko-sosyal faktörler ve sosyo-ekonomik yetersizlik gibi risk

faktörlerinin artmasıyla DM'li kişi sayısı artmakta ve bundan dolayı DM'ye harcanan maliyette günden güne yükselmektedir (Tamayo, 2013).

DM, bireylere ve ülkelere yüksek maliyet getirmektedir. Ayrıca yüksek morbidite ve mortaliteye neden olan komplikasyonları olduğundan diyabet tedavisine harcanan yük giderek daha da artmaktadır. Bu maliyetlerin ve mortalitenin artışının altında makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonlar yatmaktadır (Keskek ve ark., 2014).

ADA'nın 2007'de yayınladığı rapora göre, ABD' de diyabete harcanan maliyetin 174 milyar dolar olduğu belirtilmektedir (Huber ve ark., 2014).

Diabetes Atlas'daki 2013 yılı verilerine göre, Dünya genelinde DM'ye harcanan miktarın 548 milyar dolar olduğu ve 2014 güncellemesiyle 612 milyar dolara ulaştığı ve DM'li kişi başına düşen maliyetin 1,583.31 Dolar olduğu belirtilmekte ve 2035 yılında bu rakamın yaklaşık olarak 627 milyar dolara kadar çıkabileceği öngörülmektedir. Ayrıca dünya genelinde DM'ye harcanan miktar tüm sağlık harcamalarının 1/9'unu oluşturduğu tablo 4'te görülmektedir (IDF, 2014).

Tablo 4: IDF bölgeleri ve bu bölgelerde 2014 yılında diyabet ve tedavisine harcanan maliyet ve 2035 yılına kadar tahmin edilen maliyet

IDF BÖLGELERİ	Diyabete harcanan Maliyet (Milyar Dolar)	
	2014 Yılı	2035 Yılı
Kuzey Amerika ve Karaippler	310	295,7
Avrupa	144,3	158,6
Güney ve Orta Amerika	28,7	34,8
Afrika	4,5	6,4
Güney-Doğu Asya	6,9	8,7
Batı Pasifik	101	98,4
Orta Doğu ve Kuzey Afrika	16,8	24,7
Dünya Geneli	548	627

Uluslararası Diyabet Federasyonunun yayınladığı Diabetes Atlas'daki 2013 yılı verilerine göre, erişkin birey sayısının (20-79 yaş arası) 49,125 /1000 olduğu ve erişkin bireylerdeki diyabetli birey sayısının ise 7,2/1000 olduğu Ülkemizde, DM'ye harcanan maliyetin, DM'li birey başına 895 dolar olduğu belirtilmektedir (IDF, 2014).

2014 yılında Türkiye'de Tip 2 DM'li 203 hastada yapılan retrospektif bir araştırma da, diyabetik ayak ülserli 91 kişi ile herhangi bir kronik komplikasyonu olmayan 112 kişi karşılaştırılmaktadır. Çalışma sonunda elde edilen verilerde, ayak ülserli DM'li hastalara harcanan maliyetinin ortalama $976,1 \pm 253,6$ Dolar olduğu ve herhangi bir kronik komplikasyonu olmayan DM'li hastalarda ise harcanan ortalama maliyetin ise $430,3 \pm 144,2$ Dolar olduğu belirtilmiştir (Keskek ve ark., 2014).

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (THSK)'nun 2014 yılında yayınladığı Türkiye Diyabet Programı 2015-2020 adlı bildiride, 2008 yılında toplam sağlık harcamasının 27.650,27 milyon TL ve bunun DM harcamalarının toplam içindeki payının %16 olduğu ve 2012 yılında ise toplam sağlığa ayrılan maliyetin 44.150,59 milyon TL'ye ve bunun DM'ye ayrılan harcamaların toplam içindeki payının %22,6'ya kadar yükseldiği belirtilmekte ve DM'li kişi sayısının artmasıyla birlikte, bu maliyetin daha da artacağı bildirilmektedir (Tablo 5; THSK, 2014).

Tablo 5: Türkiye'deki yıllara göre sağlık harcamaları ve diyabete ve tedavi harcamalarına ayrılan pay

TÜRKİYE	2008	2009	2010	2011	2012
	Yılı	Yılı	Yılı	Yılı	Yılı
Toplam Sağlık Harcaması (Milyon TL)	27.650,27	31.770,4	34.357,37	38.265,92	44.150,59
Diyabet Harcamalarına Ayrılan Pay (%)	16	21,9	23,4	24	22,6

2.6. DİABETES MELLİTUS'UN TANI KRİTERLERİ

DM'nin yüksek morbidite ve mortaliteye yol açmasından dolayı, diyabetin erken tanısının konması ve patogenezelelerinin açığa çıkarılması, hastalıktan korunma ve tedavide büyük bir önem taşımaktadır (İrer ve ark., 2004).

DM'nin tanı kriterleri, National Diabetes Data Group (NDDG) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün tavsiyeleriyle revize edilmiştir. 2003 yılında yayınlanan raporda düzenlenen bu kriterler 3 kısımda incelenmektedir. Bu kriterlerin her biri, diyabet tanısı koyabilmek için birbirini izleyen günlerde tekrar edilerek doğrulanmalıdır (Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care.2003;26 (1)).

Diyabetin Tanı Kriterleri;

1. Yemek sonrasında günün herhangi bir zamanında alınan kanda, plazma glukoz konsantrasyonu 200 mg/dl (11,1 mmol/L) veya üzerinde ise,
2. Son yemekten en az 8 saat sonrasında alınan kanda, açlık kan glikoz konsantrasyonu 126 mg/dl (7,0 mmol/L) veya üzerinde ise,
3. OGTT (Oral Glukoz Tolerans Testi) yükleme sonrası 2. saat plazma glukoz konsantrasyonu 200 mg/dL (11,1 mmol/L) ve üzeri ise, DM tanısı koyulabilir. Ancak OGTT, rutin klinik kullanım için tavsiye edilmemektedir (Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care.2003;26(1)).

2014 yılında Amerikan Diyabet Birliği ve Avrupa Diyabet Çalışma Topluluğu tarafından yayınlanan bildiride, DM ve glikoz metabolizması bozuklukları için yeni tanı kriterleri belirlenmiştir; Açlık kan glikoz konsantrasyonu; 100 mg/dL (5,6 mmol/L) den düşükse normal, 100-125 mg/dL (5,6 – 6,9 mmol/L) arasında ise bozulmuş açlık glikozu (BAK), 126 mg/dl (7,0 mmol/L) ve üzeri ise DM' den söz edilir (ADA, 2014).

Diğer bir tanı kriteri; 8 saat açlık sonrası 75 gr oral glikoz verildikten 2 saat sonrasında kan glikoz konsantrasyonu; 140 mg/dL (7,8 mmol/L)'den

küçükse normal, 140-199 mg/dL (7,8–11,0 mmol/L) ise bozulmuş glikoz toleransı ve 200 mg/dL (11,1 mmol/L) ve üzeri ise DM olarak tanımlanmaktadır (ADA, 2014).

Plazma glikozile alfa hemoglobin (HbA1c) değeri, %6,5 veya daha büyükse de DM tanısı koymaya katkı sağlar (ADA, 2014). Ayrıca HbA1c, 48 mmol/L (%6,5)'dan küçükse bozulmuş glikoz toleransı veya 39–47 mmol/L (%5,7–%6,4) ise yüksek risk HbA1c olarak belirtilmiştir (Giberg ve ark., 2015).

WHO ve ADA'ya göre DM ve glikoz metabolizmasının diğer bozukluklarında tanı kriterleri aşağıda gösterilmektedir (Tablo 6, Giberg ve ark., 2015).

Tablo 6: WHO ve ADA'ya göre Diabetes Mellitus ve glukoz metabolizmasının diğer bozukluklarında kullanılan tanı kriterleri

TANI	WHO	ADA
Dişabet	HbA1c $\geq$ 48 mmol/L ($\geq$ %6,5)	
Dişabet	2h- PG $\geq$ 200 mg/dL (11,1 mmol/L)	
Dişabet	AKŞ $\geq$ 126 mg/dL (7,0 mmol/L)	
Dişabet	Rastgele Plazma Glikoz $\geq$ 200 mg/dL (11,1 mmol/L)	
Bozulmuş Glikoz Toleransı	HbA1c < 48 mmol/L (%6,5)	-
Bozulmuş Glikoz Toleransı	2h- PG=140-198 mg/dL (7,8-11,0 mmol/L)	
Bozulmuş Glikoz Toleransı	AKŞ < 126 mg/dl (7,0mmol/L)	
Bozulmuş Açlık Glikoz	AKŞ=110-125 mg/dL (6,1–6,9 mmol/L)	AKŞ=100-125 mg/dL (5,6–6,9 mmol/L)
Bozulmuş Açlık Glikoz	2h- PG < 140 mg/dL (7,8 mmol/L)	-
Bozulmuş Açlık Glikoz	HbA1c < 48 mmol/L (%6,5)	
Yüksek Risk HbA1c		HbA1c, 39–47 mmol/L (%5,7–64)

DM'nin klasik semptomları poliüri, polidipsi, polifaji veya iştahsızlık, halsizlik, çabuk yorulma, ağız kuruluğu ve noktüri olmakla beraber daha az sıklıkla, bulanık görme, açıklanamayan kilo kaybı, inatçı enfeksiyonlar, tekrarlayan mantar enfeksiyonları, kaşıntı görülmektedir (Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği, 2013)

Aseptomatik Hastalarda Yapılan Diyabet Testleri

Aseptomatik insanlarda prediyabeti ve Tip 2 DM'yi belirleme testleri, özellikle obez (Vücut Kitle İndeksi $\geq 25 \text{ kg/m}^2$) ya da ailesel risk faktörlerine sahip erişkinlerde dikkate alınmalıdır. Risk faktörleri olmayan kişilerde teste 45 yaşında başlanmalı ve eğer test normalse en az 3 yılda bir tekrarlanmalıdır. Prediyabet ve DM'yi belirlemede, HbA1c, açlık kan şekeri (AKŞ) ya da oral glukoz tolerans testi (OGTT) yapılır (ADA, 2014).

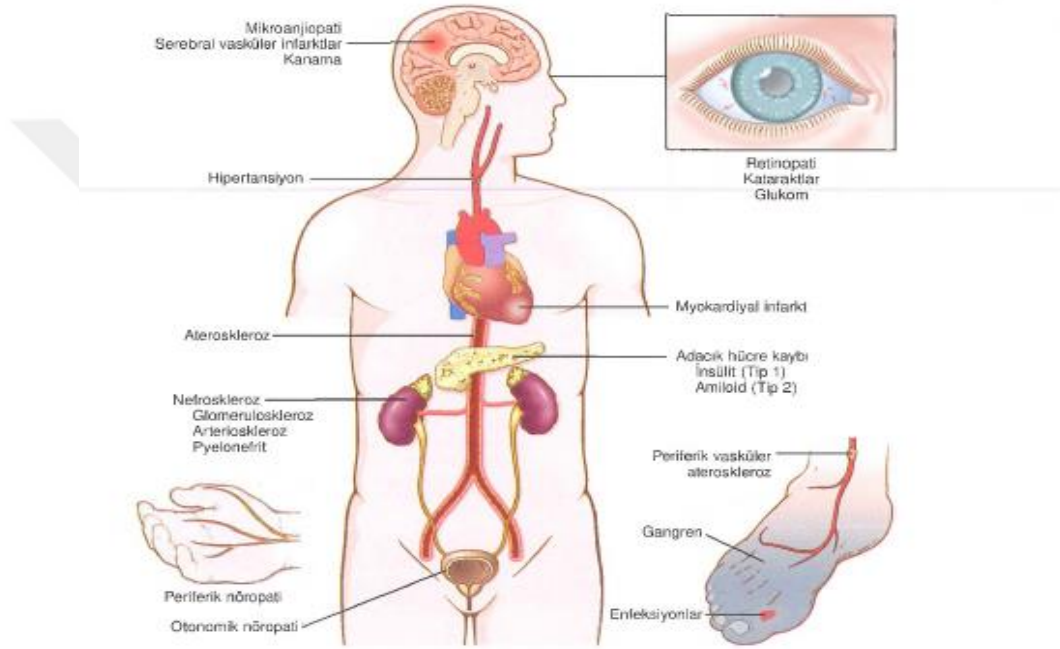
DM tanısı için HbA1c kriterinin bulunuşundan bugüne kadar, HbA1c prediyabet ya da DM için risk artışının göstergesi olarak kategorize edilmektedir (Kim ve ark., 2011). Kandaki glikozun eritrositlerle beraber etkileşimi sonucu ortaya çıkan bir protein olan HbA1c'nin değeri, kandaki glikoz miktarının yükselmesi ile artar. Ek olarak, Diyabetin tanı yöntemleri arasında gün geçtikçe daha çok kabul edilmekte ve testin güvenilirliğinin sürdürülebilmesi ve standardizasyonunun sağlanması için gerekli çalışmalar devam etmektedir (Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği, 2013).

Epidemiyolojik çalışmalarda, pre-diyabeti tanımlama da, HbA1c ile glikoz temelli testlerin arasında önemli bir uyumsuzluk olduğunu göstermektedir (Cowie ve ark., 2010; Mann ve ark., 2010). Ayrıca açlık glikoz kriterleriyle HbA1c kriterinin tanısal derecesi etnik gruplar ve popülasyonlara göre değişiklik gösterebilmektedir (Kim ve ark., 2011).

Bu testlerin dışında, C-peptit düzeyi (pankreatadaki beta hücre rezervinin göstergesi) ve adacık otoantikörleri gibi testlere de bakılmalıdır (Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği, 2013).

2.7. DİYABET VE KOMPLİKASYONLAR

Dünya genelinde yaygın olarak bulunan ve önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelen DM, beraberinde önemli bazı komplikasyonların oluşumuna da yol açmaktadır. Ayrıca; kalp, damarlar, göz, böbrek, periferik ve otonomik sinir sistemi gibi organ ve dokular üzerinde uzun süreli ciddi komplikasyonların oluşmasına neden olmaktadır (Resim 1; Kumar ve ark., 2013). Ayrıca bireylerde ciddi görme kaybı, son aşama böbrek hastalığı ve çeşitli amputasyonlara yol açmaktadır (David, 2015; Kumar ve ark., 2013).



Resim 1: Diyabetes Mellitus' un uzun dönem komplikasyonları (Kumar ve ark., 2013)

Meydana gelen komplikasyonların yaygın görülmesinin yanı sıra bireyler ve toplumlar için ciddi kayıplara yol açmaktadır. Ayrıca DM, hastaların yaşam kalitesini de azaltmaktadır. Avrupa'da yaklaşık olarak 7000 hastada yapılan bir çalışma sonucunda DM' li hastaların %72'sinde en az bir komplikasyon varken, %24'ünde ise mikro ve makrovasküler komplikasyonlardan her ikisi de bulunmaktadır (Marshall ve Flyvbjerg., 2006).

Diyabette kandaki şeker düzeyinin yüksek seyretmesiyle beraber, meydana gelen komplikasyonların gelişiminde birçok etmen risk faktörü

olarak dikkat çekmektedir (Tablo 7). DM' nin başlıca komplikasyonları arasında, kardiyovasküler komplikasyonlar, nöropati, retinopati, nefropati ve vasküler patolojiler bulunmaktadır (Khan ve ark., 2005).

Tablo 7: Diabetes Mellitusa bağlı meydana gelen komplikasyonların altında yatan risk faktörleri ve markırlar

FAKTÖR	MİKROVASKÜLER KOMPLİKASYONLAR	MAKROVASKÜLER KOMPLİKASYONLAR
Genetik	++	++
Etnik Köken	+	+
Diyabet Süresi	++	+
Glisemik Kontrol	++	+
Kan Basıncı	++	++
Kandaki Lipidler	+	++
Sigara	+	++
Vücut Kitle İndeksi	+	+
Diğer	+	+
Mikrovasküler Komplikasyonlar		
Kardiyovasküler Komplikasyonlar	+	+
Sosyal Yoksunluk	+	+
İnflamasyon	+	+
Markırları		
Endotel Disfonksiyon Markırları	+	+

+ Ilımlı Risk Faktörü ya da Markır, ++ Kuvvetli Risk Faktörü ya da Markır

DM'li hastalarda, mikrovasküler komplikasyon ve vasküler hasar oluşmasında özellikle kan şekeri düzeyinin yüksek seyretmesinin daha çok etkili olduğu belirtilmektedir (DCCTRG, 1993; UKDPS, 1995). Buna ilave olarak hipertansiyon, sigara, diyabetik süreç, hiperkolesterolemi, dislipidemi, obezite ve genetik özellikler de neden olabilmektedir. Makrovasküler risk oluşumu ise hiperglisemiden daha çok yaş, sigara,

hipertansiyon, hiperkolesterolemi, dislipidemi, obezite gibi risk faktörleriyle daha sıkı ilişki içerisinde. Bu risk faktörleri inflamatuvar bir süreç ve endotel disfonksiyonu gibi durumların oluşmasına temel oluşturmaktadır (Caballero, 2003). DM, ayrıca önemli mortalite ve morbidite'ye sebep olan akut ve kronik komplikasyonlarla yakın ilişkilidir (Wan ve ark., 2015). Diyabetik komplikasyonlar, akut (metabolik) veya kronik (dejeneratif) olarak incelenebilmektedir.

2.7.1. Akut Komplikasyonlar

2.7.1.1. Diyabetik Ketoasidoz: Diyabetik ketoasidoz (DKA), insülin miktarındaki eksiklik veya yokluğu ile meydana gelen ve yağ asitlerinin salınımıyla ve ardından ketoasitlerin toksik seviyede oluşumuyla sonuçlanan akut bir diyabetik rahatsızlıktır. Tip 2 DM'li hastalarda normalde az miktarda insülin salınımı olmasından dolayı keton üretimi olmamasına rağmen (Bahçecik, 2005), enfeksiyon veya kortikosteroidler gibi direnç geliştiren ilaç kullanımı gibi nedenlerden dolayı da diyabetik ketoasidoz oluşabilir (Katzung, 2015).

DKA, potansiyel olarak özellikle Tip 1 DM' de yaşamı tehdit eden ve insidansı 10.000 hastada 3,2'den-4,6'ya kadar artabilen akut komplikasyonlardan bir tanesidir (Nemecik ve ark., 2014). Ayrıca artan morbidite ve mortalitenin de kaynaklarından birisi olan DKA, insülinin yetersizliği sonucunda beraberinde insülin karşıtı hormonların artan etkilerine bağlı olarak geliştiği belirtilmektedir ve Tip 1 DM' li hastaların %15-67'sinde ilk tanı aşamasında bu durumun bulunduğu bildirilmektedir (Sağlam, 2005). Ayrıca mortalite oranı %6-10'dur. Bu hastalığın belirtileri ve bulguları; ağız kuruluğu, iştahsızlık, kilo kaybı, halsizlik, bulantı, kusma, karın ağrısı, polidipsi, poliüri, hipotansiyon, dehidratasyon, taşikardi, hiperglisemi, hipotermi, enfeksiyon, infarktüs, ödem, ketonemi, lökositoz, düşük PH, şuur kaybı ve koma gibi durumlardır (Bahçecik, 2005; Harrison, 2004).

2.7.1.2. Non-Ketotik Hiperosmolar Koma:

Keto olmaksızın, kan şekerinin yüksek seyretmesi, plazma hiperozmolaritesi ve dehidrasyonla karakterize edilen bir durumdur (Bahçecik, 2005). Tedavi edilmemiş veya az kontrol edilebilmiş Tip 2 DM'li hastalarda dehidrasyon, bireylerde yaşamı tehdit eden non-ketotik hiperosmolar koma'ya sebep olabilir. Bu durumda kan glikoz değeri, normala oranla 6-20 kat daha fazla yükselir ve hastalarda bilinç kaybı gelişebilir (Katzung, 2015).

Mortalite oranı %40-70 olarak belirtilmekte ve sıklıkla orta yaş üzeri tip 2 DM'li (ortalama 60 yaş) bireylerde görülmektedir (Bahçecik, 2005; Harrison, 2004). Bu rahatsızlığın belirtileri ve bulguları arasında; poliüri, polidipsi, halsizlik, ileri derece dehidrasyon, gastrik distansiyon, laktik asidoz, plazma glikoz konsantrasyonu'nun 600-1200 mg/dl olması ve buna rağmen ketonemi bulunmaması, glikozüri, üre ve kreatinin düzeyinde ve plazma ozmolaritesinde yükseklik olarak belirtilmektedir (Bahçecik, 2005).

2.7.1.3. Laktik Asidoz:

DM gibi birçok hastalık sonucunda laktat birikmesiyle birlikte laktik asidoz meydana gelmektedir. Bu, glikolizisin artması veya laktik asit metabolizmasının fonksiyonunda meydana gelen bozukluk sebebiyle ortaya çıkmaktadır (Kavaklı ve ark., 1998).

Kandaki laktat düzeyi, 5 mmol/L den büyük ise ve pH 7,34'den düşük ise laktik asidozdan söz edilir. 1976'da Cohen ve Woods laktik asidozun 2 tipi'nin olduğu rapor edilmiştir (Krzymien ve ark., 2013; Seo ve ark., 2013; Richy ve ark., 2014). Bunlar anemi, hemoraji, konjestif kalp yetmezliği (KKY), feokromastoma ve CO₂ zehirlenmesi gibi durumlarda hafif doku perfüzyonu veya oksijenizasyonundan dolayı oluşan Tip A laktik asidoz ve çeşitli hastalıklar (DM, Karaciğer hastalıkları vb.) , ilaçlar (biguanidler, alkol, salisilat vb), toksin ve metabolitlere bağlı olan ve hipoglisemi gibi nedenlerle ortaya çıkan Tip B laktik asidoz olarak incelenmektedir (Kavaklı ve ark., 1998; Krzymien ve ark., 2013).

Tip 2 DM' nin tedavisinde sık kullanılan oral antidiyabetik ajanlardan metforminin çok nadir komplikasyonları arasında ise laktik asidoz bulunmaktadır (Seo ve ark., 2013; Richy ve ark., 2014).

2.7.1.4. Hipoglisemik Koma:

DM'li hastalarda sık görülen, çok ani gelişen ve özellikle Tip 1 DM tanısı konmuş hastalarda insülinin yüksek dozlarda alınımı sonucunda meydana gelen önemli akut komplikasyonlar arasında yer alan bir durumdur. Ek olarak, insülin enjeksiyonundan sonra yeterli miktarda gıda alınmaması veya insülin alımı sonrasında egzersiz yapmak (Galesetti ve ark., 2013; Tran ve ark., 2014) gibi durumlarda, hipoglisemi ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca oral sülfanilüre kullanan yaşlılarda da hipoglisemi görülebilmektedir. Birkaç saat sürebilen hipoglisemik bir koma, ölümle de sonuçlanabilmektedir. ADA'ya göre hipoglisemi, kan glikoz düzeyinin %70 mg/dL'nin altına inmesiyle başlar (Kalra, 2014).

2.7.2. Kronik Seyirli Komplikasyonlar

Kronik seyirli diyabetik komplikasyonlar, makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonlar olarak 2 başlık altında incelenmektedir (Marshall ve Flyvbjerg., 2006).

2.7.2.1. Makrovasküler Komplikasyonlar: Kalp hastalıkları ve inme gibi kardiyovasküler hastalıkları dünyada ölümlerin ana sebebidir. 2008 yılında, kardiyovasküler hastalıklardan 17,3 milyon kişinin öldüğü bildirilmiş olup Dünya genelindeki ölümlerin~ %30'unu temsil etmektedir (Maranho ve ark., 2015). Makrovasküler komplikasyonlar Tip 1 DM ve Tip 2 DM sonucu meydana gelen ölümlerin ana sebebidir (Marshall ve Flyvbjerg., 2006).

Kardiyovasküler olay riski, DM' li hastalarda diyabetik olmayanlara göre 3-5 kat daha fazla olduğu bildirilmektedir (Stamler ve ark., 1993). DM bağlı morbitide ve mortalitenin başlıca nedeni, tüm yaş gruplarında özellikle ise gençlerde, hipertansiyon ve koroner kalp hastalıkları gibi kardiyovasküler bozukluklardır ve makroanjyopatiye bağlı olarak gelişir (Fox ve ark., 2004; Stamler ve ark., 1993).

Diyabette oluşan makroanjiopati, aterosklerozun ileri bir şekli olup, koroner, karotis ve periferik arterleri etkileyerek kalp krizi oluşma riskini artırır, inme ve diyabetik ayak gelişimine neden olur (Goldberg, 2003).

Makrovasküler komplikasyonlar; koroner arter hastalığı, serebrovasküler hastalıklar ve periferik arter hastalığı olarak kendi içerisinde çeşitli gruplara ayrılmaktadır.

2.7.2.1.1. Koroner Arter Hastalığı:

Dünya genelindeki yaşanan ölümlerin, yaklaşık 7,3 milyon' unun koroner arter hastalıklarından kaynaklandığı rapor edilmiştir (Maranho ve ark., 2015). Diyabetik hastalar, yüksek oranda koroner arter hastalıklarının prevelansına sahiptir. İleri glikasyon son ürünleri ve lipoprotein anomalileri, koagülasyon anomalisi, endotel disfonksiyonu ve yüksek oranda oksidatif stres gibi birçok metabolik faktör, koroner arter hastalığının gelişiminde ve ilerlemesinde önemli risk artışı sağlamaktadır (Alexandre ve ark., 2015). Ayrıca, bu, miyokard iskemisine de sebep olmaktadır (Pehlivanoğlu, 2006).

2.7.2.1.2. Serebrovasküler Hastalıklar:

Serebrovasküler hastalık, beyni besleyen damarların tıkanması veya kanaması nedeniyle ortaya çıkmaktadır ve dünyada ölüme sebebiyet veren hastalıklar arasında üçüncü sırada yer almaktadır. DM'de hiperglisemi, damar yapılarında fonksiyon bozukluğu meydana getirerek serebrovasküler hastalık oluşumuna neden olmaktadır. Hipergliseminin yanı sıra hipertansiyon, hiperlipidemi, yaş, cinsiyet, genetik ve obezite gibi faktörler risk artışı sağlayabilmektedir (Davis ve ark., 2015).

2.7.2.1.3. Periferik Arter Hastalığı:

Tip 2 DM' li hastalarda periferik arter hastalığı, geniş karakteristik özellikler ve ciddi sonuçlar sergilemektedir ve tip 2 diyabetin önemli makrovasküler komplikasyonlarından bir tanesidir. Periferik arter hastalığının en önemli sebebi, ateroskleroz olarak bilinmektedir; fakat akut ve kronik kol-bacak iskemisi, çeşitli risk faktörleriyle beraber bunu tetikleyebilir. Dislipidemi, sigara, hipertansiyon ve DM, periferik arter hastalığının risk faktörleri arasındadır (Rhee ve ark., 2015). Bu nedenlerle DM bu hastalık görölme sıklığını önemli oranda artırmaktadır.

2.7.2.2. Mikrovasküler Komplikasyonlar

DM'nin seyrine bağılı olarak, retinal ve renal vasküler yapılar ile periferik sinirlere kan akımını sağlayan küçük damarlarda gelişen mikroanjiopati; diyabetik retinopati, diyabetik nefropati ve diyabetik nöropati oluşumuna neden olmaktadır (Duby ve ark., 2004; Porta ve ark., 2002).

2.7.2.2.1. Diyabetik Nefropati:

Hiperglisemi, oksidatif stresin artması veya antioksidan aktivitenin azalması ve intrasellüler ATP azalması gibi faktörler, diyabetik nefropati (DN) oluşumuna katkı sağlamaktadır (Şen ve ark., 2002). Ayrıca tip 1 ve tip 2 diyabetli hastaların yaklaşık %40'ını etkileyen DN, kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili olarak son aşama böbrek hastalıklarının oluşumuna, aynı zamanda mortaliteninde artmasına da neden olmaktadır (Li ve ark., 2015; Gros ve ark., 2015) ve prevelansı ve insidansı, gün geçtikçe daha da artmakta ve Tip 2 DM'li hastalarda prevelansı %5 ile 20 arasında değişmektedir (Jhonson ve ark., 2015; Gros ve ark., 2015). Bu hastalığın oluşmasında; hiperglisemi, hipertansiyon, glomerüler hiperfiltrasyon, proteinüri seviyesi ve genetik yatkınlık gibi faktörler risk artışı sağlamaktadır. İlaveten hiperlipidemi, sigara alışkanlığı ve protein veya yağ içerikli diyet ve miktarı da, DN oluşumunda rol oynamaktadır (Gros ve ark., 2015; Kos ve ark., 2014). DN'li hastaların idrarında albümin atılımı artar. Bu nedenle DN iki durumla kategorize edilir. Mikroalbuminüri; idrar albümin miktarı 20 µg/min'den büyük, 199 µg/min'e eşit veya küçük olması veya makroalbuminüri yani idrardaki albümin miktarının 200 µg/min'den büyük veya eşit olması halinde de diyabetik nefropatiden söz edilebilir (Gros ve ark., 2015).

2.7.2.2.2. Diyabetik Nöropati:

Nöropatinin ya da periferik sinir sistemi hasarının en yaygın sebebi DM' dir. Genel popülasyona bakıldığında %2'den daha fazladır, 40 yaş üzeri bireylerde ise yaklaşık %15'dir. DM'li hastaların büyük bir kısmında özellikle periferik sinirlerde fonksiyon bozukluğu meydana gelebilmektedir. Diyabetli hastaların yaklaşık %30-90'ında periferik nöropati gelişir (Spanos

ve ark., 2015). Buda, alt ekstremitelerde uyuşukluk, yanma, ağrı, halsizlik, karıncalanma gibi belirtilerle kendini göstermektedir (Callaghan ve ark., 2012; Spanos ve ark., 2015). Diyabetik nöropatinin oluşumunda altta yatan en önemli sebep hiperglisemidir. Ayrıca Tip 2 DM’de, dislipidemi de aktif rol oynamaktadır ve bu kişilerde nöronal insülin hassasiyeti de azalmaktadır (Callaghan ve ark., 2012).

Periferal Nöropati: Distal simetrik duyu-motor nöropati, femoral nöropati, mononöropati, basıç paralizileri şeklinde görülebilmektedir (Marshall ve Flyvbjerg., 2006).

Otonomik Nöropati: Postüral hipotansiyon, mesane disfonksiyonu, gastroparezi, kabızlık, diyare yada her ikisi, gustatuvar terleme, erektil disfonksiyon şeklinde görülür (Marshall ve ark., 2006).

2.7.2.2.3. Diyabetik Retinopati:

DM’nin çok yaygın mikrovasküler komplikasyonlarından birisidir ve bu hastalarda görme kaybının majör sebebidir. Dünya genelinde yaklaşık 93 milyon kişide diyabetik retinopati (DR) bulunmaktadır. DM’li hastalar arasındaki DR prevalansı, %34,6’dır (Safi ve ark., 2014). Oluşumundaki risk faktörleri, hiperglisemi, hipertansiyon, serum lipid düzeyi ve sigara kullanımıdır. Ayrıca yaş, diyabet süresi, genetik yatkınlık ve etnik kökünde DR oluşumunda risk artışı sağlayabilmektedir (Scanlon ve ark., 2013).

2.8. DENEYSEL DİYABET MODELLERİ

Hayvan modelleri, belirli yöntem ve deneyimlerle davranışsal çalışmalarda kullanılabilen yada spontan veya indüklenmiş patolojik işlemlerin araştırılabilmesine ve iki veya daha fazla parametrenin karşılaştırılmasına olanak sağlayan tasarımlardır (Chatzigeorgiou ve ark., 2009).

DM'de artan komplikasyonlara bağlı olarak, mortalite ve morbidite oranı da bu bağlamda artmakta ve bunun yanı sıra diyabetli kişilerin yaşam kalitesi düşmekte ve uzun süre devam edebilen komplikasyonlar nedeniyle de DM'ye harcanan maliyetlerin artmasını da beraberinde getirmektedir (Öztürk ve ark., 2005)

Her 5 saniyede bir DM tanısı konan (Colagiuri, 2010) ve her 7 saniyede bir kişinin DM'den öldüğü ve sayısı 387 milyona kadar ulaşan ve gün geçtikçe daha da artan DM'li birey sayısının olduğu Dünya'mızda (ADA, 2014), bu hastalığın ve komplikasyonları'nın altında yatan sebeplerin araştırılması ve yeni terapötik tedavi yaklaşımlarının keşfedilmesi amacıyla deneysel diyabet modellerinin kullanılması, DM çalışmalarına ve araştırmacılara bilimsel açıdan birçok yarar sağlamaktadır (Chatzigeorgiou ve ark., 2009; Kurçer Z ve ark., 2012).

Hayvan modeli çalışmaları DM'de ve tedavisinde çok sık kullanılmaktadır. DM'ye yönelik deneysel çalışmalar uzun bir tarihe sahiptir. Geçmişte glikoz homeostazisinde pankreasın merkezi rolünü doğrulamak ve insülinin keşfedilmesi ile saflaştırılması için pankreatektomi yapılmış köpekler kullanılmıştır. Bunun yanı sıra günümüzde deneysel tasarımlar, dünya genelinde etik ve yasal olarak sınırlamalara konu olmakta ve tartışılmaktadır (Rees ve ark., 2005).

Etik, ahlaki ve yasal konular, hayvan modelleri kurarken ve modeli uygularken gerekli ve her açıdan önemli bir yere sahiptir. Öncelikle insanlardaki DM hakkında ve tedavisine yönelik bilimsel çalışmalar yapabilmek için etik ve vicdani değerlere dikkat edilmeli ve gerekli yasal prosedürlere azami uyulmalıdır. (Rees ve ark., 2005).

Omurgalı hayvanların bilimsel çalışmalarda kullanılmaları için bazı kriterler ve sınırlamalar bulunmaktadır. Öncelikle çalışmanın yapılabilmesi için, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurullarınca izin alınmalı ve çalışmayı yapacakların deney hayvanı kullanma sertifikasına sahip olmaları gerekmektedir. Ek olarak, hayvan deneyleri ve araştırmaları için 3R (Replacement, Reduction ve Refinement) prensibi önemlidir. Bu prensipler 1959 yılında Russel ve Burch tarafından önerilmiştir. Bunlar, çalışma için eğer hayvan kullanmak zorunlu ise, çalışmanın veri güvenliğini bozmayan en az sayıda hayvan kullanılmalı ve çalışma boyunca hayvanın yaşam koşulları, refahı optimum sağlanmalı ve deney sonunda hayvan öldürülecekse, ağrısız ve hızlı bir şekilde gerçekleştirilmelidir (Curaj ve ark.,2015, Törnqvist ve ark.,2014).

DM modellerinde genellikle omurgalı hayvanlar içerisinde fare, sıçan, tavşan, kobay, hamster, maymun, domuz, köpek ve kedi gibi deney hayvanları kullanılabilmektedir.

Hayvan modelleri, genellikle ya hayvanın diyeti değiştirilerek veya diyetine ilave maddeler katılarak ve/veya hedeflenen organa uygun toksik kimyasal ajanlar kullanılarak oluşturulmaktadır (Kayaalp, 2006). DM modelleri oluşturulurken genellikle alloksan, streptozotosin (STZ) (Szkudelski, 2001), çinko şelatörleri, 8-hidroksikinolin, rodentisid-Vacor ve diyet nitrozaminleri gibi ajanlar kullanılmaktadır. Bunlar içerisinde yaygın olarak ya alloksan ya da STZ kullanılarak DM modeli oluşturulmaktadır (Szkudelski, 2001; Kurçer Z ve ark., 2012). DM modelleri, klinikte görülen diyabetin tipine göre değişmekle birlikte genellikle yüksek doz STZ uygulanarak oluşturulan Tip 1 DM'li modeli kullanılmaktadır. Ancak yaygın olan ve insandaki Tip 2 DM'yi taklit eden bir model oluşturabilmek için, 2-4 hafta yüksek yağlı diyet ilavesi ile birlikte düşük dozlarda i.p enjeksiyonla STZ veya alloksan kullanılmasının daha uygun olduğu belirtilmektedir (Sasidharan ve ark., 2013).

Yalnızca yüksek dozda STZ veya alloksan uygulaması genelde Tip 1 DM' yi taklit eden DM modelleri olup (Cheng ve ark., 2007), bu dozların aralığı kullanılan hayvan tipine göre değişmektedir (Tablo 8, Kurçer ve ark.,

2012). Bu kimyasallar, pankreasta bulunan beta hücreleri tahrip ederek pankreastan insülin sekresyonunu azalmaktadır. Ancak tüm bu modeller insandaki DM'ye tam anlamıyla yansıtamamaktadır (Irer ve ark., 2004).

Tip 2 DM'nin önemli belirteçlerinden bir tanesi insüline karşı direnç gösterilmesidir. Bunun sağlanması için yüksek yağ içerikli yem kullanılması oldukça yararlı bir yöntemdir (Sasidharan ve ark., 2013).

Tablo 8: Farklı hayvan türlerine göre kullanılan Alloksan ve STZ dozu aralığı

Tür	Alloksan Doz Aralığı	STZ Doz Aralığı
Sıçan	30-65 mg/ kg (i.v) 75 ⁽¹⁾ -250 mg/kg (i.p) 100-200 mg/ kg (sc)	40-80 mg/ kg (i.v) 35 ⁽²⁾ -150 mg/kg (i.p) 60-120 mg/ kg (sc)
Fare	40-100 mg/ kg (i.v) 50 ⁽¹⁾ --200 mg/kg (i.p) 150-200 mg/ kg (sc)	60-200 mg/ kg ⁽³⁾ (i.v) 50-180 mg/kg (i.p)
Tavşan	80-150 mg/kg(i.v)	Dirençli
Köpek	50-75 mg/kg(i.v)	20-30 mg/kg(i.v)

1.Tekrarlayan dozlarda kullanılarak uygulanmaktadır.
2.Yüksek yağlı diyetle birlikte uygulanmaktadır.
3.Nikotinamid (NAD) ile birlikte uygulanmaktadır.
(i.v: intravenöz; i.p: intraperitoneal; sc: subkutan; STZ: Streptozotosin)

İnsanda tip 1 ve tip 2 DM'yi taklit etmek için fare ve sıçanlarda alloksan ve STZ'nin kullanım şekilleri ve uygulanacak dozları tablo 9' da gösterilmektedir (Kurçer ve ark.,2012).

Tablo 9: Fare ve sıçanlarda alloksan ve STZ'nin kullanım şekilleri ve uygulanan dozları

Madde-	Tip 1 Diyabet	Tip 2 Diyabet
Deney		
Hayvanı		
Alloksan-Sıçan	*40-65 mg/ kg (i.v) tek doz *150 mg/ kg ve üzeri dozlarda tek doz i.p *75 mg/ kg 5 gün i.p *80 mg/ kg i.p	*Erişkin'de 120 mg/ kg tek doz (i.p) *Yenidoğan'da 200-250 mg/ kg tek doz (i.p)
Alloksan-Fare	*40-65 mg/ kg tek doz (i.v) *200 mg/ kg tek doz i.p *50 mg/ kg 5 gün i.p	Farelerde Tip 2 Diyabet oluşturabilmek için obez veya non-obez spontan modeller tercih edilmektedir.
STZ-Sıçan	*Erişkinde *35-80 mg/ kg tek doz, i.v.,i.p., s.c. *40 mg/ kg i.m	* Yenidoğan'da 100 mg/ kg tek doz (i.v.,i.p., s.c.) * Erişkin'de -65 mg/ kg (i.v)+110-230 mg/ kg i.p. NAD -35 mg/ kg i.p.+ 2 Hafta YYD -30 mg/kg i.p.+ 4 Hafta YYD -60 mg/ kg i.p.+ 2 Hafta YYD
STZ-Fare	*Erişkinde *60-150 mg/ kg tek doz i.p.	*Erişkinde -65 mg/ kg+ 150 mg/ kg i.p.NAD -40 mg/ kg i.p.+ 5 Hafta YYD -90-100 mg/ kg i.p.+ 3 Hafta YYD
(i.v: intravenöz; i.p: intraperitoneal; sc: subkutan; i.m: intramusküler; YYD: Yüksek Yağlı Diyet; NAD: Nikotinamid; STZ: Streptozotosin)		

D. A. Rees ve J. C. Alcolado, 2005 yılında yayınladıkları makalede deneysel DM modelleri, Tip 1 DM ve Tip 2 DM modelleri olarak aşağıdaki gibi iki başlık halinde incelenmektedir.

2.8.1. Tip 1 Diyabet Modelleri

2.8.1.1 Diyabetojenik Kimyasal Maddelerle Oluşturulan

Modeller:

*Alloksan

* Streptozotosin

*Vacor

*Dithizone ve 8-hidroksikinolin (Çinko şelatörleri) gibi kimyasallar kullanılarak DM modelleri oluşturulmaktadır.

2.8.1.2 Spontan Tip 1 Diyabet Modelleri: NOD (Non-Obez Diyabetik) fare ve BB (Bio-Breeding) sıçan, insanda tip 1 diyabete benzer spontan olarak en yaygın kullanılan hayvanlardır. Bunun yanı sıra, LETL (Long Evans Tokushima Lean) sıçanı, Yeni Zelanda beyaz tavşanı, Keeshond köpeği, Çin hamsteri, Tepeli siyah makak ile oluşturulan modeller de spontan tip 1 diyabet modeli olarak kullanılmaktadır.

2.8.1.3. Virüs Yardımıyla Oluşturulan Tip 1 Diyabet Modelleri:

- EMC (ensefalomiyokardit) virüsünün M varyantı
- Kilham Rat Virus (KRV)
- Coxsachie B
- Rubella
- Reovirus
- Sitomegalovirus (CMV)
- Venezuelan Equine Ensefalit virüsleri yardımıyla DM modeli oluşturulabilmektedir.

2.8.1.4. Transgenik Tip 1 Diyabet Modelleri:

- MHC antijenleri (I-E alfa, I-A antijenleri gibi)
- Sitokinler (interferon-gama, IL-2 ve IL-10 gibi)
- Viral proteinler (LCMV antijeni, influenza virüs hemaglutinini)

2.8.2. Tip 2 Diyabet Modelleri

Çeşitli yöntemlerle hayvanlarda oluşturulan Tip 2 DM modelleri tablo 10'da belirtilmiştir (Rees ve ark., 2005; Srinivasan ve Ramarao, 2007).

Tablo 10: Tip 2 Diabetes Mellitus’u taklit eden modeller

KATEGORİ	TİP 2 DİYABET MODELLERİ	
	OBEZ	NON-OBEZ
Spontan ve genetik türevli diyabetik hayvanlar	*Ob/Ob fare, monogenik obezite modeli, ılımlı hiperglisemili modeller *db/db fare, monogenik obezite modeli, Ağır düzeyde hiperglisemili modeller *Kuo Kondo (KK) Fare ve Sarı KK Obez (KK/Ay Fare) *Yeni Zelanda Obez Fare * NONcNZO10 Fare *TSOD Fare *M16 Fare *Zucker (fa/fa) Sıçanı, monogenik obezite modeli, Bozulmuş Glukoz Toleransı Modeli *ZDF Sıçan *SHR/N-cp Sıçan *JCR/LA-cp Sıçan *OLETF Sıçanı *Obese rhesus maymunu	*Cohen Diyabetik Sıçan * Goto Kakizaki Sıçan * Diyabetik Torri Sıçan (Torri rat Non obese C57BL/6) ALS/Lt mouse
Diyet indüklü diyabetik hayvanlar	İsrail Kum Sıçanı; C57/BL 6J Fare; Yüksek Yağlı Diyet	-----
Kimyasal indüklü diyabetik hayvanlar	GTG tedavili obez fare	Düşük doz Alloksan ve STZ indüklü sıçan ve fare
Cerrahi diyabetik hayvanlar	Ventromedyal hipotalamus lezyonlu diyet obez diyabetik sıçan	Pankreatektotemi hayvanlar
Bunların dışında İnsan insülin reseptörü, insan GLUT-4 glukoz taşıyıcısı ve insan adacık hücre amiloid polipeptidi (IAPP) gibi transgenik tip 2 diyabet modelleri de bulunmaktadır.		

(TSOD; Tsumara Suzuki obez diyabet, ZDF; Zucker yağlı diyabetik; OLETF, Otuska Long Evans Tokushima fatty, GTG, Altın tioglukoz, GLUT; Glikoz taşıyıcı, ALS; Alloksan duyarlı)

2.9.ENDOTEL, ENDOTEL DİSFONKSİYONU VE DİYABET

Endotel, damar iç katmanını kan akımı yönünde döşeyen ve kan ile temas halinde bulunan, tek katlı ve yassı ince bir tabakadan meydana gelen ve mezenkimal hücrelerin farklılaşması sonucu oluşan ve erişkin insanda yaklaşık 5500 m² den daha fazla yer kaplayan, yaklaşık olarak 1 kg ağırlığında ve yetişkin bir insanda 1×10^{13} Hücre civarında olan yapıdır (Fishman, 1982; Sumpio ve ark., 2002). Endotel, kan ile kan duvarı arasında selektif olarak antitrombotik bir bariyer olarak işlev üstlenmektedir ve bunun yanı sıra tablo 11 'da gösterildiği gibi sentezlediği ve salgıladığı bir çok medyatörler ile vasküler homeostazın kontrolünde rol oynamaktadır (Lau ve ark., 2015; Sumpio ve ark., 2002).

Tablo 11: Endotel hücrelerinden salgılanan ve eksprese edilen mediyatörler

Medyatörler	Türleri
Vazodilatör medyatörler	*Nitrik oksit (NO), endotelyum türevli hiperpolarize faktörler (EDHF), prostasiklin (PGI ₂), bradikinin, asetil kolin (Ach), serotonin, histamin,
Vazokonstriktör medyatörler	*Endotelinler (ET-1, ET-2, ET-3), anjiotensin II, tromboksan A ₂ (TXA ₂), asetil kolin (Ach), arasıdonik asit, trombin, nikotin, lökotrienler, serbest radikaller
Antitrombotik Medyatörler	*Trombomodulin, PGI ₂ , doku plazminojen aktivatör (t-PA), heparin sülfat
Antikoagulan Medyatörler	*von Willebrand faktör (vWF), tromboplastin, faktör V, platelet aktive faktör (PAF) , plazminojen aktivatör inhibitör tip 1 ve 2 (PAI-1 ve 2),
Büyüme modülatör/mediatörler	*Büyüme promotörleri; platelet türevli büyüme faktörü (PDGF), endotelial türevli büyüme faktörü (EDGF), Basic FGF, IGF, TGF-beta, GM-CSF, G-CSF
İnflamatuvar medyatörler	*IL-1, IL-6, IL-18 *LTB ₄ , C ₄ , D ₄ , E ₄ *Makrofaj kemotaktik faktör 1-2 (MCP-1 ve MCP-1), Majör histokompatibilite kompleks 2 (MHC II) *Adezyon molekülleri; endotelyal lökosit adezyon molekülü (ELAM), İntraselüler adezyon molekülü (ICAM) ve vasküler hücre adezyon molekülleri (VCAM) *Tümör nekrozis faktör (TNF)
Lipid Metabolizması	*LDL Reseptör, lipoprotein lipaz
Matriks ürünleri	*Fibronektin, laminin, kollajen 1, 2, 3, 4, 8 ve 18, proteoglikanlar, proteazlar

Endotel; lökosit, monosit ve lenfositleri kontrol etmek suretiyle immün ve inflamatuvar yanıtların düzenlenmesinde, büyüme faktörleri yapımı ve selektif damar geçirgenliği, ekstrasellüler matriks bileşenleri

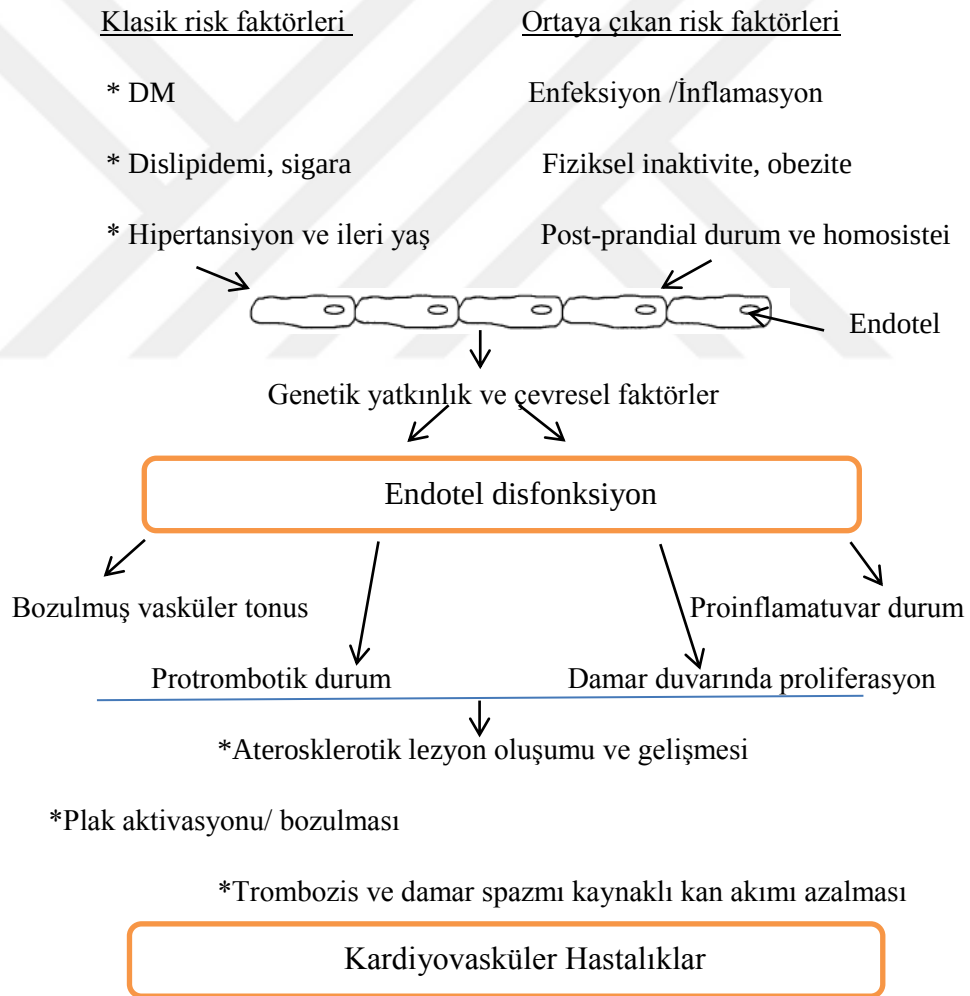
üretimi, kan akışının regülasyonu gibi bir takım damar fonksiyonlarının düzenlenmesi ve işlevlerinin sürdürülmesi gibi önemli rollere sahiptir (Yaylalı ve Küçükaslan, 2011; Özdoğu). Ayrıca, endotel bağımlı gevşetici faktör (EDRF) ve endotel bağımlı kasıcı faktör (EDCF) gibi kısa ömürlü vazodilatör ve vazokonstriktör maddelerin salınımıyla normal vasküler tonusun modülasyonunda çok etkilidir. Birçok fonksiyonundan dolayı endotel'e, parakrin ve endokrin organ da denilmektedir (Lau ve ark., 2015; Sumpio ve ark., 2002; Fishman, 1982).

Normalde endotel hücreleri, bazı antikoagulan maddeleri ve EDRF'leri doğrudan salgılamaktadır. Ayrıca, trombositlerin ve pıhtılaşma faktörlerinin aktive olmasını engelleyerek kan akımının normal seyrinde sürdürülmesini sağlar Endoteldeki nitrik oksit sentetaz (eNOS) enzimiyle meydana gelen NO, vazodilatör prostaglandinler ve endotel bağımlı hiperpolarize faktör gibi EDRF'ler, düz kas hücrelerinde, hücre içi guanozin siklik monofosfat (cGMP)'ı stimüle ederek vazodilatasyonu artırır (Kumar ve ark., 2013).

Sağlıklı insanlardaki endotel hücreleri, vazodilatasyon ve vazokonstriksiyon arasındaki dengeyi korumaktadır. Fakat, oksidatif stres, inflamasyon gibi durumlarda, endotel hücrelerinin yapısında ve fonksiyonunda meydana gelen bir takım değişiklikler, bu dengenin bozulmasına neden olmaktadır (Lau ve ark., 2015). Hasar gören ve inflamatuvar sitokinlerle indüklenen endotel hücreleri, pıhtılaşmayı uyaran prokoagulan faktörlerin ekspresyonunu artırarak, antikoagulan bileşenlerin ekspresyonunu yavaşlatır (Kumar ve ark., 2013).

Endotel yapısı ve fonksiyondaki bozukluklar; ateroskleroza, hemostatik disfonksiyona, inflamatuvar ve immünite yanıtlarında bir takım değişikliklere ve bazı patolojik durumların oluşabilmesine neden olabilmektedir ve endotel hücreleri bu olaylarda kritik rol oynamaktadır (Sumpio ve ark., 2002). Ek olarak, kardiyovasküler hastalıkların meydana gelmesinde de özellikle endotel'in, birçok risk faktöründe eşlik etmesiyle beraber, normal fonksiyonlarını kaybettiği bildirilmektedir (Şekil 1; Widlansky ve ark., 2003).

Herhangi bir sebeple endotel tabakasının fonksiyon görememesi durumuna endotel disfonksiyon denmektedir. Endotelin, anjiyotensin (Ang) II, siklooksijenaz türevi prostanoitler ve reaktif oksijen türleri (ROS) gibi vazokonstriktör maddelerin aşırı salınımıyla endotel disfonksiyonu hızlandırılmaktadır. Tipik olarak endotel disfonksiyonu, NO salınımının azalması ve EDCF'deki artışından dolayı endotel bağımlı vazodilatasyonun bozulmasıdır (Lau ve ark., 2015). İlave olarak da; hipertansiyon, DM, hiperkolestrolemi, hiperhomosisteinemi, sigara, obezite, ateroskleroz ve ileri yaş gibi durumlar, endotel fonksiyonlarını bozabilen risk faktörleridir (Yaylalı ve Küçükaslan, 2011; Özdoğu).



Şekil 1: Kardiyovasküler hastalıkların patogeneğinde endotel disfonksiyon' un rolü

Endotel fonksiyonlarının bozuması durumunda tablo 12’ de görüldüğü gibi bazı parametreler ve faktörler azalmakta, bazıları ise artmaktadır (Schalkwijk ve Stehouwer, 2005; Stehouwer ve ark., 1997).

Tablo 12: İnsanda endotel disfonksiyonu durumunda değişen parametreler

Değişen endotel fonksiyonları	Değişen endotel fonksiyonları
Endotel bağımlı vazodilatasyon bozulur	Vazodilatörlerin üretimi azalır, vazokonstrüktör elemanların üretimi artar
Endotelin düzeyi artar vWF düzeyi artar*	Makromoleküller için permeabilite artar Protrombotik ve prokoagulan aktivite artar
Trombomodulin düzeyi artar*	Antikoagulan ve profibrinolitik etkinlik azalır
t-PA ve PAI-1 düzeyi artar*	Lökositlerin permeabilite ve adezyonu artar
sE-selektin ve sVCAM düzeyi artar*	İnflamatuvar aktivasyon değişir
sICAM düzeyi artar*	Ekstrasellüler matriks sentezi değişir
Hücrel fibronektin ve Tip 4 kollajen elementleri artar*	Profibrinolitik etkinlik azalır

(s: çözülebilen; *: Plazma ya da serumdaki seviye artışı)

DM’de hiperglisemi; glikoz kullanımındaki yetersizlik ya da insülin salınımının bozulması ve insüline karşı direnç sonucu meydana gelen bir durumdur. Hiperglisemi sonucu, aşırı üretilen ROS’lar, DM’ye bağlı mikro ve makrovasküler komplikasyonların oluşmasında önemli rol oynamaktadır. Bu sebeple, tip 1 ve tip 2 DM’de endotel disfonksiyonu, hiperglisemi sonucu ROS miktarının artması ve devamında EDRF seviyesinin anormal seviyede azalması ile ilişkilendirilmektedir (Lau ve ark., 2015)

Artan kardiyovasküler hastalıklarla sıkı ilişki içerisinde olan DM ve beraberindeki insülin direnci, endotel hasarının oluşmasında büyük rol oynamakta ve vasküler anti-aterojenik rolü azaltabilen endotel disfonksiyona neden olmaktadır. Hiperglisemi, kronik diyabetik komplikasyonların ve endotel disfonksiyonu’nun meydana gelmesinde önemli bir metabolik risk faktörüdür. İnsülin direncinin ise, hiperlipidemi, DM, obezite, hipertansiyon, metabolik sendrom ve kalp yetmezliği gibi hastalıklarda, kardiyovasküler risk ve mortalite artışına neden olduğu bildirilmektedir (Hadi ve Suwaidi, 2007). Ayrıca DM’li hastalarda, kardiyovasküler hastalık oluşma riski, DM’li olmayan bireylere göre daha fazla olduğu belirtilmektedir (Stamler ve ark., 1993).

Makrofajlardaki monosit aktivasyonu ve transformasyonu, aterosklerotik ve inflamatuvar sürecin önemli bir adımıdır. Aterosklerozis'in patogenezinde görülen ilk olaylardan biri, arter duvarında fibrozis elementleri ve lipid birikmesidir (Lawson ve Wolf, 2009). Yüksek yağ içerikli diyet ile beslenme hiperkolesterolemiye neden olmakta ve arter duvarlarında kolesterol depolanmasına sebep olabilmektedir (O'hara ve ak., 1993; Brown ve Goldstein, 1984).

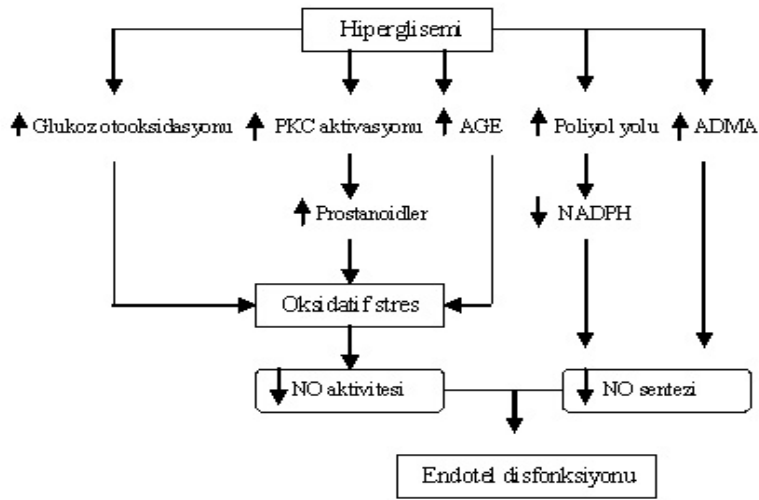
Yağlı dejenerasyon ve damar daralması ateroskleroza oluşturmaktadır. Ateroskleroz; endotel disfonksiyonu, sitokin ekspresyonu, monosit infiltrasyonu, düz kas hücresi proliferasyonu, trombozis artmasıyla kombine bozulmuş fibrinolizis ile ve kronik kalp hastalıkları, miyokard infarktüsü, felç ve periferik arteriyal hastalıklarına neden olan kronik inflamasyonla karakterize edilen bir rahatsızlıktır ve hiperglisemi, aterosklerotik plak oluşumuna neden olmaktadır. İnsülin direnci, aterosklerozisin oluşmasını hızlandırmakta ve beraberinde bir takım vasküler komplikasyonların oluşmasına neden olmaktadır (Geraldine ve King, 2010).

Aterosklerozun endotele bağlı vazodilatasyonun bozulmasına neden olduğu ve vazokonstriksiyona ve damar spazmına yol açabileceği bildirilmektedir. Ayrıca, hipertansiyon, sigara, hiperkolesterolemi, DM, obezite ve yaş gibi risk faktörleri aterosklerozisin patogenezinde rol oynamaktadır (Lawson ve Wolf, 2009).

DM'nin yanı sıra gelişen hipertansiyonda oksidatif stres'le beraber NO düzeyleri azalmaktadır ve endotel bağımlı vazodilatasyonun bozulmasıyla yakın ilişki içerisinde olduğu görülmektedir. Kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda oksidatif stres markırları ile endotel fonksiyonları arasında negatif bir ilişkinin olduğu bildirilmektedir (Endemann ve Schiffrin, 2004).

NO azalmasına yol açan bir diğer mekanizma eNOS enziminin majör endojen kompetitif inhibitörü olan asimetrik dimetil arjinin (ADMA) düzeylerindeki artıştır. Protein yıkımı sırasında ortaya çıkan ADMA, böbrekler yoluyla veya sitrülline metabolize edilerek elimine edilir.

Hipergliseminin plazmadaki ADMA seviyesini artırmasının yanı sıra, kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda eNOS inhibisyonu'nun, artmış plazma ADMA düzeyleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Hiperkolesterolemik bireylerde ADMA düzeylerindeki artış ile endotele bağımlı vazodilatasyon arasında negatif korelasyon bulunmuştur ve artan ADMA plazma konsantrasyonu insülin direncinin ve koroner kalp hastalıklarının gelişimine sebep olabileceği bildirilmiştir (Şekil 2; Chan ve Chan, 2002, Erişim tarihi:15.11.2015). Ayrıca, eNOS enziminin substratı ve ADMA'nın kompetitif inhibitörü olan L-arjinin infüzyonunun endotel fonksiyonlarını düzelttiği gösterilmiştir Endemenn ve Schriffrin, 2004; Chan ve Chan, 2002).

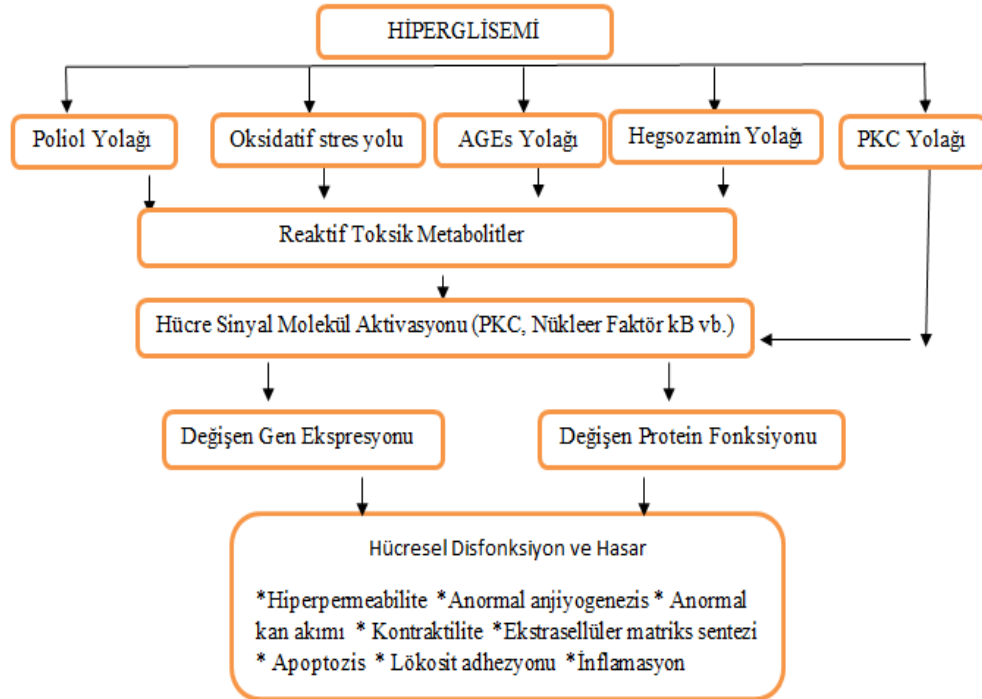


Şekil 2: ADMA'nın hiperglisemi ve endotel disfonksiyonu ile ilişkisi

DM oluşturulmuş ratların koroner arterlerinde asetilkolin (Ach)'le yapılan damar gevşeme yanıtlarında meydana gelen azalma, plazma NO seviyesindeki düşüş ve eNOS enzim ekspresyonundaki azalma ile ilişkilendirilmektedir. Ayrıca STZ ile DM oluşturulmuş sıçanlardan izole edilen torasik aortalarda da buna yakın sonuçların çıkması NO seviyesi ve eNOS protein sentezinde azalmayı göstermektedir. Ek olarak, DM'li ratlarda tip 2 DM'nin göstergesi olan insülin direncinin, endotelial NO salınımının bozulmasına neden olduğu ve vazodilatasyonu bozduğu

bildirilmektedir (Tawfik ve ark., 2006; Fu ve ar., 2007; Shinozaki ve ark., 1995).

DM'nin uzun dönem komplikasyonların'ın meydana gelmesinde etkili olan en az 3 farklı yolağın olduğu belirtilmektedir. Doku tipine göre her birinin farklı etkileri bulunmaktadır (Kumar ve ark., 2013). Hiperglisemi; poliol, hegsozamin, diaçilgliserol (DAG) ya da protein kinaz C (PKC) aktivasyonu ve ileri glikasyon son ürünleri (AGEs) gibi birçok yolağı ve hücrel mekanizmaları aktive ederek, advers etki göstermektedir (Geraldes ve King, 2010; Kitada ve ark.,2010). Ek olarak, hiperglisemi ve toksik metabolitlerle indüklenen sinyal transdüksiyon moleküllerinde gen ekspresyonu ve protein fonksiyonlarında meydana gelen bir takım değişiklikler, hücrel disfonksiyona ve vasküler doku hasarına yol açabildiği Kita ve ark. tarafından gösterilmiştir (Kitada ve ark.,2010, şekil 3).



Şekil 3: Hiperglisemi indüklü diyabetik vasküler komplikasyonların mekanizması

Endotelial hasar, DM'nin vasküler komplikasyonlarının ortaya çıkmasında büyük bir yere sahiptir. Hiperglisemi ile beraber miktarı artan AGEs, bazı yolaklarla, endotel disfonksiyon'da kilit rol üstlenmektedir. AGEs, hücre içi ve hücre dışı proteinlerin amino gruplarının, non enzimatik glikasyon reaksiyonu ile irreversibl bir şekilde meydana gelen son ürünleridir (Kumar ve ark., 2013).

Hiperglisemik durumlarda ve yaşlılıkta AGEs üretimi artar ve damar duvarı, retina ve böbrek gibi yapılarda birikebilir. Böylece AGEs, nitrik oksit sentetaz (NOS) enzimini baskılayarak ve endotel hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin salınımını artırarak, endotel bağımlı NO üretimini ve etkinliğini azaltabilir. Ayrıca, endotelial antikoagulan kofaktör ekspresyonu'nu azaltmak suretiyle, hücrel koagülasyon fonksiyonlarını değiştirebilir. Bundan dolayı, AGEs, diyabetik vasküler komplikasyonlarda, aterosklerozis ve trombozis gelişimiyle sıkı ilişkilendirilmektedir. Bunun yanı sıra damar düz kas hücrelerinde çoğalma ve ekstrasellüler matriks sentezinde artışa sebep olmaktadır (Hao ve ark., 2001; Kumar ve ark., 2013).

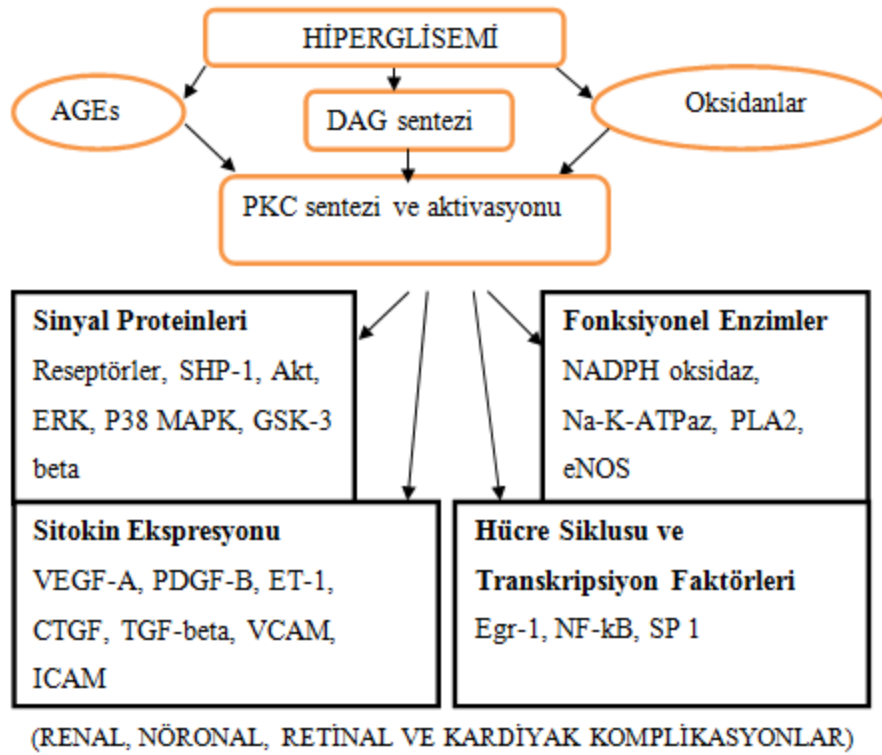
Hiperglisemiyle aktive olan yolaklardan bir tanesi PKC'dir. PKC, vasküler permeabilite, kontraktile, ekstrasellüler matriks sentezi, anormal kan akışı, hücre büyümesi ile apoptozis, anjiyogenez, lökosit adhezyonu, sitokin aktivasyonu ve inhibisyonu gibi birçok hücrel fonksiyonlarda etkisi olan ve diğer protein fonksiyonlarının kontrolünde rol oynayan bir enzim ailesidir. Hiperglisemi; hidrojen peroksit gibi oksidanlarla ve mitokondriyal süperoksit radikalleri ve AGEs aracılığı ile PKC'yi aktive eder (Gerald ve King, 2010).

Hiperglisemiyle beraber DAG miktarı kronik olarak yükselmektedir. Böylece DM'li bireylerde; retina, aort, kalp ve renal glomerullar gibi vasküler dokularda ve karaciğer ve iskelet kası gibi vasküler olmayan dokularda total DAG seviyesi artmaktadır (Gerald ve King, 2010).

Hücre içi PKC' nin kalsiyum iyonları ve sekonder iletili DAG ile aktivasyonu, birçok hücrel sistemde önemli bir taşıma yolağıdır. Hücre içindeki hiperglisemi ile aktive olan PKC, bir takım zincir etkiler meydana

getirmektedir (Kumar ve ark., 2013; Geraldde ve King, 2010). Böylelikle PKC; sinyal proteinleri'ni, fonksiyonel enzimleri, bazı sitokinlerin ekspresyonu'nu, hücre siklusu ve transkripsiyon faktörleri'ni etkileyerek bir takım renal, retinal, nöronal ve kardiyak komplikasyonların meydana gelmesine yol açtığı görülmektedir (Geraldde ve King, 2010, Şekil 4).

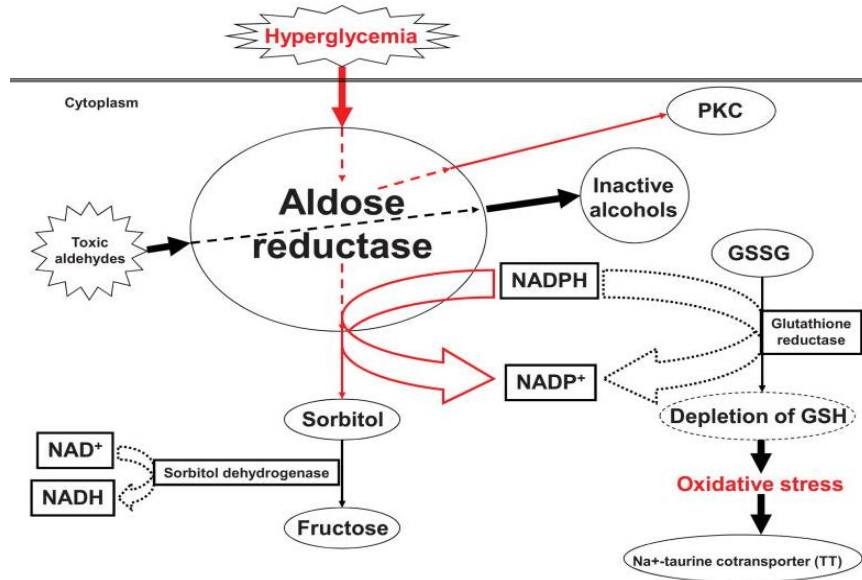
PKC, endotel hücreleri vasıtasıyla oluşturulan bariyerle albumin ve diğer makromoleküllerin permeabilitesini artırmaktadır. Ayrıca, nitrik oksit (NO)'in biyoyararlılığı'nı da değiştirerek, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi proanjyogenik moleküllerin ekspresyonunu ve fonksiyonunu etkileyerek, prostasiklin üretimini azaltarak ve tromboksan üretimini artırarak, endotel bağımlı vazodilatör disfonksiyona sebep olur (Kumar ve ark., 2013; Geraldde ve King, 2010).



Şekil 4: Protein kinaz C (PKC)'nin sentezinin ve aktivasyonunun biyolojik hedefi.

(MAPK:Mitojen aktive protein kinaz, PLA2:sitosolik fosfolipaz A2, Egr-1:erken büyüme yanıtı-1, TGF-beta: Dönüştürücü büyüme faktörü-beta, NF-kB: Nükleer faktör kappa B, CTGF: Konnektif doku büyüme faktörü, ERK: ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz)

Hiperglisemi'nin aktive ettiği bir diğer yolak ise poliöl yolağıdır. Aldoz redüktaz enzimi yardımıyla, bir doku toksini gibi işlev gören sorbitol üretimine ve sonunda sorbitol dehidrogenaz ile fruktozun meydana gelmesine neden olan poliöl yolağının işleyişinde NADPH kullanılmaktadır. Aşırı glikoz alındığında NADPH fazla tüketilmekte ve sorbitol üretimi de daha fazla artmaktadır. Fazla üretilen sorbitolden dolayı, sorbitol dehidrogenazın aktivitesinin zayıflamasına ve glikozun fruktoza dönüşümünün yavaşlamasına ve sorbitolün dokularda birikmesine neden olmaktadır. Ayrıca, hücredeki önemli antioksidan mekanizmalardan biri olan indirgenmiş glutatyon (GSH) yolağındaki bir reaksiyonda ve nitrik oksit sentezi için NADPH gereklidir. GSH'ın indirgenmesi oksidatif stres'e eğilimi artırmaktadır (Altan ve ark., 2006; Kumar ve ark., 2013). Sorbitol yolunun aktif olması ve burada NADPH'ın kullanılması antioksidan etkinliği yavaşlatan bir durumdur ve beraberinde NO sentezinin azalması, DM'nin mikro ve makro vasküler komplikasyonları'nın ortaya çıkmasında büyük rol oynamaktadır (Altan ve ark., 2006; Chiu ve Taylor, 2011, Resim 2)



Resim 2: Hiperglisemik polyöl yolağı (Chiu ve Taylor, 2011, Erişim tarihi: 15.11.2015).

Oksidatif stresin artması daha fazla ROS oluşumuna neden olur. Bundan dolayı da ROS, damar duvarında proinflatuar olayları başlatır. Ayrıca, vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM-1) ve interselüler adezyon molekülü (ICAM-1) ve kemotaktik molekülleri (makrofaj kemotaktik peptid; MCP-1) artırmaktadır (Endemenn ve Schriffrin, 2004).

İnterselüler adezyon molekülü -1 (ICAM-1); lökosit ve endotel hücreleri gibi çeşitli hücre tiplerinden sentezlenir ve yapısal olarak immünoglobulin süpergen ailesi üyeleri ile sıkı ilişkilidir. Ayrıca, 5 tipi bulunan ve 453 hidrofobik aminoasitten oluşan ve plazmada çözülebilir formu (sICAM-1) bulunan hücre adezyon molekülüdür. Lenfosit, monosit ve vasküler endotel hücrelerinde düşük seviyelerde eksprese edilmesine rağmen, TNF- α , interlökin-1 (IL-1) ve interferon gama (INF γ) ve lipopolisakkaritler gibi inflamatuvar sitokinler ve ROS'larla birlikte, sentezi önemli oranda artmaktadır (Lawson ve Wolf, 2009; Hubbard ve Rothlein, 2000).

ICAM-1, lökositlerin göçünde katkı sağlamasının yanı sıra, kardiyovasküler ve otoimmün hastalıklarda ve kanserli hastaların plazmasında seviyesi yükselmektedir. ICAM-1'in endotelial ekspresyonu, aterosklerotik dokularda ve aterosklerotik hayvan modellerinde miktarı artmaktadır ve böylece ICAM-1'in, ateroskleroz'un gelişiminde rol oynadığı bildirilmektedir (Lawson ve Wolf, 2009; Hubbard ve Rothlein, 2000).

2.10. OKSİDATİF STRES

2.10.1. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri

1900 'lü yılların başlarında Moses Gomberg tarafından keşfedilen serbest radikaller (Lushchak, 2014), genel olarak, moleküler ya da atomik yörüngesinde bulunan ve reaktivite özelliği yüksek olan, bir yada daha çok sayıda çiftlenmemiş yani bir yörüngesinde tek elektron bulunduran; pozitif, negatif yada nötr yükte olabilen ve biyolojik sistemlerde elektron transferi ile meydana gelen bir kimyasal maddedir (Altan ve ark.,2006; Halliwell, 1991).

Serbest radikaller;

- Normal bir molekülün, elektron kaybetmesi ile dış elektron yörüngelerinde çiftlenmemiş elektron kalması durumunda,
- Normal bir moleküle elektron transferi ile dış elektron yörüngelerinde çiftlenmemiş elektron meydana gelmesiyle,
- Moleküldeki bağların homolitik parçalanması ile, elektronlardan herbirinin farklı atomlar üzerinde kalması ile oluşmaktadır (Altan ve ark., 2006; Öğüt ve ark., 2012).

Tek elektron sayısına sahip, küçük aktivasyon enerjileri ve kısa ömürleriyle reaktif küçük molekül yapıları olan serbest radikaller, bu sayede hücre membranından kolaylıkla geçebilirler. Ayrıca serbest radikaller, reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin bir alt kümesi olarak nitelendirilebilir. Reaktif oksijen türleri, mitekondride oksijen metabolizması sırasında meydana gelir (Jensen, 2003).

Canlılığın sürdürülmesinde çok önemli bir yere sahip olan oksijen, çok önemli elektron yakalayıcıdır. Ancak oksijenin dış yörüngesine bir veya daha fazla çiftlenmemiş elektron eklenmesiyle oksijen, serbest oksijen radikaline dönüşüp, kolayca diğer moleküllerle reaksiyona girerek, o molekülleri tahrip edebilen bileşikler oluştururlar (Halliwell ve ark., 1990).

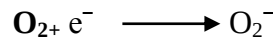
Endojen ve ekzojen kaynaklı reaktif oksijen türleri (ROS) doku ve hücrelere zarar verebilmektedir. Reaktif oksijen türleri, radikal olan ve radikal olmayan reaktif oksijen türleri olarak ikiye ayrılmaktadır (Riley, 1994; Muratoğlu, 2014, tablo 13).

Tablo 13:Serbest radikallerin sınıflandırılması

Radikal olanlar	Radikal olmayanlar
Süperoksit Anyonu (O_2^-)	Hidrojen Peroksit (H_2O_2)
Hidroksil Radikali ($HO^\bullet$)	Singlet oksijen (O_2)
Peroksil Radikali ($ROO^\bullet$)	Ozon (O_3)
Alloksil ($RO^\bullet$)	Hipokloröz asit ($HOCl$)
Nitrik Oksit (NO)	Lipid hidroperoksit ($LOOH$)
Semikinon Radikali (HQ)	Peroksinitrit ($ONOO^\bullet$)
Hemoproteine bağlı serbest radikaller	Azot dioksit (NO_2)
Organik radikaller (R)	N- Halojenli aminler ($R-NH-X$)
Organik peroksit radikali ($RCOO^\bullet$)	Hipohalöz asid (HOX)

Reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin kaynakları; mitokondri, mikrozomlar (sitokrom P450), ksantiz oksidaz (XO) ve nikotinamid adenin dinükleotit fosfat ($NADPH$) oksidaz (NOX) gibi sitosolik enzimlerdir. Fagositlerde, peroksidazlarla beraber ROS üretmektedir (Saso ve ark., 2014). ROS'lardan bazıları aşağıda gösterilmektedir.

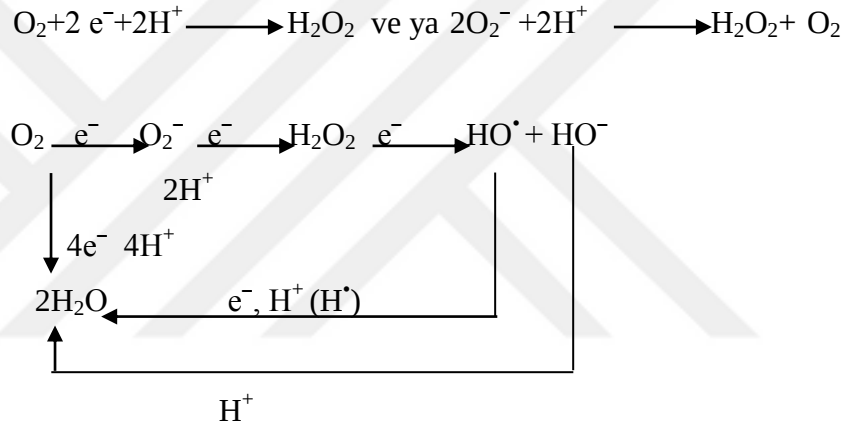
Süperoksit Anyonu (O_2^-): Mitokondri iç membranında suya oksijen indirgeyen bir mekanizmasının parçası olarak elektronca zengin bir ortamda, elektron taşıma zincirinde, redükte nikotinamid adenin dinükleotit ($NADH$)'ın nikotinamid adenin dinükleotit (NAD)'a okside olması mekanizmasıyla meydana gelmektedir (Memişoğulları, 2005; Jensen, 2003). Bir elektron alan oksijen (O_2), süperoksit radikaline dönüşür (Şekil 5, Lushchak, 2014). Bunun dış orbitalinde eşlenmemiş bir elektron bulunur. Bu anyonun en önemli özelliği, sekonder radikallerin üretilmesinde öncülük yapmasıdır (Memişoğulları, 2005).



Süperoksit radikalının, nötrofillerin bakterisidal aktivitesi, apoptozis, inflamasyon ve vasküler fonksiyonların düzenlenmesi gibi bir takım yararlı etkilere sahip olduğu bildirilmekte ve bu radikalın düzeyindeki azalma, bakteriyel enfeksiyonlara yatkınlığı artırdığı belirtilmektedir (Memişoğulları, 2005). Artmış süperoksit seviyesi ise, süperoksit dismutaz

enzimi (SOD) ile iki süperoksit radikalının birbiriyle etkileşmesi sonucu, birisi indirgenip diğeri oksitlenir ve hidrojen peroksit ve oksijene dönüştürülerek azaltılır ve bu sayede denge sağlanmış olur (Memişoğulları, 2005; Fridovich, 1987).

Hidrojen Peroksit (H₂O₂): İki süperoksit anyonunun iki proton almasıyla yada oksijen molekülünün enzimatik olarak iki elektronla indirgenmesi sonucu hidrojen peroksit meydana gelir. Yörüngesinde eşlenmemiş elektron içermediğinden radikal olmayan bir yapıya sahip hidrojen peroksit, kimyasal olarak bakıldığında moleküler oksijenden daha aktiftir; fakat süperoksit anyonu (O₂⁻) kadar aktif değildir (Şekil 5, Lushchak, 2014).

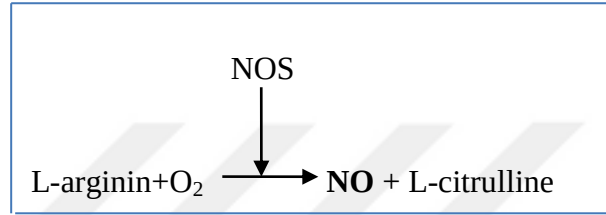


Şekil 5: Moleküler oksijenin suya indirgenmesi ve serbest radikal oluşumu

Hidroksil Radikali (HO[•]): Oksijen türleri arasında en reaktif ve en toksik formu hidroksil radikalıdır. Hidrojen peroksit (H₂O₂)' in bir elektron alması sonucu indirgenmesiyle oluşur (Şekil 5, Lushchak, 2014). Organizmada büyük hasar meydana getirme potansiyeline sahip olan hidroksil radikali, bütün biyolojik molekülleri etkileyerek, serbest radikal zincir basamaklarına öncülük edebilmektedir (Yu, 1994).

Nitrik Oksit (NO): Vücut fonksiyonların işleyişinde yeterli miktarda oksijen radikalleri kadar, nitrik oksit (NO) radikali de nörotransmisyon, inflamatuvar yanıt, protein nitrasyonu ve nitrosilasyon gibi birçok fizyolojik fonksiyon için önemli bir sinyal molekülüdür (Gulati ve ark., 2015; Özkan ve Yüksekol, 2003; Bian ve ark., 2015).

NO, çok kısa yarı ömürlü lipofilik, yayılabilen, yüksüz bir sinyal molekülü ve önemli biyoregülatör bir maddedir (Özkan ve Yüksekol, 2003). nitrik oksit sentetaz (NOS) enzimi aracılığı ile L- arjininden üretilen NO, oksijen bağlanan bölgeye kompetatif olarak bağlanıp, sitokrom oksidazı inhibe ederek hücresel solunumunu regüle eder (Memişoğulları, 2005, Şekil 6). Yüksüz olduğu için hücre membranından hiçbir bariyerle karşılaşmadan kolayca geçer ve eşlenmemiş bir elektrona sahip olması nedeniyle hızlı reaksiyona girer.



Şekil 6: L- arjininden NOS aracılığıyla NO oluşumu

NOS enzimi, kaynaklandığı hücre ve dokularda 3 değişik formda bulunarak NO üretmektedir (Tablo 14; Gulati ve ark., 2015; Özkan ve yüksekol, 2003). Bunlar; nöronal nNOS (NOS 1), uyarılabilir iNOS (NOS 2) ve endotelial eNOS (NOS 3)'tur (Bian ve ark., 2015).

Tablo 14: Nitrik oksit sentezleyen enzimlerin sınıflandırılması

NOS izoformu	Salınım	Kaynak	Regülasyon	NO Miktarı
Nnos	Sürekli	Nöron	Kalsiyum bağımlı	Düşük
iNOS	Uyarılma ile	Makrofaj, düz damar kası, damar endoteli, hava yolu epiteli, immün hücreler ve miyokard	Kalsiyum bağımsız	Yüksek
eNOS	Sürekli	Vasküler endotel hücresi, trombosit, nötrofil	Kalsiyum bağımlı	Düşük

nNOS ve eNOS enzimlerinin aktive olabilmesi için hücre içinde kalsiyum konsantrasyon artışına ihtiyacı vardır. Bazı bileşikler hücre içi kalsiyum düzeyini artırılmasına yardımcı olmaktadır (Tablo 15). İlave olarak bu enzimlerin temel fonksiyonları kısaca aşağıdaki gibidir:

- nNOS: Nörotransmisyon ve nöromodülasyon
- iNOS: Enfeksiyon eradikasyonu, Tümör eradikasyonu
- eNOS: Vasküler tonus regülasyonu, organlara kan akımının sağlanması

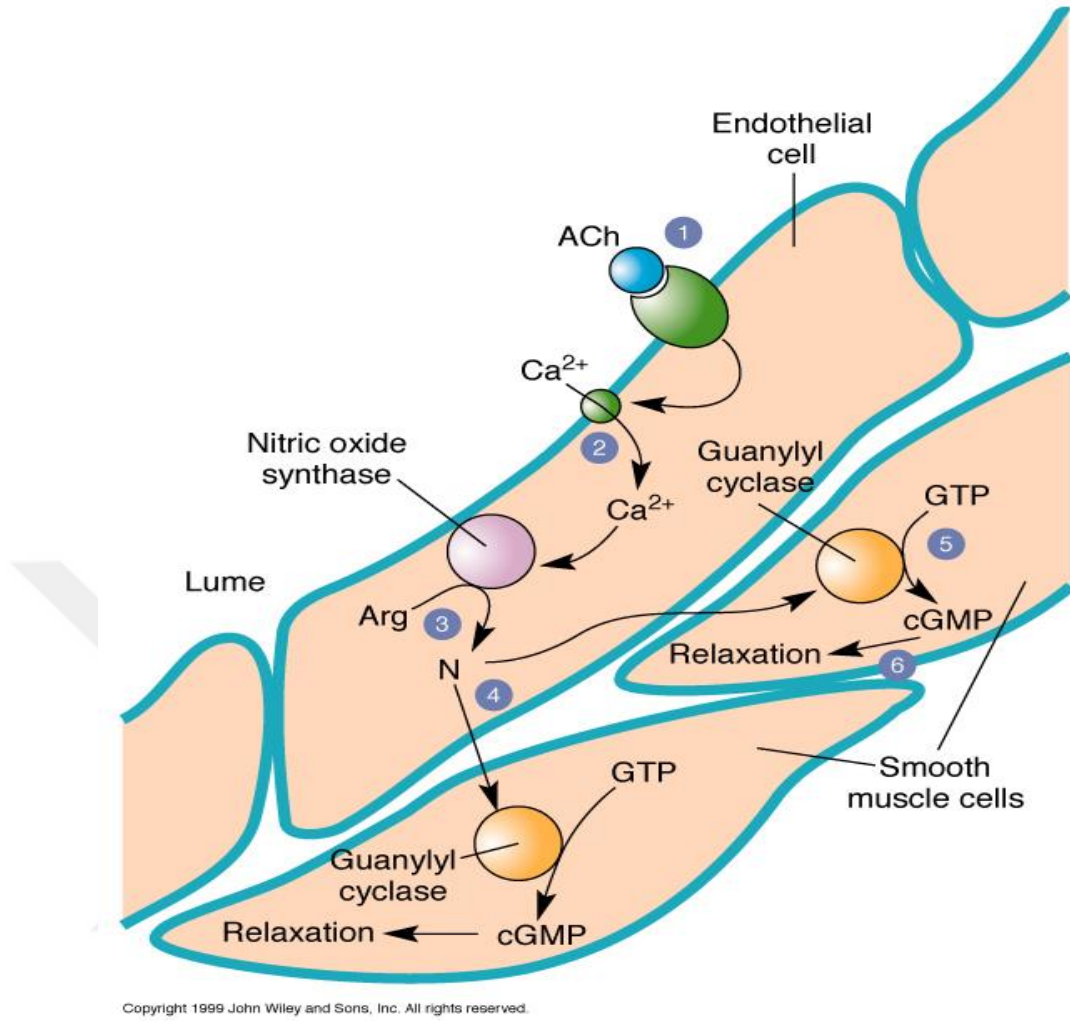
Tablo 15: Hücre içi kalsiyum düzeyini artıran bileşikler

Asetilkolin	Tromboksan A ₂
Histamin	Endotelin-1
Bradikinin	ATP
Trombin	Anjiyotensin-II
Glutamat	Serotonin
Noradrenalin	

NO, nitrit ve nitrata dönüşerek inaktif olur. Esasen protein, DNA ve lipitlere zarar verebilecek sitotoksik bir etkiye sahip olan NO, ROS'larla etkileşime geçerek peroksinitrit ve dinitrojen trioksit gibi daha güçlü oksidanlara dönüşebilmektedir.

Süperoksit düzeylerinin yükseldiği durumlarda süperoksit anyon radikali ile reaksiyona girerek peroksinitrit oluşmasına yol açmaktadır. Peroksinitrit ise, doğrudan lipid peroksidasyonuna, oksidatif ve nitrosatif protein modifikasyonuna ve DNA hasarına sebep olan toksik bir etkiye sahiptir. NO ayrıca, guanilat siklazı (GC) aktive ederek cGMP oluşturup düz kas gevşemesine neden olmaktadır (Özkan ve Yüksekol, 2003; Bian ve ark.,2015; Şekil7; <http://nptel.ac.in/course/102103012/module5/lec4/3.html>, Erişim tarihi:29.02.2016).

Bunların dışında alloksil (RO), peroksil radikali (ROO) gibi radikallerde bulunmaktadır.



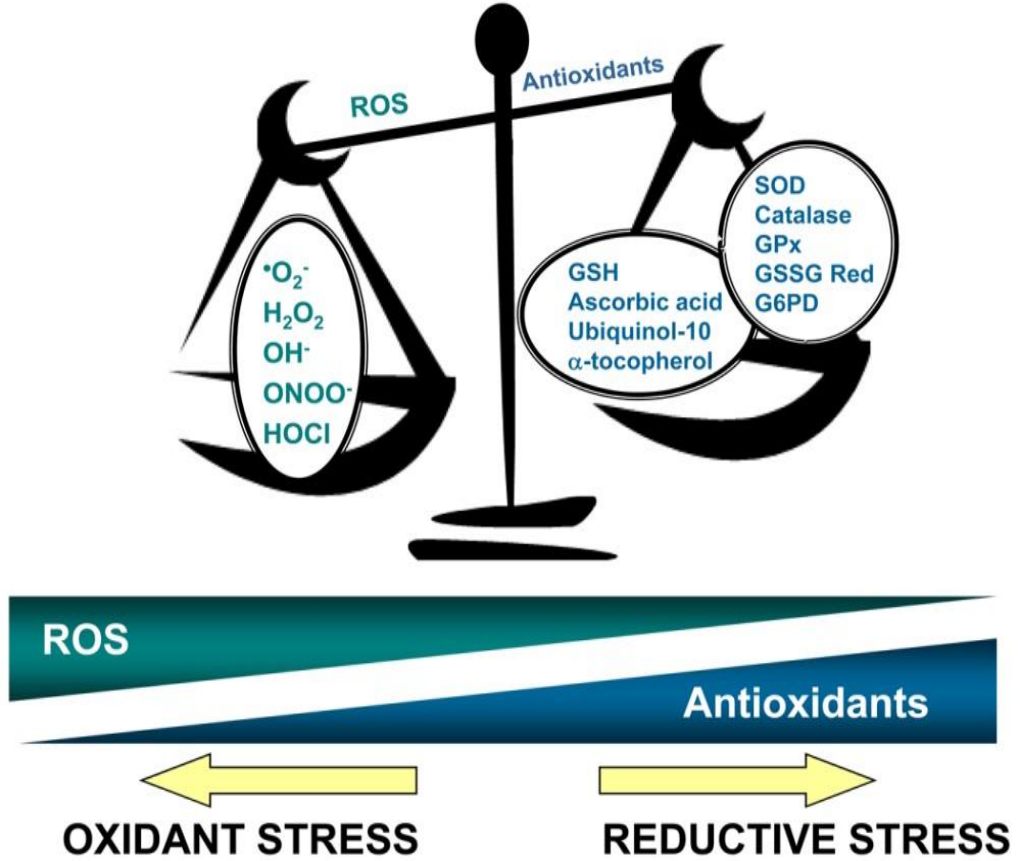
Şekil 7:Nitrik oksit'in, üretimi, metabolizması ve fonksiyonel hedefleri

2.10.2. Antioksidanlar

Antioksidanlar, serbest radikallerin meydana getirdiği oksidasyona ve onların hasar verici etkisine karşı etki gösteren ve serbest radikallerin stabilizasyonunda önemli yeteneğe sahip olan maddelerdir. Antioksidanlardan bazıları, serbest radikallerle tepkimeye girmek suretiyle, oksitlenebilen maddelerin zararlı formlara dönüşmesini durdururken, diğerleri ise serbest radikal oluşumunu engellemektedir (Halliwell ve ark., 1990; Ames ve ark., 1993).

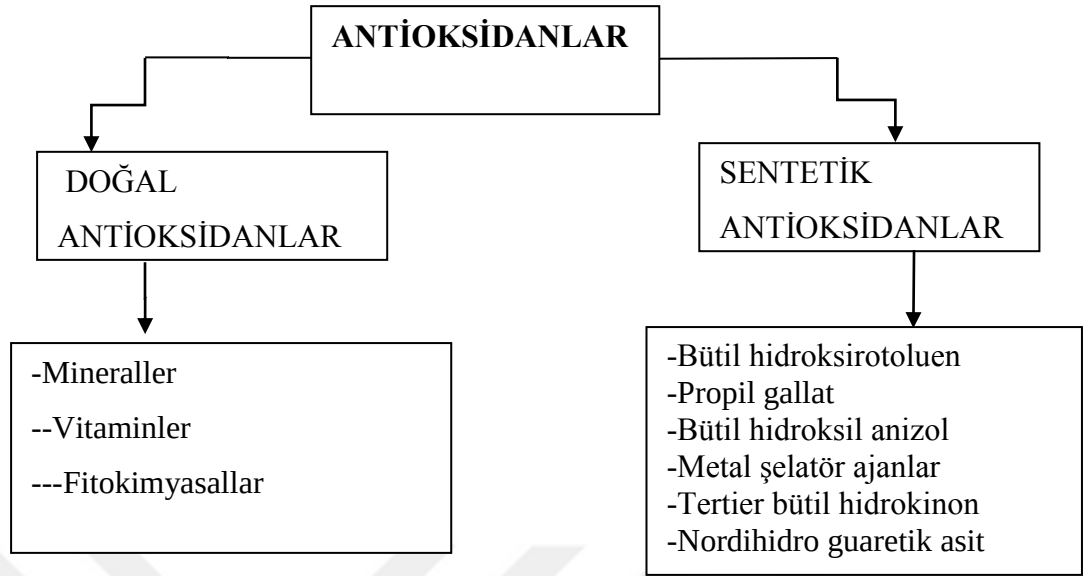
Antioksidanlar vücudumuzda doğal olarak bulunabilirken, dışarıdan da alınabilirler. Afiniteleri çok yüksek olan antioksidanlar, insan sağlığını korumada serbest radikalleri temizleme yeteneğine sahiptirler (Grajales ve

Muriel, 2015). Antioksidan özelliğe sahip bileşikler, serbest radikallere elektron vererek, onların reaktivitelerini azaltırlar ve vücutta oksidatif ve antioksidatif dengeyi sağlarlar. Antioksidan savunma mekanizmalarının zayıflaması ya da serbest radikallerin fazla salınımı sonucunda bu denge bozulur ve bu olay sonucunda oksidatif stres meydana gelir (Grajales ve Muriel, 2015; Jeopold ve Joscalzo, 2008, Resim 3)



Resim 3: Oksidan- Antioksidan dengesi (Jeopold ve Joscalzo, 2008 Erişim tarihi: 10.10.2015).

Antioksidanlar, primer veya doğal ve sekonder veya sentetik antioksidanlar olarak şekil 8’de gösterildiği üzere 2 grupta incelenebilmektedir (Wanid ve Kumar, 2015).



Şekil 8: Antioksidanların sınıflandırılması

2.10.2.1 Primer veya Doğal Antioksidanlar:

1.Antioksidan Mineraller: Bu grupta enzim kofaktörleri bulunmaktadır. Bunların eksikliğinde karbonhidrat gibi büyük moleküllerin metabolizması olumsuz etkilenmektedir. Bunlar; demir, bakır, çinko, selenyum, manganez gibi maddelerdir (Wanid ve Kumar, 2015).

2.Antioksidan Vitaminler: Vücut metabolizmasında işleyen fonksiyonlarının sürdürülmesi için gerekli olan doğal maddelerdir. Askorbik asit, α -tokoferol ve A vitamini örnek verilebilir (Wanid ve Kumar, 2015).

3.Fitokimyasallar: Bitkilerde doğal olarak bulunan kimyasal bileşiklerdir. ve bitkileri patojenlere, ultraviyole radyasyona ve herbivorlara karşı korurlar. Genel olarak fenolik asitler, flavonoidler, proantosiyandinler, ve diğer polifenoller bu gruba girmektedir ve insan sağlığı içinde yararlı fitokimyasallardır (Wanid ve Kumar, 2015). Bunlar serbest radikal oluşumunu engelleyerek, kanser, metabolik sendrom, diyabet gibi birçok hastalıkta yararlı etkilere neden olmakta ve hastalık riskini azaltmaktadır (Wanid ve Kumar, 2015).

2.10.2.2 Sekonder veya Sentetik Antioksidanlar:

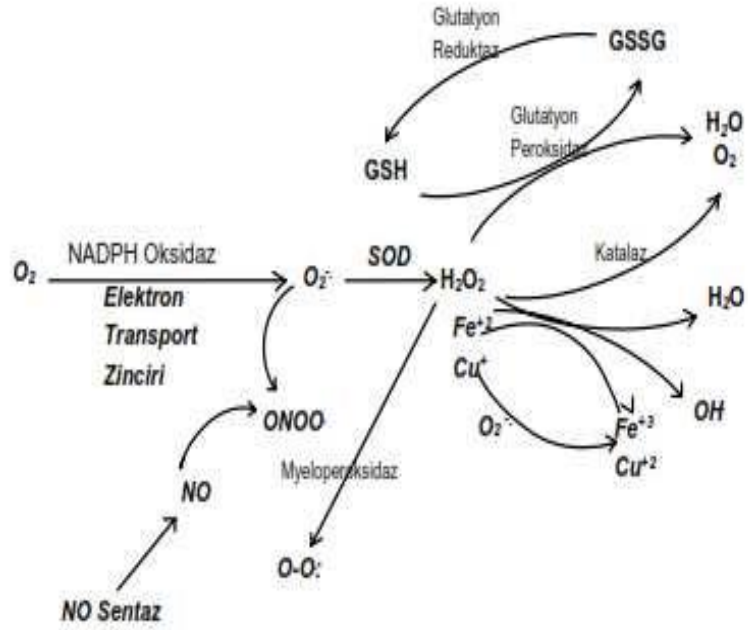
Bu antioksidanlar, genellikle serbest radikal yakalayan ve bu sayede zincir reaksiyonlarını durduran ve bu yolla oksidasyondan dolayı meydana gelen hasarı önleyen fenolik bileşikler içermektedir. Bunlara ;

- Bütıl hidroksitrotoluen,
- Propil gallat,
- Bütıl hidroksil anizol,
- Metal şelatör ajanlar,
- Tertier bütıl hidrokinon (TBHQ),
- Nordihidro guaretik asit (NDGA), örnek verilebilir (Wanid ve

Kumar, 2015).

Genelde mitekondride, reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve zarar verici etkilerini önleyebilen bir takım antioksidan savunma mekanizmaları bulunmaktadır. Bunlar, endojen enzimler ve enzimatik olmayan radikal yakalayıcılardır. Enzimatik olmayan sistemler, direkt olarak ROS durduran moleküller üzerinde bulunur. Örnek olarak, A,C,E vitaminleri, polifenoller, glutatyon (GSH) ve koenzim Q10 verilebilir. Enzimatik sistemler, metabolik olarak ROS'u detoksifiye eden spesifik enzim bileşenleridir. Bunlara; ROS'u yok etmede, savunmada öncelikli olarak bulunan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon reduktaz, tioredoksin sistemler, peroksiredoksinler, sülfiredoksinler ve sitokrom c örnek verilebilir (Ramis ve ark., 2015, Memişoğulları, 2005, Resim 4)

Antioksidanlar aynı zamanda moleköl ağırlıklarına göre ve endojen ya da ekzojen ajanlar olarak kendi içinde sınıflandırılabilirler Ekzojen antioksidan maddeler doğal veya sentetik olabilirler. İnsan sağlığı ve çeşitli hastalıkları için önemli antioksidanlar tablo 16 ve 17'de belirtilmektedir (Saso ve ark., 2014).



Resim 4: Serbest Radikallerin oluşumu ve enzimatik detoksifikasyonu (Memişoğulları, 2005).

Tablo16:En yaygın endojen antioksidanlar ve molekül ağırlıklarına göre sınıflandırılması

Endojen ve düşük molekül ağırlıklı olanlar	Endojen ve yüksek molekül ağırlıklı olanlar	
	Enzimatik Olanlar	Enzimatik Olmayanlar
Glutatyon	SOD	Albumin
Koenzim Q10	Katalaz	Transferrin
Ürik asit	GPx	Seruloplazmin
Melatonin	Peroksiredoksin	Metallotioneinler
Bilirubin	Tiyoredoksin sistem	
Biliverdin	Glutatyon	
	S- transferaz	
	Hem oksijenazlar	

Tablo17: En yaygın ekzojen antioksidanlar ve molekül ağırlıklarına göre sınıflandırılması

Ekzojen ve düşük molekül ağırlıklı olanlar		Ekzojen ve yüksek molekül ağırlıklı olanlar
Doğal Olanlar	Sentetik Olanlar	
*Tokoferoller, Ascorbik asit, Beta karoten.	*Tiolik ajanlar (N-Asetil sistein) *Ederavon, idibenon *PBN, NXY-059	*Pegilate- SOD *Polifenolik Polimerler
*Flavonoidler gibi polifenoller	*Trilazad, U83836E (lazaroidler) *SOD mimetikler	
*Resveratrol	*Epselen (GPx mimetikler)	
*Alfa lipoik asit	*Ksantin oksidaz inhibitörleri (Alloprinol)	
*Sülforafen	*NOX inhibitörleri (Aposinin, triazoloprimidinler)	

Bu antioksidan maddeler, genel olarak, oksidan moleküllerin sebep olduğu hasarı, hem hücre içi hem de hücre dışındaki bir takım savunma mekanizmalarıyla etkisiz hale getirmektedirler. Bunların kısaca;

- ✓Direkt antioksidan etki
 - ✓Antioksidan enzimlerin düzenlenmesi
 - ✓Antioksidan enzimleri taklit etme
 - ✓Prooksidan enzim inhibisyonu
 - ✓Düşük molekül ağırlıklı endojen antioksidanların rejenerasyonu
- gibi etkileri bulunmaktadır (Saso ve ark., 2014).

2.10.3. Oksidatif Stres

Serbest radikallerin, bağışıklılık sistemindeki hücrelerin savunması için ve birikmesine izin verilmeden biyolojik fonksiyonlarda kullanıldığı belirtilse de, aşırı üretimi ve antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz kalması sonucu dengenin bozulması durumunda, moleküllerden elektron alma yeteneği sayesinde serbest radikaller; lipid, protein, ve DNA gibi hayati önemi olan bileşiklerin yapılarını bozarak, dokuda hasar oluşmasına, lipid peroksidasyonu'na, hücrelerde bozukluk meydana

gelmesine ve ayrıca hücre ölümüne yol açabilmektedir (Altan ve ark., 2006; Halliwell, 1991). Buda oksidatif stres denilen kompleks bir olayın oluşmasına neden olmaktadır.

Oksidatif stres aşağıdaki durumlarda;

- Reaktif oksijen radikallerin aşırı salınımı,
- Küçük molekül ağırlıklı antioksidanların rezervlerinin tüketilmesi,
- Antioksidan enzimlerin inaktif olması,
- Antioksidan enzimlerin ve küçük molekül ağırlıklı antioksidanların

üretilmesinde azalma,

•ya da bunların iki veya daha fazlasının kombinasyonu sonucunda oluşmaktadır (Lushchak, 2014).

Oksidatif fosforilasyonda ATP üretiminden ve elektron transfer zincir reaksiyonlarının işleyişinden büyük oranda sorumlu olan mitokondri de, meydana gelen fonksiyon bozukluğu ve serbest radikallerin aşırı artışıyla meydana gelen oksidatif stres; ateroskleroz ve kalp yetmezliği gibi kardiyovasküler hastalıklarda alzheimer, parkinson gibi nörolojik hastalıklarda, kanser de, romatoid artrit gibi romatizma hastalıklarında, iskemi- reperfüzyon hasarı, obezite, DM ve yaşlılık gibi durumların patofizyolojisinde önemli rol oynamaktadır (Ramis ve ark., 2015; Saso ve ark., 2014).

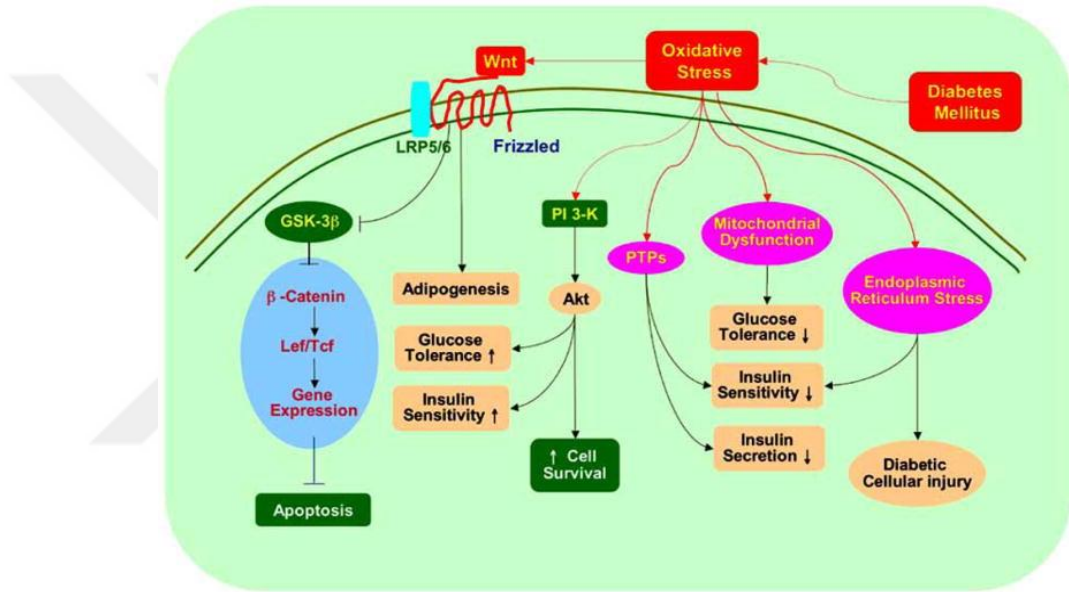
2.10.4.Diyabet ve Oksidatif stres

DM, dünyada hızla yayılan ve insidansı gün geçtikçe artan metabolik bir hastalık olmasıyla beraber, diyabette artmış bir oksidatif stres durumu da söz konusudur. Bu da, serbest radikallerin aşırı artması ve bunu kontrol eden antioksidan enzim ve enzimatik olmayan maddelerin fonksiyonundaki yetersizlik sonucu meydana gelmektedir. Beraberinde oksidan- antioksidan dengesi bozulmakta ve böylelikle hücre ve dokularda yapısal bir çok yıkım meydana gelmektedir ve bu bağlam da, DM'ye bağlı bir takım erken ve son dönem komplikasyonların oluşmasına neden olmaktadır (Memişoğulları, 2005, Anjenayelu ve Chopra, 2004; Aksoy ve ark., 2003).

Hiperglisemi, antioksidan enzimlerin enzimatik olmayan glikasyonu ve glikoz oto-oksidasyonu, metabolik stres ve iskemi reperfüzyon

sonucunda oluşan doku hasarı, serbest radikal üretiminin artmasına neden olmaktadır. Ayrıca, bu durum, oksidatif stresin oluşum hızını artırabilir ve antioksidan savunma sistemini zayıflatabilir (Altan ve ark.,2006; Ha ve Kim, 1995; Maiese ve ark., 2007).

Mitokondri diyabette, oksidatif stresin oluşmasında önemli bir kaynaktır. Oksidatif stres, mitokondriyel disfonksiyona neden olmakta, beraberinde glikoz toleransını, insüline olan hassasiyeti azaltmakta ve insülin salınımını zayıflatmaktadır. İlave olarak ise diyabetik hücre ve doku hasarına yol açmaktadır (Resim 5, Maiese ve ark., 2007).



Resim 5: Diyabet ve Oksidatif Stres (Maiese ve ark., 2007, Erişim Tarihi: 12.10.2015)

DM’li hastalarda oksidatif stres göstergeleri artmaktadır ve serbest radikal yakalayıcı SOD, katalaz, GPx, glutatyon, E ve C vitamini gibi antioksidanların seviyelerindeki düşüş oksidatif stres hasarının etkisi artırmaktadır (Memişoğulları, 2005).

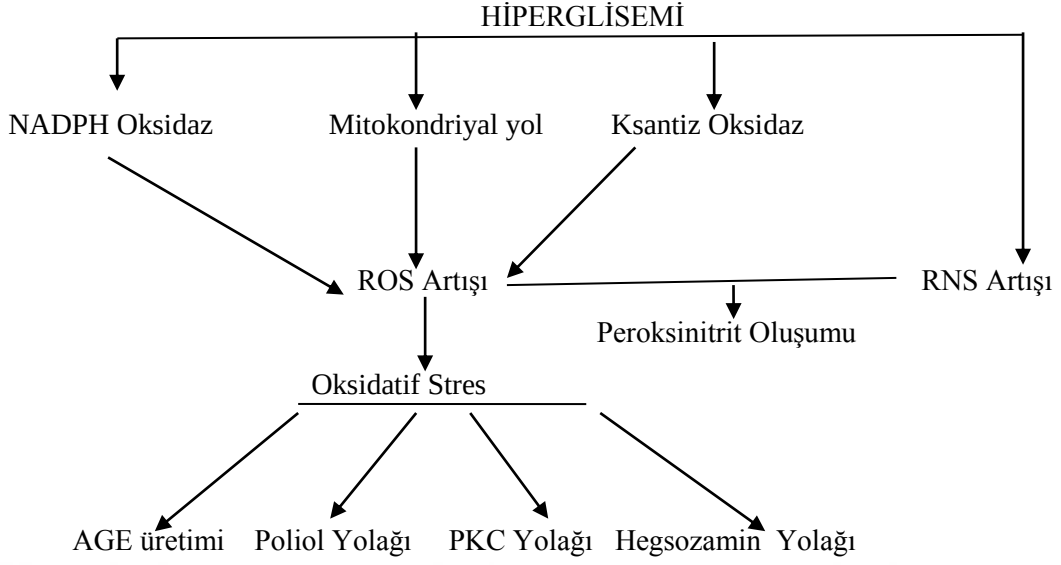
Diyabetik hücre hasarı ve insülin direnci gelişmesi, hücresel oksidatif stres ile yakın ilişki içerisindedir. DM’li hastalarda artan seruloplazmin seviyesi, reaktif oksijen türlerinin arttığını göstermektedir ve akut glikoz dalgalanmaları, oksidatif stres oluşma riskini artırabilir. Hücresel glikoz düzeyinin artması sırasında antioksidanlar, serbest radikal

üretimini durdurabilir ve DM’li hastalarda ROS üreten ileri glikasyon son ürünleri’nin (AGEs) üretimini önleyebilir. AGEs, hiperglisemi durumu meydana geldiğinde artarak meydana gelen heterojen bileşik gruplarıdır. Bundan dolayı, tip 2 diyabetin ve diyabet komplikasyonlarının patogenezinde rol oynadığı bildirilmektedir. İlave olarak ise, oksidatif stresin, insülin hassasiyetini azaltarak ve pankreasta insülin üretimine hasar vererek DM’nin başlamasını doğrudan artırabildiği belirtilmektedir (Maiese ve ark., 2007; Nowotny ve ark., 2015).

DM, pankreas beta hücrelerden salgılanan insülinin eksikliği ve yetersizliği sonucu meydana gelmektedir. Kc, böbrek, iskelet kası ve adipoz gibi organ ve dokularla karşılaştırıldığında, antioksidan enzim ekspresyonu çok daha düşük olduğundan dolayı, pankreasta bulunan beta hücreler, oksidatif stres yönünden çok hassastır (Altan ve ark., 2006). Diyabet oluşturmada kullanılan kimyasal ajanlardan N- nitroso türevi streptozotosin’in pankreas langerhands adacıklarını oksidan maddeler oluşturarak harap edip nitrik oksit yanıtını bozarak diyabet oluşumuna yol açtığı belirtilmektedir (Altan ve ark.,2006; Houslay, 1991; Das ve Chainy, 2001).

DM’de hiperglisemi; NADPH oksidaz, ksantiz oksidaz ve hücresel mitekondri yolaklarını indükleyerek reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türlerinin (RNS) üretimini artırmakta ve oksidatif stresi meydana getirmektedir. Ayrıca, protein kinaz C (PKC), poliol, hegzosamin gibi bir çok yolağı ve ileri glikasyon son ürünlerini (AGE) aktive etmektedir (Zu ve ark.2011,; Nowotny ve ark., 2015; Singh ve ark., 2015) (Şekil 9, Zu ve ark., 2011; Erişim tarihi: 12.10.2015)

Bir doku toksini gibi işlev gören sorbitol üretimine neden olan poliol yolağının işleyişinde NADPH önemli rol oynamaktadır. Okside glutatyonun redükte forma dönüşebilmesi ve nitrik oksit sentezi için NADPH gereklidir. Sorbitol yolunun aktif olması ve burada NADPH’ ın kullanılması antioksidan etkinliği yavaşlatan bir durumdur ve NO sentezinin azalması, diyabetin mikro ve makro vasküler komplikasyonlarının ortaya çıkmasında büyük rol oynamaktadır (Altan ve ark.,2006).



Şekil 9: Hiperglisemi ve oksidatif stres ilişkisi

2.11.FRANSIZ SAHİL ÇAMI EKSTRESİ'NİN GENEL ÖZELLİKLERİ

2.11.1. Fransız Sahil Çamı'nın Genel Özellikleri

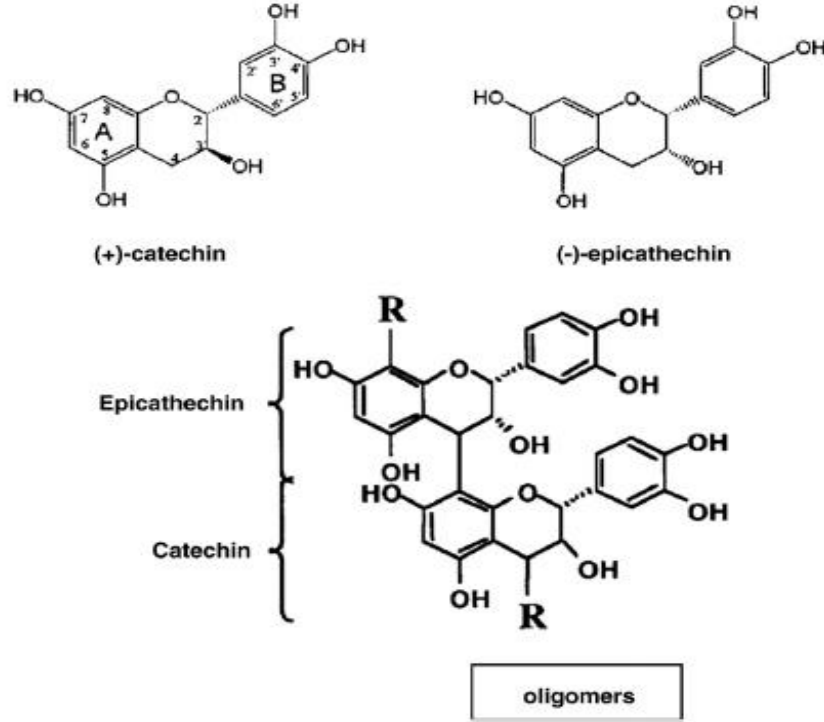
Fransız Sahil Çamı (FSC), taksonomik olarak incelendiğinde, tohumlu bitkilerin kozalaklı bitkiler alt bölümünün içerisinde 100'den fazla türü barındıran *Pinaceae* (Çamgiller) familyasına ait olup, *Pinus* cinsine dahildir ve FSC'nin latince adı, *Pinus pinaster* ya da *Pinus maritima* olarak belirtilmektedir (Maimoona ve ark., 2011).

FSC, parlak kırmızı-kahverengi renkte derin çatlaklı kabukları olan 30 metre'ye kadar uzayabilen, orta boylu bir çam ağacıdır. Karşılıklı İğne yaprakları bulunan FSC'nin, 2 cm uzunluğunda ve kahverengi renkte oval şekilli kozalakları bulunmaktadır (Maimoona ve ark., 2011).

Bu tür, Akdeniz'in batı ve kuzeybatı bölgelerinde doğal olarak bulunurken; Amerika, İngiltere, Güney Afrika ve Avustralya gibi ülkelerde de yaygın bulunmaktadır. Dünyanın en büyük insan yapımı ormanı olan ve Fransa'nın güneybatısındaki Atlantis kıyılarında bulunan 900 bin hektarlık bir alandaki Les Landes bölgesinin neredeyse tamamında doğal FSC bulunmaktadır (Maimoona ve ark., 2011; Packer ve ark., 1999).

2.11.2. Fransız Sahil Çamı Kabuğu Ekstresi

FSC kabuğundan elde edilen ekstre, çeşitli kimyasal gruplardan oluşmaktadır. Genel olarak biyoflavonoidlerin bir karışımı olup, esas olarak oligomerik proantosiyanidinleri (OPS) içermektedir. OPS; kateşin, epikateşin alt birimlerinden oluşmaktadır. İlave olarak da kateşin ve taksifolin monomerlerinin yanı sıra çeşitli fenolik asitleri de içerisinde barındırmaktadır. Fenolik asitler ise; benzoik ve sinnamik asit türevli maddelerdir (Liu ve ark., 2004; Resim 6, D'Andrea, 2010, Erişim Tarihi:22.01.2016).



Resim 6: FSC kabuğu ekstresi' nin kimyasal bileşenleri

FSC ekstresi, kuru ve güneş görmeyen bir yerde tutulup kurutulduğunda kahverengi toz halindedir (Resim 7). Proantosiyanidin bakımından zengin olan FSC kabuğu ekstresi, büyük ölçüde suda çözülebilir. Ekstre, oral olarak alındıktan sonra hızlı bir şekilde emilir ve vücut dokularında hızla dağılır (Maimoona ve ark., 2011)

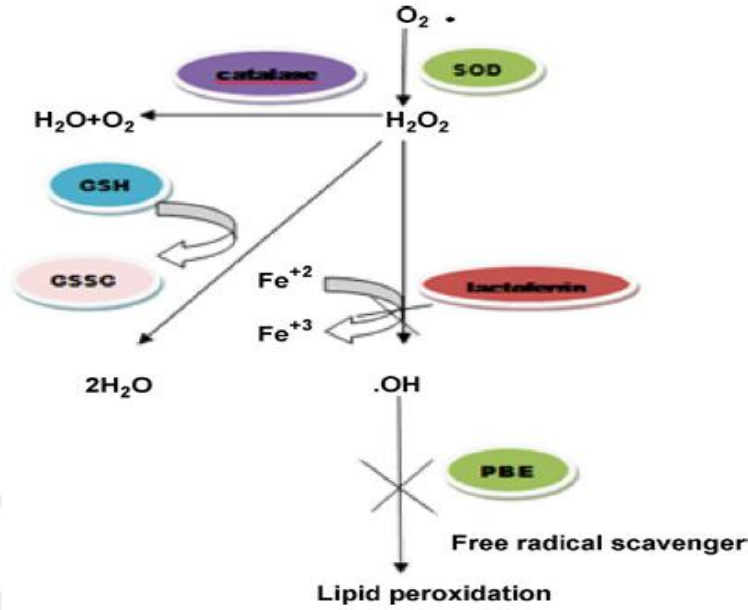


Resim 7: FSC kabuğundan elde edilen ekstre'nin toz görüntüsü (NİKON D80 Dijital Fotoğraf Makinesi)

Zengin OPS İçeriği ile doğal antioksidan ürünler arasında yerini alan FSC ekstresinin önemli etkileri arasında;

- Serbest radikalleri yakalama özelliğinden dolayı antioksidan etki,
 - Anti-inflamatuvar etki,
 - vazodilatör etki (eNOS enzimini stimüle etmek suretiyle)
- gösterdiği belirtilmiştir (Maimoona ve ark., 2011).

Serbest radikal üretiminin artması yada antioksidan savunma sisteminin zayıflaması sonucu oksidan-antioksidan dengesi bozulmaktadır. Bu sebeple vücutta oksidatif stres meydana gelmektedir. Süperoksit ve hidroksil anyonu (HO) gibi serbest radikallerinin meydana getirdiği oksidan etkinin inaktive olması ve singlet oksijen oluşumunun inhibe olması FSC'nin, önemli yararlı etkilerinden bazılarıdır. Bu özelliklerinden dolayı FSC ekstresi, lipid peroksidasyonu'na, tiobarbitürik asit reaktif ürünlerin oluşumuna ve hidrojen peroksit (H_2O_2) indüklü oksidatif hemolize karşı koruyucu etki gösterebilmektedir (Maimoona ve ark., 2011; Iravani ve Zolfaghari, 2011, şekil 10).



Şekil 10: FSC ekstrelerinin serbest radikal yakalayıcı etkisi

Serbest radikaller; immünite, inflamasyon, sinyal transdüksiyon, hücre-hücre adezyonu, hücre proliferasyonu, transkripsiyon ve apoptozis gibi birçok fizyolojik fonksiyonlarda önemli rollere sahiptir. Fakat, vücutta mitokondriyel yıkım, enzim ve oto-oksidasyon reaksiyonları gibi endojen kaynaklı ve sigara, kirlilik, ultraviyole ışık, radyasyon ve ksenobiyotikler gibi ekzojen kaynaklı serbest radikallerin aşırı salınımı, organizma için çok önemli olan DNA, protein, lipid gibi biyomoleküllerde birtakım hasar oluşumuna yol açarak, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar, DM, Alzheimer hastalığı ve kanser gibi çeşitli patofizyolojik durumların oluşumuna sebep olmaktadır (Sathya ve Sidhuraju, 2012; Harsha ve ark., 2013).

Hücrede serbest radikallerini düşük konsantrasyonlara indiren SOD, katalaz, glutayon peroksidaz ve glutatyon redüktaz gibi antioksidan enzimler, diyabet gibi oksidatif stres durumlarında zarar görebilir. Bu antioksidan enzimlerin yeterli fonksiyon gösterememesi durumunda serbest radikallerin miktarı artmaktadır. Bu nedenle kuvvetli serbest radikal yakalayıcı özelliği olan FSC ekstreleri'nin; antiinflamatuvar mekanizmalar

aracılığı ile ROS oluşumuna yol açan, siklooksijenaz (COX), PKC, NADH oksidaz (NOX), lipoksijenaz, ksantin oksidaz ve indüklenebilir nitrik oksit sentetaz (iNOS) gibi enzimlerin aktivasyonunu inhibe ettiği ve oksidatif stresten endojen E vitaminini ve glutasyonu koruma ve askorbil radikalleri üretebilme yeteneğinde olduğu çalışmalarda gösterilmektedir (Maritim ve ark., 2003; Packer ve ark., 1999). Ayrıca FSC ekstresi'nin, serbest radikalleri nötralize etme bakımından C ve E vitaminlerine göre yaklaşık olarak 20-50 kat daha güçlü olduğu bildirilmiştir (Ni ve ark., 2002).

Yüksek oranda içerdiği OPS sayesinde, reaktif oksijen ve nitrojen türlerine karşı serbest radikalleri yakalayıcı etkisinden dolayı, kronik ve dejeneratif bazı hastalıklara karşı koruyucu etkisinin olabileceği bazı çalışmalarda belirtilmektedir (Liu ve ark., 2004; Iravani ve Zolfaghari, 2011; Maritim ve ark., 2003). Ayrıca, ekstrenin vasorelaksan etki, anjiotensin dönüştürücü enzimi (ADE) inhibisyonu ve kapillerin permeabilitesini artırmak gibi kardiyovasküler aktivitelere sahip olduğu rapor edilmiş ve ilave olarak, immün sistem ve NO metabolizması üzerine düzenleyici etkisi bildirilmiştir (Iravani ve Zolfaghari, 2011 ; Maritim ve ark., 2003).

FSC ekstresinin ayrıca, beta-amiloid ya da artmış glutamat toksisitesine karşı sinir hücrelerini koruduğu ve yara iyileşmesini hızlandırdığı, yara izi oluşumunu azalttığı, mast hücrelerinden histamin salınımını azalttığı ve proinflamator sitokinlerin etkilerini inhibe ettiği rapor edilmiştir. Çocuklarda, hiperaktivite ve dikkat eksikliğini azalttığı ve astımlı hastalarda antiinflamatuvar etkisinin olduğu görülmüştür (Iravani ve Zolfaghari, 2011). Ayrıca, oksidatif olarak hasar görmüş proteinlerin birikimini önleyerek Parkinson, Alzheimer ve Huntington gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıkların riskini azaltabilir. Bir çalışma da, FSC ekstresinin streptozotosinle indüklenmiş diyabetik sıçanlarda, glutasyon sentez yolağında GSH ve GSH-disülfid redüktaz (GSSG-R) oranını, endojen antioksidan enzimlerin (SOD, CAT, GSH-Px, GSSG-R) aktiviteleri, ve γ -glutamil transpeptidaz enzim aktivitesini arttırdığını göstermiştir (Maritim ve ark., 2003).

FSC ekstrelerinin, birçok hastalığın tedavisinde kullanılması potansiyelinin yanı sıra, içerdği yüksek oranda OPS özelliğinden dolayı, çeşitli mekanizmalarla DM'de yararlı olabileceğine dair bazı çalışmalar mevcuttur (Liu ve ark., 2004; Iravani ve Zolfaghari, 2011 ; Maritim ve ark., 2003; Schafer ve Högger, 2007).

İleri glikasyon son ürünleri (AGEs) yaşlanma ile doğal olarak birikmektedir ve reaktif oksijen radikallerinin aşırı üretilmesiyle beraber oksidatif stres ve hiperglisemi ile birlikte bu durum hızlanmaktadır (Wu ve ark., 2013). Bu durum reseptörle (RAGEs) etkileşim sonucunda, proinflatuvar ve immün yanıtları artırmaktadır. Ayrıca hiperglisemi; insülin, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve platelet türevli büyüme faktörü (PDGF) gibi endojen koruyucu faktörlerin seviyesindeki düşüşten dolayı, kronik vasküler komplikasyonların oluşmasına yol açmaktadır. İlave olarak DM, yüksek oranda kardiyovasküler hastalıklar, retinopati, nefropati, nöropati ve ayak enfeksiyonu gibi durumlarla yakın ilişki içerisindedir. Bu nedenle, kan şekerinin normal seviyelerde tutulması, diyabetin ilerlemesini azaltmada ve akut ve kronik komplikasyonların oluşumunu önlemede çok önemli bir yere sahiptir (Huang ve ark., 2013).

İçerdği yaklaşık olarak %65-75 oranındaki, çeşitli uzunlukta epikateşin ve kateşin alt birimlerinden oluşan OPS sayesinde, yüksek antioksidan kapasitesinin olduğu bilinmektedir ve yüksek anti inflamatuvar etkisinden dolayı da, FSC kabuğu ekstrelerinin, inflamasyon ve diyabet oluşma risklerini azaltmasıyla ilişkilendirilmektedir (Bang ve Choung, 2014). Ayrıca, son yıllarda yapılan çalışmalarda doğal ürünlerden elde edilen polifenolik bileşenler tarafından kan glikoz seviyesinin, karaciğer lipid birikiminin, adipoz doku ağırlığının ve adipozit boyutunun azalmasına neden olduğu ve bu nedenle glikoz ve lipid metabolizmasını düzenlediği (Bang ve Choung, 2014) ve buna ek olarak, OPS'nin reaktif karbonil yakalayıcı özelliğinden dolayı, AGEs oluşumunu inhibe ettiği bildirilmektedir (Wu ve ark., 2013). Bu nedenlerle DM ortaya çıkan oksidatif stres ve inflamasyonu önleyerek DM bağlı komplikasyonların gelişmesini önleyebilir.

III. GEREÇ-YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanlarının Gruplandırılması

Çalışmada yaklaşık 200-300 gram ağırlığında, 10- 12 haftalık erkek wistar albino türü sıçanlar kullanıldı. Gruplar rastgele oluşturuldu. 8 grupta 8'er adet sıçan ayrıldı. Ayrıca diyabet oluşmayan veya yüksek ölüm riski nedeniyle her grubu için ilave 4 sıçan ayrıldı. Sıçanların bir grubu 8 hafta boyunca normal sıçan yemi ile beslenirken, diğer gruplar, yüksek yağ içerikli yem ile beslendi (Tablo 18).

Tablo 18: Oluşturulan deney grupları, gerekli ve kullanılacak toplam hayvan sayısı

DENEY GRUPLAR	Gerekli Hayvan	Kullanılan Toplam hayvan
Grup I: Kontrol (Standart yem)	12	8
Grup II: Yüksek yağlı diyet (YYD)	12	8
Grup III: YYD+Diyabet kontrol	12	8
Grup IV: YYD+ Diyabet + Metformin (300 mg/kg/gün)	12	8
Grup V: YYD+Diyabet + FSC ekstresi (10 mg/kg/gün)	12	8
Grup VI: YYD+Diyabet + FSC ekstresi (50 mg/kg/gün)	12	8
Grup VII: YYD+Diyabet + FSC ekstresi (100 mg/kg/gün)	12	8
Grup VIII: YYD+Diyabet + FSC ekstresi (50 mg/kg/gün) + Metformin (300 mg/kg/gün)	12	8
Toplam	96	64

Sıçanlar için; gürültüsüz ve ortam sıcaklığının 22±3 °C'de, sıcaklık ve nem kontrolü olan, 12 saat aydınlık (08:00-20:00) ve 12 saat karanlık döngüsü olan bir ortamda barındırılan ratlara çalışma boyunca sıçanların su ve yiyecek alımında bir kısıtlama yapılmadı (Resim 8).



Resim 8: Deney hayvanlarının üçerli gruplar halinde oluşturulması

Gruplandırılan sıçanlar, bireysel olarak takip edilmek üzere, birisi boyasız, diğerleri baş ve kuyruk kısımları bir miktar boya ile boyanarak resim 9'daki gibi yerleştirilmiştir.



Resim 9: Bir kafeste bulunan boyasız, başı ve kuyruk kısmı boyalı sıçanlar

Yem üretici firmadan temin edildi. Yağ içeriği yüksek olan yem, pellet haline gelemediğinden dolayı, hava ile teması kesilecek şekilde poşetlerde vakumlanarak, +4 derecede muhafaza edildi. Yem hayvanlara

yedirileceği zaman, vakumlu ambalajdan yeteri kadar çıkarıldı ve biraz su ile kap içerisinde yoğurularak ve el ile sıkıştırılarak şekil verilip hayvanların rahatça alabilmesi sağlandı.

Tüm sıçanların çalışma başlamadan önce, çalışma esnasında ve bitiminde ağırlıkları ölçüldü.

Sıçanlar, kontrol grubu, YYD grubu, tedavisiz diyabet grubu, 3 farklı dozda tedavili diyabet grubu ve kombine tedavili diyabet grubu olmak üzere 8 gruba ayrıldıktan sonra, tip 2 diyabet modeli oluşturulacak sıçanlar, enerji yüzdeleri %45 yağ, %33,7 karbonhidrat, %21,3 protein olan yüksek yağ içerikli diyet ile 8 hafta süreyle beslendi (Sasidharan ve ark., 2013; Salman ve ark., 2013). Diğer sıçanlar; standart rat yemi beslendi. 4 haftalık diyetin ardından, diyabetik gruptaki sıçanlara, pH' sı 4,5 olan, 0,1 M sitrat tampon içerisinde taze hazırlanmış, 35 mg/kg streptozotosin, intraperitoneal (i.p) olarak enjekte edildi (Akan ve ark., 2014; Mansor ve ark., 2013; Chen ve ark., 2013, Srinivasan ve ark., 2005; Öztürk Z ve ark., 2015).

STZ sonrası, ilk hafta 3.günden sonra (Salman ve ark., 2013), kuyruk veninden rastgele bir zamanda alınan kandan kan şekeri ölçümü (Accu check aktive-Roche, Mannheim, Germany) yapıldı. Kan şekeri düzeyi, 300 mg/dl'nin (1 mmol/l=18 mg/dl) üzerinde saptananlar tip II diyabetik kabul edilerek deney gruplarına alındı (Sasidharan ve ark., 2013). Bu değer altında olan sıçanlara tekrar 1 doz daha STZ i.p. enjekte edildi. Diyabet olmayan sıçanlar, çalışmadan çıkarıldı. Kontrol grubundaki hayvanlara bir kez eşit hacimde i.p. yolla sitrat tamponu (pH:4,5 0,25 ml/kg) enjeksiyonu yapıldı.

FSC ekstresi, STZ enjeksiyonundan sonra, dört hafta süreyle, 3 ayrı grupta sırasıyla 10, 50, 100 mg/kg/gün oral yoldan gastrik lavaj yoluyla FSC ekstresi (Parveen ve ark., 2013; Jankyova ve ark., 2012; Parveen ve ark., 2010; Jankyova ve ark., 2009; Berryman ve ark., 2004) ve 50 mg/kg FSC ekstresi + 300 mg Metformin kombine olarak, resim 10'da görüldüğü gibi oral gavaj yoluyla yapıldı (Salman ve ark., 2013)



Resim 10: Oral gavaj yoluyla ekstre ve ilaçların verilmesi(NİKON D80 Dijital Fotoğraf Makinesi)

3.2. Kan ve Doku Örneklerinin Ölçüme Hazır Hale Getirilmesi ve Saklanması:

Hayvanlar, 2 aylık beslenme sonrası 12 saat açlık sonrası, i.p. ketamin (75 mg/ kg) ve ksilazin (10 mg/ kg) anestezisi altında (resim 11) göğüs kafesi açılarak kalp boşluğundan (İssi ve Gül) kan alındı. Santrifüje edildi (10 dakika, 3000 devir), elde edilen serumun bir kısmı, açlık kan glukozu, trigliserid, total kolesterol, yüksek dansiteli lipoprotein (HDL), düşük dansiteli lipoprotein (LDL) tayini için, diğer kısmı ise ELİSA yöntemiyle insülin, malondialdehit (MDA), c-reaktif protein (CRP) ve nitrat nitrik ölçümleri için -80 °C'de dondurularak saklandı. Kalpten alınan kanın bir kısmı ise EDTA'lı mor tüpe konarak, HbA1C ölçülmek üzere serumu ayrılmadan günlük çalışıldı.



Resim 11: Anestezi sonrası kalpten kan alınması (NİKON D80 Dijital Fotoğraf Makinesi)

İzole organ deneylerinde kullanılmak üzere, hayvanın torasik aorta'sı izole edildi. Histopatolojik çalışmalar için, böbreği ve pankreas alındı ve %10 formaldehit içerisinde fikse edildi; biyokimyasal parametre olan lipid peroksidasyonun göstergesi MDA düzeyi için ise, diğer böbrek, alüminyum folyo içerisinde alındı ve biyokimyasal çalışmalar için -80 dereceye kaldırıldı.

3.3. Damar Yanıtlarının İncelenmesi:

Torasik aorta hayvandan izole edilerek hızla; 119 mM NaCl, 4,7mM KCl, 1,5 mM MgSO₄ 1,2 mM KH₂PO₄, 2,5 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃ ve 11 mM glikozdan oluşan ve 7,4 pH'da önceden gazlandırılmış ve hazırlanmış Krebs-Henseleit çözeltisi içeren petri kabına alındı. Damar çevre bağ dokularından dikkatli bir şekilde temizlendi. İyice temizlenen aort şeritleri, 3-4 mm'lik parçalar halinde ayrılır. 3-4 mm'lik aort halkaları hızlı bir şekilde 37 °C de sürekli % 95 O₂ ve %5 CO₂ ile gazlandırılan Krebs-Henseleit solüsyonu içeren organ banyolarına asıldı. Her Hayvanın

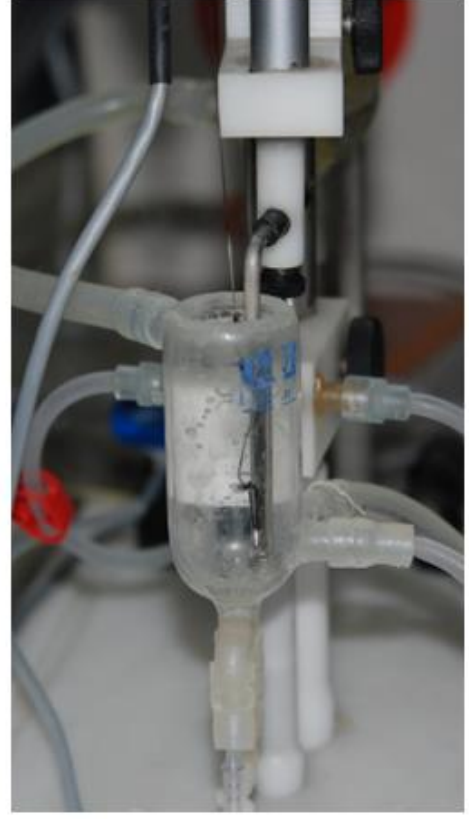
aortasından 2 ayrı parçaya ayrılarak izole organ banyosuna asıldı. Asılma işlemleri sırayla (resim 12, resim 13 ve resim 14);



Resim 12: Sıçanlardan deney esnasında izole edilen torasik aorta ve sabitlenmesi (NİKON D80 Dijital Fotoğraf Makinesi)



Resim 13: Sıçanlardan deney esnasında izole edilen torasik aortanın çevre bağ dokulardan temizlenmesi (NİKON D80 Dijital Fotoğraf Makinesi)



Resim 14: İzole organ banyosuna temizlenen torasik aortanın asılması (NIKON D80 Dijital Fotoğraf Makinesi)

1. Aort uygun kanca yardımıyla, dokuya hasar vermeden, izomerik transdüserlere bağlandı.
2. Bazal gerilim 1 gram olacak şekilde ayarlandı ve veriler tüm deney boyunca data acquisition system (MP 150 Biopac Systems, Ankara, Turkey)' e kaydedildi.
3. İzole organ banyosundaki doku 15 dakikada yıkandı. Bu şekilde bir saat dinlenen organ, bu sürenin sonunda kümülatif dozda fenilefrin (10^{-9} M – 10^{-5} M) ile kasılma yanıtları elde edildi ve kayıtlar kaydedildi. Elde edilen kayıtlardan sub maximal fenilefrin dozu tespit edildi.
4. Fenilefrin ile kasılma yanıtlarının alınmasının ardından banyolar 15 dakikada bir yıkandı. Aort dokusu 60 dakika dinlenmeye bırakıldı.
5. Bir saat sonunda organ submaksimal fenilefrin konsantrasyonu ile kasıldı. Submaksimal kasılma elde edildikten sonra (10^{-6}), kümülatif

dozlarda asetilkolin (ACh) (10^{-9} M – 10^{-5} M) banyoya eklenerek gevşeme yanıtları kaydedi. ACh ile elde edilen gevşeme yanıtlarının alınmasının ardından doku 15 dakikada bir yıkanarak aort halkalar 1 gram gerilim altında dinlenmeye bırakıldı.

6. Bu 1 saatlik dinlenme sonrasında izole organ banyosundaki aort dokusuna submaksimal fenilefrin ilave edildi. Submaksimal kasılma elde edildikten sonra (10^{-6}), kümülatif dozlarda Na nitroprusid (SNP) 10^{-9} M – 10^{-5} M konsantrasyonlarda banyoya ilave edildi. Fenilefrin kasılması sonrasındaki gevşeme yanıtları sistem aracılığı ile kaydedildi.

7. SNP ile elde edilen gevşeme yanıtları sonrası banyodaki solüsyon 15 dakikada bir boşaltılıp yeniden dolduruldu. 1 saat doku dinlenmeye bırakıldı.

8. Yıkama ve dinlenme periyodunun ardından endotele bağımlı olduğunu göstermek için, nonspesifik bir NOS inhibitörü olan L-NAME (N^G -nitro-L-arjinin metil ester) 10^{-4} M dozunda organ banyosuna tek defada eklendi. Ardından banyoya submaksimal fenilefrin konsantrasyonda (10^{-6} M) ilave edilip bir ön kasılma oluşturularak damarların kasılma yanıtları kaydedilir. Daha sonra kümülatif dozlarda ACh (10^{-9} M- 10^{-5} M) eklendi (Ölmez ve ark., 2015; Roghani-Dehkordi ve ark., 2015; Gürpınar ve Gök, 2012; Park ve ark., 2003).

3.4.Homojenizasyon işlemleri:

Böbrek dokuları hızlıca soğuk izotonik su ile yıkanıp, alüminyum folyoya sarıldıktan sonra, lipid peroksidasyonun göstergesi MDA ve protein tayini yapılana kadar -80°C derin dondurucuda saklandı.

Yaş ağırlıkları 1 gr olarak ayarlanan dokular soğukluğu muhafaza edilerek makasla küçük parçalara ayrılıp, cam tüpe aktardı. Doku üzerine 2 ml Tris-HCl tamponu eklendi. Homojenizasyon tampon çözeltisi günlük hazırlandı. Buz doldurulmuş plastik kap içerisine yerleştirilen cam tüpteki doku 16.000 devir/dakika hızda homojenize edildi. Son hacim doku ağırlığının 10 katı olacak şekilde tampon solüsyonu ilave edildi. Doku tekrar homojenize edilerek Homojenatın ısısı artırılmadan ependorf tüplerine aktarılarak üzeri numaralandı. Yaş doku ağırlığı ve ilave edilen tampon

miktarları kaydedildi. Elde edilen homojenatlar, 3220 rpm / 30 dakika +6 °C soğutmalı santrifüjde santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. Alınan süpernatantdan MDA ve protein tayinleri yapıldı.

3.5. Protein tayini:

Alkali çözeltide bakır-protein kompleksi oluşmaktadır. Bu kompleks fosfomolibdat-fosfotungstat reaktifini (Folin-Ciocalteu-Phenol reaktifi) redükler ve koyu mavi bir renk oluşur (Lowry, 1951). Folin reaktifinin ilavesinde şunlara dikkat edilmesi gerekir. Bu reaktif sadece asit ortamda dayanıklıdır. Fakat ifade edilen bu redükleme ise pH 10 da oluşmaktadır. Bu yüzden folin reaktifi süratle alkali bakır-protein çözeltisine ilâve edilmeli ve vortekslenmelidir. Bu uygulama ile fosfomolibdat-fosfotungstat (folin) reaktifi parçalanmadan önce redüklenme olayı gerçekleştirildi.

A reaktifi: 0,5 gr $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve 1 gr Na_3Sitrat (susuz) 100 mL distile suda çözüldü,

B reaktifi: 20,0 gr Na_2CO_3 ve 4 gr NaOH , 1 L distile suda çözüldü,

C reaktifi: 50,0 mL B çözeltisine 1 mL A çözeltisi ilave edildi. A ve B reaktifleri hazırlandıktan sonra, numune sayısına göre C reaktifi hazırlanıp bekletilmeden kullanılmalıdır.

D reaktifi: (Phenol-Folin-Ciocalteu reaktifi): 1 / 1 (v / v) oranında distile su ile seyreltilmelidir.

Ağzı kapaklı 5 ml tüplere, 2,5 ml C reaktifi eklenir. 10µl numune üzerine 490 µl distile su eklendi. Kör tüpüne 500 µl distile su eklendi. Vortekslenip 10 dakika beklendi. Bu Süre sonunda 250 µl D reaktifi eklendi. Tüpler vortekslendi, 20-30 dakika oda ısısında inkübe edildikten sonra 700 nm’de numunenin ve standardın absorbansı köre karşı absorbansı spektrofotometre ile okundu.

Protein (mg/mL) = grafikten okunan değer x F

F (faktör) = standart hacmi (0,5 mL) / numune hacmi (0,010 mL) = 50

Faktör, kullanılan numunenin miktarına göre değişir. Kullanılan numunenin miktar değişikliği, distile su hacminde azaltma yapılarak tüplere pipetlenir. Yani standart hacim (numune + distile su) 500 µL’dir.

3.6. Böbrekte MDA Ölçümü:

Böbrek homojenatlarında MDA düzeyi, spektrofotometrik olarak ölçüldü. Wasowicz ve arkadaşlarının (Wasowicz, 1993) metodu yardımı ile, asidik ortamdaki tiobarbitürik asit ile 95 °C'de reaksiyona giren malondialdehit (MDA), pembe renkli bir kromojen oluşturur. Bu kromojenin n-butanol ekstraktı floresans spektrofotometrede ekstinksiyon 525 nm, emisyon 547 nm dalga boylarında ölçülür. Hazırlanan (standart olarak 1,1,3,3-tetramethoxypropane kullanılır) MDA standart grafiği eğimi kullanılarak numune MDA miktarları tayin edildi. Bu rengin şiddeti ortamdaki MDA ile orantılıdır. 1 ml deiyonize su, 50 µL homojenat, 1 ml TBA çözeltisi tüplere eklenir. 36 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda 25 µL HCl ve 3,5 mL n-Butanol eklendi. Bu solüsyon vortekslenip 1500 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki bütanol fazı alınarak Excitation: 525 nm, emission: 547 nm olacak şekilde spektrofluorometre yardımı ile okundu (Fernandez ve ark., 1997; Garcia ve ark., 2005).

3.7.Kanda Açlık Kan Şekeri, HbA1C, Total Kolesterol, Trigliserid, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol, Üre ve Kreatinin Seviyelerinin Ölçümü:

Deney hayvanlarından alınan kan örneklerinde açlık kan şekeri (AKŞ), total kolesterol, trigliserid, LDL-kolesterol, HDL-kolesterol, üre ve kreatinin düzeyleri, CBÜ Hafsa Sultan Hastanesi Biyokimya laboratuvarındaki Beckman Unicell DXC 800 otoanalizörü kullanılarak enzimatik olarak ölçüldü. Ayrıca, HbA1C düzeylerine de günlük tam kanda bakıldı.

AKŞ ölçümlerinde, glukozoksidaz- peroksidaz (GOD-POD) ölçüm prensibi kullanıldı. Bu ölçüm metodunda glikoz, glukozoksidaz enzimi aracılığı ile oksidasyona uğramaktadır ve glukonik asit ile hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşmaktadır. H_2O_2 , fenol ve ampiron gibi maddelerle peroksidaz enzimi varlığında reaksiyona girerek renkli bir kompleks oluşturmaktadır. (Halifeoğlu ve ark., 2005).

Total kolesterol ölçümü için, kolesterol oksidaz-peroksidaz ölçüm metodu kullanıldı. Bu metot da kolesterol, enzimatik olarak kolesterol esteraz ve daha sonra kolesterol oksidaz, kolesterol peroksidaz enzim serilerinin de etkisiyle kırmızı renk oluşumuna neden olan kinomine dönüşmektedir. Oluşan renkli bileşik 540 nm’de tayin edildi (Halifeoğlu ve ark., 2005).

Serum trigliserid seviyelerinin ölçümünde ise, gliserol fosforik asidoksidaz- peroksidaz ölçüm yöntemi kullanıldı. Bu metotta, trigliseridler lipoprotein lipaz enzimiyle, gliserol ve yağ asidlerine dönüşmektedir. Daha sonra gliserolkinaz ve gliserofosfatoksidaz enzimlerinin etkisiyle renkli bir bileşik oluşturmaktadır. TG düzeyi; oluşan bu son renkli bileşiğin konsantrasyonu 520 nm’de ölçüldü (Halifeoğlu ve ark., 2005).

HDL-kolesterol ölçümleri magnezyum iyonlarının varlığında fosfotungustik asit ile çöktürme yöntemine göre yapıldı. LDL- kolesterol ölçümleri ise Friedwald formülü kullanılarak hesaplandı.

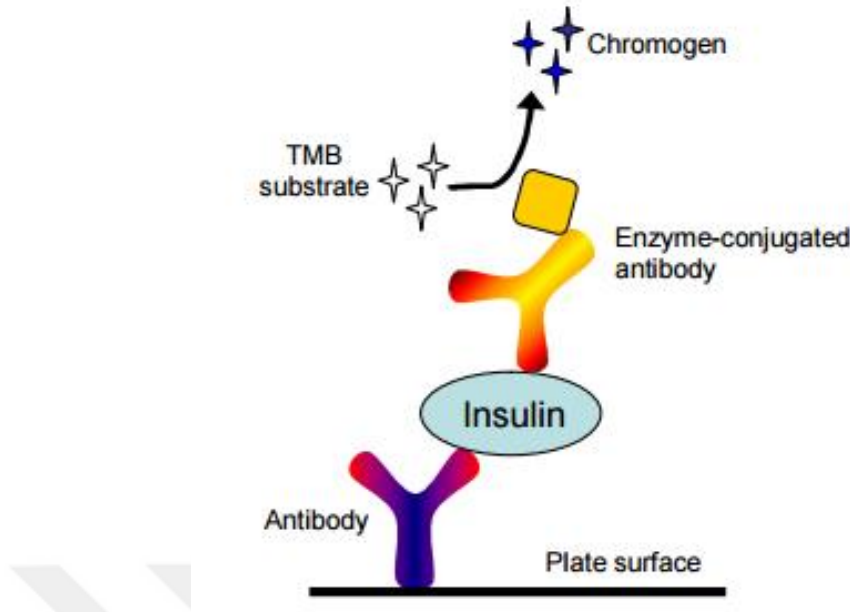
Böbrek fonksiyonları için kanda üre ve kreatinin düzeylerine bakıldı.

Açlık kan şekeri ve insülin değerlerinin elde edilmesinden sonra, tip 2 diyabetin belirteçlerinden olan insülin direncinin göstergesi olan HOMA-IR (Homeostase model assessment- insülin resistance) seviyesi hesaplandı. Hesaplamak için; “HOMA-IR: Plazma glikoz (mg/dl) X açlık insülin (mIU/L)/ 405” formülü kullanıldı (Ghiasi ve ark., 2015).

3.8 İnsülin Seviyelerinin Ölçümü:

Çalışmada insülin düzeyleri sıçana özel rat insülin kiti (YEHUA-YHB0584Ra, SHANGHAI) ile ELISA yöntemiyle ölçüldü. Bu yöntemde sandwich ELISA tekniği kullanıldı (Resim 15, Scont)

Kitin analitik sensitivitesi, 0.05 mIU/L, ölçüm aralığı 0.1-40 mIU/L, intra-assay varyasyon katsayısı (CV) değeri < %10, inter-assay CV değeri < %12 olarak katalogda bildirilmiştir.



Resim 15: Sandwich ELİSA Yöntemiyle İnsülin Seviyesi Ölçümü

3.9. Serumda MDA Seviyelerinin Ölçümü:

Deney kan örneklerinin serumlarından MDA düzeyini belirlemek için, ELISA yöntemiyle ticari rat insülin kiti (YEHUA- YHB0708Ra, SHANGHAI) kullanılarak ölçüldü.

Kitin analitik sensitivitesi, 0.01 nmol/ml, ölçüm aralığı 0.05-10 nmol ng/ml, intra-assay CV değeri < %10, inter-assay CV değeri < %12 olarak katalogda bildirilmiştir.

3.10. Serum CRP Seviyelerinin Ölçümü:

Çalışmada CRP düzeyleri, ELISA yöntemiyle sıçana özel rat CRP kiti (YEHUA- YHB0282Ra, SHANGHAI) ile ölçülmüştür. Bu yöntemde sandwich ELISA tekniği kullanılmaktadır.

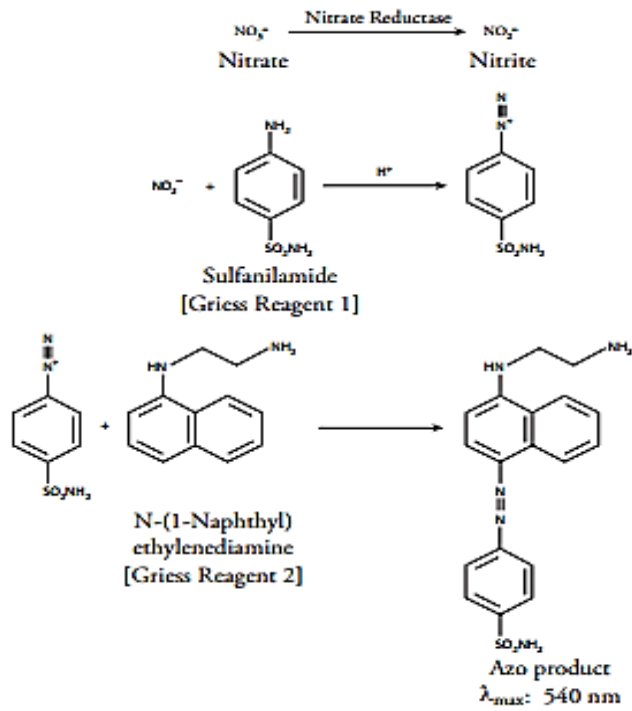
Kitin analitik sensitivitesi, 1,53 pmol/L, ölçüm aralığı 3-900 ng/ml, intra-assay CV değeri < %10, inter-assay CV değeri < %12 olarak katalogda bildirilmiştir.

3.11. Serum Nitrat/Nitrit Seviyelerinin Ölçümü:

Sıçan serumunda total nitrat/nitrit konsantrasyonu ölçümü için, nitrat/nitrit kolorimetrik test kiti (Cayman chemical, 780001, USA) kullanıldı.

Kitin intra-assay CV değeri < %2,7, inter-assay CV değeri < %3,4 olarak katalogda bildirilmiştir.

Bu testte iki adım bulunmaktadır. İlk adımda nitratın nitrite, nitrat reduktaz ile çevrilmesini baz almaktadır. İkinci adımda Griess reaktiflerinin eklenmesidir (resim 16). Nitrit, griess diazotizasyon reaksiyonu sonucu oluşan mor renkli bileşik ile tespit edildi ve miktar absorbansı 540 nm olan spektrofotometri ile ölçüldü. Nitrat/nitrit standartları kullanılarak standart bir eğri elde edildi. Elde edilen nitrat/nitrit değerleri, bu standarta göre hesaplandı (Csonka ve ark., 2015; Cayman, 2015).



Resim 16: Nitrit/Nitrat ölçümünün genel prensibi

3.12. Histopatolojik Çalışmalar:

Pankreasta; hemotoksilen-eozin ve immünohistokimyasal olarak insülin antikoru kullanılarak, adacık sayı ve büyüklükleri değerlendirildi.

Böbrekte ise; böbrek hasarının değerlendirilmesi için hemotoksilen-eozin ve immünohistokimyasal olarak anti-megalin ve anti-TGF beta-1 antikorları kullanıldı.

3.12.1. Parafin doku takibi:

%10 formalinde tespit edilen böbrek ve pankreas örnekleri, fiksatiflerin uzaklaştırılmaları amacıyla 1 gece akar su altında yıkandıktan sonra, dehidratasyon amacıyla 30'ar dakika %60'dan %100'e artan etil alkol serilerinden geçirildi. Ardından 15 dakika 1:1 oranında ksilen-alkol karışımına ve şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki değişim ksilene tabi tutuldu ve 60°C'lik etüv içersinde 15 dakika 1:1 oranında ksilen-parafin uygulanıp 60'ar dakika iki değişim parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra dokular parafin bloklar içerisine gömüldü.

3.12.2. Hemotoksilen-eozin boyaması:

Rotary mikrotom (RM 2135, Leica) aracılığı ile alınan 5 µm'lik parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bırakıldıktan sonra, 30'ar dakika iki değişim ksilene tabi tutuldu. Ardından rehidratasyon işlemi için %95'den %60'a azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 5 dakika akan su altında yıkandı. Ardışık kesitlere Hematoksilen-Eozin boyamaları uygulandı. Boyamanın ardından sırasıyla %80 ve %95'lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı. Işık mikroskopunda incelenerek gruplar arasındaki farklılıklar değerlendirildi.

3.12.3. İndirekt immunohistokimya boyaması:

Alınan kesitler immunohistokimyasal boyama için bir gece 60 C°'lik etüvde tutulduktan sonra, 30'ar dakika iki saat değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından %95'ten %60'a azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak suda 5 dakika bekletildi. Dakopen (IM3580, Immunotech, France) ile sınırlandırılan % 0,5'lik tripsin solüsyonu içinde oda sıcaklığında 15 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk %3'lük H₂O₂ uygulandı. 3 defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu (PBS; Posphate buffer solution) ile yıkanan kesitlere bloklama amacıyla 1 saat bloklama solusyonu (TA-125-UB, Lab Vision, Fremont, CA) ile muamele edildi. Bloklama solusyonu

dokudan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikorlar anti-insülin, anti-Megalin ve anti-TGF beta-1 ile bir gece inkübe edildi.

Ertesi gün tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler, anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz ikincil antikor (85-9043 Zymed Histostain kit San Francisco, USA) ile 30'ar dakika boyandı. Yine üç defa 5'er dakika tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler, oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla DAB ile 5 dk boyandı. Mayer's hematoksilen (72804E, Microm, Walldorf, Germany) ile artalan boyaması sağlandıktan sonra distile su ile 10 dk yıkanan kesitler kapatma medyum (AML060, Scytek, Logan, Utah, USA) ile kapatıldı. İmmunohistokimyasal değerlendirme incelenerek zayıf (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak değerlendirildi.

Dokuların histolojik takibi sırasında bölümümüzde prensip olarak dokular iki aşamalı olarak takibe alınmaktadır. Herhangi bir aksaklık ihtimaline karşılık dokular iki kısma ayrılarak iki ayrı günde takip edilmektedir.

3.13. İstatiksel Analizler:

İstatistiksel analizler, IBM SPSS İstatistics 22.0 for windows programı kullanılarak yapıldı. Veriler, n sayıdaki deneyin aritmetik ortalaması $\pm$ standart hata (SH) olarak gösterildi. p değerinin 0.05'den küçük olması durumunda, değerler arası farklılık istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Gruplar arası farklılık olup olmadığı, parametrik ve normal dağılıma uyan ölçümler için tek yönlü varyans analizi ile; parametrik olmayan veya normal dağılıma uymayan ölçümler için Kruskal-Wallis testi ile saptandı. Gruplar arasında fark olması durumunda, hangi gruplar arasında fark olduğunu tespit etmek için yapılacak çoklu karşılaştırma testi olarak ise; parametrik ve normal dağılıma uyan ölçümler için ANOVA Tukey HSD testi, parametrik olmayan veya normal dağılıma uymayan ölçümler için Mann-Whitney U testi uygulandı. İmmünhistokimyasal boyamalar ya da aritmilerle ilgili insidanslar arasındaki farklılık ise, "Fisher's exact" testi ile değerlendirildi.

IV. BULGULAR

4.1. Deney Hayvanlarında Gözlenen Bulgular

Deneyin başlangıcından bitimine kadar, 8 hafta boyunca normal yem ile ve yüksek yağ içerikli yem ile beslenen gruplardaki sıçanların, vücut ağırlığında meydana gelen değişimler ölçülerek, ağırlık takibi sağlanmıştır.

Sıçanların deneyin başlangıcında ve deney bitiminde ölçülen ağırlıklarından elde edilen veriler arasındaki farklılıklar ve istatistiksel olarak anlamlılıkları gösterilmiştir (Tablo 19).

Tablo 19: Standart ya da yüksek yağlı yem ile beslenen gruplarda çalışmanın başlangıcında ve sonundaki vücut ağırlığı (VA) değerleri

GRUPLAR	VA değeri (g) Başlangıç	VA değeri (g) Bitiş
Kontrol	237,73±9,38	337,18±9,53
YYD	242,64±8,32	336,09±6,63
Diyabet Kontrol	240,45±8,40	272,25±12,27*
Diyabet+MTF	246,17±7,18	290,40±16,99
Diyabet+FSC 10	233,64±5,07	300,11±12,59
Diyabet +FSC 50	239,42±11,43	291,50±14,20
Diyabet+FSC 100	235,78±8,07	284,89±12,70
Diyabet+FSC50+MTF	233,00±11,66	283,57±12,85

YYD: Yüksek yağlı diyetle beslenen grup, Diyabet kontrol: Tedavi uygulanmayan diyabetik grup, MTF: 300 mg/kg/gün metformin, FSC: Fransız Sahil Çamı ekstresi, 10: 10 mg/kg/gün, 50: 50 mg/kg/gün, 100: 100 mg/kg/gün. Veriler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. * p<0,05, kontrole göre anlamlı olarak farklılığı ifade etmektedir., Her bir grup için n:7-11

Elde edilen vücut ağırlığı verilerine göre, deney sonunda ölçülen hayvan ağırlıklarına bakıldığında, deneyin başlangıcında ölçülen değere göre, bütün hayvanların vücut ağırlıklarında artış görülmektedir. Ancak deney sonu ağırlıkları ile gruplar arasında bir kıyaslama yapıldığında, kontrol ve yüksek yağlı diyetle beslenen gruba göre, tedavi uygulanmayan diyabetik grupta dahil olmak üzere, tüm gruplarda kilo kaybı yaşanmıştır. Ancak, diyabetik kontrol ve FSC ekstresinin 50 ve 100 mg/kg/gün verilen

diyabetik gruptaki vücut ağırlığındaki azalma, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Hayvanların ağırlıkları ile elde edilen sayısal verilerin yanı sıra, deney hayvanlarında 8 hafta deney süresi boyunca, morfolojik olarak meydana gelen bir takım değişikliklerde gözlemlenmiştir ve kaydedilmiştir. Bu morfolojik değişiklikler arasında, kontrol ve yüksek yağlı yem ile beslenen grupta yer alan hayvanların görünümünde kilo artışı dışında çok fazla değişiklik gözlenmemiştir. Öte yandan, 5. Haftada uygulanan düşük doz STZ ile diyabet oluşturulan gruptaki sıçanlarda, diyabete bağlı olarak, tüy dökülmesi, aşırı zayıflama, bazılarında ciltte yara oluşumu gibi morfolojik bazı değişiklikler yaşanmıştır. İlave olarak diyabetik gruptaki hayvanların bazılarında, ölümler gözlenmiştir.

4.2 Deney Hayvanlarının Açlık Kan Şekeri, Açlık İnsülin, HbA1c ve HOMA-IR Seviyelerine Ait Bulgular:

Deney hayvanlarından alınan serum örneklerinden elde edilen açlık kan şekeri, açlık insülin, HbA1c ve HOMA-IR değerleri aşağıda gösterilmiştir (Tablo 20).

Açlık kan şekeri değerleri tedavi almayan diyabetik grupta (diyabetik kontrol), kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır. Tedavi uygulanan tüm deney gruplarında (FSC grupları, metformin ve kombine grup) kan şekeri değerlerinde anlamlı düşüş sağlanmıştır. Öte yandan, tüm tedavi gruplarındaki değerler halen kontrole göre anlamlı olarak yüksek bulunmuş ve kombine grupta daha fazla bir etki gözlenmemiştir.

Kan şekeri düzeylerinin genel seyri açısından grupların HbA1c değerleri karşılaştırılmıştır. HbA1c düzeyleri, kontrole göre diyabetik grupta anlamlı olarak artmıştır. Tüm tedavi gruplarında diyabetik kontrole göre zamlı gözlenirken, anlamlı azalma sadece FSC ekstresinin 50 mg/kg/gün uygulandığı grupta gözlenmiştir. Öte yandan, tedavi gruplarındaki HbA1c düzeyleri, kontrole göre anlamlı olarak farklı bulunmamıştır.

Tablo 20: Deney hayvanlarının açlık kan şekeri, açlık insülin, HbA1c ve HOMA-IR değerleri

GRUPLAR	Açlık Kan Şekeri (mg/dl)	İnsülin Değeri (mIU/L)	HbA1C (%)	HOMA- IR
Kontrol	113±7,75 ^b	11,68±2,22	4,56±0,38 ^b	3,23±0,28 ^b
YYD	159±8,81 ^b	11,85±0,68	4,49±0,41 ^b	4,75±0,27 ^b
Diyabet Kontrol	356±32,80 ^a	11,77±0,79	6,85±0,52 ^a	10,63±1,18 ^a
Diyabet+MTF	219±17,32 ^{ab}	11,68±0,73	4,99±0,35	6,53±0,88 ^b
Diyabet+FSC 10	230±23,31 ^{ab}	12,54±0,64	6,19±0,30	7,12±0,59 ^a
Diyabet +FSC 50	210±29,91 ^{ab}	12,84±0,53	4,45±0,39 ^b	6,73±1,02 ^b
Diyabet+FSC 100	234±28,32 ^{ab}	12,14±1,21	5,94±0,81	7,52±1,36 ^a
Diyabet+FSC50+MTF	242±21,80 ^{ab}	12,19±0,66	4,91±0,52	7,64±0,96 ^a

YYD: Yüksek yağlı diyetle beslenen grup, Diyabet kontrol: Tedavi uygulanmayan diyabetik grup, MTF: 300 mg/kg/gün metformin, FSC: Fransız Sahil Çamı ekstresi, 10: 10 mg/kg/gün, 50: 50 mg/kg/gün, 100: 100 mg/kg/gün. Veriler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. ^a p<0,05, kontrole göre, ^bp<0,05 tedavi uygulanmayan diyabetik gruba göre anlamlı olarak farklılığı ifade etmektedir., Her bir grup için n:7-11

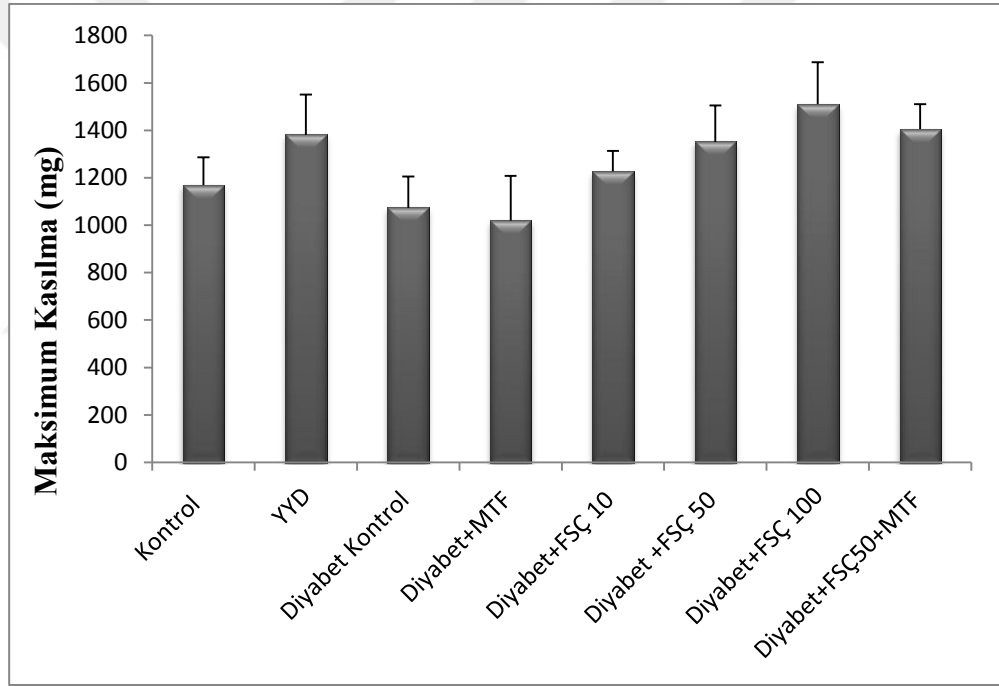
İnsüline direncin göstergesi olan HOMA-IR değerleri ise, diyabetik grupta kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır. Tüm tedavi uygulanan gruplarda diyabetik kontrole göre azalma gözlenirken, istatistiksel olarak anlamlı azalma sadece metformin ve FSC ekstresinin 50 mg/kg/gün uygulandığı gruplarda gözlenmiş ve bu iki grupta kontrole göre anlamlılık ortadan kalkmıştır.

4.3. Damarda Kasılma ve Gevşeme Yanıtlarına Ait Bulgular:

İzole torasik aorta parçalarıyla elde edilen konsantrasyona bağlı fenilefrine gösterilen maksimum kasılma değerleri şekil 12’de gösterilmektedir.

Gruplar arasında maksimum kasılma değerleri bakımından anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Yapılan izole damar çalışmalarından elde edilen fenilefrin kasılmalarının EC_{50} değerlerine etkisi tablo 21 gösterilmiştir. Gruplar arasında kıyaslama yapıldığında, EC_{50} değerleri bakımından anlamlı bir fark bulunamamıştır.



Şekil 11: Standart ya da yüksek yağlı yem ile beslenen gruplarda uygulamaların sıçanların torasik aortalarında fenilefrin kasılmalarının maksimum kasılma değerlerine etkisi. YYD: Yüksek yağlı diyetle beslenen grup, Diyabet kontrol: Tedavi uygulanmayan diyabetik grup, MTF: 300 mg/kg/gün metformin, FSC: Fransız Sahil Çamı ekstresi, 10: 10 mg/kg/gün, 50: 50 mg/kg/gün, 100: 100 mg/kg/gün. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. Her bir grup için n:7-11

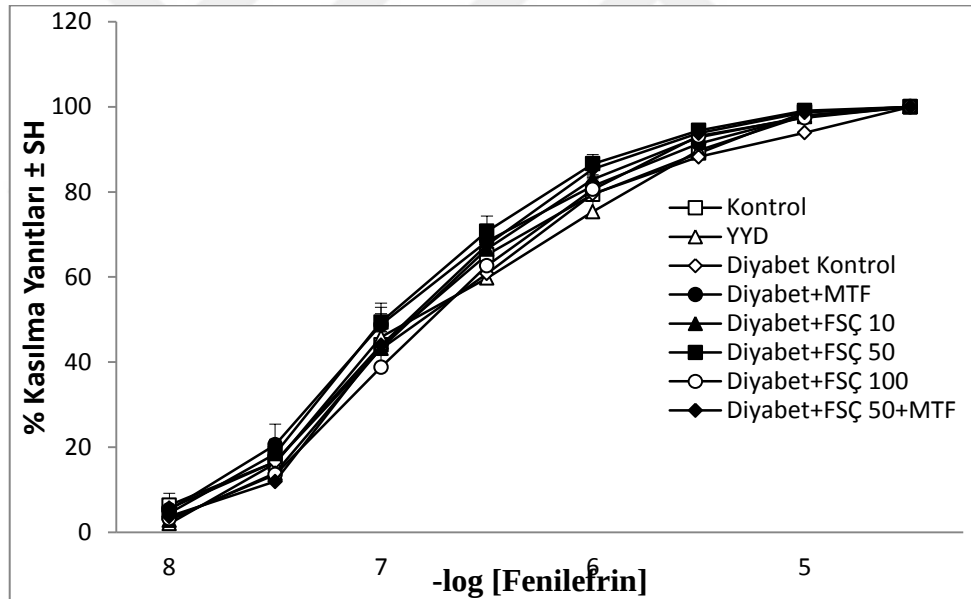
Gerek fenilefrin ile oluşturulan kasılma yanıtları bakımından (Şekil 13), gerekse endotele-bağımlı (Şekil 14) ve bağımlı olmayan gevşeme

yanıtları (Şekil 15) bakımından deney grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.

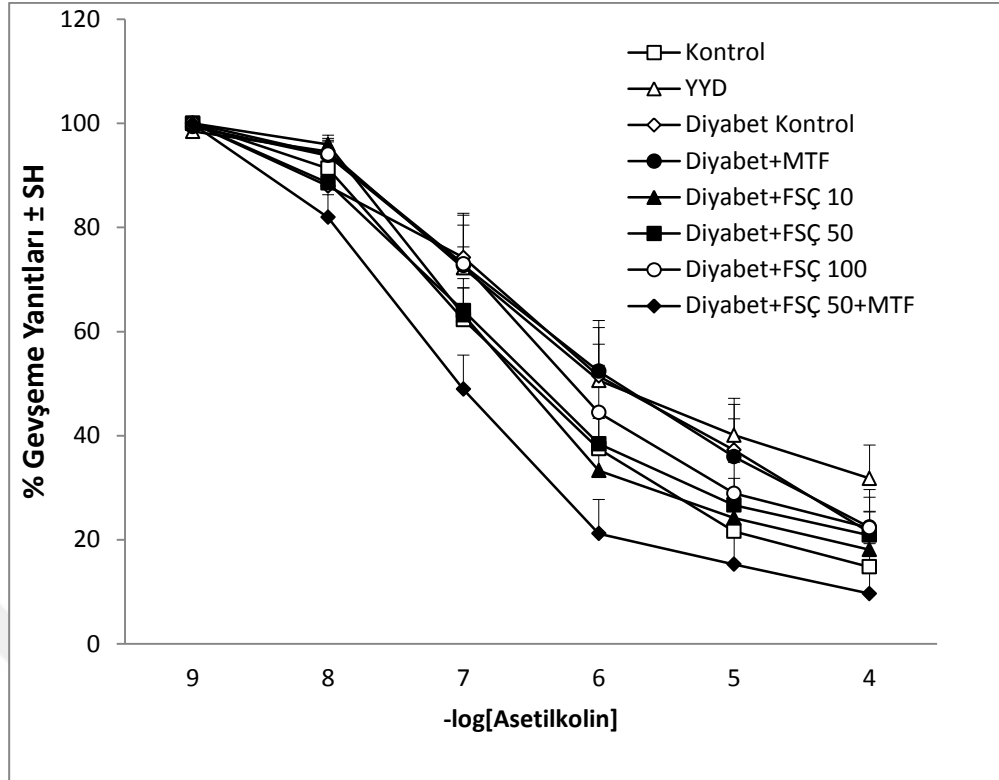
Tablo 21: Standart ya da yüksek yağlı yem ile beslenen gruplarda uygulamaların sıçanların torasik aortalarında fenilefrin kasılmalarının, EC₅₀ değerlerine etkisi.

GRUPLAR	EC ₅₀ Değeri (10 ⁻⁷ x mol/L)	GRUPLAR	EC ₅₀ Değeri (10 ⁻⁷ x mol/L)
Kontrol	1,73±0,31	Diyabet+FSC 10	1,49±0,28
YYD	2,64±0,65	Diyabet +FSC 50	1,34±0,25
Diyabet Kontrol	2,99±1,39	Diyabet+FSC 100	2,04±0,39
Diyabet+MTF	1,43±0,29	Diyabet+FSC50+MTF	1,52±0,17

YYD: Yüksek yağlı diyetle beslenen grup, Diyabet kontrol: Tedavi uygulanmayan diyabetik grup, MTF: 300 mg/kg/gün metformin, FSC: Fransız Sahil Çamı ekstresi, 10: 10 mg/kg/gün, 50: 50 mg/kg/gün, 100: 100 mg/kg/gün. Veriler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. Her bir grup için n:7-11

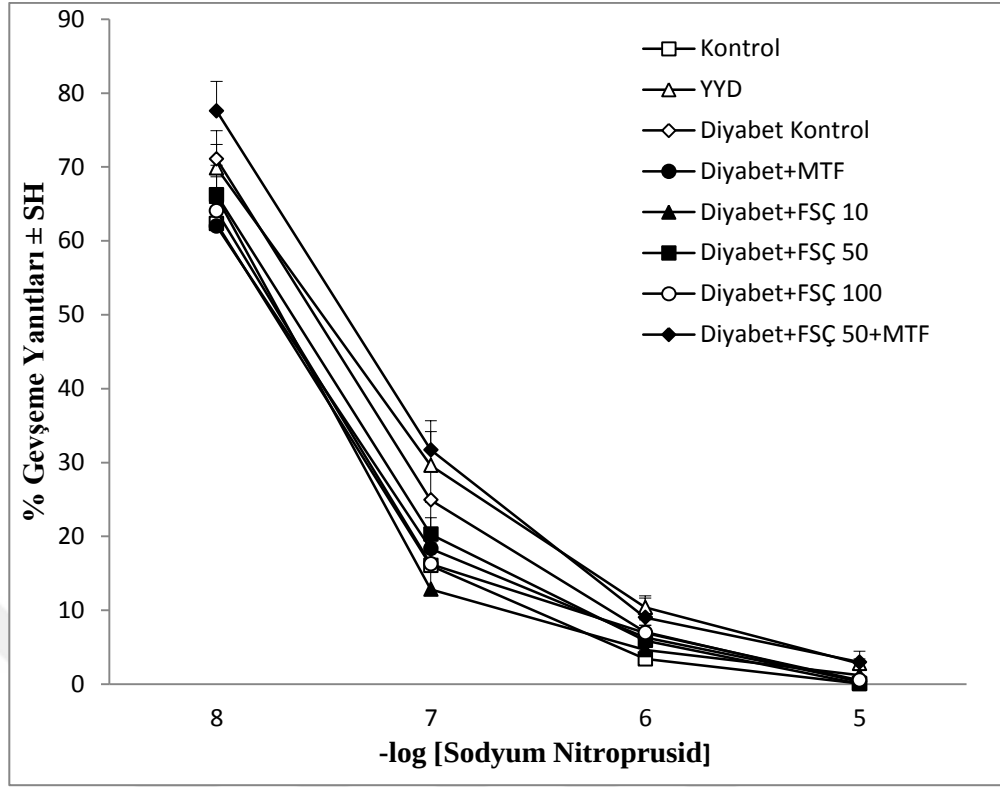


Şekil 12: Deney gruplarındaki sıçanların torasik aortalarındaki fenilefrin kasılmalarının karşılaştırılması. YYD: Yüksek yağlı diyetle beslenen grup, Diyabet kontrol: Tedavi uygulanmayan diyabetik grup, MTF: 300 mg/kg/gün metformin, FSC: Fransız Sahil Çamı ekstresi, 10: 10 mg/kg/gün, 50: 50 mg/kg/gün, 100: 100 mg/kg/gün. Veriler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. Her bir grup için n:7-11



Şekil 13: Deney gruplarındaki sıçanların torasik aortalarındaki endotele bağımlı asetilkolin gevşeme yanıtlarının karşılaştırılması. YYD: Yüksek yağlı diyetle beslenen grup, Diyabet kontrol: Tedavi uygulanmayan diyabetik grup, MTF: 300 mg/kg/gün metformin, FSC: Fransız Sahil Çamı ekstresi, 10: 10 mg/kg/gün, 50: 50 mg/kg/gün, 100: 100 mg/kg/gün. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. Her bir grup için n:7-11

ACH ile elde edilen endotele bağımlı gevşeme yanıtlarında gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır, ancak diyabetik ve YYD ile beslenen gruplarda kontrole göre gevşeme yanıtlarında azalma gözlenmiştir ve bu durum FSC ekstresi ile beslenen gruplarda geri çevrilirken, metformin uygulaması geri çevirememiştir. FSC ekstresi uygulanan gruplarda, gevşeme yanıtlarındaki en belirgin artış, kombine metformin + 50 mg/kg/gün FSC ekstresi verilen grupta gözlenirken, en az etkili olan 100 mg/kg uygulaması FSC ekstresi olmuştur.



Şekil 14: Deney gruplarındaki sıçanların torasik aortalarındaki endotelden bağımsız sodyum nitroprusid gevşeme yanıtlarının karşılaştırılması. YYD: Yüksek yağlı diyetle beslenen grup, Diyabet kontrol: Tedavi uygulanmayan diyabetik grup, MTF: 300 mg/kg/gün metformin, FSÇ: Fransız Sahil Çamı ekstresi, 10: 10 mg/kg/gün, 50: 50 mg/kg/gün, 100: 100 mg/kg/gün. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. Her bir grup için n:7-11

4.4. Deney Hayvanlarının Serumlarında Lipit Profiline Ait Bulgular:

Deney hayvanlarının serumlarında bakılan kolestrol, HDL- kolestrol, LDL- kolestrol, ve trigliserid düzeyleri incelenmiştir (Tablo 22).

Gruplar arasında total kolestrol ve HDL- kolestrol değerleri bakımından anlamlı bir fark bulunamamıştır. LDL- Kolestrol değerleri incelendiğinde, gruplar arasında anlamlı bir fark yoktur ancak, kontrol grubuna göre, yüksek yağlı diyet ve diyabetik kontrol grubunda bir miktar artış görülmüştür. Metformin ve FSÇ uygulamaları bu artışı geri çevirmiştir.

Trigliserid değerleri incelendiğinde, YYD grubunda kontrole göre bir artış olmasına rağmen anlamlı bir farklılık görülememiştir. Diyabet kontrol grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış göstermiştir. Metformin ve

FSC ekstresi uygulamaları diyabetteki bu artışı, kontrole yakın geri çevirmiştir. Bu geri çevirme, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde 50 mg/kg/ gün FSC ekstresi verilen grupta gözlenmiştir.

Tablo 22: Standart ya da yüksek yağlı yem ile beslenen gruplarda uygulamaların sıçanların serum kolesterol, LDL-kolesterol, HDL- kolesterol ve trigliserid değerlerine etkisi

GRUPLAR	Kolesterol (mg/dl)	HDL Kolesterol (mg/dl)	LDL Kolesterol (mg/dl)	Trigliserid (mg/dl)
Kontrol	56,22±1,96	15,30±0,96	24,41±4,05	50,00±4,91 ^b
YYD	63,00±2,93	14,88±0,84	37,20±2,42	71,63±6,30
Diyabet Kontrol	63,88±2,29	15,94±0,67	34,50±2,97	107,25±26,04 ^a
Diyabet+MTF	60,00±3,54	16,90±1,03	23,21±4,00	58,14±7,24
Diyabet+FSC 10	59,40±4,19	15,88±1,36	24,60±4,06	66,40±9,84
Diyabet +FSC 50	56,45±3,94	13,91±1,20	21,93±6,00	53,70±8,58 ^b
Diyabet+FSC 100	63,00±3,30	16,74±1,57	27,43±4,47	69,44±7,09
Diyabet+FSC50+ MTF	61,29±2,33	16,26±1,07	30,14±1,16	62,29±6,96

YYD: Yüksek yağlı diyetle beslenen grup, Diyabet kontrol: Tedavi uygulanmayan diyabetik grup, MTF: 300 mg/kg/gün metformin, FSC: Fransız Sahil Çamı ekstresi, 10: 10 mg/kg/gün, 50: 50 mg/kg/gün, 100: 100 mg/kg/gün. Veriler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. ^ap<0,05 kontrole göre, ^bp<0,05 tedavi uygulanmayan diyabetik gruba göre anlamlı olarak farklılığı ifade etmektedir., Her bir grup için n:7-11

4.5. Deney Hayvanlarının Kan Üre Azotu (BUN) ve Kreatinin Seviyelerine Ait Bulgular:

Gruplar arasında kan üre azotu (BUN) ve kreatinin değerleri bakımından anlamlı bir fark bulunamamıştır (Tablo 23).

Tablo 23: Standart ya da yüksek yağlı yem ile beslenen gruplarda uygulamaların sıçanların serum kan üre azotu ve kreatinin düzeylerine etkisi.

GRUPLAR	Kan Üre Azotu (BUN-mg/dl)	Kreatinin (mg/dl)
Kontrol	21,01±1,14	0,31±0,02
YYD	17,76±1,33	0,33±0,01
Diyabet Kontrol	22,38±2,22	0,38±0,02
Diyabet+MTF	19,81±2,01	0,36±0,02
Diyabet+FSC 10	19,99±1,68	0,33±0,02
Diyabet +FSC 50	19,91±1,17	0,34±0,02
Diyabet+FSC 100	21,77±1,76	0,36±0,02
Diyabet+FSC50+MTF	18,43±1,25	0,36±0,02

YYD: Yüksek yağlı diyetle beslenen grup, Diyabet kontrol: Tedavi uygulanmayan diyabetik grup, MTF: 300 mg/kg/gün metformin, FSC: Fransız Sahil Çamı ekstresi, 10: 10 mg/kg/gün, 50: 50 mg/kg/gün, 100: 100 mg/kg/gün. Veriler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. Her bir grup için n:7-11

4.6.Deney Hayvanlarının Serum CRP ile Serum ve Böbrekte MDA Seviyelerine Ait Bulgular:

Deney hayvanlarının serumlarında ve böbrek örneklerinde bakılan malondialdehit (MDA) düzeyleri ve c-reaktif protein (CRP) düzeyleri elde edilmiştir (Tablo 24).

Serum MDA düzeylerinde gruplar arasında bir kıyaslama yapıldığında, kontrol grubuna göre tüm gruplarda artış görüldü ancak, YYD ve 100 mg/kg/gün FSC ekstresi uygulanan gruplarda anlamlı bulunamadı, diğerlerinde bu artış anlamlı görüldü. Metformin ve FSC ekstresi uygulamaları bu artışı kontrole yakın azalttıysa da anlamlı bulunamamıştır.

Böbrek dokusundan elde edilen MDA ve serum CRP verileri, diğer gruplarla kıyaslandığında, anlamlı bir fark bulunamadı ancak diyabetik grupta kontrole göre artmıştır ve metformin ve FSC ekstresi uygulamaları bu artışı bir miktar azalttıysa da anlamlı bulunamamıştır.

Tablo 24: Standart ya da yüksek yağlı yem ile beslenen gruplarda uygulamaların sıçanların CRP ve MDA düzeylerine etkisi

GRUPLAR	CRP (ng/ml)	MDA (nmol/ml)	Böbrekte MDA (nmol/g doku proteini)
Kontrol	98,00±13,30	2,04±0,24	3,18±0,32
YYD	135,34±13,38	3,26±0,74 ^a	3,88±0,52
Diyabet Kontrol	159,60±30,96	5,92±1,12 ^a	9,99±4,32
Diyabet+MTF	131,77±11,24	2,52±0,43 ^a	4,59±1,05
Diyabet+FSC 10	123,18±14,43	3,02±0,64 ^a	7,24±2,44
Diyabet +FSC 50	124,44±17,90	2,87±0,42 ^a	5,33±1,71
Diyabet+FSC 100	123,03±9,00	3,06±0,61 ^a	5,30±1,26
Diyabet+FSC50+MTF	130,06±9,08	2,30±0,24 ^a	7,49±1,83

YYD: Yüksek yağlı diyetle beslenen grup, Diyabet kontrol: Tedavi uygulanmayan diyabetik grup, MTF: 300 mg/kg/gün metformin, FSC: Fransız Sahil Çamı ekstresi, 10: 10 mg/kg/gün, 50: 50 mg/kg/gün, 100: 100 mg/kg/gün. Veriler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. ^ap<0,05, kontrole göre, ^bP<0,05 tedavi uygulanmayan diyabetik gruba göre anlamlı olarak farklılığı ifade etmektedir. Her bir grup için n:6-11

4.7.Deney Hayvanlarının Serumlarında Nitrit/nitrat Seviyelerine

Ait Bulgular:

Deney hayvanlarının serum örneklerinde bakılan nitrat/nitrit düzeyleri elde edilmiştir (Tablo 25).

Tablo 25: Standart ya da yüksek yağlı yem ile beslenen gruplarda uygulamaların sıçanların nitrit/nitrat düzeylerine etkisi

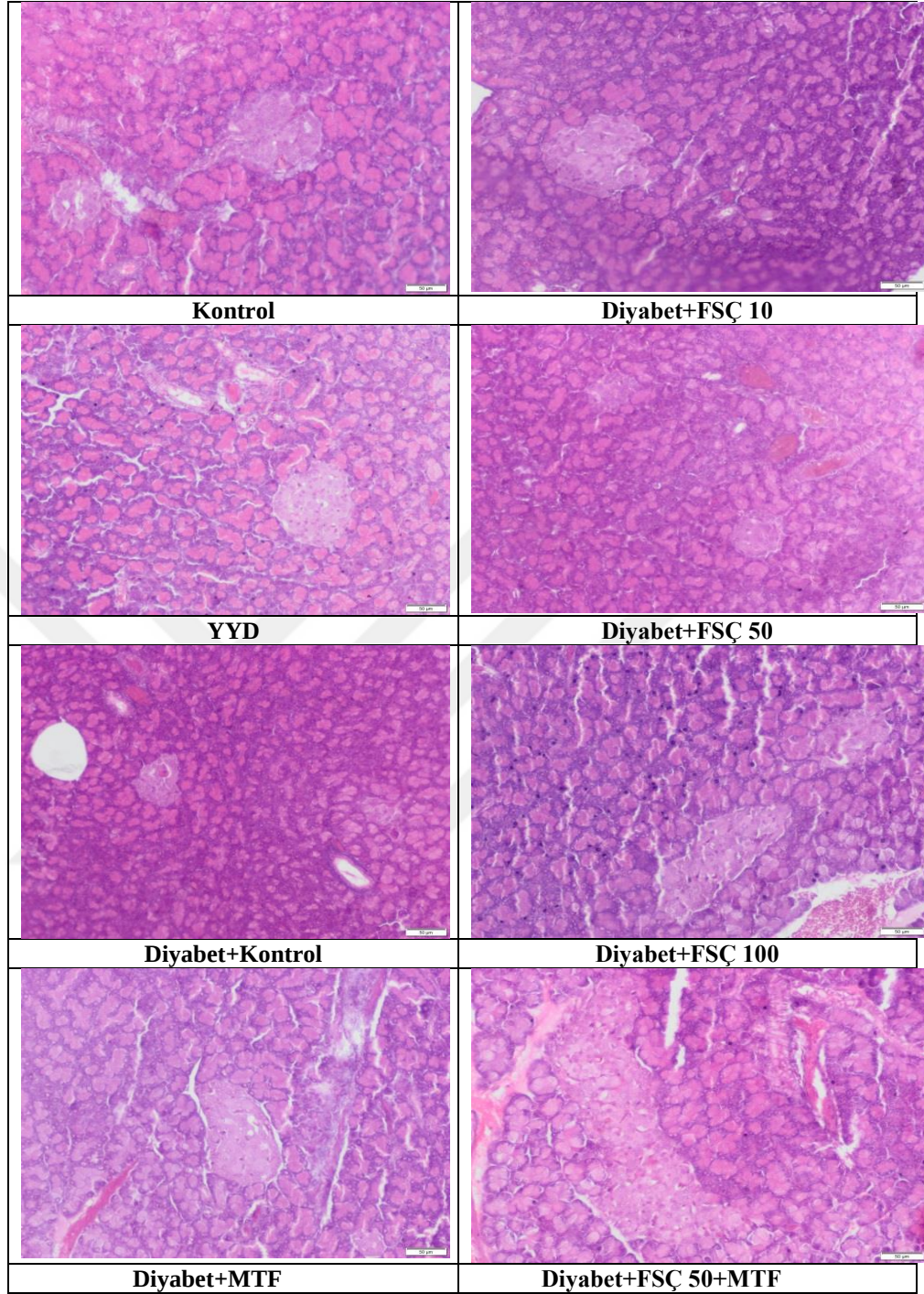
GRUPLAR	Nitrit/Nitrat (μmol/L)	GRUPLAR	Nitrit/Nitrat (μmol/L)
Kontrol	1,27±0,14	Diyabet+FSC 10	1,47±0,13
YYD	1,28±0,20	Diyabet +FSC 50	1,76±0,23
Diyabet Kontrol	2,17±0,33	Diyabet+FSC 100	1,62±0,14
Diyabet+MTF	1,77±0,29	Diyabet+FSC50+MTF	1,56±0,19

YYD: Yüksek yağlı diyetle beslenen grup, Diyabet kontrol: Tedavi uygulanmayan diyabetik grup, MTF: 300 mg/kg/gün metformin, FSC: Fransız Sahil Çamı ekstresi, 10: 10 mg/kg/gün, 50: 50 mg/kg/gün, 100: 100 mg/kg/gün. Veriler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. Her bir grup için n:7-11

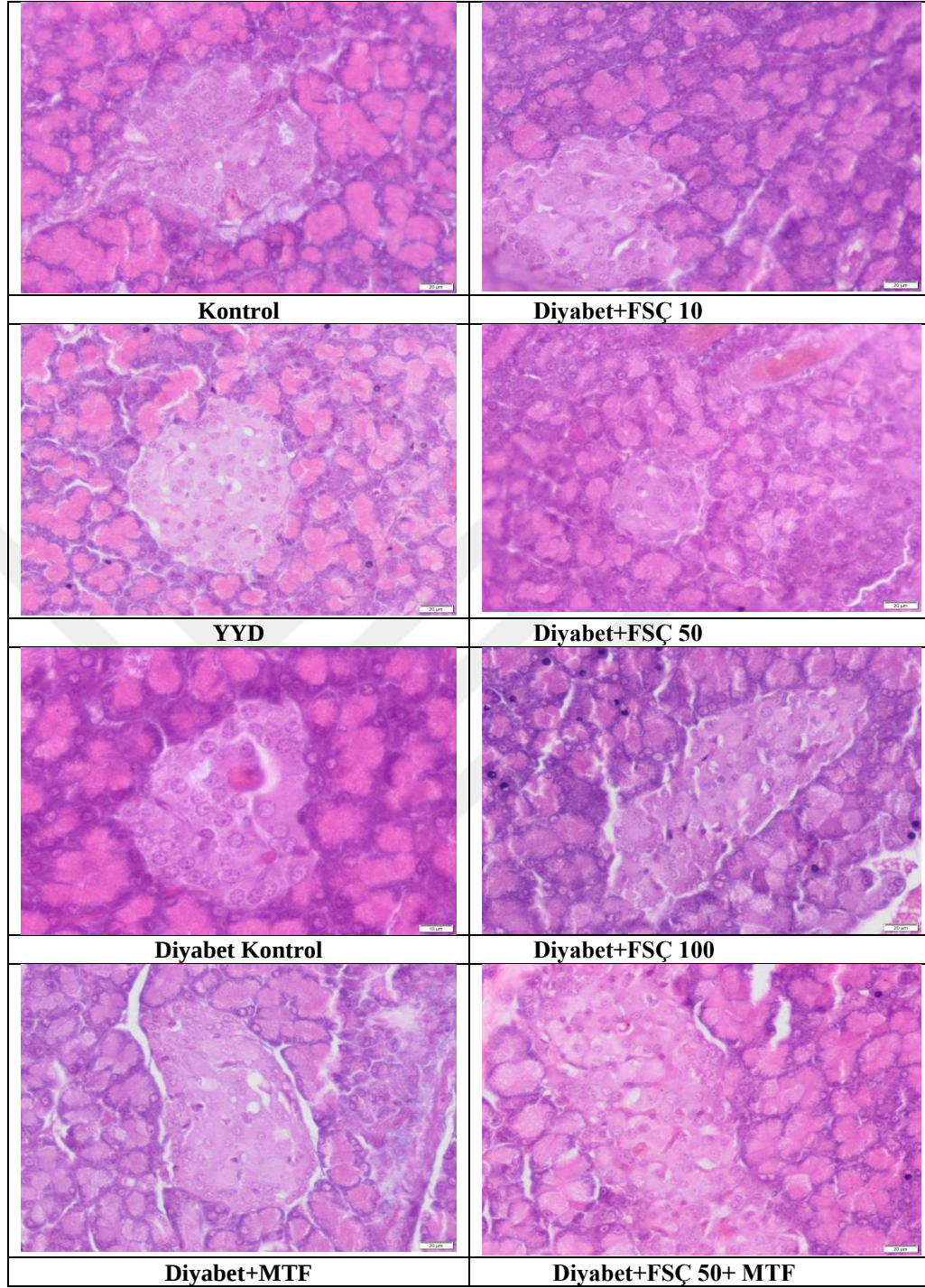
Deney hayvanlarının serumundan elde edilen nitrat/nitrit seviyesi, diyabetik grupta kontrole göre artmıştır ve metformin ve FSC ekstresi uygulamaları bu artışı bir miktar azalttıysa da anlamlı bulunamamıştır.

4.8. Deney Hayvanlarının Pankreas ve Böbrek Histopatolojisi Üzerine Elde Edilen Bulgular:

Pankreas lobülleri normal görüntüsünde olup, soluk yuvarlak alanlar şeklinde görülen endokrin pankreas, etrafı ekzokrin pankreatik asinüslerle dolu olarak görüldü. Her bir adacığın içerisinde birbirine sık ve yoğun bir şekilde organize olmuş kordon veya kümecikler şeklinde hücre grupları izlendi. Küçük kapillercikler içeren bağ dokusunun varlığı izlendi. Hücrelerin pankreatik asiner olanlarında yuvarlak bazal nükleus izlenirken, nadir olarak çift nükleuslu hücrelerde gözlemlendi. Stoplazmalarında bazal bir bazofili ile apikal bir asidofili gözlemlendi. İnterlobiller bağ dokusu içerisinde kanallar ve geniş bir şekilde uzanmış kübik epitel doku bulundu. Kontrol grubunda izlenen, bu normal görünüm, YYD grubunda benzer şekilde olduğu ancak, diyabetik grupta lobüllerin içerisindeki kan damarlarının konjesyona uğradığı, langerhans adacıklarının azalmış ve bozulmuş olduğu ve içerisinde piknotik, kondanse hatta fragmente çekirdekler içeren hücreler olduğu görüldü. Benzer şekilde pankreatik asinuslar ve interlobalinal kanallarda piknotik nükleuslar ve yassılaşmış epitel ve kanala doğru infiltrasyon olmuş hücreler görüldü. Diyabet+MTF grubunda, pankreastaki morfolojinin hem adacık hücreleri hem de pankreatik asinus ve interlobalinal kanallar açısından, diyabetik kontrol grubundaki hasara göre azaldığı izlendi. Histolojik olarak metformin ile gerçekleşen iyileşmenin, 50 mg/kg/gün FSC ekstresi verilen grupta çok az, 100 mg/kg/gün FSC ekstresi verilen grupta biraz daha belirgin ve kombine (50 mg/kg/gün FSC ekstresi ve 300 mg/kg/gün) edildiğinde daha da belirginleşen bir düzelmenin olduğu görüldü (Resim 17 ve Resim 18).



Resim 17: Deneysel gruplarda oluşan hasara ve yapılan tedaviye pankreasın verdiği cevapların histolojik görüntüleri. Langerhans adacıkları, hücreleri, asinus ve interlobinel kanallarda oluşan değişikliklerin HE boyamaları. YYD: Yüksek yağlı diyetle beslenen grup, Diyabet kontrol: Tedavi uygulanmayan diyabetik grup, MTF: 300 mg/kg/gün metformin, FSC: Fransız Sahil Çamı ekstresi, 10: 10 mg/kg/gün, 50: 50 mg/kg/gün, 100: 100 mg/kg/gün. 10x.

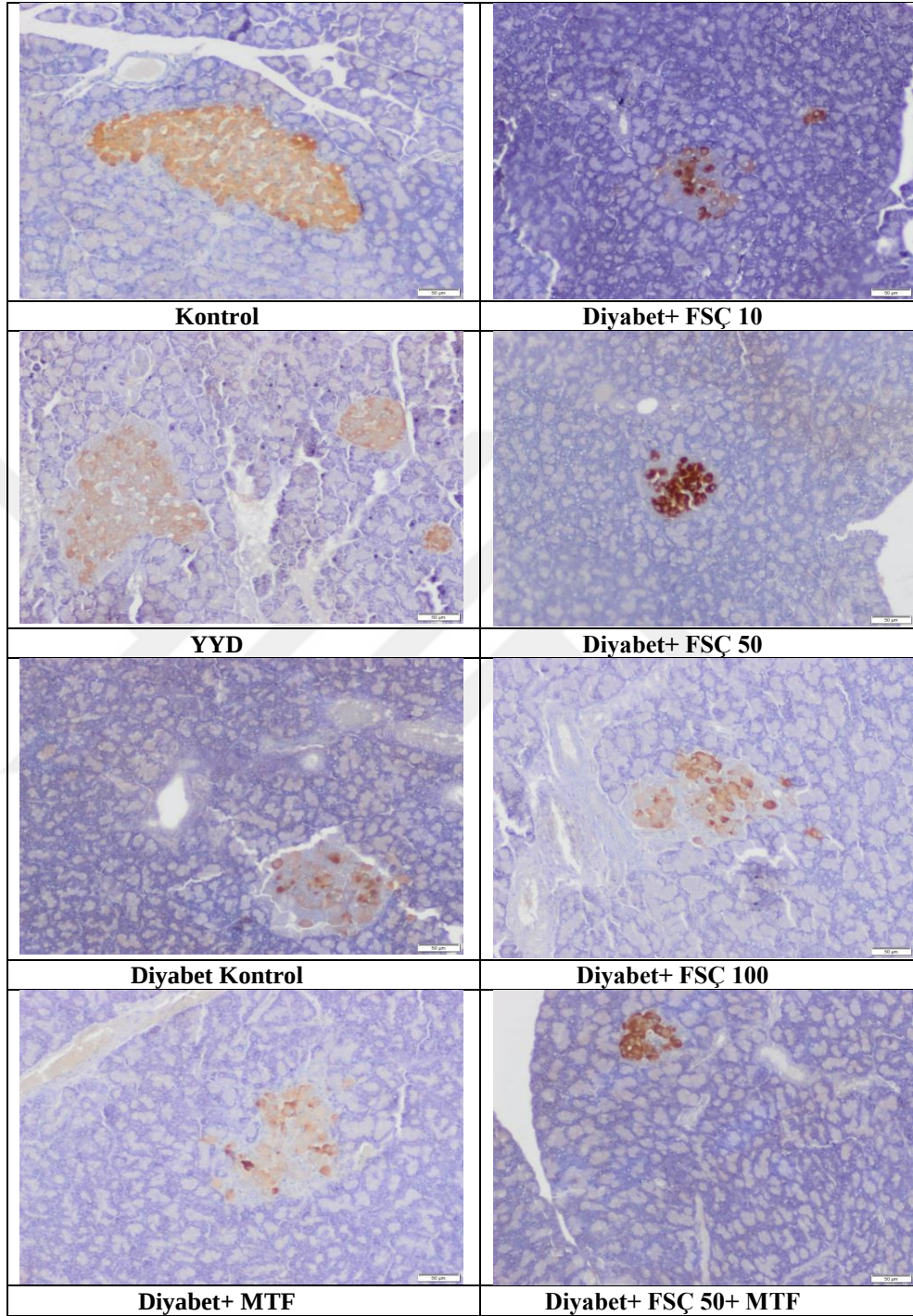


Resim 18: Deneysel gruplarda oluşan hasara ve yapılan tedaviye pankreasın verdiği cevapların histolojik görüntüleri. Langerhans adacıkları, hücreleri, asinus ve interlobinel kanallarda oluşan değişikliklerin HE boyamaları. YYD: Yüksek yağlı diyetle beslenen grup, Diabet kontrol: Tedavi uygulanmayan diyabetik grup, MTF: 300 mg/kg/gün metformin, FSC: Fransız Sahil Çamı ekstresi, 10: 10 mg/kg/gün, 50: 50 mg/kg/gün, 100: 100 mg/kg/gün. 40x.

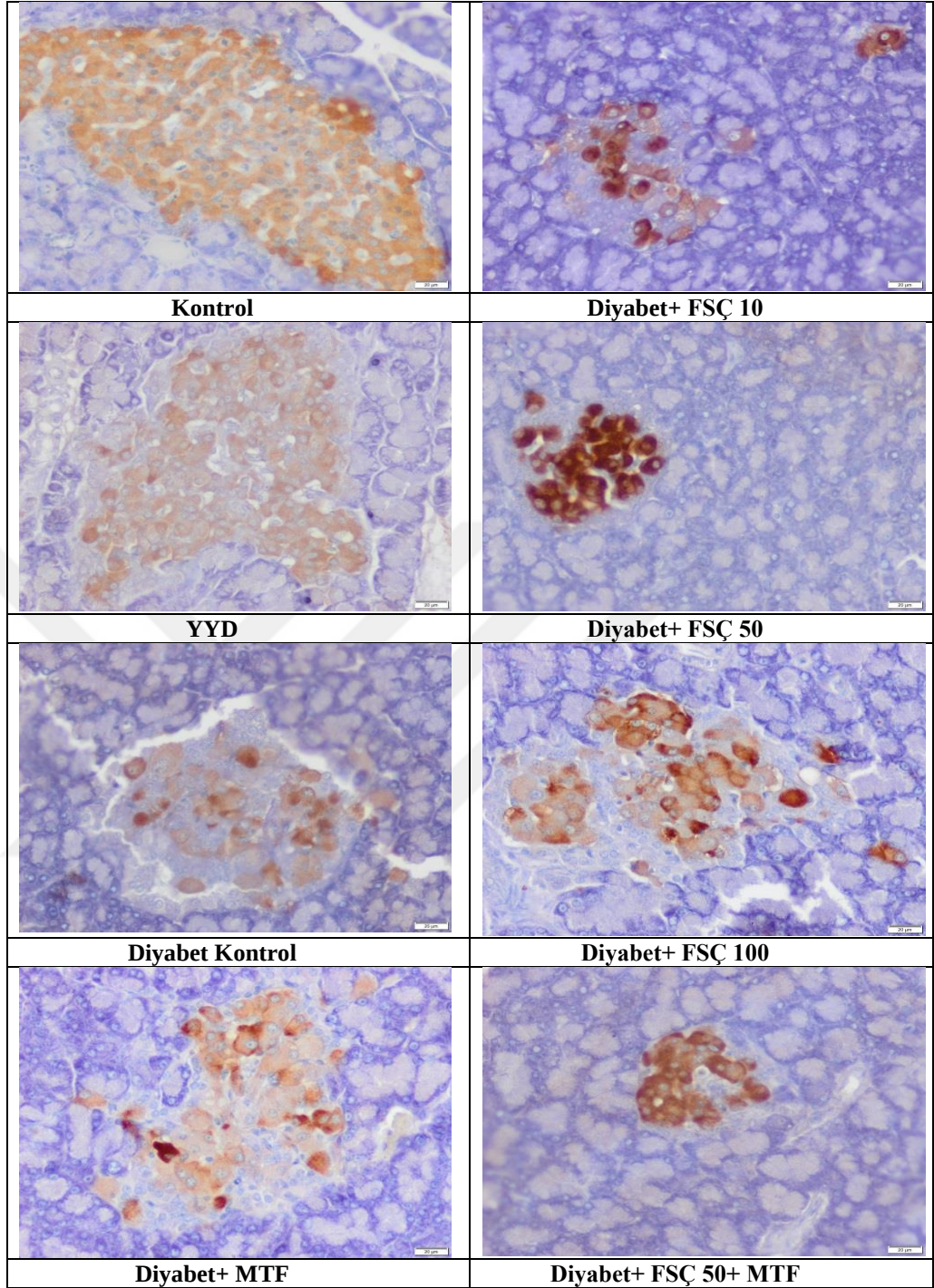
Beta hücrelerini tanımlamak için yapılan insülinoma antikor boyamasında, primer antikor yerine PBS in kullanıldığı negatif kontrollerde boyamanın olmaması ve pozitif boyanan hücrelerin, lokalizasyon olarak beklenen yerde gözlenmesi boyamanın özgün olduğuna işaret etmiştir. Kuvvetli insülin immünoreaktivitesi, adacık içerisindeki beta hücrelerinin stoplazmasında, kahverengi granüller şeklinde gözlendi. Bazı adacıkların periferinde, asinus içinde de görülebilen nadir pozitif boyanmalar bulundu. Kontrolde gözlenen bu histolojik manzara, YYD grubunda değişmezken, diyabetik kontrol grubundaki hayvanlarda bozulduğu ve azaldığı gözlendi. metformin tedavisi ile, histopatolojinin düzeldiği ancak, FSC ile bunun düşük dozda çok az, yüksek dozda biraz ve kombine de oldukça belirginleştiği görüldü (Resim 19 ve Resim 20).

Kontrol grubu böbrek dokusunda korteks bölgesi histolojik olarak incelendiğinde glomerulus, proksimal ve distal tübül yapılarının normal görünümünü koruduğu gözlenirken hiçbir patolojik bulguya rastlanmadı. Bowman kapsülünün dış yaprağı ile glomerulusu saran iç yaprak arasındaki aralık normal genişlikte izlenirken glomerulusun hemen yakınında yerleşim gösteren proksimal tübüller şekillendiren epitel hücreleri asidofilik sitoplazmaya, yuvarlak ve merkezi bulunan çekirdekleri ile karakterizedydi. Distal tübüller ise bazofilik sitoplazmaları ve geniş lümenleri ile ayırt edildi. YYD grubu böbrek örneklerinde korteksin kontrol grubuna benzer bulgular saptandı. Fakat diyabetik grupta kortekste glomerulusta mezenşimal matriks artışı, Bowman aralığında azalma, tübüller dilatasyon, tübüller atrofi, konjesyon ve lenfosit infiltrasyon bulgularına rastlandı; özellikle distal tübüllerin dilate olarak lümen genişliklerinin arttığı görüldü. Aynı zamanda glomerulus ve çevresindeki dokularda eritrosit yoğunluğu dikkat çekti. Diyabet+MTF grubunda, böbrek korteksini oluşturan glomerulus, proksimal ve distal tübül yapılarındaki hasarların diyabetik kontrol grubundaki hasara göre azaldığı izlendi. Histopatolojik bulguların FCS ekstresi ve MTF verilmesiyle düzeldiği, en belirgin düzelmenin 50 mg/kg/gün FSC ekstresi ve 300 mg/kg/gün metformin uygulaması ile olduğu, 50 mg/kg/gün FSC

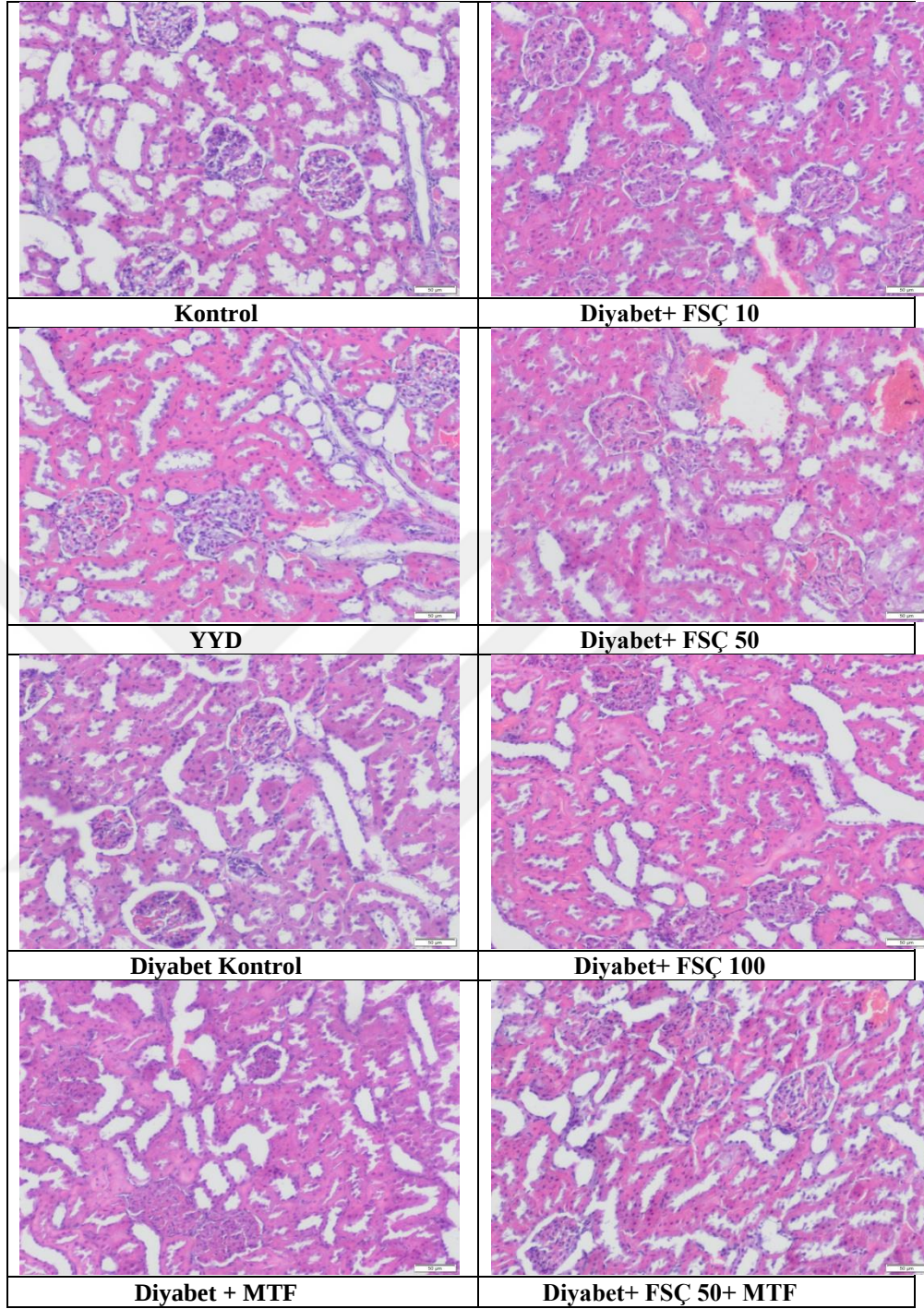
ekstresi verilen grupta çok az, 100 mg/kg/gün FSC ekstresi verilen grupta biraz daha belirgin iyileşmenin olduğu görüldü (Resim 21 ve Resim 22).



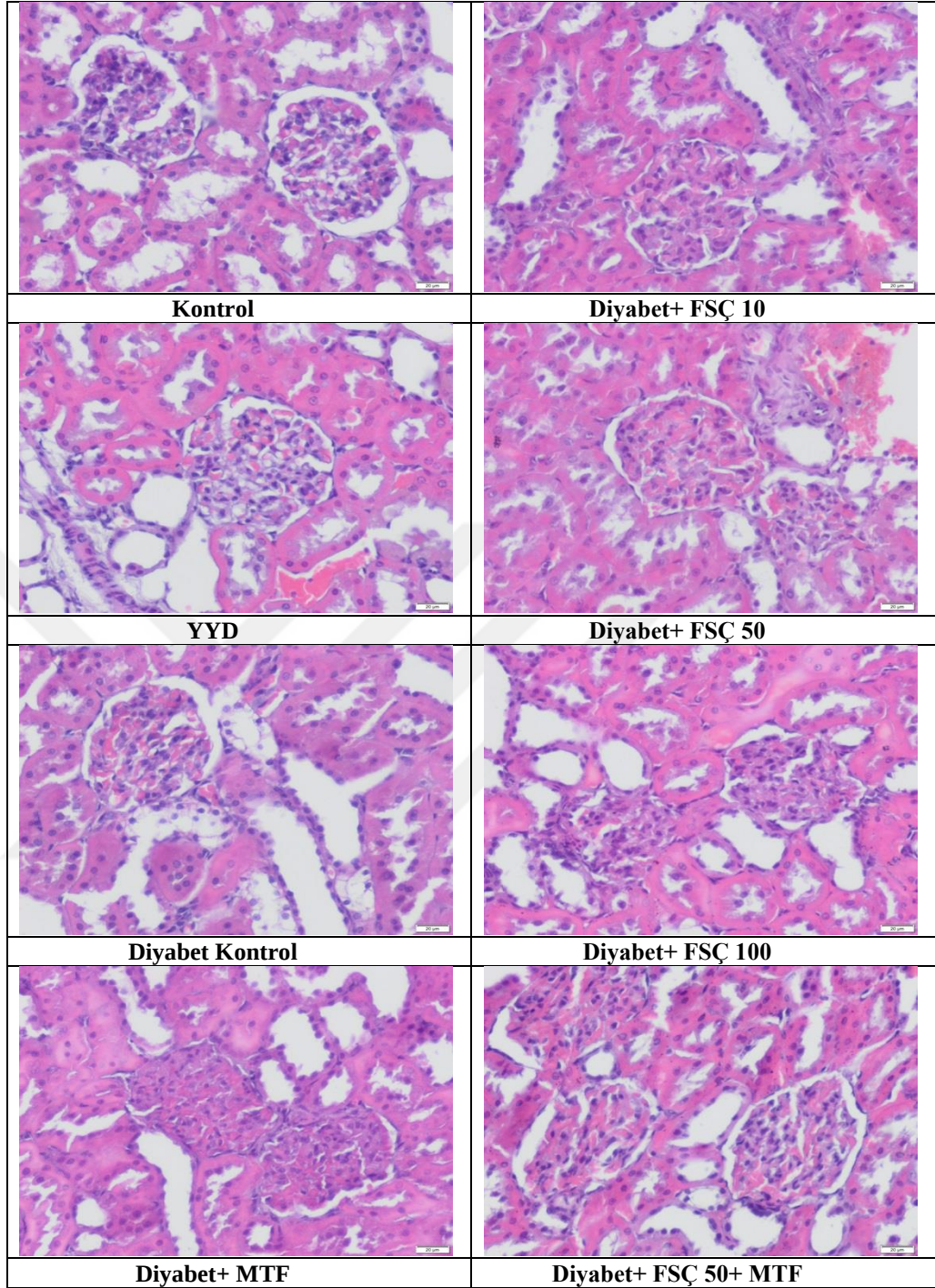
Resim 19: Deneysel gruplarda beta hücrelerinin belirteci olarak kullanılan insülin antikor boyamasının immünohistokimyasal görüntüleri YYD: Yüksek yağlı diyetle beslenen grup, Diyabet kontrol: Tedavi uygulanmayan diyabetik grup, MTF: 300 mg/kg/gün metformin, FSC: Fransız Sahil Çamı ekstresi, 10: 10 mg/kg/gün, 50: 50 mg/kg/gün, 100: 100 mg/kg/gün. 10x.



Resim 20: Deneysel gruplarda beta hücrelerinin belirteci olarak kullanılan insülin antikor boyamasının immünohistokimyasal görüntüleri YYD: Yüksek yağlı diyetle beslenen grup, Diabet kontrol: Tedavi uygulanmayan diyabetik grup, MTF: 300 mg/kg/gün metformin, FSC: Fransız Sahil Çamı ekstresi, 10: 10 mg/kg/gün, 50: 50 mg/kg/gün, 100: 100 mg/kg/gün. 40x.



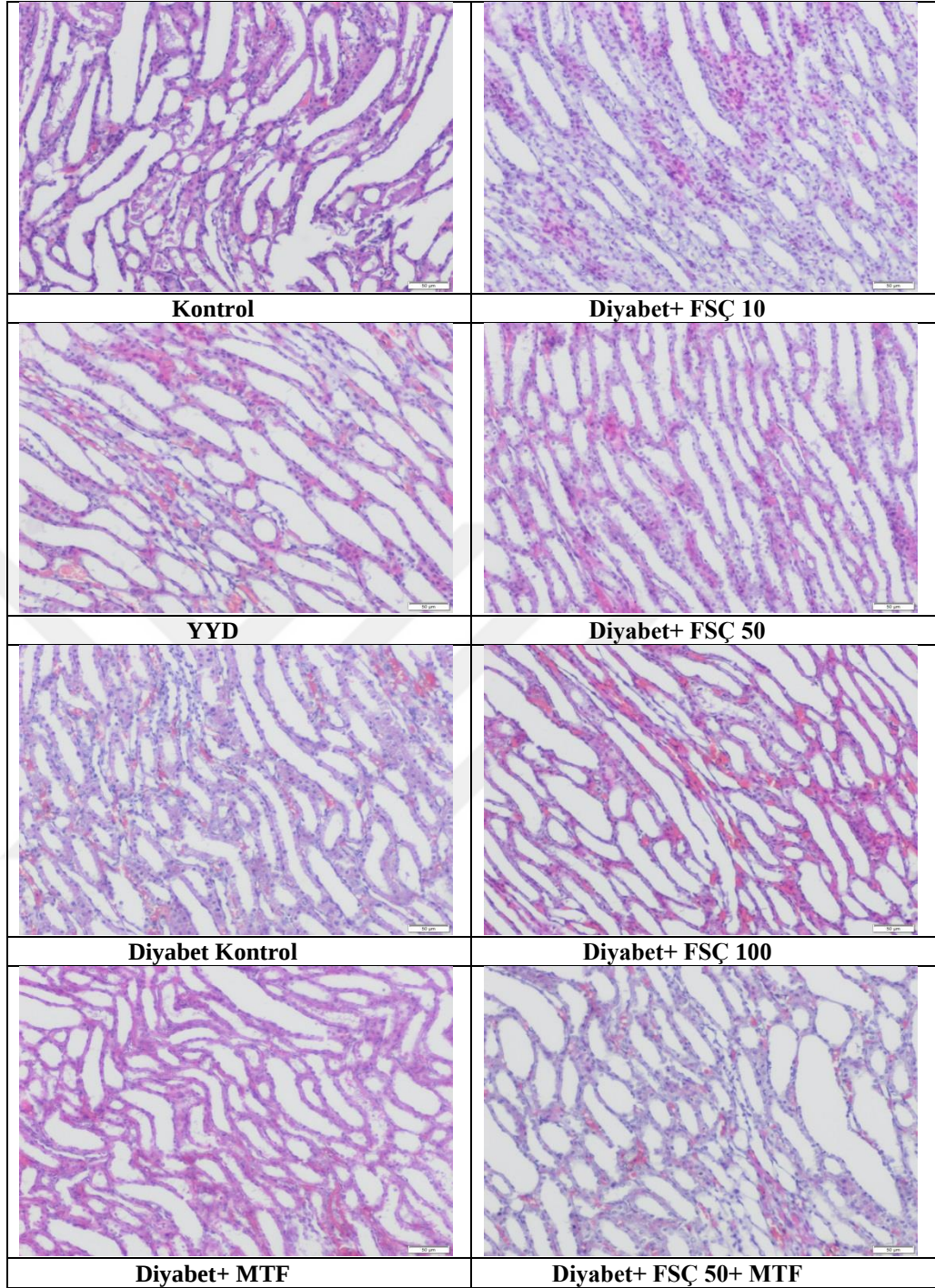
Resim 21: Deneyşel grúplarda b brek kortekşinin HE ile boyamasının g r nt leri YYD: Y ksek yağlı diyetle beslenen grúp, Dişabet kontrol: Tedavi uygulanmayan dişabetik grúp, MTF: 300 mg/kg/g n metformin, FSC: Fransız Sahil  amı ekstresi, 10: 10 mg/kg/g n, 50: 50 mg/kg/g n, 100: 100 mg/kg/g n. 10x.



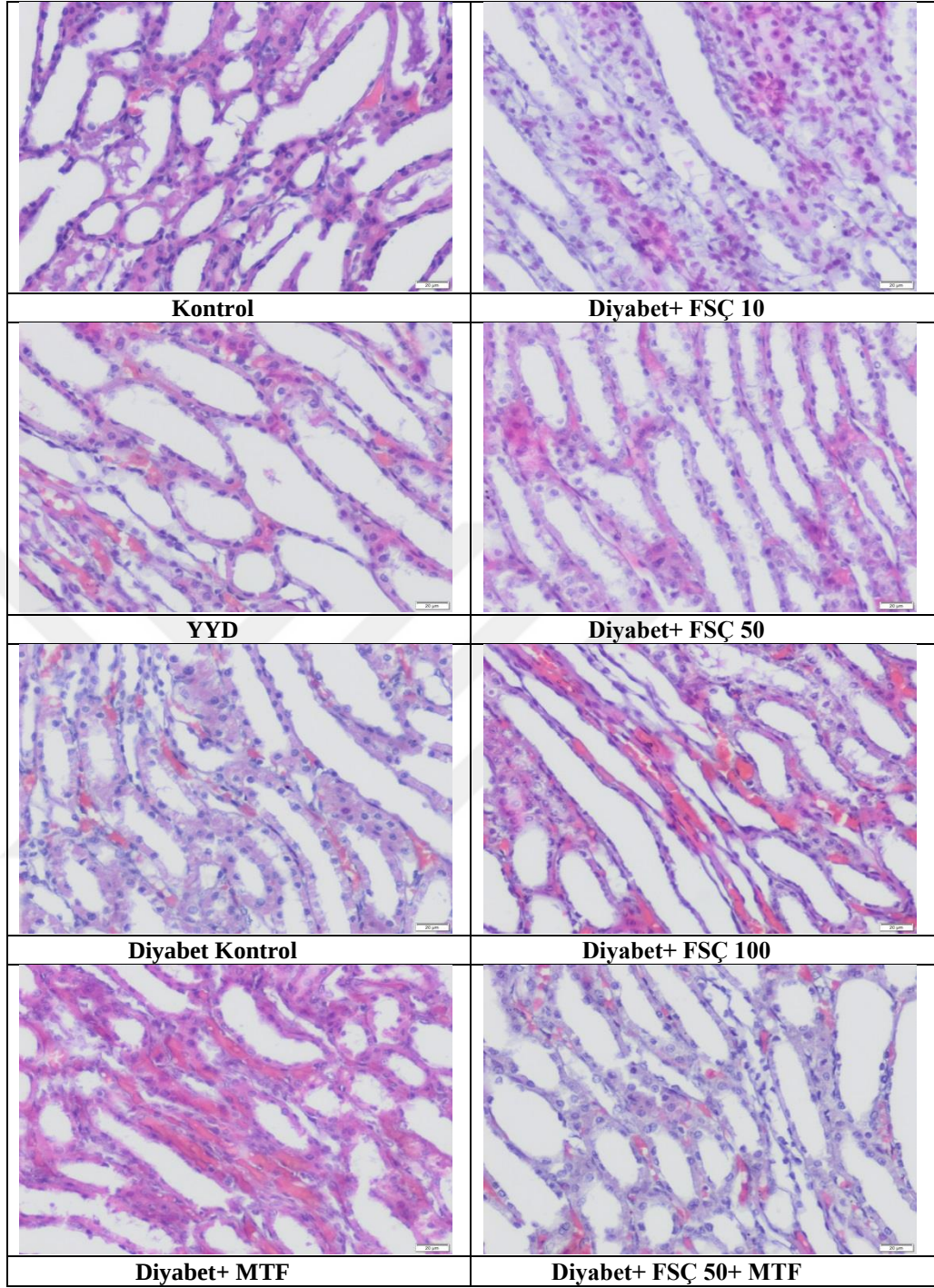
Resim 22: Deneysel gruplarda böbrek korteksinin HE ile boyamasının görüntüleri. YYD: Yüksek yağlı diyetle beslenen grup, Diabet kontrol: Tedavi uygulanmayan diyabetik grup, MTF: 300 mg/kg/gün metformin, FSC: Fransız Sahil Çamı ekstresi, 10: 10 mg/kg/gün, 50: 50 mg/kg/gün, 100: 100 mg/kg/gün. 40x.

Tüm gruplara ait böbrek medullası incelendiğinde, kontrol grubunda toplayıcı tübüllerin normal histolojik yapıya sahip oldukları başlangıçta tek katlı yassı veya kübik epitel hücreleri ile döşeli iken sonlara doğru prizmatik şekilli epitel hücreleri ile döşeli olduğu görüldü. Toplayıcı tübülleri oluşturan epitel hücrelerinin bir kısmının soluk sitoplazmalı ve yuvarlak merkezi yerleşimli hücre çekirdeklerine sahip oldukları izlenirken bu epitelyum hücreleri arasında asidofilik sitoplazmalı hücrelerin de bulunduğu saptandı. YYD grubundaki hayvanların böbrek medullasında da kontrol grubuna benzer bulgulara rastlanırken diyabetik kontrol grubunda tübüler dilatasyon, konjesyon ve lökosit infiltrasyonun gerçekleştiği histopatolojik bulgular ayırt edildi. Tübül lümenlerinin genişlemiş olduğu ve tübüller arasında lökosit ve eritrosit infiltrasyonu görüldü. FÇS ekstresi ve MTF uygulanmasıyla histopatolojik hasarlarda iyileşme izlendi. İyileşmenin sırasıyla 50 mg/kg/gün FÇS ekstresi ve 300 mg/kg/gün metformin verilen grupta en fazla, 100 mg/kg/gün FÇS ekstresi verilen grupta biraz daha belirgin ve 50 mg/kg/gün FÇS ekstresi verilen grupta ise az olduğu saptandı (Resim 23 ve Resim 24).

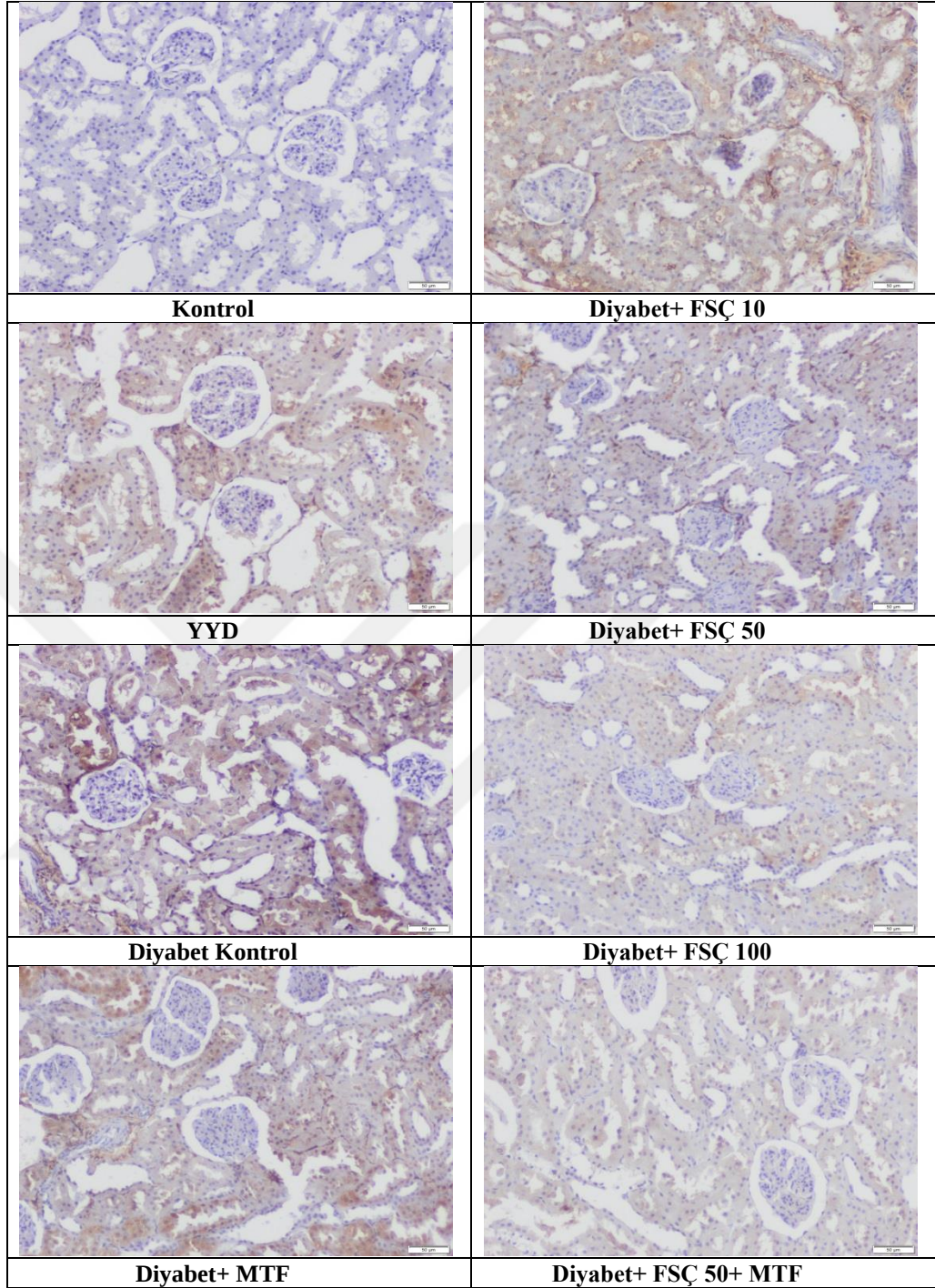
Böbrek proksimal tübül epitel hücre yüzeyinde bulunan ve glikoprotein yapısındaki megalin, birçok molekül için bağlayıcı bir reseptördür ve kendisine bağlanan moleküllerin hücre içine alımını sağlamaktadır. Tüm gruplara ait böbrek örnekleri immunohistokimyasal olarak megalin antikoru ile boyandığında korteks bölgesinde kuvvetli boyanmanın diyabetik grupta proksimal tübül epitelinde olduğu, kontrol ve YYD grubunda ise az olduğu görüldü. Artmış megalin immunoreaktivitesinin metformin tedavisi ile diyabetik gruba oranla azaldığı, FÇS ekstresinin metformin ile birlikte kombine verildiği grupta immunoreaktivitenin oldukça azalmış olduğu, FÇS ekstresinin düşük dozda çok az ve yüksek dozda biraz daha belirgin azalma sağladığı saptandı (Resim 25 ve Resim 26).



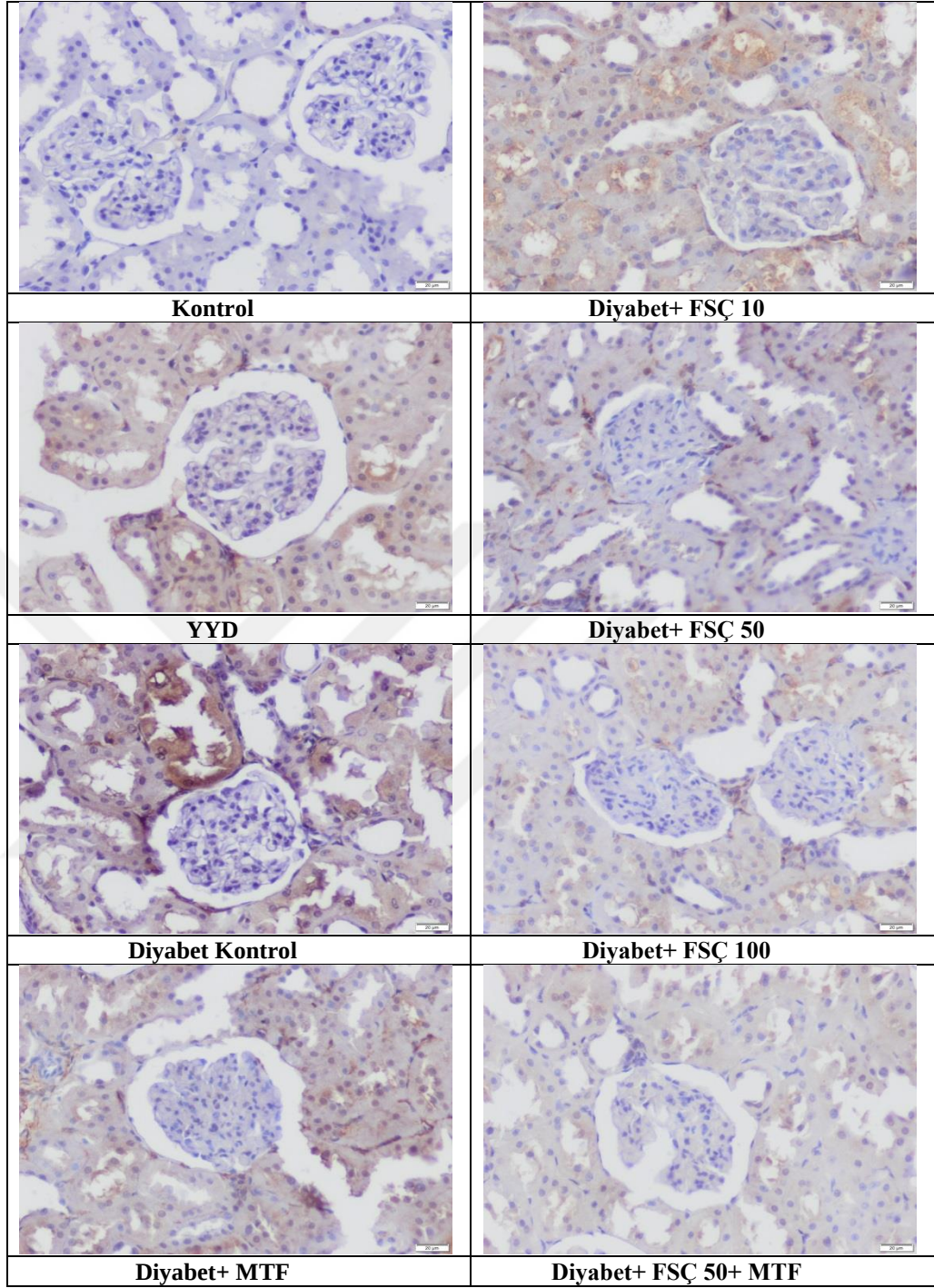
Resim 23: Deneysel gruplarda böbrek medullasının HE ile boyamasının görüntüleri. YYD: Yüksek yağlı diyetle beslenen grup, Diyabet kontrol: Tedavi uygulanmayan diyabetik grup, MTF: 300 mg/kg/gün metformin, FSC: Fransız Sahil Çamı ekstresi, 10: 10 mg/kg/gün, 50: 50 mg/kg/gün, 100: 100 mg/kg/gün. 10x



Resim 24: Deneysel gruplarda böbrek medullasının HE ile boyamasının görüntüleri. YYD: Yüksek yağlı diyetle beslenen grup, Diabet kontrol: Tedavi uygulanmayan diyabetik grup, MTF: 300 mg/kg/gün metformin, FSC: Fransız Sahil Çamı ekstresi, 10: 10 mg/kg/gün, 50: 50 mg/kg/gün, 100: 100 mg/kg/gün. 40x



Resim 25: Deneysel gruplarda böbrek korteksinin megalin antikoruna ile boyamasının immünohistokimyasal görüntüleri YYD: Yüksek yağlı diyetle beslenen grup, Diabet kontrol: Tedavi uygulanmayan diyabetik grup, MTF: 300 mg/kg/gün metformin, FSC: Fransız Sahil Çamı ekstresi, 10: 10 mg/kg/gün, 50: 50 mg/kg/gün, 100: 100 mg/kg/gün. 10x.

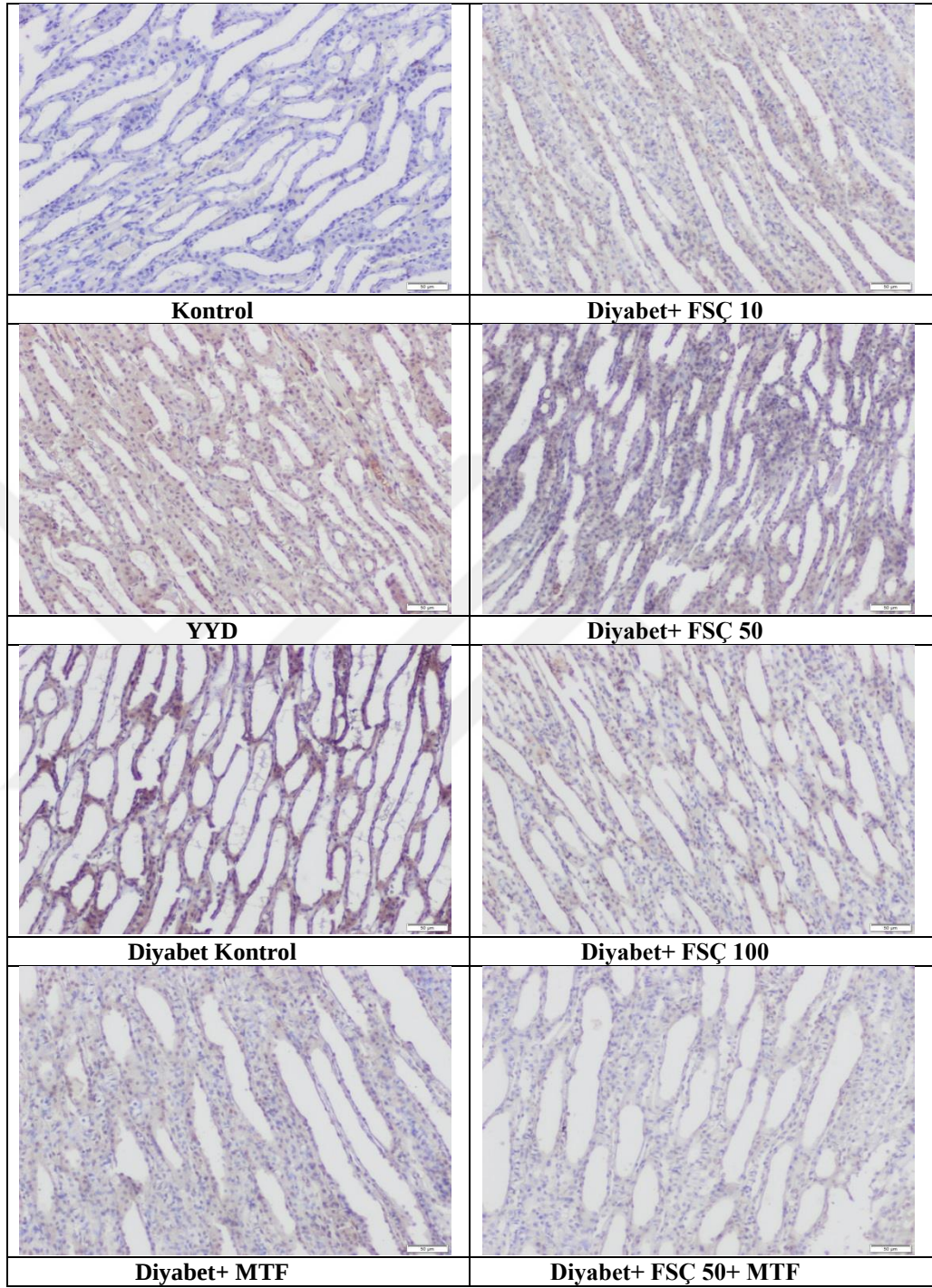


Resim 26: Deneysel gruplarda böbrek korteksinin megalin antikoruna ile boyamasının immünohistokimyasal görüntüleri. YYD: Yüksek yağlı diyetle beslenen grup, Diyabet kontrol: Tedavi uygulanmayan diyabetik grup, MTF: 300 mg/kg/gün metformin, FSC: Fransız Sahil Çamı ekstresi, 10: 10 mg/kg/gün, 50: 50 mg/kg/gün, 100: 100 mg/kg/gün. 40x

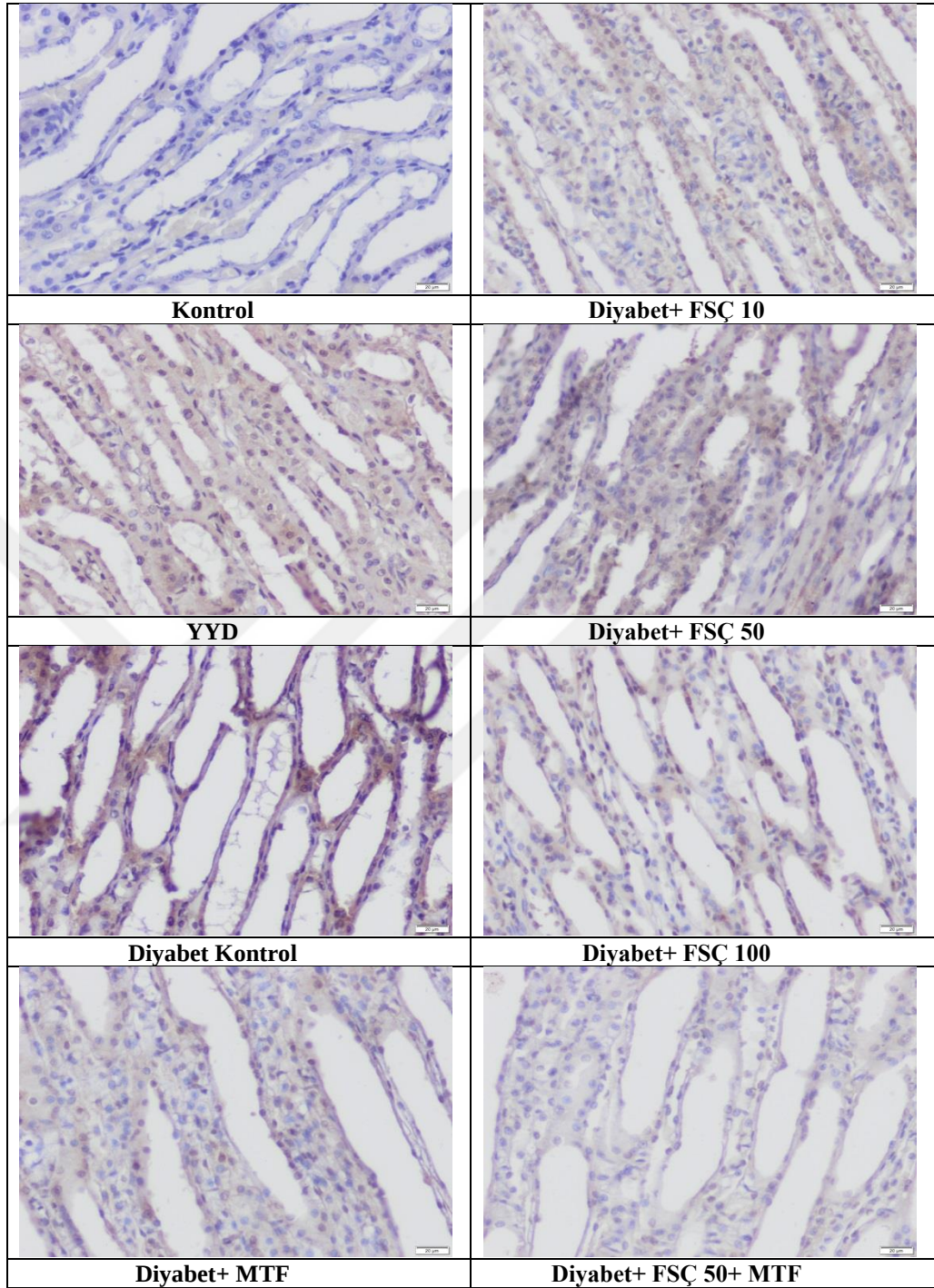
Böbrek medullası megalin immunoreaktivitesi açısından incelendiğinde, kontrol ve YYD gruplarında boyanmanın az olduğu, diyabetik kontrol grubunda ise kuvvetli boyanma saptandı. Boyanmanın özellikle tübüllerin epitelinde yer aldığı görüldü. Artmış megalin immunoreaktivitesinin metformin tedavisi ile iyileşmeye bağlı olarak diyabetik gruba oranla azaldığı izlenirken, FŞÇ ekstresinin düşük dozda çok az ve yüksek dozda biraz daha belirgin azalma sağladığı, FŞS ekstresinin metformin ile birlikte kombine verildiği grupta immunoreaktivitenin oldukça azalmış olduğu saptandı (Resim 27 ve Resim 28).

Böbrekte rejenerasyonu sağlayıcı faktörlerden biri olan TGF-beta 1 immunohistokimya boyaması yapıldı ve TGF-beta 1 boyanmasının kontrol ve YYD grubu böbrek korteksinde az olduğu, boyanmanın diyabetik kontrol grubunda hasara bağlı olarak arttığı saptandı. Boyanmanın özellikle proksimal ve distal tübüllerin epitel hücrelerinde yer aldığı görüldü. TGF-beta 1 immunoreaktivitesinin metformin ile azaldığı, özellikle FŞS ekstresinin metformin ile birlikte kombine verildiği grupta iyileşmeye bağlı olarak boyanmadaki azalma en fazla idi. FŞÇ ekstresinin düşük dozda çok az ve yüksek dozda biraz daha belirgin azalma sağladığı izlendi (Resim 29 ve Resim 30).

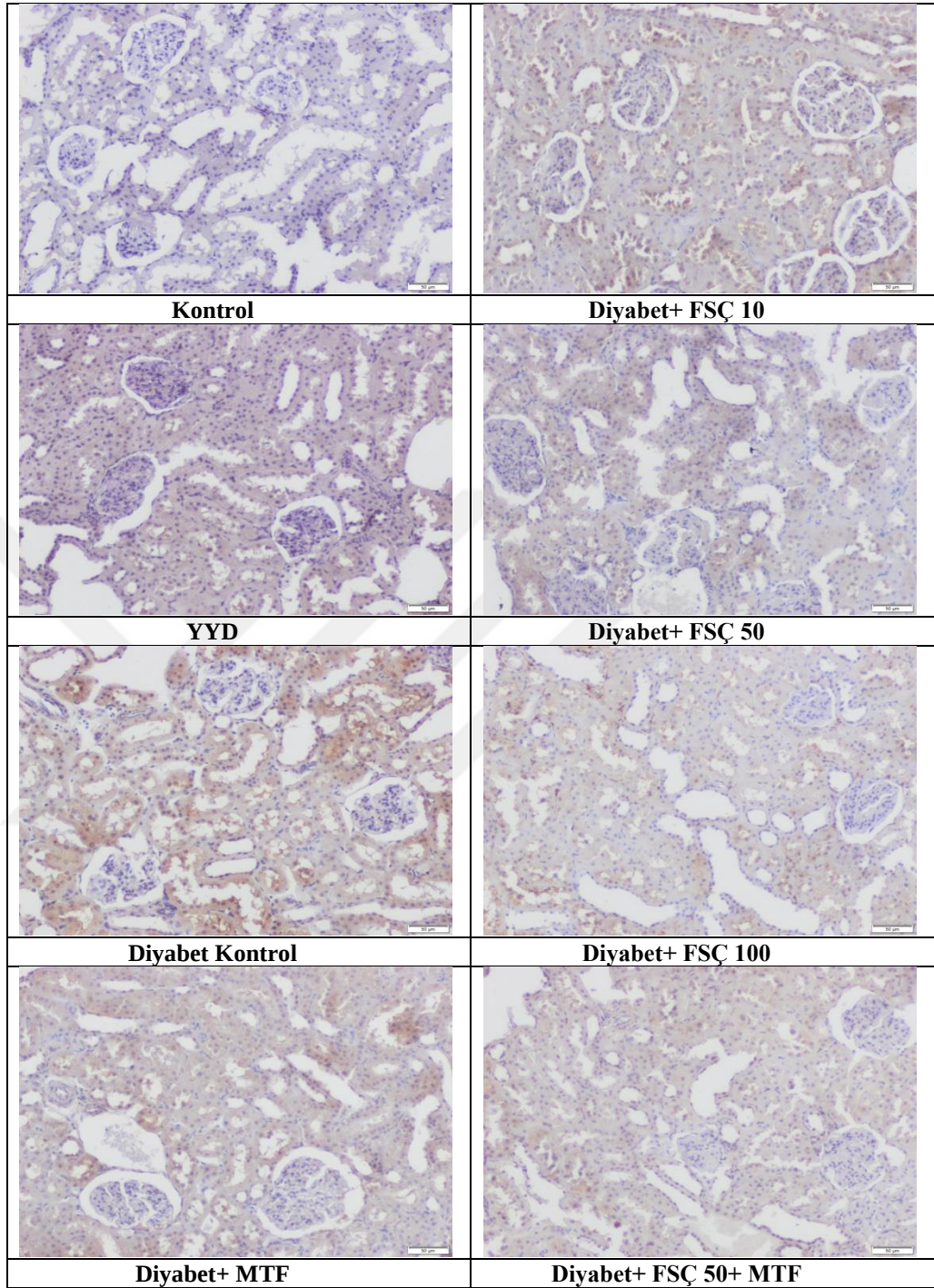
Böbrek medulla bölgesinde TGF-beta 1 boyanmasının kontrol ve YYD grubunda az olduğu, boyanmanın diyabetik kontrol grubunda hasara bağlı olarak toplayıcı tübül epitelinde arttığı saptandı. TGF-beta 1 immunoreaktivitesinin metformin ile azaldığı, özellikle FŞS ekstresinin metformin ile birlikte kombine verildiği grupta iyileşmeye bağlı olarak boyanmadaki azalma en fazla idi. FŞÇ ekstresinin düşük dozda çok az ve yüksek dozda biraz daha belirgin azalma sağladığı izlendi (Resim 31 ve Resim 32).



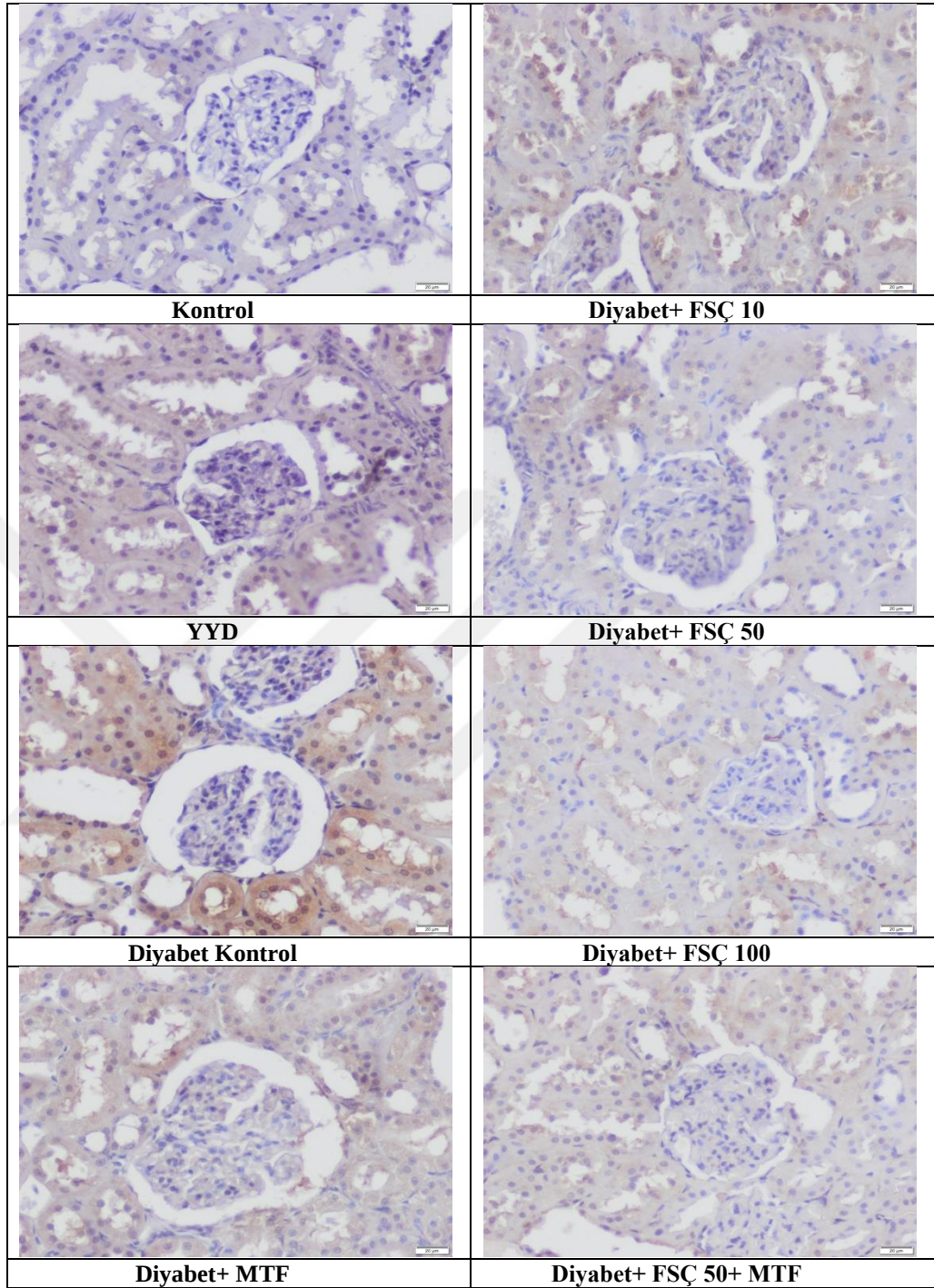
Resim 27: Deneysel gruplarda böbrek medullasının megalin antikoru ile boyamasının immünohistokimyasal görüntüleri. YYD: Yüksek yağlı diyetle beslenen grup, Diyabet kontrol: Tedavi uygulanmayan diyabetik grup, MTF: 300 mg/kg/gün metformin, FSC: Fransız Sahil Çamı ekstresi, 10: 10 mg/kg/gün, 50: 50 mg/kg/gün, 100: 100 mg/kg/gün. 10x.



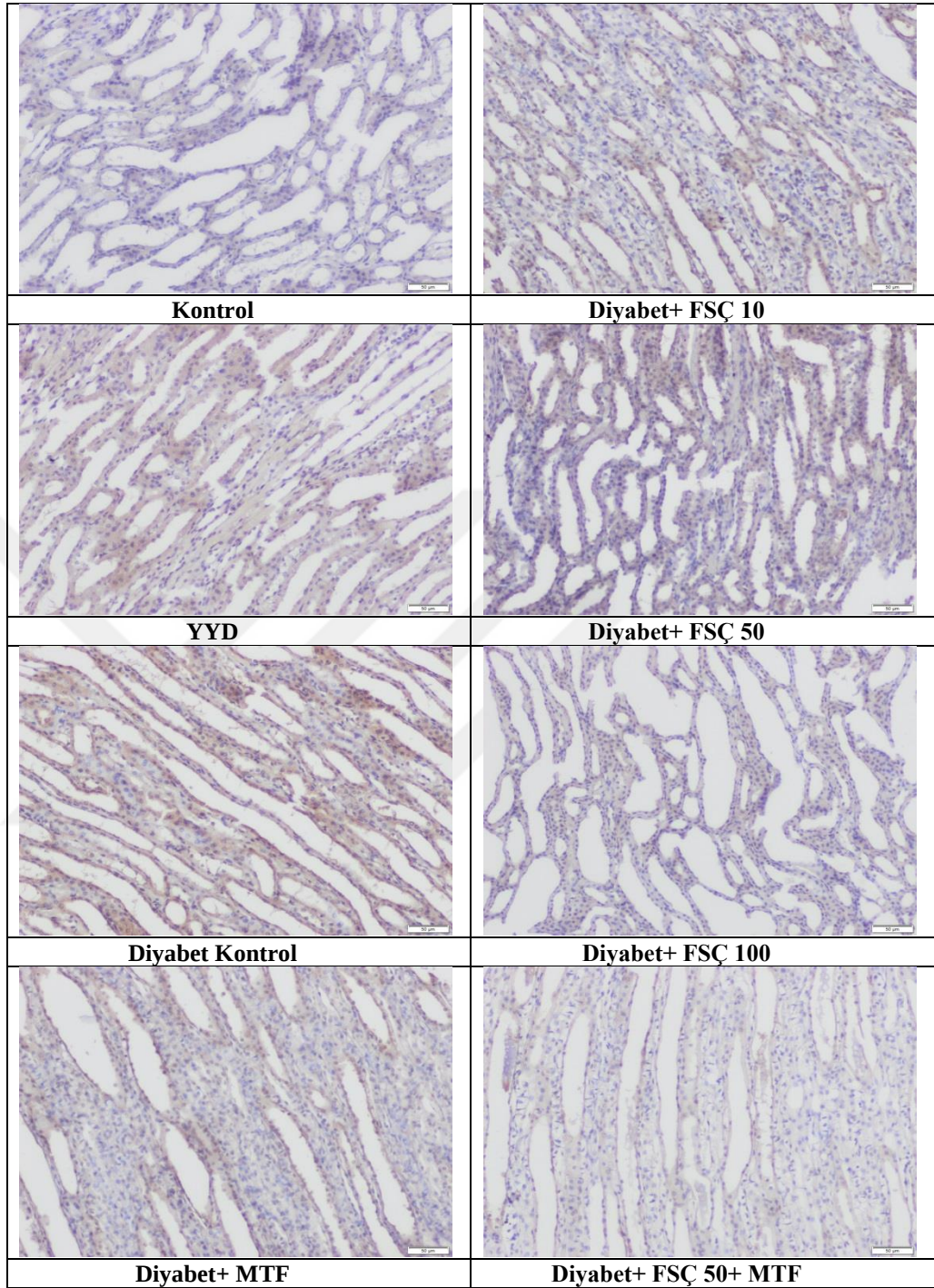
Resim 28: Deneysel gruplarda böbrek medullasının megalin antikoru ile boyamasının immünohistokimyasal görüntüleri. YYD: Yüksek yağlı diyetle beslenen grup, Diabet kontrol: Tedavi uygulanmayan diyabetik grup, MTF: 300 mg/kg/gün metformin, FSC: Fransız Sahil Çamı ekstresi, 10: 10 mg/kg/gün, 50: 50 mg/kg/gün, 100: 100 mg/kg/gün. 40x.



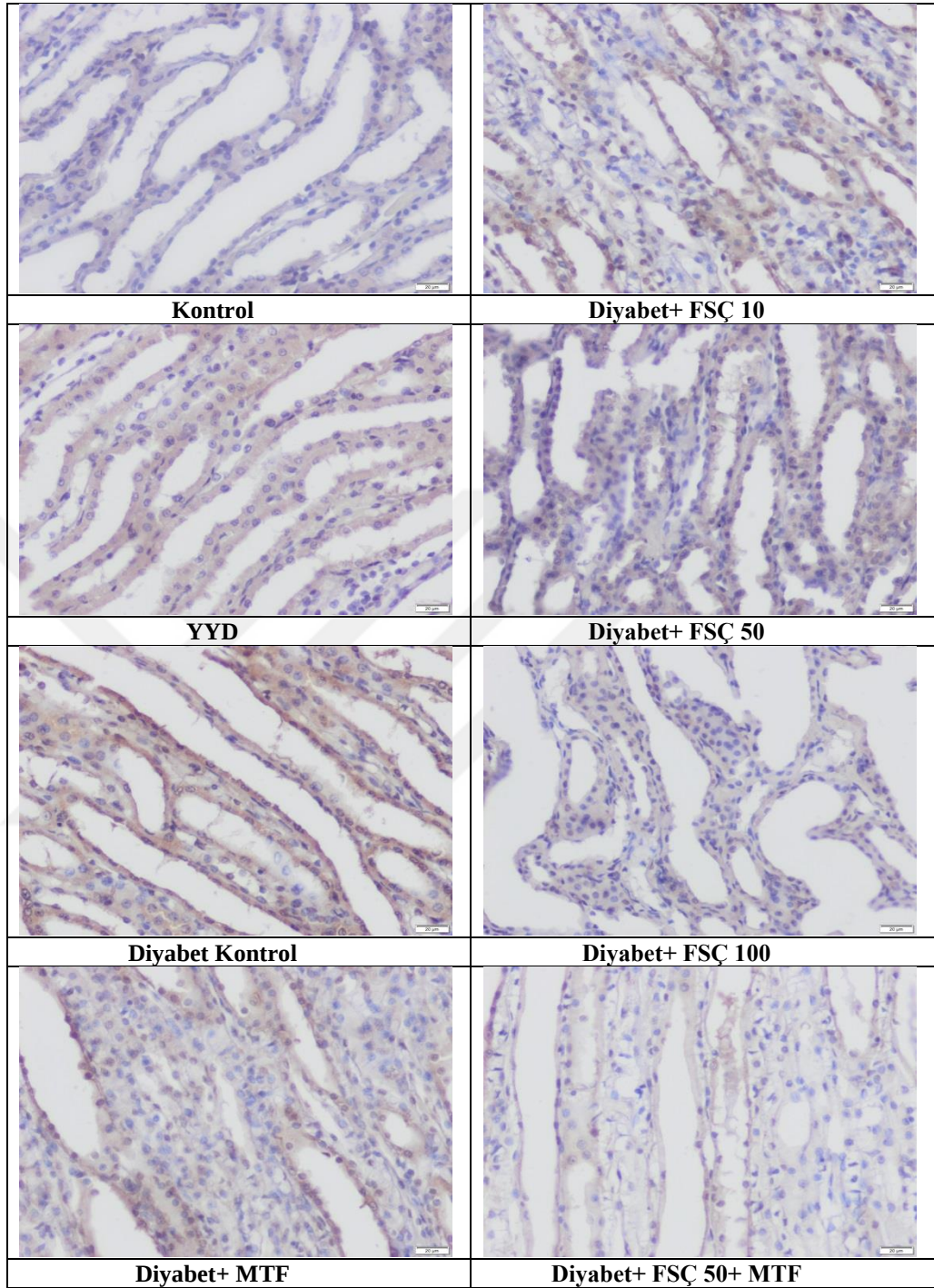
Resim 29: Deneysel gruplarda böbrek korteksinin TGFbeta 1 antikoru ile boyamasının immünohistokimyasal görüntüleri. YYD: Yüksek yağlı diyetle beslenen grup, Diabet kontrol: Tedavi uygulanmayan diyabetik grup, MTF: 300 mg/kg/gün metformin, FSC: Fransız Sahil Çamı ekstresi, 10: 10 mg/kg/gün, 50: 50 mg/kg/gün, 100: 100 mg/kg/gün. 10x.



Resim 30: Deneysel gruplarda böbrek korteksinin TGFbeta 1 antikoru ile boyamasının immünohistokimyasal görüntüleri. YYD: Yüksek yağlı diyetle beslenen grup, Diabet kontrol: Tedavi uygulanmayan diyabetik grup, MTF: 300 mg/kg/gün metformin, FSC: Fransız Sahil Çamı ekstresi, 10: 10 mg/kg/gün, 50: 50 mg/kg/gün, 100: 100 mg/kg/gün. 40x.



Resim 31: Deneysel gruplarda böbrek medullasının TGFbeta 1 antikoru ile boyamasının immünohistokimyasal görüntüleri. YYD: Yüksek yağlı diyetle beslenen grup, Diabet kontrol: Tedavi uygulanmayan diyabetik grup, MTF: 300 mg/kg/gün metformin, FSC: Fransız Sahil Çamı ekstresi, 10: 10 mg/kg/gün, 50: 50 mg/kg/gün, 100: 100 mg/kg/gün. 10x.



Resim 32: Deneysel gruplarda böbrek medullasının TGFbeta 1 antikoru ile boyamasının immünohistokimyasal görüntüleri. YYD: Yüksek yağlı diyetle beslenen grup, Diabet kontrol: Tedavi uygulanmayan diyabetik grup, MTF: 300 mg/kg/gün metformin, FSC: Fransız Sahil Çamı ekstresi, 10: 10 mg/kg/gün, 50: 50 mg/kg/gün, 100: 100 mg/kg/gün. 40x.

V. TARTIŞMA

Bizim yaptığımız çalışmada, sıçanlarda yüksek yağlı diyet (YYD) ve düşük doz streptozotosin ile oluşturulan Tip 2 diyabet (Tip 2 DM) modelinde Fransız sahil çamı (FSC) ekstresinin (10, 50, 100 mg/kg/gün) etkinliği değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol grubu olarak metformin (300 mg/kg/gün) kullanılmış ve bir grupta metformin ile birlikte FSC ekstresi (50 mg/kg/gün) birlikte verilerek bu kombinasyonunun etkinliği araştırılmıştır. Bizimde daha önce denediğimiz Bu deneysel hayvan modeli insanlardaki Tip 2 DM' yi oldukça iyi bir şekilde taklit ettiği birçok çalışmada gösterilmiştir (Sasidharan ve ark., 2013; Bhandari ve ark., 2015; Reed ve ark., 2000; Şahin ve ark., 2007; Ghiasi ve ark., Öztürk ve ark., 2015).

Diyabet oluşturulduktan 4 hafta sonra sakrifiye edilen sıçanların açlık kan şekerleri, tedavi almayan diyabetik grupta (diyabetik kontrol) anlamlı olarak artarken; tüm tedavi uygulanan gruplarda (FSC grupları, metformin, kombine tedavi) kan şekeri değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı düşmeye neden olmuştur. Öte yandan, tüm tedavi gruplarındaki değerler halen kontrole göre anlamlı olarak yüksek bulunmuş ve kombine grupta en fazla kan şekerini düşürücü etki gözlenmemiştir.

Kan şekeri düzeylerinin uzun dönem boyunca genel seyrini gözlemlediğimiz HbA1c değerleri karşılaştırılmıştır. HbA1c düzeyleri, kontrole göre diyabetik sıçan grubunda anlamlı olarak artmıştır. Tüm tedavi gruplarında diyabetik kontrole göre azalma gözlenirken, istatistiksel olarak anlamlı azalma sadece FSC ekstresinin 50 mg/kg/gün uygulandığı grupta görülmüştür. Öte yandan, tedavi gruplarındaki HbA1c düzeyleri, kontrole göre anlamlı bir fark bulunmamıştır. FSC'nin, kan şekeri ve HbA1c değerini düşürücü etkisi, FSC'nin antidiyabetik etkisinin araştırıldığı diğer çalışmalarla benzerlik göstermektedir (Liu ve ark., 2004; Parveen ve ark., 2010; Jankyova ve ark., 2012).

Serum insülin düzeylerinde gruplar arası anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Bu sonuçlar, Sasidharan ve arkadaşlarının yaptığı Tip 2 DM modelindeki açlık insülin değerleri ile uyumluluk göstermektedir

(Sasidharan ve ark., 2013). Ancak, bu modelin uygulandığı birkaç çalışmada insülin değerlerinin diyabette arttığı da görülmektedir (Xu ve ark., 2015; Bhandari ve ark., 2015).

İnsüline direncin göstergesi olan HOMA-IR değerleri ise, diyabetik grupta kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır. Bu durum, oluşturulan modelin Tip 2 DM' le uyumlu olduğunu önemle desteklemektedir (Ding ve ark., 2013; Ghiasi ve ark., 2015). Tüm tedavi gruplarında diyabetik kontrole göre azalma gözlenirken, istatistiksel olarak anlamlı azalma sadece metformin ve FSC ekstresinin 50 mg/kg/gün uygulandığı gruplarda gözlenmiş ve bu iki grupta kontrole göre anlamlılık ortadan kalkmıştır.

Tip 2 DM modelimizde, deney sonuna kadar yapılan vücut ağırlığı ölçümlerinde, tüm gruplardaki hayvanların ağırlıkları, başlangıça göre artmıştır. Diyabetik gruptaki vücut ağırlığında kontrole göre anlamlı bir azalma gözlenirken, tedavi uygulan gruplarda kontrole göre anlamlı bir fark bulunmamıştır. Yüksek doz STZ ile oluşturulan Tip 1 DM oluşturulan modellerde aşırı kilo kaybı yaşanmaktadır. Tip 2 DM oluşturulan deneysel modellerde ise aşırı kilo kaybı gözlenmiştir. Bu durumda tip II modelimizin oluşturulduğunu desteklemektedir (Sasidharan ve ark., 2013).

Fransız sahil çamı (FSC) ekstresi, reaktif oksijen ve nitrojen türlerine karşı serbest radikalleri kuvvetli temizleyici etkisinden dolayı kullanılmaktadır. Reaktif oksijen ve nitrojen türleri; kanser, aterosklerozis ve diyabet gibi dejeneratif hastalıkların gelişiminde önemli role sahip olduğu bildirilmektedir (Iravani ve ark, 2011). FSC ekstresi, zengin oligomerik proantosiyandinleri (OPS) içermesinden dolayı, kronik ve dejeneratif hastalıklara karşı potansiyel olarak farklı koruyucu etkiler gösterme kapasitesine sahip olduğu ve ekstrenin vasorelaksan aktivite, ADE inhibisyonu ve kapillerin permeabilitesini artırarak mikrosirkülasyonu geliştirme yeteneği gibi kardivasküler yararları sahip olduğu rapor edilmiştir (Iravani ve ark, 2011, Maritim ve ark., 2003).

Yüksek yağlı diyetle beslenme ve düşük doz STZ ile oluşturulan Tip 2 DM ve beraberinde oluşan insülin direnci, endotel hasarı oluşmasında

büyük rol oynamakta ve vasküler anti-aterojenik rolü azaltabilen ve erken aterosklerozun göstergelerinden biri olan endotel disfonksiyona neden olabilmektedir (Gerald ve King, 2010). Ayrıca, aterosklerozun, endotele bağlı vazodilatasyonun bozulmasına neden olduğu ve vazokonstrüksiyona ve damar spazmına yol açabileceği bildirilmektedir (Lawson ve Wolf, 2009). Bazı çalışmalarda Tip 2 DM oluşturulan hayvan modellerinde ve Tip 2 DM bulunan hastalarda Ach ile meydana gelen endotele bağımlı gevşeme yanıtları bozulmaktadır. DM oluşturulmuş ratların koroner arterlerinde asetilkolin (Ach)'le yapılan damar gevşeme yanıtlarında meydana gelen azalma, plazma NO seviyesindeki düşüş ve eNOS enzim ekspresyonundaki azalma ile ilişkilendirilmektedir (Tawfik ve ark., 2006; Fu ve ark., 2007; Shinozaki ve ark., 1995).

Öte yandan, özellikle antioksidan kapasitesi yüksek besinler ve bitkisel tedavi yaklaşımları ya da ilaçlarla bu durum geri çevrilebilmektedir (Ohkita ve ark., 2011; Virgılı ve ark., 1997; Liu ve ark., 2004; Zibadi ve ark., 2008). Bizim çalışmamızda, sıçanlarda, fenilefrin ile oluşturulan kasılma yanıtlarında bir farklılık gözlenmezken; ACh ile oluşturulan gevşeme yanıtlarında, diyabetik grupta kontrole göre anlamlı olmayan bir azalma gözlenmiş ve bu durum FSC ekstresi ile beslenen gruplarda geri çevrilirken, metformin uygulaması ile geri çevirememiştir. FSC ekstresi uygulanan gruplarda, gevşeme yanıtlarındaki en belirgin artış, kombine metformin + 50 mg/kg/gün FSC ekstresi verilen grupta gözlenmiştir.

Sodyum nitroprusid (SNP), endotelden bağımsız olarak, ACh'den farklı bir mekanizma ile guanilat siklaz aktivasyonunun artırarak direkt damar düz kasına etki eder ve gevşeme sağlar. Yaptığımız çalışmada, deney gruplarındaki sıçanların torasik aortalarındaki endotelden bağımsız SNP gevşeme yanıtlarında gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.

Gruplar arasında kan lipid düzeyleri açısından, total kolesterol ve HDL-kolesterol değerleri bakımından anlamlı bir fark bulunadı. LDL-kolesterol değerleri incelendiğinde, kontrol grubuna göre, yüksek yağlı diyet ve diyabetik kontrol grubunda bir miktar artış görülmüş; ancak bu artış

istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. Metformin ve FSC uygulanan gruplar bu artışı geri çevirmiştir.

Trigliserid değerleri incelendiğinde, diyabetik kontrol grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gözlenmiştir. Metformin ve FSC ekstresi uygulamaları diyabetteki bu artışı, kontrole geri çevirmiştir. Bizim bulgularımızla uyumlu olarak, FSC ekstresinin, HepG2 hücrelerinde, lipid sentezini azalttığı ve sıçanlarda özellikle trigliseridleri düşürdüğü gösterilmiştir (Guerrero ve ark., 2013).

Bu çalışmada, ayrıca, lipid peroksidasyonun göstergesi olarak, hayvanların serumlarında ve böbreklerinde MDA düzeyi ve serumlarında c-reaktif protein (CRP) düzeyi ölçülmüştür. Serum CRP düzeyleri, diyabete bağlı olarak artmakla beraber, istatistiksel olarak anlamlılık oluşmadı. Tedavi uygulamaları ise kontrol grubunda görülen bu artışı anlamlı olmayan bir şekilde azalttılar.

Serum nitrat/nitrit düzeyleri, diyabete bağlı olarak artmakla beraber, istatistiksel olarak anlamlılık oluşmamıştır. Tedavi uygulamaları ise bu artışı anlamlı olmayan bir şekilde azaltmıştır.

Serum MDA düzeylerinde ise, diyabete bağlı olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir. Tedavi uygulamaları, bu artışı azaltırken, kontrol düzeylerine geri çevirememiştir. Bu sonuç, Tip 2 DM oluşturulmuş ratlarda hiperglisemi ile indüklenen oksidatif hasar üzerine FSC ekstresinin araştırıldığı çalışmayla uyumluluk göstermektedir (Parveen ve ark., 2010).

Pankreatik dokunun YYD, diyabet veya her ikisinin kombinasyonunda uğradığı hasar, adacık hücrelerinin bozulması ve azalması, etrafı saran asiner hücreler ile interlobiler epitelde dejeneratif bozukluklar şeklinde olduğu bir çok çalışmada gözlenmiştir (Krishnasamy G ve ark., 2015; Mcalla G ve ark., 2015; Ben Abdallah Kolsi R ve ark., 2015; Arya A ve ark., 2015). Bizim çalışmamızda bulunan pankreas hasarı üzerine elde edilen histolojik bulgularımız, yukarda belirtilen çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur.

FSC ekstresinin, diyabetik sıçanlarda antioksidan etkisi ile ilişkili olarak, karaciğer histolojisini düzelttiği gösterilmiştir (Parveen K ve ark.,

2010). Karaciğere benzer şekilde, böbrekte de antioksidan etki üzerinden potasyum dikromat ile oluşturulmuş nefrotoksik hasarı düzelttiği, hem biyokimyasal hem de histokimyasal olarak gösterilmiştir (Parveen K ve ark., 2009). Bizim çalışmamızda, diyabetik kontrol grubunda böbreklerde oluşan histopatolojik hasarda, FSC ekstresinin tek başına az miktarda etkisinin olduğu, ama MTF ile kombine edildiğinde belirgin bir şekilde koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır.

FSC ekstresinin, diyabette yararlı olduğuna yönelik deneysel çalışmaların büyük çoğunluğu, yüksek doz STZ kullanılarak tip 1 diyabetin taklit edildiği çalışmalardır. Bir çalışmada, düşük doz STZ kullanılarak karaciğer hasarı üzerine koruyucu etki bildirilmiştir (Parveen ve ark., 2010). FSC ekstresi'nin, mikroanjiopatiye bağlı gelişen diyabetik retinopatide etkili olabileceğini bildiren bir çalışma (Steigerwalt ve ark, 2009) bulunmakla beraber, diyabetik nefropatideki olası yararlı etkilerine yönelik çalışma bulunmamaktadır. Proantosiyanidinlerin diyabetik nefropatideki olası yararlı etkilerine yönelik yapılan birkaç deneysel çalışma ise, yüksek doz STZ'in kullanıldığı tip 1 diyabet modelini taklit eden çalışmalar olup, doza bağlı etki araştırılmamıştır (Mansouri ve ark, 2011; Sayed, 2012; Zhang ve ark., 2013).

Böbrek fonksiyonlarına yönelik, deney hayvanlarının serumlarından elde edilen kan üre azotu ve kreatinin değerleri için, gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.

Böbrek MDA düzeylerinde ise, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamazken; diyabetik grupta kontrole göre bir artış gözlenmiş ve tedavi uygulamaları bu artışı geri çevirmiştir.

Potasyum bikromat ile böbrek hasarı oluşturulan bir çalışmada yapılan HE boyamasında, renal tubüler epitel hücrelerinin bozulduğu ve tubülüs lümeninde hyalin birikiminin gözlemlendiği, buna karşılık glomeruluslarda da bir bozukluğun olduğu saptanmıştır. FSC ekstresinin, bu bozuklukları, engellediği görülmüştür. FSC ekstresinin bu etkisi için, antioksidan mekanizmayı kullandığı düşünülmüştür. FSC ile etkili lipid peroksidasyonunun engellenmesi demir iyonları ile şelat yapmasına

bağlıdır. Serbest demir iyonlarının güçlü serbest radikal üretici etkisi, bu şelasyon ile engellenmekte ve böbrek hasarını durdurmaktadır. FSC ekstresinin, bir önemli etkisi de iNOS üzerinde yaptığı inhibisyonudur ve serbest radikalın oluşturduğu Nf-Kb aktivasyonunu engellemektedir. FSC ekstresinin bir başka etkisi ise, NADPH, sitokrom C redüktaz gibi, mutajenliği artıran aromatik hidrokarbonların, üzerinden gerçekleştirmesidir (Parveen ve ark., 2009).

Yapılan bir başka çalışma da, FSC ekstresinin diyabete bağlı nefropatili hastalardaki etkisinin, glikozu azaltmasından ziyade, antioksidan etkisine bağlı olduğu ileri sürülmüştür (Muchova ve ark., 2014). Hiperglisemiye bağlı nefropatide önemli bulgulardan bir tanesi, renal tübüler hücre apoptozu olup; FSC ekstresi, direk olarak BCL-2/Bax proteinleri üzerinden anti-apoptotik etkiler göstermektedir. Bu etkinin oluşmasında antioksidatif ve anti-inflamatuar etki ile lipid peroksidasyonu baskılanmaktadır ve ilgili parametrelerden süper oksit, nitrik oksit, peroksinitrit, iNOS, COX 2, Nf-KB inhibisyonu sağlanmaktadır. Kültür ortamında yapılan bir çalışmada, OPS'nin, böbrek tübüler hücrelerinde yüksek şekere maruz bırakılması sonucu gelişen apoptozisi engellendiği gösterilmiştir (Kim ve ark., 2010).

Megalinin, diyabete bağlı nefropatide, özellikle proksimal tübül hücrelerinin yüzeyinde yer aldığı ve RAP 38 knock out yapılmış sıçanlarda, kontrole göre artmış idrar albumin konsantrasyonuna karşı azalmış olduğu gösterilmiştir. Diyabete bağlı böyle bir gen profil değişikliği albuminüriyi etkileyecek şekilde megalin üzerinden sağlamıştır (Teumer ve ark., 2015). Farelerde yapılan ROCK-1 knock out çalışmasında STZ ile diyabetik nefropati oluşturulmuş ve burada megalin/cubilin kaybına karşılık artmış TGF-beta 1 ve İL-1 beta ilişkili fibrozisin olduğu ve bir Rho kinaz inhibitörü ile bulguların geriye döndürüldüğü bildirilmiştir (Zhou ve ark., 2011; Takeyama ve ark., 2011)

Sıçanlarda yapılan bir çalışmada, diyabet olmayan komalı ratlarda yüksek glikoz uygulamasına bağlı olarak oluşan akut hiperglisemi sonucu, anlamlı bir şekilde glomerular filtrasyon bariyerini, tübüler epitelyal

hücreleri ve peritübüler vasküler endotelial hücreleri bozmuştur. İdrarda mikroalbumin, beta 2 mikroglobulin, sistatin C, üriner ve seröz nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin seviyeleri artmış, buna karşılık megalin ve cubilin düzeyleri azalarak, renal ve oksidatif stres artmış ve beraberinde apoptoz oluşmuştur (Wang ve ark., 2015).

Bir başka çalışmada diyabetik nefropatili sıçanlara Çinde kullanılan bir bitki ekstresi uygulanmış ve bozulan üriner protein atılımı ve tübüler reabsorbsiyon fonksiyonu, bu bitki ekstresinin oluşturduğu antioksidan etkiye bağlı, artmış megalin ekspresyonu ile renal tübüler epitel hücrelerinde düzelmeyi sağlamıştır (Yin ark., 2013). STZ ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda, bir başka bitki ekstresi kullanılarak, artmış oksidatif stres biyokimyasal parametrelerle gösterilmiş, paralel şekilde gelişen nefrotolojik bulgular, hipertrofi, matriks yayılımı ve fibrozisin oluşturduğu glomeruller, TGF beta ekspresyonunun azalması ile görülmüştür. Burada azalan megalin ekspresyonunu artıran bitki ekstraktı bütün olumsuz patolojik bozuklukları düzelterek şekilde etkili olmuştur. Bu ektre ile bozulmuş tübüler fonksiyonun normale döndüğü bildirilmiştir (Yin ve ark., 2014). Benzer etki ve mekanizmalar bir başka ekstrede saptanmış ve aynı yöntemle megalin ve cubilin artışı üzerinden glomerular hasar azaltılmış ve tübüler reabsorbsiyon artırılmıştır (Ke ve ark., 2014).

Thiazolidinedionların diyabetik nefropatideki koruyucu özelliklerinin, oluşan fibrozis ve inflamasyonu, tübüler hücre kaybını, endotelial hasarı ve anormal anjiyogenezi, fibrozis için, bağ dokusu büyüme faktörü ve fibronektin üzerinden, inflamasyon için TNF alfa, IL-6 ve MCP-1 üzerinden, tübüler hücreler için megalin üzerinden hücre çoğalması ve apoptozis için PCNA/ kaspaz 3 oranı, anormal anjiyogenez için VEGF dağılımı ve oksidatif stres ile endotelial disfonksiyon için eNOS ve iNOS üzerinden gösterilmiştir (Toblli ve ark., 2011). Ayrıca Anjiyotensin 2 blokajında, diyabetik nefropati de proksimal tübüllerde megalin ekspresyonu üzerinden iyileşme sağladığı saptanmıştır. Burada megalinin bir endositoz reseptörü olarak, proksimal tübüllerin apikal

bölgelerinde bulunduğu ve albumin ile ilişkisinin diyabetik nefropati de önemli olduğu düşünülmüştür (Tojo ve ark., 2001, Tojo ve ark.; 2003).

TGF betayı inceleyen bir başka çalışma da diyabetik nefropati ile direk ilişkili olduğu ve etkisini tip 2 reseptörler üzerinde gösterdiği ve bunların da artmış megalin ile azalmış kollojen IV ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu şekilde özellikle reseptör II üzerinden oluşan fibrozis ve albuminürinin azaltıldığı gösterilmiştir (Russo ve ark., 2007). Bu çalışmaya ilaveten leptin uygulanmış diyabetik nefropatililerde, TGF-beta 1, Tip IV kollojen ve fibronektin ilişkisi gösterilmiş ve leptinin de diyabetik nefropati de rol oynadığı düşünülmüştür (Wolf ve Ziyadi, 2006)

Bu bilgiler ışığında, bizim çalışmamızda megalin ve TGF-beta 1 ile yapılan immünohistokimyasal bulgularımız, yukarda belirtilen çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur ve FSC ekstresinin tek başına az miktarda etkisinin olduğu ama MTF ile kombine edildiğinde belirgin bir şekilde bu mekanizmalar üzerinden diyabetik nefropati de etkili olabildiği saptanmıştır.

VI. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, yaptığımız bu çalışmada, yüksek yağ içerikli diyet ve düşük doz streptozotosinle diyabet oluşturulmuş sıçanlarda, tek başına farklı dozlarda ve metforminle kombine edilen Fransız sahil çamının etkinliği incelenmiştir. FSC ekstresi, diyabet oluşturulmuş sıçanlarda anlamlı bir şekilde yükselen açlık kan şekeri, HbA1C ve insüline karşı direnci gösteren artmış HOMA-IR değerlerinde iyileştirme göstermiştir. Gerek fenilefrin ile oluşturulan kasılma yanıtları bakımından, gerekse endotele-bağımlı ve bağımlı olmayan gevşeme yanıtları bakımından deney grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Ancak, istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamasa da, diyabetik ve YYD ile beslenen gruplarda kontrole göre Ach ile oluşturulan endotele-bağımlı gevşeme yanıtlarında azalma gözlenmiş ve bu durum FSC ekstresi ile beslenen gruplarda geri çevrilirken, metformin uygulaması gevşemede meydana gelen bu azalmayı geri çevirememiştir. FSC ekstresi uygulanan gruplarda, gevşeme yanıtlarındaki en belirgin artış, 300 mg/kg/gün metformin ve 50 mg/kg/gün FSC ekstresinin kombine verildiği grupta gözlenmiştir.

Lipid profilinde, sadece trigliserit değerleri anlamlı bir şekilde diyabetik grupta kontrole göre yükselirken, tedavi uygulamaları ise bu değerleri kontrole geri çevirmiştir.

Serum CRP ve MDA değerleri ve böbrekte MDA seviyesi diyabette belirgin yükselmiş; ancak istatistiksel olarak anlamlı farklılık sadece serum MDA düzeyleri için bulunmuştur. Tedavi uygulamaları ise, artmış olan bu parametrelerde azalmaya neden olmuştur.

Bunların yanı sıra, pankreas ve böbrek histopatolojisi üzerine yapılan çalışmaların sonucunda, kontrol grubunda sergilenen normal görünüm, YYD grubunda benzer şekilde bulunurken, diyabetik grupta bozulmuştur. Metformin uygulamasıyla diyabetik kontrol grubundaki hasar azalmıştır. Histolojik olarak metformin ile gerçekleşen iyileşme, 50 mg/kg/gün FSC ekstresi verilen grupta az, yüksek dozda FSC ekstresi verilen grupta biraz daha belirgindir; kombine (50 mg/kg/gün FSC ekstresi ve 300 mg/kg/gün metformin) grupta ise, daha da belirginleşen bir düzelme sağlanmıştır.

Yukarıda bahsedilen sonuçların ışığında, FSC ekstresinin, tip 2 diyabet ve onun neden olduğu komplikasyonların tedavisinde tek başına ya da diğer tedavilerle kombine edilerek, katkı sağlama potansiyeli olabilir.

VII. KAYNAKLAR

- Akan Z, Dikilidal M, Ozdemir H, Oto G, Yilmaz A. Effects of Thymus Vulgaris L. and Thymbra Spicata L. on diabetes mellitus associated cognitive impairment and neuropathy: Thymus Vulgaris and Cognitive Function Improvements. Medical Science and Discovery.2014;1:16-21
- Aksoy N, Vural H, Sabuncu T, Aksoy S. Effects of melaytonin on oxidative-antioxidative status of tissues in streptozotocine-induced diabetic rats. Cell Biochem Funct 2003;21: 121-125
- Alexandre C, Segre W, Hueb W, Maria R, Garcia R, Rezende PC, Favarato D, Maria C, Strunz C, Sprandel MC, Rogg rio A, Carvalho ACO, Maranhao RC, Ramires JAF, Filho RK. Troponin in diabetic patients with and without chronic coronary artery disease. BMC Cardiovasc Disord. 2015; 15: 72.
- Altan N, Sepici Din el A, Koca C. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres Turk Biyokimya Dergisi.2006;31,2:51-56
- Altuntaş Y. Diabetes Mellitus'un Tanımı, Tanısı ve Sınıflandırılması. Ed: M. Yenig n, Y. Altuntaş, Her Y n yle Diabetes Mellitus. Nobel Tıp Kitabevi Ltd. şti., 2. Baskı,51-62, İstanbul, 2001.
- American Diabetes Association (ADA). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care.2005; 28: 37-42
- American Diabetes Association. Executive Summary: Standards of Medical Care in Diabetes-2014. Diabetes Care. 2014; 37,1:5-80
- Ames BN, Hagen TM, Shigenaga MK. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1993; 90(17):7915-22.
- Amos AF, McCarty DJ, Zimmet P. Therising global burden of diabetes and its complications: Estimates and projections to theyear 2010. Diabet. Med., 1997;14:1-85
- Andreoli TE, Carpenter C.C.,Griggs RC, Benjamin IJ. Cecil Essentials of Medicine, Nobel Kitap Evleri, 7th Edition, 2008; Page:678-679
- Anjenayelu M, Chopra K. Effect or irbesartan on the antioxidant defence system ve nitric oxide release in diabetic rat kidney. Am J Nephrol 2004;24:488-496

- Anthony J.Trevor, Bertram G.Katzung. Basic and Clinical Pharmacology,13th Edition.2015; 41: 972-974
- Arya A, Jamil A-Obaidi MM, Karim RB, Taha H, Khan AK, Shahid N, Sayem AS, Looi CY, Mustafa MR, Mohd MA, Ali HM. Extract of *Woodfordia fruticosa* flowers ameliorates hyperglycemia, oxidative stress and improves β -cell function in streptozotocin- nicotinamide induced diabetic rats. *J Ethnopharmacology*. 2015;175:229-40
- Aslan M, Orhan N. Diyabet tedavisinde kullanılan bitkisel ürünler ve gıda destekleri. 2010; 23-24
- Bağrıaçık N. Diabetes Mellitus tanımı, tarihçesi,sınıflaması ve sıklığı: İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitim Sempozyumu.18-19 Aralık 1997; 9-18 İstanbul.
- Bahçecik N. Diyabet ve Akut Durumlar. Diyabet Hemşireliği Derneği Kitabı.2005: 11;118-120
- Bang CY, Choung SY. Enzogenol improves diabetes-related metabolic change in C57BL/Ksj-db/db mice, a model of type 2 diabetes mellitus. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*.2014; 66; 875–885
- Baynes YW, Thorpe R. Role of oxidative stress in diabetic complications. *Diabetes*.1999;48:1-9
- Ben Abdallah Kolsi R, Ben Gara A, Jardak N, Chaaben R, El Feki A, El Feki L, Belghith K. Inhibitory effects of *Cymodocea nodosa* sulphated polysaccharide on α -amylase activity, liver-kidney toxicities and lipid profile disorders in diabetic rats. *Arch Physiol Biochem*. 2015;121(5):218-27
- Berryman AM, Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Influence of treatment of diabetic rats with combinations of pycnogenol, beta-carotene, and alpha-lipoic acid on parameters of oxidative stress. *J Biochem Mol Toxicol*. 2004;18(6):345-352.
- Bhandari U, Kumar V, Kumar P, Tripathi CD, Kha G. Protective effect of pioglitazone on cardiomyocyte apoptosis in low-dose streptozotocin & high-fat diet-induced type-2 diabetes in rats. *Indian J Med Res*. 2015;142: 598-605
- Bian M, Xu Q, Xu Y, Li S, Wang X, Sheng J, Wu Z, Huang Y, Yu X. Investigation on oxidative stress of nitric oxide synthase interacting protein from *Clonorchis sinensis*. *Parasitol Res*.2015
- Bonnefont-Rousselot D, Lehmann E, Jaudon MC, Delattre J, Perrone B, Rechke JP. Blood oxidative stress and lipoprotein oxidizability in haemodialysis patients:

- effect of the use of a vitamin E-coated dialysis membrane. *Nephrol Dial Transplant*. 2000;15(12):2020-2028.
- Brown, H.; Sanger, F.; Kitai, R., "The structure of pig and sheep insulins", *Biochemical Journal*. 1955;60 (4): 556–565
- Brown, MS, Goldstein JL. How LDL-receptor influences cholesterol and atherosclerosis. *Sci. Am*. 1984;251: 52–60.
- Brownlee M, *Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications*. Nature. 2001;13;414(6865);813-20.
- Caballero AE. Endothelial dysfunction in obesity and insulin resistance: a road to diabetes and heart disease. *Obes. Res*. 2003;11: 1278–1289
- Callaghan, BC., Cheng, HT, Stables, CL, Smith, AL, Feldman, EL. Diabetic neuropathy: Clinical manifestations and current treatments. *Lancet Neurol*. 2012;11,6: 521–534
- Cayman, nitrite/nitrate assay kit kullanım kılavuzu, 2015.
- Chan NN, Chan JC. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a potential link between endothelial dysfunction and cardiovascular diseases in insulin resistance syndrome?. *Diabetologia*. 2002;45(12):1609-16
- Chatzigeorgiou A, Halapas A, Kalafatakis K, Kamper E. The Use of Animal Models in the Study of Diabetes Mellitus. 2009; 23: 245-258
- Chen F, Xiong H, Wang J, Ding X, Shu G, Mei Z. Antidiabetic effect of total flavonoids from *Sanguis draxonis* in type 2 diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2013;149:729–736
- Cheng M, Gao HQ, Xu L, Li BY, Zhang H, Li XH. Cardioprotective Effects of Grape Seed Proanthocyanidins Extracts in Streptozocin Induced Diabetic Rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2007;50:503–509
- Chiu CJ, Taylor A. Dietary hyperglycemia, glycemic index and metabolic retinal diseases. *Prog Retin Eye Res*. 2011; 30(1): 18–53
- Colagiuri R, Diabetes: a pandemic, a development issue or both? *Cardiovasc. Ther*. 2010;8(3);305–309
- Coskun O, Kanter M, Korkmaz A, et al. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and β -cell damage in rat pancreas. *Pharmacol Res* 2005; 51: 117-123.

- Cowie CC, Rust KF, Byrd-Holt DD, et al. Prevalence of diabetes and high risk for diabetes using A1C criteria in the U.S. population in 1988-2006. *Diabetes Care* 2010; 33: 562–568.
- Csonka C, Páli T, Bencsik P, Görbe A, Ferdinandy P, Csont T. Measurement of NO in biological samples. *British Journal of Pharmacology*. 2015;172: 1620–1632
- Curaj A, Simsek Yilmaz S, Staudt M, Liehn E. Minimal invasive surgical procedure of inducing myocardial infarction in mice. *J Vis Exp*. 2015; 4:(99)
- D’Andera G. Pycnogenol: A blend of procyanidin with multifaceted therapeutic applications ?. *Fitoterapia*. 2010;81:724-736
- Das K, Chainy GBN. Modulation of rat liver mitochondrial antioxidant defense system by thyroid hormone. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2001; 1537(1): 1-13.
- David M. Nathan, *Diabetes Advances in Diagnosis and Treatment*. JAMA. 2015;314(10):1052-1062
- Davis KL, Meyers J, Zhao Z, McCollam PL, Murakami M. High-Risk Atherosclerotic Cardiovascular Disease in a Real-World Employed Japanese Population: Prevalence, Cardiovascular Event Rates, and Costs *J Atheroscler Thromb*. 2015.
- Ding Y, Zhang Z, Dai X, Jiang Y, Bao L, Li Y, Li Y. Grape seed proanthocyanidins ameliorate pancreatic beta-cell dysfunction and death in low-dose streptozotocin- and high-carbohydrate/high-fat diet-induced diabetic rats partially by regulating endoplasmic reticulum stress. *Nutrition & Metabolism*. 2013; 10:51
- Duby JJ, Campbell RK, Seter SM, White et al., *Diabetic neuropathy: an intensive review*. *Am. J. Health Syst. Pharm*. 2004; 61:160–173,
- Endemann DH, Schiffrin EL. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(8):1983-92
- Fernandez J, Perez-Alvarez JA, Fernandez-Lopez JA. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat . *Food Chemistry*, 1997;59 (3):345-353
- Fishman AP. Endothelium. A distributed organ of diverse capabilities. *Ann NY Acad Sci*. 1982;401:1-8
- Fox CS, Coary S, Sorlie PD et al., Trends in cardiovascular complications of diabetes. *JAMA, J. Am. Med. Assoc.* 2004;292:2495-2499

- Fridovich I. Superoxide radicals: an endogenous toxicant. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.*1987;23;239-25
- Fu J, Fu J, Yuan J, Zhang N, Gao B, Fu G, Tu Y, Zhang Y. Anti-diabetic activities of *Acanthopanax senticosus* polysaccharide (ASP) in combination with metformin. *Int J Biol Macromol.* 2012; 50(3): 920-926
- Fu, G.S., Huang, H., Chen, F. Carvedilol ameliorates endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2007;19 (567): 223–230.
- Galassetti P, Riddell MC. Exercise and type 1 diabetes (T1DM). *Compr Physiol.* 2013;3(3):1309-36
- Garcia YJ, Rodríguez Malaver AJ, Penaloza N. Lipid peroxidation measurement by thiobarbituric acid assay in rat cerebellar slices. *J Neurosci Methods.* 2005; 15;144(1):127-35.
- Geraldes P, King GL. Activation of Protein Kinase C Isoforms & Its Impact on Diabetic Complications. *Circ Res.* 2010; 106(8): 1319–1331
- Ghiasi R, Soufi FG, Somi MH, Mohaddes G, Babil FM, Naderi R, Alipour MR. Swim Training Improves HOMA-IR in Type 2 Diabetes Induced by High Fat Diet and Low Dose of Streptozotocin in Male Rats. *Adv Pharm Bull,* 2015; 5(3): 379-384
- Goldberg RB. Cardiovascular disease in patients who have diabetes. *Cardiol. Clin.* 2003 :21;399–413
- Grajales SC, Muriel P. Antioxidants in liver health. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 2015; 6(3): 59-72
- Gross JL, Azevedo MJ, Silveiro SP, Canani LH, Caramori ML, Zelmanovitz T. Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment. *Diabetes Care.* 2005 Jan;28(1):164-76
- Guerrero L, Margalef M, Pons Z, Quinones M, Arola L, Arola-Arnal A, Muguerza B. Serum metabolites of proanthocyanidin-administered rats decrease lipid synthesis in HepG2 cells. *J Nutr Biochem.* 2013;24(12):2092-2099
- Gulati K, Joshi JC, Ray A. Recent advances in stress research: Focus on nitric oxide. *European Journal of Pharmacology* 2015: 765;406–414
- Gurpinar T, Gok S. Vasodilator effects of cromakalim and HA 1077 in diabetic rat aorta. *Swiss Med Wkly.* 2012;142
- Guyton AC, Hall J.E. *Textbook of Medical Physiology.* 11th Edition, 2007;972-975

- Guyton AC. Textbook of Medical Physiology. 7'th Philadelphia: WB Saunders Company;1986.
- Gürler M. Subklinik Diyabetliler ile Yeni Tespit Tip 2 Diyabetli Kişilerde Serum Visfatin düzeyleri, Uzmanlık Tezi, 2009.
- Gyberg V, Bacquer DD, Kotseva K, Backer GD, Schnell O, Sundvall J, Tuomilehto J, Wood D, Ryde'n L. Screening for dysglycaemia in patients with coronary artery disease as reflected by fasting glucose, oral glucose tolerance test, and HbA1c: a report from EUROASPIRE IV—a survey from the European Society of Cardiology, European Heart Journal; 2015 (36) :1171–1177
- Ha H, Kim KH. Pathogenesis of diabetic nephropathy: the role of oxidative stres and protein kinase C. Diabetes Res Clin Pract 1999;45: 147-151
- Hadi AR H, Suwaidi JA. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus Vascular Health and Risk Management 2007;3(6) 853–876
- Halifeoğlu İ, Karataş F, Çolak R. Tip 2 Diyabetik Hastalarda Tedavi Öncesi ve Tedavi Sonrası Oksidan ve Antioksidan Durum, Fırat Tıp Dergisi 2005;10(3): 117-122.
- Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in humandisease. The Am J of Med.1991; 14-22
- Halliwell, B.,Gutteridge, J.M.C.. Role of free radicals and catalytic metal ions in humandisease. Methods Enzymol. 1990;186: 1-85.
- Hao M, Li SY, Sun CK, Xu J, Lin Y, Liu KX, Wang L, Li CX, Zhou Q, Du JL, Li H. Amelioration effects of berberine on diabetic microendothelial injury model by the combination of high glucose and advanced glycation end products in vitro. European Journal of Pharmacology.2011;654; 320–325
- Harrison. İç Hastalıkları Prensipleri. Nobel Tıp Kitapevleri,2004;333:2109-2010
- Harsha S, Gardana C, Simonetti P, Spigno G, Lavelli V. Characterization of phenolics, in vitro reducing capacity and anti-glycation activity of red grape skins recovered from winemaking by products. Bioresource Technology. 2013;140:263-268
- Hatemi H: Diabetes Mellitusun Tarihçesi. Aktüel tip dergisi 1996; 7: 497-499.

- Houslay MD. ‘Crosstalks’: a pivotal role for protein kinase C in modulating relationships between signal transduction pathways. *European Journal of Biochemistry* 1991;195(1): 9-27.
- <http://nptel.ac.in/course/102103012/module5/lec4/3.html>, Erişim tarihi:29.02.2016
- Huang PL, Chi CW, Liu TY. Areca nut procyanidins ameliorate streptozocin-induced hyperglycemia by regulating gluconeogenesis. *Food and Chemical Toxicology*. 2013; 55: 137-143
- Hubbard AK, Rothlein R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radical Biology & Medicine*.2000;28(9);1379-1386
- Huber CA, Schwenkglenks M, Rapold R, Reich O. Epidemiology and costs of diabetes mellitus in Switzerland: an analysis of health care claims data, 2006 and 2011; 2014:44
- International Diabetes Federation (IDF). *Diabetes Atlas 6*. Edition. 2013-2014
- Iravani S, Zolfaghari B. Pharmaceutical and nutraceutical effects of *Pinus pinaster* bark extract. *Res Pharm Sci*. 2011, 6(1):1-11.
- İrer SV, Alper G. Experimental Models of Diabetes Mellitus, *Türk Klinik Biyokimya Derg* 2004; 2(3): 127-136
- İssi M, Gül Y. Deney Hayvanlarında Kan ve Örnek Alma Teknikleri. *Journal of Clinical and Analytical Medicine*. Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı
- Jankyova S, Kmecova J, Cernecka H, Mesarosova L, Musil P, Brnoliakova Z, Kyselovic J, Babal P, Klimas J. Glucose and blood pressure lowering effects of Pycnogenol® are inefficient to prevent prolongation of QT interval in experimental diabetic cardiomyopathy. *Pathol Res Pract*. 2012;15;208(8):452-457.
- Jankyova S, Kucera P, Goldenberg Z, Yaghi D, Navarova J, Kyselova Z, Stolic S, Klimas J, Racanska E, Matyas S. Pycnogenol efficiency on glycaemia, motor nerve conduction velocity and markers of oxidative stress in mild type diabetes in rats. *Phytother Res*. 2009;23(8):1169-1174
- Jensen SJK. Oxidative stress and free radicals. *Journal of Molecular Structure (Theochem)*.2003; 666–667:387–392

- Jeopold JA, Joscalzo J. Oxidative mechanisms and atherothrombotic cardiovascular disease. *Drug Discov Today Ther Strateg.* 2008;5,1: 5–13
- Jhonson SA, Spurney RF. Twenty years after ACEIs and ARBs: Emerging Treatment Strategies for Diabetic Nephropathy, *American Journal of Physiology- Renal Physiology.*2015:
- Kahn CR, Weir GC, King GL et al., *Joslin's Diabetes Mellitus.* 14.th Edition. Lippincott Williams-Wilkins, 2005
- Kalra S. Hypoglycaemia in diabetes. *Recent Advances In Endocrinology. J Pak Med Assoc.*2014;1090-1093
- Katzungs Basic & Clinical Pharmacology. 13th Edition. 2015; 41:978-979
- Kavaklı B, Sargın M, Gümüş M. Diyabetes Mellitus'un Akut Metabolik Komplikasyonları 3: Laktik Asidoz.1998:718-719
- Kayaalp O. *Klinik Farmakolojinin Esasları ve Temel Düzenlemeler.* 11. baskı. Hacettepe TAŞ, 2006, Ankara.
- Ke JT, Li M, Xu SQ, Zhang WJ, Jiang YW, Cheng LY, Chen L, Lou JN, Wu W. Gliquidone decreases urinary protein by promoting tubular reabsorption in diabetic Goto-Kakizaki rats. *J Endocrinol.* 2014;220(2):129-41
- Keskek SA, Kirim S, Yanmaz N, Estimated costs of the treatment of diabetic foot ulcers in a tertiary hospital in Turkey, *Pak J Med,* 2014;30(5):968-971
- Kim CH, Him HK, Kim BY, Jung CH, Mok JO, Kang SK. Impact of hemoglobin A1c-based criterion on diagnosis of prediabetes: The Korea National Health and Nutrition Examination Survey, 2011.
- Kim YJ, Kim YA, Yokozawa T. Attenuation of oxidative stress and inflammation by gravinol in high glucose-exposed renal tubular epithelial cells. *Toxicology.*2010;270(2-3):106-11
- Kitada M, Zhang Z, Mima A, King GL. Molecular mechanisms of diabetic vascular complications. *Journal of Diabetes Investigation.*2010
- Kolios G, Valatas V, Ward SG. Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal Messenger in a unsolved puzzle. *Immunology.*2004;113(4);427-437
- Kos I, Prkacin I. Diabetic Nephropathy As a Cause Of Chronic Kidney Disease. *Acta Med Croatica.* 2014;68(4-5):375-81.
- Krishnasamy G, Muthusamy K, Chellappan DR, Subbiah N. Antidiabetic, antihyperlipidaemic, and antioxidant activity of *Syzygium densiflorum* fruits in

- streptozotocin and nicotinamide-induced diabetic rats. *Pharm Biol.* 2015; 24:1-11
- Krzymien J, Karnafel W. Lactic acidosis in patients with diabetes. *Pol Arch Med Wewn.* 2013;123 (3): 91-97
- Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robin's Temel Patoloji 9. Baskı, 2013. Nobel Kitapevleri. Sayfa 743-745.
- Kurçer Z, Karaoğlu D. The use of Alloxan and Streptozotocin in Experimental Diabetes Models. *Turk Jem.* 2012; 16: 34-40
- Larner, J. (1985). Insulin and oral hypoglycemic drugs, glucagon. Goodman and Gilman's the pharmacological basis therapeutics. 7th Eds: Gilman A.G., Goodman L.S., Rall T.W., Murad F., MacMillan Publ. Comp., New York, p: 1490-1516.
- Lau YS, Ling WC, Murugan D, Mustafa MR. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2015 65:4;297–298
- Laurence L. Brunton, John S. Lazo, Keith L. Parker (edit.), Goodman&Gilman, Tedavinin Farmakolojik Temelleri, Nobel Kitap Evleri, 2009;60:1613-1614
- Lawson C, Wolf S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. 2009;61; 22–32
- Li T, Xi HF, Luo HM, Liu WX, Gao X, Liu DW, Yang L. Association of the NAD(P)H oxidase p22 phox gene C242T polymorphism with type 2 diabetes mellitus, diabetic nephropathy, and carotid atherosclerosis with type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis. *Meta Gene.* 2015;6: 1–8
- Lipinski, B: Pathophysiology of oxidative stress in diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and Its Complications.* 15: 203–210, 2001.
- Liu X, Wei J, Tan F, Zhou S, Würthwein G, Rohdewald P. Antidiabetic effect of Pycnogenol French maritime pine bark extract in patients with diabetes type II. *Life Sci.* 2004;8:75(21): 2505-13
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem,* 1951, Nov;193(1):265-75.
- Lushchak VI. Classification Of Oxidative Stress Based On Its Intensity. *EXCLI Journal* 2014;13:922-937
- Madsbad S, Hilsted J, Krarup T, Tronier B, Sestoft L. Plasma somatostatin increases during hypoglycaemia in insulin-dependent patients with and without Beta-cell function. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1983;19(1);47-51.

- Maiese K, Chong ZZ, Shang YC. Mechanistic Insights Into Diabetes Mellitus and Oxidative Stress. *Curr Med Chem*. 2007 ; 14(16): 1729–1738.
- Maimoona A, Naeem I, Saddiqe Z, Jameel K. A review on biological, nutraceutical and clinical aspects of French maritime pine bark extract. *J Ethnopharmacol* . 2011;133(2):261-277.
- Malaisse WJ. Alloxan toxicity to pancreatic beta cells. *Biochem Pharmacol*. 1982;22:3527-34
- Mann DM, Carson AP, Shimbo D, et al. Impact of A1C screening criterion on the diagnosis of pre-diabetes among U.S. adults. *Diabetes Care* 2010; 33: 2190–2195
- Mansor LS, Gonzalez ER, Cole MA, Tyler DJ, Beeson JH, Clarke K, Carr CA, Heather LC. Cardiac metabolism in a new rat model of type 2 diabetes using high-fat diet with low dose streptozotocin. *Cardiovascular Diabetology*. 2013;12:136
- Mansouri E, Panahi M, Ghaffari MA, Ghorbani A. Effects of grape seed proanthocyanidin extract on oxidative stress induced by diabetes in rat kidney. *Iran Biomed J*. 2011;15(3):100-6
- Maranhao RC, Leite ACA. Development of Anti- Atherosclerosis Therapy Based on the Inflammatory and Proliferative Aspects of the Disease. *Current Pharmaceutical Design*. 2015; 21; 1196-1204
- Maritim A, Dene BA, Sanders RA, Watkins J. Effect of Pycnogenol treatment on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biochem Mol Toxicol*. 2003;17:193–199.
- Marshall S M, Flyvbjerg A. Prevention and early detection of vascular complications of diabetes. *BMJ*. 2006 Sep 2; 333(7566): 475–480.
- McCalla G, Parshad O, Brown PD, Gardner MT. Beta Cell Regenerating Potential of *Azadirachta indica* (Neem) Extract in Diabetic Rats. *West Indian Medical Journal*. 2015
- Memisogullari R, Taysi S, Bakan E et al., Antioxidant Status and Lipid Peroxidation in Type II Diabetes Mellitus. *Cell Biochem Func*. 2003; 21: 291-296,
- Memişoğulları R. Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi* 2005;3: 30-39

- Muchova J, Orszaghova Z, Zitnanova I, Trebaticky B, Breza J, Durackova Z. The effect of natural polyphenols on the oxidative stress markers in patients with diabetic nephropathy. *Free Radic Biol Med.* 2014;75:42
- Muratoğlu S. Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı tanılı bireylerde konvansiyonel inflamasyon ve oksidatif stres belirtilerinin düzeyleri. Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2014, Ankara. (Danışman: Prof.Dr. Ayşe BİLGİHAN)
- Nemecek BD, Hermayer KL, Arnold PC, Bohm NM. Evaluation of Ward Management of Diabetic Ketoacidosis. *Clinical Diabetes.* 2014;32:3
- Ni Z, Mu Y, Gulati O. Treatment of melasma with Pycnogenol. *Phytother Res.* 2002; 16(6): 567-71.
- Nowotny K, Jung T, Höhn A, Weber D, Grune T. Advanced Glycation End Products and Oxidative Stress in Type 2 Diabetes Mellitus. *Biomolecules.* 2015; 5: 194-222
- O'hara, Y, Pterson, TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J. Clin. Invest.* 1993;91: 2546–2551.
- Ohkita M, Kiso Y, Matsumura Y. Pharmacology in Health Foods: Improvement of Vascular Endothelial Function by French Maritime Pine Bark Extract (Flavangenol). *J Pharmacol Sci.* 2011;115:461-465
- Olmez E, Vural K, Gok S, Ozturk Z, Kayalar H, Ayhan S, Var A. Olive Leaf Extract Improves the Atherogenic Lipid Profile in Rats Fed a High Cholesterol Diet. *Phytother Res.* 2015;29(10):1652-1657
- Oztürk Z, Gulpinar T, Vural K, Boyacıoğlu S, Korkmaz M, Var A. Effects of selenium on endothelial dysfunction and metabolic profile in low dose streptozotocin induced diabetic rats fed a high fat diet. *Biotech Histochem.* 2015;90(7):506-515
- Öğüt S, Atay E. Yaşlılık ve Oksidatif stres. *S.D.Ü. Tıp Fak. Dergisi.* 2012; 19(2):68-74
- Özata M, Yöntem A. Endokrinoloji Metabolizma ve Diyabet. 1. Baskı. 2006. İstanbül Medical Yayıncılık
- Özdoğu H. İnflamasyonda bir başka aktör: Endotel. Sayfa: 21-28
- Özkan M, Yüksekol İ. Nitrik Oksit ve Akciğerler. *Türk Toraks Dergisi.* 2003;4(1);88-94

- Öztürk Y, Herekman Demir T. Streptozotosin ile Oluşturulan DeneySEL Diyabetin Sıçan Uterusunda Asetilkolin ve Prostaglandin f2 Kasılmaları Üzerine Etkileri. Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi, 2005;6 (1): 109-123
- Packer L, Rimbach G, Virgili F. Antioxidant Activity And Biologic Properties of a Procyanidin-Rich Extract From Pine (Pinus Maritima) Bark, Pycnogenol. Free Radical Biology & Medicine.1999;27: 704–724
- Park YS, Yoo SE, Shin HS, Jin YR, Yun YP. Pharmacological Characterization of Vasorelaxant Effects of BMS-180448, a Novel Cardiosensitive ATP-Sensitive Potassium Channel Opener, in Rat Aorta. J Pharmacol Sci.2003;92: 218 – 227
- Parveen K, Khan MR, Mujeeb M, Siddiqui WA. Protective effects of Pycnogenol on hyperglycemia-induced oxidative damage in the liver of type 2 diabetic rats. Chem Biol Interact.2010;186(2):219-27.
- Parveen K, Khan MR, Siddiqui WA. Pycnogenol prevents potassium dichromate K₂Cr₂O₇-induced oxidative damage and nephrotoxicity in rats. Chem Biol Interact. 2009;181(3):343-50
- Parveen K, Ishrat T, Malik S, Kausar MA, Siddiqui WA. Modulatory effects of Pycnogenol in a rat model of insulin-dependent diabetes mellitus: biochemical, histological, and immunohistochemical evidences. Protoplasma. 2013;250(1):347-360
- Patel, V., Rassam, S. M., Chen et al., Oxygen reactivity in diabetes mellitus: effect of hypertension and hyperglycaemia. Clin Sci (Lond).1994;86(6): 689-95.
- Pehlivanoglu S. Kronik İskemik Kalp Hastalığı. Ateroskleroz; Koroner, Serebral, Periferik Arter Tutulumu Sempozyum.2006; 73-76
- Porta M and Bandello F. Diabetic retinopathy: a clinical update. Diabetologia 45,1617–1634, 2002
- Prabhakar PK, Prasad R, Ali S, Doble M. Sinergistic interaction of ferulic acid with commercial hypoglycemic drugs in streptozotocin induced diabetic rats. Phytomedicine. 2013; 20(6): 488-94
- Ramis MR, Esteban S, Miralles A, Tan DX, Reiter RJ. Protective Effects of Melatonin and Mitochondria-targeted Antioxidants Against Oxidative Stress: A Review Current Medicinal Chemistry, 2015;22: 2690-2711
- Reed MJ, Meszaros K, Entes LJ, Claypol MD, Pinkett JG, Gadbois TM, Reaven GM. A new Rat Models of type 2 diabetes: The fat- fed, streptozotocin- treated rat. Metabolism.2000; 49: 1390-1394

- Rees DA, Alcolado JC. Animal models of diabetes mellitus, *Diabetic Medicine*. 2005;22: 359–370
- Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, Volume 26, Supplement 1, January 2003
- Rhee SY, Kim YS. Peripheral Arterial Disease in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes Metab J*.2015; 39:283-290
- Richy FF, Espin MS, Guedes S, Corvino FA, Gottwald Hostalek U. Incidence of Lactic Acidosis in Patients With Type 2 Diabetes With and Without Renal Impairment Treated With Metformin: A Retrospective Cohort Study. *Diabetes Care* 2014;37: 2291–2295
- Riley PA. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol*. 1994;65(1):27-33.
- Ritter JM. Chronic disease: When in doubt, consider accrual into a randomized controlled trial (RCT). *Br J Clin Pharmacology*. 2008; 66 (2): 169-172
- Roghani-Dehkordi F, Roghani M, Baluchnejadmojarad T. Diosgenin Mitigates Streptozotocin Diabetes-Induced Vascular Dysfunction of the Rat Aorta: The Involved Mechanisms. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2015.
- Russo LM, del Re E, Brown D, Lin HY. Evidence for a role of transforming growth factor (TGF)-beta1 in the induction of postglomerular albuminuria in diabetic nephropathy: amelioration by soluble TGF-beta type II receptor. *Diabetes*. 2007;56(2):380-8
- Safi SZ, Qwist R, Kumar S, Batumalaie K, Ismail IS. Molecular Mechanisms of Diabetic Retinopathy, General Preventive Strategies, and Novel Therapeutic Targets. *Biomed Res Int*.2014.
- Sağlam H. Çocuklarda Endokrinolojik Aciller Serisi (1): Diyabetik Ketoasidoz. 2005
- Sahin K, Onderci M, Tuzcu M, Ustundag B, Cikim G, Ozercan IH, Sriramoju V, Juturu V, Komorowski JR. Effect of chromium on carbohydrate and lipid metabolism in a rat model of type 2 diabetes mellitus: the fat-fed, streptozotocin-treated rat. *Metabolism Clinical and Experimental*. 2007;56:1233–1240
- Salman ZK, Refaat R, Selima E, Sarha AE, Ismail EA. The combined effect of metformin and L-cysteine on inflammation, oxidative stress and insulin resistance in streptozotocin-induced type 2 diabetes in rats. *European Journal of Pharmacology*. 2013;714;:448–455

- Sanger, F. Chemistry of Insulin: determination of the structure of insulin opens the way to greater understanding of life processes.1959
- Sasidharan SR, Joseph JA, Anandakumar S, Venkatesan V, Madhavan C.N, and Agarwal A. An Experimental Approach for Selecting Appropriate Rodent Diets for Research Studies on Metabolic Disorders. *BioMed Research International*, 2013; ID 752870
- Saso L, Firuzi O. Pharmacological Applications of Antioxidants: Lights and Shadows. *Current Drug Targets*, 2014; 15:1177-1199
- Sathya A, Sidhuraju P. Role of phenolics as antioxidants, biomolecule protectors and as anti-diabetic factors - Evaluation on bark and empty pods of *Acacia auriculiformis*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2012;757-765
- Satman I, Yılmaz T, Bostar I et al. Diabetes Epidemiology Study in Turkey: First Step Data results. *Diabetes*1998;47:A384,1480
- Satman İ. ve ark. Türkiye Diyabet Prevalans Çalışmaları-II. (TURDEP II),47. Ulusal Diyabet Kongresi, 2011.
- Sayed AA, Thymoquinone and proanthocyanidin attenuation of diabetic nephropathy in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*.2012;16(6):808-815.
- Scanlon PH, Aldington SJ, Stratton IM. Epidemiological Issues in Diabetic Retinopathy. *Middle East Afr J Ophthalmol*.2013; 20(4): 293–300.
- Schafer A, Högger P, Oligomeric procyanidins of French maritime pine bark extract (Pycnogenol) effectively inhibit alpha-glucosidase. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007;77(1):41-6
- Schalkwijk CK, Stehouwer CDA. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clinical Science*. 2005;109:143–159
- Scont T. A practical manual-Determination of serum insulin level by ELISA. Practical course: Basic biochemical methods and ischemic heart models
- Seo JH, Lee DY, Hong CW, Lee IH, Ahn KS, Kang GW. Severe Lactic Acidosis and Acute Pancreatitis Associated with Cimetidine in a Patient with Type 2 Diabetes Mellitus Taking Metformin. *Intern Med*. 2013; 52: 2245-2248
- Shinozaki, K., Suzuki, M., Ikebuchi, M., et al 1995. Insulin resistance associated with compensatory hyperinsulinemia as an independent risk factor for vasospastic angina. *Circulation* 92, 1749–1757.
- Singh RK, Gupta B, Tripathi K, Singh SK. Antioxidant potential of Metformin and Pioglitazone in Type 2 Diabetes Mellitus: Beyond their anti glycemic effect. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*.2015.

- Sodeman WA, Sodeman TM: Sodeman's Pathologic Physiology mechanisms of disease. Çevirenleri: V.Cesur, N.Kemal, I.Baskı, Hekimler Birliği Vakfı Türkiye Klinikleri Yayınevi. 1992 cilt 2. Ankara.
- Spanos K, Lachanas VA, Chan P, Bargiota A, Giannoukas AD. Validation of the Leeds Assessment of Neuropathic Symptoms and Signs (LANSS) questionnaire and its correlation with visual analog pain scales in Greek population. *Journal of Diabetes and Its Complications*.2015
- Srinivasan K, Ramarao P. Animal models in type 2 diabetes research: An overview. *Indian J Med Res*. 2007;125; 451-472
- Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul CL, Ramarao P. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res*. 2005;52(4):313-20.
- Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD. Diabetes, other risk factors and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care* 1993;16; 434–444.
- Stehouwer CDA, Lambert J, Donker AJM, Hinsberg VWM. Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy. *Cardiovascular Research* .1997; 34: 55–68
- Steigerwalt R, Belcaro G, Cesarone MR, Di Renzo A, Grossi MG, Ricci A, Dugall M, Cacchio M, Schonlau F. Pycnogenol improves microcirculation, retinal edema, and visual acuity in early diabetic retinopathy. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2009 ;25(6):537-540
- Sumpio BE, Riley JT, Dardik A. Cells in focus: endothelial cell *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 34 (2002) 1508–1512
- Szkudelski T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in β Cells of the Rat Pancreas *Physiol. Res*. 2001; 50: 536-546
- Şen S, Üstündağ S, Yalçın Ö, Aydoğdu N. Deneysel Diyabetik Nefropatide Enalapril ve L-Karnitin'in Etkileri. 2002;11(2): 80-86
- Takeyama A, Sato H, Soma-Nagae T, Kabasawa H, Suzuki A, Yamamoto-Kabasawa K, Hosojima M, Kaneko R, Higuchi F, Kaseda R, Ogasawara S, Narita I, Saito A. Megalin is downregulated via LPS-TNF- α -ERK1/2 signaling pathway in proximal tubule cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;407(1):108-12

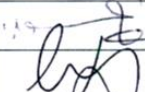
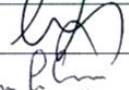
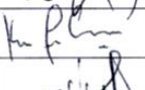
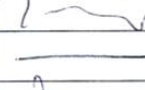
- Tamayo T, Rosenbauer J, Wild SH, Spijkerman A.M.V, Baan C, Forouhi NG, Herder C, Rathmann V. Diabetes in Europe: An update, Diabetes Research and Clinical Practice.2013
- Tawfik, H.E., El-Remessy, A.B., Matragoon, S., et al, 2006. Simvastatin improves diabetes-induced coronary endothelial dysfunction. J. Pharmacol. Exp. Ther. 319, 386–395.
- Tesfamariam, B., Free radicals in diabetic endothelial cell dysfunction. Free Radic Biol Med, 1994. 16(3): p. 383-91.
- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (DCCTRG). The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. N. Engl. J. Med. .1993;329:977–986
- Toblli JE, Cao G, Giani JF, Angerosa M, Dominici FP, Gonzalez-Cadavid NF. Antifibrotic effects of pioglitazone at low doses on the diabetic rat kidney are associated with the improvement of markers of cell turnover, tubular and endothelial integrity, and angiogenesis. Kidney Blood Press Res. 2011;34(1):20-33
- Tojo A, Onozato ML, Ha H, Kurihara H, Sakai T, Goto A, Fujita T, Endou H.Reduced albumin reabsorption in the proximal tubule of early-stage diabetic rats. Histochem Cell Biol. 2001;116(3):269-76
- Tojo A, Onozato ML, Kurihara H, Sakai T, Goto A, Fujita T. Angiotensin II blockade restores albumin reabsorption in the proximal tubules of diabetic rats. Hypertens Res. 2003;26(5):413-419
- Törnqvist E, Annas A, Granath B, Jalkestén E, Cotgreave I, Öberg M. Strategic focus on 3R principles reveals major reductions in the use of animals in pharmaceutical toxicity testing. PLoS One. 2014; 23;9(7)
- Tran BD, Galassetti B. Exercise in pediatric type 1 diabetes.Pediatr Exerc Sci. 2014;26(4):375-83
- Trevor ve Katzung. Basic & Clinical Pharmacology. 13th Edition. 2015; 41: 978-979
- Triplitt C, Herrera CS, Reasner C, DeFronzo RA, Cersosimo E. Classification of Diabetes Mellitus,2015.
- Türkiye diyabeti önleme ve kontrol programı (TDÖKP). Sağlık Bakanlığı, 2011,yayın no:816

- Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği. Diabetes Mellitus Çalışma ve Eğitim Grubu. Diabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem kılavuzu 2013;(2): 20-38
- Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (THSK), Türkiye Diyabet Programı 2015-2020,2014.Yayın No: 816, Ankara
- United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS). 13: relative efficacy of randomly allocated diet, sulphonylurea, insulin, or metformin in patients with newly diagnosed non-insulin dependent diabetes followed for three years. Br. Med. J. 1995;310:83–88,
- Vırgılı F, Kobuchi H, Packer L. Procyanidins extracted from pinus maritime (Pycnoogenol): Scavengers of free radical species and modulators of nitrogene monoxide metabolism in activated murine raw 264,7 macrophages. Free Radicals Biology and Medicine. 1997; 24: 1120-1129
- Wan TT, Li XF, Sun YM, Li YB, Su Y. Role of the calpain on the development of diabetes mellitus and its chronic complications. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2015 ;74:187-190
- Wang JY, Yang JH, Xu J, Jia JY, Zhang XR, Yue XD, Chen LM, Shan CY, Zheng MY, Han F, Zhang Y, Yang XY, Chang BC. Renal tubular damage may contribute more to acute hyperglycemia induced kidney injury in non-diabetic conscious rats. J Diabetes Complications. 2015;29(5):621-8
- Wanid SA, Kumar P. Antioxidants and its Properties as Affected by Extrusion Process: A Review. Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture, 2015; 7: 108-114
- Wasowicz W, Neve J, Peretz A. Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage, 1993; 39(12):2522
- Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF, Vita JA. The Clinical Implications of Endothelial Dysfunction. Journal of the American College of Cardiology. 2003;42:1149–60
- Wild S., Roglic G., Green A., Sicree R., King H. Global Prevelance of Diabetes, Estimates for the year 2000 and projection for 2030. Diabetes Care 2004; 27:1047-1053
- Wolf G, Ziyadeh FN. Leptin and renal fibrosis. Contrib Nephrol. 2006;151:175-83. Review

- Wu Q, Chen H, Lv Z, Li S, Hu B, Guan Y, Xie B, Sun Z. Oligomeric procyanidins of lotus seedpod inhibits the formation of advanced glycation end-products by scavenging reactive carbonyls. *Food Chemistry*. 2013; 138: 1493-1502
- Xu BQ, Yang P, Zhang YQ. Hypoglycemic activities of lyophilized powder of *Gynura divaricata* by improving antioxidant potential and insulin signaling in type 2 diabetic mice. *Food & Nutrition Research* 2015; 59: 29652
- Yaylalı YT, Küçükaslan M. Endotel Disfonksiyonu. *Pamukkale Tıp Dergisi*.2011: 4 (3); 152-157
- Yılmaz M.T: Editörden Galenos aylık sağlık meslek dergisi 1997; 1: 3.
- Yin D, Yin J, Yang Y, Chen S, Gao X. Renoprotection of Danshen Injection on streptozotocin-induced diabetic rats, associated with tubular function and structure. *J Ethnopharmacol*. 2014;151(1):667-74
- Yin JJ, Yang Y, Wang QB, Li Y, Yin DK. [Effect of Chinese herbal medicine with Supplement Qi and Activating Blood Circulation on tubular reabsorption function of diabetic nephropathy rats]. *Zhong Yao Cai*. 2013 Jun;36(6):953-8
- Yoshida T, Kawano H, Miyamoto S, et al. Prognostic value of flow-mediated dilation of the branchial artery in patients with cardiovascular disease. *Intern Med*.2006;45(9):575-579
- Yu BP. Cellula defences against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*. 1994: 74;139-162
- Zhang Z, Li BY, Li XL, Cheng M, Yu F, Lu WD, Cai Q, Wang JF, Zhou RH, Gao HQ, Shen L. Proteomic analysis of kidney and protective effects of grape seed procyanidin B2 in db/db mice indicate MFG-E8 as a key molecule in the development of diabetic nephropathy. *Biochim Biophys Acta*.2013;1832(6):805-16
- Zhou L, Liu F, Huang XR, Liu F, Chen H, Chung AC, Shi J, Wei L, Lan HY, Fu P. Amelioration of albuminuria in ROCK1 knockout mice with streptozotocin-induced diabetic kidney disease. *Am J Nephrol*. 2011;34(5):468-75
- Zhu W, Chen M, Shou Q, Li Y, Hu F. Biological Activities of Chinese Propolis and Brazilian Propolis on Streptozotocin-Induced Type 1 Diabetes Mellitus in Rats, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.2011
- Zibadia S, Rohdewaldb PJ, Parkc D, Watson RR. Reduction of cardiovascular risk factors in subjects with type 2 diabetes by Pycnogenol supplementation. *Nutrition Research*.2008; 28: 315-320

EK 1: ETİK KURUL ONAY KARARI

T.C.
Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
Karar Formu

KARAR TARİH / NO	17/02 /2015 / 77.637.435 - 13		
ARAŞTIRMANIN ADI	Fransız sahil çamı (<i>Pinus maritime</i>) ekstresinin yüksek yağ içerikli diyet ve düşük doz streptozotosinle diyabet oluşturulmuş sıçanlarda etkinliğinin araştırılması		
SORUMLU ARAŞTIRMACI	Prof.Dr. Ercüment ÖLMEZ - C B Ü Tıp Fak. Farmakoloji AD		
ARAŞTIRMA EKİBİ	Arş. Gör. Bedirhan AY, Doç. Dr. Kamil VURAL, Doç. Dr. Tuğba ÇAVUŞOĞLU, Doktora öğr. Işıl AYDEMİR,- Prof. Dr. Ahmet Var		
ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Uzmanlık Tezi ☐	Yüksek Lisans/Doktora ☒	Akademik ☐
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	13.02.2015 – 13 Tarih ve sayılı dilekçe		
KARAR BİLGİLERİ	İlgi dilekçe görüşülmüş, dilekçe talebi bilimsel ve etik açıdan oy birliği ile UYGUN bulunmuştur.		
Ünvanı/Adı/Soyadı	İmza	Araştırma İle İlişkisi Olan Üye	Toplantıya Katılmayan Üye
Prof. Dr. Emin KURT Göz Hastalıkları		☐	☐
Prof. Dr. Necip KUTLU Fizyoloji		☐	☐
Prof. Dr. Cüneyt TEMİZ Nöroşirürji		☐	☐
Doç. Dr. Kıvanç GÜNHAN DEHAM Müdürü		☐	☐
Prof. Dr. İsmet TOPÇU Anestezi ve Reanimasyon		☐	☐
Prof. Dr. Nuri ÖZKÜTÜK Tıbbi Mikrobiyoloji		☐	☐
Doç. Dr. Kamil VURAL Farmakoloji		☒	☒
Yrd. Doç. Dr. Selim ALTAN Tıbbi Etik		☐	☐
Yrd. Doç. Dr. Fulya OCAK Veteriner Hekim		☐	☒
Yavuz DEMİR Veteriner Hekim		☐	☐
Sivil Üyesi		☐	☐
Saime ÖZKARA Sivil Toplum Üyesi			
Etik Kurulumuzun kararı yukarıda belirtilmiştir. Araştırma Başvuru Formunun Taahhütname kısmında belirtilmiş olan hususların dikkate alınarak istenilen bilgilerin Etik Kurulumuza zamanında iletilmesi konusunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.  Prof. Dr. Emin KURT Başkan			

EK 2: ÖZGEÇMİŞ

Adı	Bedirhan	Soyadı	AY
Doğum Yeri	Kırşehir	Doğum Tarihi	05.04.1988
Uyruğu	T.C	Tel	0553 547 5640
E-mail	bedirhan.ay@cbu.edu.tr , bdrhn_40@hotmail.com		

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora	Celal Bayar Üniversitesi	2016-Devam
Yüksek Lisans	Celal Bayar Üniversitesi	2013-2016
Lisans	Celal Bayar Üniversitesi	2007-2011

İş Deneyimi	Kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Araştırma Görevlisi	Süleyman Demirel Üniversitesi	2013-2014
Araştırma Görevlisi	Celal Bayar Üniversitesi	2014-Devam

Sınavlar	NOTU
ALES	93,81
YDS	68,75

Bilgisayar Bilgisi	Kullanma Becerisi
Excel, Word, Powerpoint	Çok iyi