



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



DIYABETİK RAT MODELİNDE KAFEİK ASİT ve KAFEİK ASİT
FENETİL ESTERİN GÖZ DOKULARINDAKİ KORUYUCU
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Alparslan ŞAHİN

DOKTORA TEZİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mukadder BAYLAN

DIYARBAKIR 2018



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



DIYABETİK RAT MODELİNDE KAFEİK ASİT ve KAFEİK ASİT
FENETİL ESTERİN GÖZ DOKULARINDAKİ KORUYUCU
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Alparslan ŞAHİN

DOKTORA TEZİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mukadder BAYLAN

DIYARBAKIR 2018

ONAY SAYFASI



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DICLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



ONAY

Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi Alparslan ŞAHİN'in hazırladığı "Diabetik Rat Modelinde Kafeik Asit Fenetil Esterin Göz Dokularına Etkilerinin Araştırılması" başlıklı tez Dicle Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih: 30/11/2018

Danışman: Prof.Dr.Mukadder BAYLAN

Jüri Üyeleri

Jüri Başkanı: Prof.Dr. Abdurrahman ŞERMET

Üye: Prof.Dr.Mukadder BAYLAN

Üye: Prof.Dr.M.Zülcüf AKDAĞ

Üye: Doç.Dr.Sayad KOCAHAN

Üye: Dr.Öğrt.Üyesi Betül YAZGAN

Bu tez Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun.../.../20.. tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....

Prof.Dr.Hakkı Murat BİLGİN

Dicle Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



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 olmadığını ve tezimi Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzu standartlarına uygun bir şekilde hazırladığımı beyan ederim.

05/10/2018

Alparslan ŞAHİN

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince, çalışmalarına büyük emeği geçen, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım başta tez danışmanım değerli hocam Sayın Prof. Dr. Mukadder BAYLAN'a, bilimsel anlamda katkılarını esirgemeyen kürsümüzün kıymetli hocaları Prof.Dr. Abdurrahman ŞERMET'e, Prof.Dr. Hüda Diken OFLAZOĞLU'na, Prof.Dr. Mustafa KELLE'ye, Prof.Dr. Mehmet AYBAK'a, Prof.Dr. Cihat Güzel'e, Prof.Dr. Orhan DENLİ'ye, Prof.Dr. Basra Deniz OBAY'a, Prof.Dr. Murat BİLGİN'e teşekkür ederim.

Ayrıca tez çalışmamdaki katkılarından dolayı İmmünoloji Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Savaş Kaya ve Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. İbrahim Kaplan'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

KAPAK

İÇ KAPAK

ONAY SAYFASI

BEYAN SAYFASI

I

TEŞEKKÜR

II

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

III

ŞEKİLLER

VI

RESİMLER

VII

TABLolar

VIII

KISALTMALAR

IX

1.1. TÜRKÇE ÖZET

1

1.2. İNGİLİZCE ÖZET

3

2. GİRİŞ ve AMAÇ

5

3. GENEL BİLGİLER

7

3.1. Diyabet Tanımı

7

3.2. Diabetes Mellitus Epidemiyolojisi

7

3.3. Diyabetin Sınıflandırılması

8

3.3.1. Tip 1 diabetes mellitus

9

3.3.2. Tip 2 diabetes mellitus

9

3.3.3. Gestasyonel diyabet

10

3.4. Diyabetin Tanısı

11

3.5. Diabetes Mellitusta Tedavi Metodları

11

3.6. Diyabetik Retinopati

12

3.6.1 Diyabetik retinopati tanımı

12

3.6.2. Diyabetik retinopati epidemiyolojisi	12
3.6.3. Diyabetik retinopati sınıflaması	13
3.6.3.1. Non-proliferatif diyabetik retinopati (NPDR)	13
3.6.3.2. Proliferatif diyabetik retinopati (NPDR)	13
3.6.4. Diyabetik retinopatinin önlenmesi	14
3.6.5. Diyabetik retinopatinin tedavisi	15
3.7. Deneysel Diyabet Modelinin Oluşturulması	16
3.8 CAPE ve CAPE İçeren Maddeler	17
3.8.1. CAPE'nin biyosentezi ve kimyasal yapısı	17
3.8.2. CAPE'nin sistemler üzerine etkileri	18
3.8.3. CAPE'nin oküler çalışmalarda kullanımı	20
4. GEREÇ ve YÖNTEM	22
4.1. Kimyasallar	22
4.2. Deney Hayvanları	22
4.3. Diyabetik Rat Modelinin Oluşturulması	22
4.4. Deney Tasarımı	22
4.5. Kan Glukoz Düzeylerinin Ölçümü	23
4.6. Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü	23
4.7. Rat MMP-2 ve MMP-9 ELISA	23
4.8. Histopatolojik Değerlendirmeler	24
4.9. Rat MMP-2 ve MMP-9 İmmünofloresan Boyama Ve Görüntüleme	24
4.10. Rat Aktif Caspase-3 İmmünohistokimyası	25
4.11. İstatistiksel Analiz	26
5. BULGULAR	27
5.1. Kan Glukoz Seviyeleri	27

5.2. Retinal TAS, TOS ve PON Seviyeleri	28
5.3. Serum ve Retina MMP-2 ve MMP-9 Seviyeleri	29
5.4. Retina Caspase-3 İmmünohistokimyası	29
6. TARTIŞMA	32
7. SONUÇ	36
8. KAYNAKLAR	37
9. ÖZGEÇMİŞ	55
10. EKLER	57
10.1. Etik Kurul Raporu	57
10.2. Doktora Öğrencisi İlgili Makalesi	58
11. ORİJİNALLİK RAPORU	64

ŞEKİLLER

Şekil 1. CAPE'nin kimyasal yapısı	18
Şekil 2. Gruplara göre kan glukoz ölçümlerinin karşılaştırılması	29



RESİMLER

- Resim 1.** Diyabetik gözde MMP-2 ve MMP-9'un immünoflöresan yöntemle gösterilmesi 31
- Resim 2.** Diyabetik gözde aktif caspase-3'ün immünohistokimyasal yöntemle gösterilmesi. 31



TABLÖLAR

Tablo 1. Grúplarda ölçülen glukoz değerlerinin (mg/dl) karşılaştırılması	27
Tablo 2. Grúplara göre retinal oksidatif stres parametrelerinin Karşılaştırılması	29
Tablo 3. Grúplardaki serum ve retina MMP-2 ve MMP-9 seviyeleri ile retinal caspase-3 boyama sonuçlarının karşılaştırılması	30



KISALTMALAR

CAPE	Kafeik asit fenetil ester
COX	Siklooksijenaz
DM	Diabetes mellitus
DR	Diyabetik retinopati
FCS	Fetal dana serumu
GDM	Gestasyonel diabetes mellitus
IL-2	İnterlökin-2
MMP	Matriks metalloproteinaz
NF-κB	Nükleer faktör- kappa B
OSI	Oksidatif stres indeksi
PBS	Fosfat tamponlu salin çözeltisi
PDR	Proliferatif diyabetik retinopati
PON-1	Paraoksonase-1
PPV	Pars plana vitrektomi
ROS	Reaktif oksijen türleri
RPE	Retina pigment epiteli
STZ	Streptozotosin
TAS	Total antioksidan kapasite
TOS	Total oksidan kapasite
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü

Diyabetik Rat Modelinde Kafeik Asit ve Kafeik Asit Fenetil Esterin Göz Dokularındaki Koruyucu Etkilerinin Araştırılması

Öğrencinin Adı ve Soyadı: Alparslan ŞAHİN

Danışmanı: Prof. Dr. Mukadder BAYLAN

Anabilim Dalı: Fiziyoloji

1.1. ÖZET

Amaç: Bu çalışmada kafeik asit fenetil esterin (CAPE) streptozotosin (STZ) ile oluşturulan diyabetik rat modelinde retinal apoptozis ve oksidatif stres parametreleri üzerine olan etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada 3 grup oluşturuldu; Kontrol, STZ ve STZ+CAPE. STZ ve STZ+CAPE grubundaki ratlara diyabet oluşturmak için tek doz 35mg/kg dozunda STZ intraperitoneal olarak enjekte edildi. STZ+CAPE grubunda 10 µmol/kg CAPE 4 hafta boyunca her gün intraperitoneal olarak enjekte edildi.

Kontrol ve STZ grubunda sadece intraperitoneal olarak serum fizyolojik verildi. Ratlar 4. hafta sonunda anestezisi altında sakrifiye edildi. Retinal dokulardaki total anti-oxidant status (TAS), total oxidant status (TOS), paroxanase (PON) seviyeleri ölçüldü. Histopatolojik değerlendirmeler için diğer göz kullanıldı ve Caspase-3, matriks metalloproteinaz -2 (MMP-2) ve MMP-9 değerlendirildi.

Bulgular: CAPE tedavisi ile kan glukoz seviyesinde özellikle 21. günde olmak üzere anlamlı olarak düşüklük saptanmıştır. Ancak bu hipoglisemik etki 28. günde gözlenmemiştir. Çalışma sonucunda elde edilen oksidatif stres parametreleri (TOS ve OSI) STZ grubunda STZ+CAPE ve kontrol gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek saptandı. CAPE tedavisi total oksidan durumunun artmasını engelleyici etki göstermiştir. Fakat PON seviyeleri STZ+CAPE ve STZ gruplarında karşılaştırılabilir bulunmuştur. Serum ve retina MMP seviyelerinde de farklılık saptanmamıştır. Tüm gruplarda retinal caspase-3 boyaması ile benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Sonuç: Bu alışmada CAPE tedavisi ile STZ ile indüklenmiş diyabetik rat modelinde retinal dokuda oksidatif stresin azaltılabileceği gösterilmiştir. Fakat muhtemelen kısa diyabetik süre nedeni ile retinal apoptozis gösterilememiştir.

Anahtar sözcükler: Kafeik asit fenetil ester, streptozotosin, diabetes mellitus, diyabetik retinopati, caspase-3, oksidatif stres, antioksidan kapasite.



Investigation of The Protective Effects of Caffeic Acid and Caffeic Acid Phenethyl Ester in Ocular Tissues in a Diabetic Rat Model

Student's Surname and Name: ŞAHİN Alparslan

Adviser of Thesis: Prof. Dr. Mukadder BAYLAN

Department: Physiology

1.2. ABSTRACT

Aim: We aimed to investigate the effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on retinal apoptosis and oxidant stress parameters in streptozotocin (STZ) induced diabetic rat model.

Material and Methods: This study included 3 groups, control, STZ, and STZ+CAPE. Rats of STZ, and STZ+CAPE groups were injected with STZ (35mg/kg, i.p.) for induction of DM. In the STZ+CAPE group, 10 µmol/kg of CAPE were intraperitoneally injected for 4 weeks. Control and STZ groups were given only intraperitoneal serum physiologic. Rats were anaesthetized and sacrificed on the 4th week of the experiment. Total anti-oxidant status (TAS), total oxidant status (TOS), Paroxanase (PON) levels were measured on the dissected retinal tissues. Fellow eyes were used for histopathologic evaluation with caspase-3 and matrix metalloproteinase (MMP-2) ve MMP-9 evaluation.

Results: Blood glucose levels were significantly decreased at 21st day of the experiment with CAPE treatment. However this hypoglisemic effect was not observed at 28th day.

The oxidative stress parameters including TOS, and OSI were significantly higher in STZ group compared to STZ+CAPE and control groups. CAPE treatment prevented the elevation of TOS. However PON levels were comparable between STZ+CAPE and STZ groups. The MMP levels of both serum and retina were not different between groups. Retinal caspase-3 staining were also similar.

Conclusion: This study demonstrated that the CAPE treatment may decrease the oxidative stress in the retinal tissue in STZ induced DM rat model. However the apoptosis was not

observed in the retina. The retinal apoptosis can not be shown probably due to shorter period of diabetes.

Key words: Caffeic acid phenethyl ester, streptozotocin, diabetes mellitus, diabetic retinopathy, caspase-3, oxidative stress, antioxidant capacity.



2. GİRİŞ ve AMAÇ

Diabetes mellitus (DM) insülin hormonu salınımında yetersizlik veya insülinin hedef organlarda etkisinin düşük olmasına bağlı ortaya çıkan kronik hiperglisemi ile seyreden metabolik bir hastalıktır (1). Son yıllarda sedanter yaşam tarzının yaygınlaşması ve beslenme alışkanlıklarındaki olumsuz değişiklikler nedeniyle görülme sıklığında artış yaşanmaktadır (2,3). Diyabetik hastalarda kronik hiperglisemi temel olarak vasküler yapılarda bozukluklara yol açabildiğinden bu durum göz, beyin, kalp, böbrekler ve ekstremiteler uçları başta olmak üzere vasküler beslenme problemlerine bağlı komplikasyonlara yol açmaktadır (4–6). Bu komplikasyonlar arasında oldukça sık görülen diyabetik retinopati (DR) DM’li hastalarda görme keskinliğini en sık azaltan faktörler arasında ilk sırada yer almaktadır (7).

DM insüline bağımlı ve bağımsız olmasına göre klinikte genellikle iki formda gözlenmektedir. İnsüline bağımlı tipte erken dönemde hastalar hipoglisemik atak ile presente olabilirken, insüline bağımsız tipte ise ketoasidoz ile seyreden koma ile hastalar başvurabilmektedir (8).

Diyabetik hastalarda kronik hiperglisemiye bağlı olarak kardiyopati, nöropati, nefropati görülmesi oldukça sıktır (4–6). Kardiyolojik açıdan en önemli komplikasyonlar sessiz myokard infarktüsü olarak da tanımlanan asemptomatik başlangıçlı kalp krizidir. Mikrovasküler düzeyde dolaşımın bozulmasına bağlı olarak eldiven-çorap tarzında el ve ayaklarda periferik nöropati oldukça sık karşılaşılan bir durumdur (9). Yine kronik hiperglisemiye bağlı olarak hasta ayaklarını hissetmediğinden ayaklarında ülserler oluşmakta ve bu durum diyabetik ayak olarak adlandırılmaktadır (9). Böbreklerde de glomerüler filtrasyon hızında azalmaya yol açan ve protein kaçağının eşlik ettiği nefropati, kronik diyabetiklerde görülebilen ve hayatı tehdit eden bir diyabet komplikasyonudur (10). Yine diyabette özellikle serebrovasüler, koroner ve periferik arterler olmak üzere vasküler tıkanıklıklar gözlenebilmektedir (11).

Diyabetik hastalarda karşılaşılan önemli komplikasyonlardan biri de DR’dir (12). Çalışma çağındaki insanlarda en önemli körlük nedenleri arasında DR yer almaktadır (13). DR’nin patogenezi tam olarak anlaşılamasa da hiperglisemiye bağlı retinal mikrovasküler yapının ve akabinde retinanın hasarı temel patofizyolojik mekanizmayı oluşturmaktadır (14). Diyabetin süresi ile orantılı olarak da retinopati prevalansında artış görülmektedir. Diyabet süresi 20 yılı aştığında hemen daima herhangi bir evrede DR gözlenmektedir (15).

Her iki göz genellikle simetrik tutulsa da eşlik eden vasküler tıkanıklıklara bağılı asimetrik tutulum da görülebilmektedir. Klinik olarak DR nonproliferatif ve proliferatif olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (16). Nonproliferatif DR kendi içinde arka plan ve pre-proliferatif olarak iki kısımda değerlendirilmektedir. Proliferatif DR’de retina yüzeyinde yeni damarlanmalar oluşmakta ve belli bir süre sonra bu damarlanmalar görme kaybına sebep olan göz içi kanama ve traksiyonel retina dekolmanına yol açmaktadır (16).

DM’ye bağılı oluşan komplikasyonları engellemek ve hastaların yaşam kalitesini arttırmak maksadı ile çeşitli ilaçlar kullanılmaktadır (17,18). Bu ilaçlar arasında antioksidan özellikteki çeşitli maddelerin kan glukoz seviyesini düşürerek ve antioksidan özelliğı dolayısı ile hücre hasarını engelleyerek koruyucu etki yaptıkları öne sürülmüştür (19–23). Bu maddelerden kafeik asit fenetil ester (CAPE) son yıllarda antioksidan özelliğı nedeniyle çeşitli disiplinlerde çalışılan bir moleküldür (24–41). CAPE bal arısı kovanlarındaki propolisin içinde önemli miktarda bulunmaktadır (42). CAPE’nin ayrıca nöroproteksiyon özelliğinin olduğı gösterilmiştir (33,43). Bunun yanında, CAPE’nin serebellar dokuda antiapoptotik aktiviteye sahip olması nedeniyle muhtemelen retinadaki diyabete bağılı apoptotik değışikliklerde olumlu etkileri olabileceğı akla gelmektedir (34,44). CAPE’nin antioksidan özelliğı ile dokularda, özellikle de retinada oluşan hasarın azaltılması ve geciktirilmesinde etkili olabileceğini düşünmekteyiz.

Bu çalışmamızda, ratlarda streptozotosin (STZ) ile oluşturulan diyabet modelinde CAPE’nin retinal dokular üzerine olası koruyucu etkilerini değılendirmeyi ve CAPE tedavisinin retina üzerindeki apoptotik aktivite üzerine etkisini incelemeyi hedefledik.

3. GENEL BİLGİLER

3.1. Diyabet Tanımı

Diyabetes Mellitus (DM), kronik hiperglisemi ile seyreden ve mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar ile karakterize bir hormonal hastalık grubunu tanımlamaktadır (1). Tanı için gerekli kriterler tanımlanmış olup herhangi birinin tek başına bulunması bile DM tanısı için yeterlidir (1).

- a) Herhangi bir anda ölçülen plazma glukoz seviyesinin 200 mg/dl üzerinde olması.
- b) 8 saat açlığı takiben alınan plazma örneğinde glukoz değerinin 126 mg/dl üzerinde olması.
- c) Oral glukoz tolerans testinde (75 gr glukoz) ilk 2 saat içinde glukoz değerinin 200 mg/dl üzerinde saptanması.

3.2. Diabetes Mellitus Epidemiyolojisi

Global olarak 2013 yılında dünyada yaklaşık 381 milyon DM'li kişinin yaşadığı (45) ancak bu sayının 2016 yılı itibari ile 422 milyon olarak bildirildiği göz önüne alınırsa DM prevalansının hızla arttığı dikkatleri çekmektedir (World Health Organization, Global Report on Diabetes. Geneva, 2016. Erişim tarihi 30 Ağustos 2016). 2010 yılındaki bir çalışmaya göre 2025 yılında DM'li hasta sayısının 300 milyonu bulacağı tahmininin bile 2016 yılında çok üstüne çıkılması bu durumun dünya çapındaki ciddiyetini de gözler önüne sermektedir (3). Özellikle gelişmiş ve gelişmekte olan ülkeler olmak üzere sedanter hayat tarzının yaygınlaştığı ve diyet ile aşırı kalori alımının olduğu ülkelerde DM prevalansındaki artış daha belirgin şekilde karşımıza çıkmaktadır (3). 2000 yılındaki DM hasta sayısının 2030 yılında 2 katına çıkacağı tahmini bildirilmiştir (46). Yine bu çalışmaya göre diyabet prevalansı üzerine en önemli demografik değişikliğin 65 yaş üzeri popülasyonun oransal olarak artışının gerçekleşecek olmasıdır. Tüm diyabet olgularının %90'ını Tip 2 DM'li olgular oluşturmaktadır. Bunda yaşam sürelerinin uzamasının yanında obezite ve beslenme alışkanlıklarındaki olumsuz değişim ile beraber toplumun yaş ortalamasının yükselmesinin rolü oldukça önem arz etmektedir (3). Diyabet komplikasyonların yanında önemli bir mortalite sebebi olarak karşımıza çıkmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre yılda yaklaşık 1,5 milyon kişi diyabet nedeniyle ölmektedir. Bununla beraber ayrıca 2,2 milyon kişi de yüksek kan glukozu ve ilişkili komplikasyonlar (koroner arter hastalığı,

böbrek yetmezliği, inme) ile alakalı artmış risk nedeniyle ölmektedir (World Health Organization, Global Report on Diabetes. Geneva, 2016. Erişim tarihi 30 Ağustos 2016).

Türkiye’de 2010 yılında gerçekleştirilen TURDEP –II çalışmasına göre diyabet sıklığı oranı 1998’e göre %90 artarak %13,7 olarak saptanmıştır (http://endokrin.org.tr/files/file/TURDEP_II_2011.pdf. Erişim tarihi 14 Temmuz 2016). Yine bu çalışmaya göre ülkemizde yıllık DM artış oranının %3,9 olacağı tahmin edilmektedir.

3.3. Diyabetin Sınıflandırılması

DM her ne kadar kronik hiperglisemi ile giden metabolik bir klinik tabloyu tarif etse de DM’nin pek çok alt tipi bulunmaktadır.

Dünya Sağlık Örgütü’nün DM ile ilgili sınıflandırması aşağıdaki gibidir.

A-Primer DM

- 1- İnsüline bağlı DM (Tip 1 DM)
- 2- İnsüline bağlı olmayan DM (Tip 2 DM)

B- İkincil DM

C- Gebeliğe bağlı DM

D- Bozulmuş glukoz toleransı

E- Sınıflandırılmayan tipler

Amerika Diyabet Cemiyetinin yaptığı ve etyolojinin temel alındığı sınıflanma aşağıdaki gibidir (47).

I) Tip 1 DM (İnsüline bağımlı)

Bu sınıflama da kendi içinde immünolojik ve idyopatik olarak 2 kısımda değerlendirilmektedir.

II) Tip 2 DM (İnsüline bağımlı olmayan)

Temel sorunu insüline karşı oluşan hücresel düzeyde direnç veya insülin sekresyonundaki kısmi yetersizlik oluşturmaktadır.

III) Gebeliğin indüklediği DM

IV) Diğer spesifik DM tipleri

Bu alt sınıflamada pankreas beta hücrelerinin genetik defektleri, insülin etkinliğindeki genetik defektler, ekzokrin pankreas hastalıkları, endokrinopatiler, ilaç ve kimyasallara bağlı oluşan diyabet, enfeksiyonlar, immün DM'nin nadir formları ve DM ile ilişkili olabilen diğer genetik sendromlar yer almaktadır.

3.3.1. Tip 1 diabetes mellitus

Tip 1 DM, tüm DM olgularının %5-10'unu kapsamaktadır (48). Bu tip DM'de insülin üretiminde yetersizlik söz konusudur. İnsülin eksikliğine bağlı olarak serum glukoz seviyesinde yükselme saptanır. Tip 1 DM çocukluk çağında daha sık gözlenir. Hastalar genellikle iştah artışı, poliüri, polidipsi ve kilo kaybı semptomları gösterirler. Buna ilave olarak görme bulanıklığı, yorgunluk, yara iyileşmesinde gecikme gibi semptomlar bulunabilir. İnsülin etkisinin olmaması ve yağ asitlerinin metabolize edilmesi nedeni ile ketoasidoz tablosu gelişebilir. Semptomlar genellikle kısa dönem içinde belirginleşir. Temel mekanizmanın tahribat yapan etkene göre değişmekle birlikte pankreastaki beta hücrelerine karşı T hücreli otoimmün hasara bağlı olduğu gösterilmiştir (49). Tip 1 DM hastaların büyük kısmında otoimmünite söz konusu iken %10 kadarında immün olmayan beta hücre hasarı bildirilmiştir (49). Otoimmün sebeplere bağlı olan Tip 1 DM'de kanda otoantikörler saptanır iken diğer tipte saptanmamıştır.

3.3.2. Tip 2 diabetes mellitus

En sık gözlenen DM alt tipi olan Tip 2 DM obezite ve yetersiz egzersiz ile ilişkilidir. Ayrıca genetik yatkınlık da sözkonusudur. Tip 2 DM kısmen egzersiz ve kilo azaltılması ile engellenebilir. Genellikle orta yaş ve üzerinde ilk semptomlar ortaya çıkar. Polidipsi ve poliüri ilk semptomları oluştururken bazı olgularda semptom vermeyebilir. Bazı tip 2 DM'li hastalar hiperozmolar hiperglisemik non ketotik koma ile presente olabilir. Amerika'da gerçekleştirilen bir çalışmada ortalama 40 yaşında DM tanısı alan olguların hayat beklenti sürelerinde erkeklerde 7 yıl kadınlarda 8 yıl azalma olacağı sonucuna varılmıştır (50). Tip 2 DM için bazı risk faktörleri bulunmaktadır. Bunlar aile öyküsü, yüksek vücut kitle indeksinin olması, ırk (51), hipertansiyon(52), sedanter yaşam tarzı ve fiziksel aktivite eksikliği (53), diyetle aşırı şeker(54), doymuş ve trans yağ asitlerinin bulunması(2), sigara kullanımıdır (55).

İnsülin salgılanmasında yetersizlik olsa da asıl patofizyolojik durum insülin direncidir (56). Kas, yağ ve karaciğer dokularındaki hücrelerin normal insülin seviyesine

karşın yeterli yanıt oluşturarak glukozun hücre içine alınmadaki yetersizliği ifade etmektedir (57). Buna hedef organdaki insülin reseptörü azalması, postreseptör seviyede hücre içi insülin etkinliğinin azalması yol açabilmektedir. İnsüline direnç, insülin salgılanmasında azalma ve bozulmuş glukoz toleransı Tip 2 DM patogenezinde üç ana metabolik bozukluğu oluşturmaktadır (58).

İnsülin fizyolojik olarak karaciğerde glikoneogenez ve glikojenolizi inhibe ederek glukoz üretimini baskımlarken, glikojen sentezini arttırmaktadır. Yine hücre zarında bulunan glukoz transporterlarını arttırarak glukozun hücre içine alınmasını kolaylaştırmaktadır (59). Normalde insüline cevap veren karaciğer, iskelet kası ve kalp kası gibi hedef dokuların insülinin etkisine karşı duyarlılıklarında azalma olması insülin direnci olarak tanımlanmaktadır (60). Bu durumun özellikle hipertansiyon, yağ metabolizması bozukluğu ve obezite ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (61,62). Tip 2 DM patogenezindeki bir diğer patoloji pankreastaki beta hücrelerinin fonksiyonunun azalmasına bağlı insülin sekresyonundaki yetersizliktir (63). Bozulmuş glukoz toleransı oral glukoz tolerans testinin ikinci saatinde plazma glukoz seviyesinin 126-200 mg/dl arasında olması olarak tanımlanmıştır (64). Oral glukoz toleransı testinin, diyabet şüphesi olan gebelik, obezite, myokard infarktüsü gibi vasküler tıkanıklıklar, ailede DM olanlarda yapılması önerilmektedir (8).

3.3.3. Gestasyonel diyabet

Gestasyonel diabetes mellitus (GDM) gebelik sırasında teşhis edilen ve aşıkarmaym diyabet olarak tanımlanmaktadır (64). Bu durum, fetal makrozomi, ölü doğum, neonatal metabolik bozukluklar ve ilgili problemler de dahil olmak üzere olumsuz gebelik komplikasyonları ile ilişkilidir (65). Hamilelik döneminde gestasyonel diyabetin ortaya çıkma olasılığı % 6'dır (66). GDM'li annelerin bebekleri diyabet ve obezite açısından yüksek risk altındadır (67,68). Ayrıca GDM'li kadınların gebeliği takip eden yıllarda diyabet gelişme olasılığı daha yüksektir (67). Bu nedenle GDM için riski yüksek olan, 35 yaş üzeri, önceki gebelikte GDM hikayesi olan, 4000 gram üzeri doğum yapmış veya düşük yapmış olan, polihidoamniyozis olan, sık idrar yolu enfeksiyonu geçiren gebelerde araştırma yapılmalıdır (66).

3.4. Diyabetin Tanısı

Diyabet tanısı için kan glukoz konsantrasyonu ölçümü ve oral glukoz tolerans testi kullanılmaktadır. Amerikan Diyabet Birliği'nin 2012'de yayınladığı kriterlerinden herhangi biri saptanırsa DM teşhisi konulmaktadır (64). Bunlar;

1. Ağız kuruması, polidipsi, polifaji, poliüri gibi DM'nin klinik semptom ve bulguları olanlarda plazma glukozunun 200 mg/dl üzerinde olması
2. Farklı zamanlarda en az iki kez ölçülen açlık kan plazma glukozu seviyesinin 126 mg/dl üzerinde olması.
3. Oral 75 gr'lık glukoz yüklemesini takiben 2 saat sonraki kan plazma glukozu seviyesinin 200 mg/dl ve üzeri olması.
4. HbA1c seviyesinin % 6,5 ve üzerinde olması

3.5. Diyabetes Mellitusta Tedavi Metodları

Diyabette tedavinin en önemli basamağını hasta eğitimi oluşturmaktadır (69). Diyabet hastaları, günlük bakımlarından sorumlu tutulmalıdır. Bu, kan glukoz düzeylerini, diyet yönetimini, fiziksel aktiviteyi sürdürmeyi, kilo ve stres kontrol altında tutmayı, oral ilaçları ve gerektiğinde enjeksiyon veya pompa yoluyla insülin kullanımını izlemeyi içermektedir.

Diyabetik hastaların yönetiminin ana amacı, kan şekeri düzeylerini normalden mümkün olduğunca güvenli tutmaktır. Yeme alışkanlıklarını değiştirmek ve fiziksel aktiviteyi arttırmak, genellikle kan şekeri düzeylerini azaltmaya yönelik ilk adımlardır.

Diyabet, kalp hastalığı ve periferik arter hastalığı riskini önemli ölçüde artırabileceğinden kan basıncını ve kolesterol düzeylerini kontrol altına almaya yönelik önlemler de diyabet tedavisinin önemli bir parçasını oluşturmaktadır (70).

Diyabetik hastalarda kan glukoz takibinde anlık takibi gösteren plazma glukoz seviyesinden ziyade 3 aylık ortalama kan glukoz seviyesi hakkında bilgi veren HbA1c kullanılmaktadır (71). Diyabet hastalarında ideal olarak HbA1c seviyesi %7'nin altında olmalıdır (64).

Medikal tedavi olarak tip 1 diyabette parenteral insülin verilirken, tip 2 diyabette tedavi hedefi insülin direncinin azaltılması, insülin sekresyonunun artırılması ve intestinal glukoz emiliminin azaltılmasını hedefleyen ilaçlar ile sağlanmaya çalışılmaktadır (69,72).

Bu tedavilerin yetersiz kaldığı durumlarda tip 2 diyabette insülin tedavisi uygulanmaktadır (69).

3.6. Diyabetik Retinopati

DR önemli bir körlük nedeni olup uygun tedavi ve yönetim ile görme kaybı önlenmektedir (73). Dünya genelinde toplam 2,4 milyon DR'ye bağlı körlük olduğu tahmin edilmektedir (74). Bunun yanında DR, diyabet hastalarında yaşam kalitesinde azalmaya yol açmaktadır (75). DR varlığı artmış kardiyovasküler hastalık riski ve mortalite ilişkili bulunmuştur (76).

3.6.1 Diyabetik retinopati tanımı

DM'nin en önemli komplikasyonlarının başında DR gelmektedir (77). DR, kronik hiperglisemiye bağlı oluşan retinada kapillerlerin, venüllerin ve arteriyollerin etkilendiği mikroanjiopati ve nöropati ile seyreden klinik durumu tanımlamaktadır (1).

3.6.2. Diyabetik retinopati epidemiyolojisi

DR, Amerika Birleşik Devletleri'nde körlüğün en önde gelen sebepleri arasında yer almaktadır (7). Dünya genelinde yaklaşık 285 milyon kişinin diyabetten etkilendiğini ve bu kişilerin üçte birinden fazlasında DR belirtileri olduğu bildirilmiştir (78). Bu rakamların, diyabet prevalansının artması, nüfusun yaşlanması ve diyabetlilerin yaşam beklentilerinin artması nedeniyle daha da artması beklenmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre, dünya genelinde DM'li insan sayısının 2030 yılına kadar 360 milyona yükseleceği tahmin edilmektedir (46).

1980'den 2008'e kadar dünya çapında yürütülen 35 çalışmayı içeren bir meta-analiz çalışmasında, diyabetli hastalarda herhangi bir DR ve proliferatif diyabetik retinopatinin (PDR) global prevalansının sırasıyla % 35,4 ve % 7,5 olacağı tahmin edilmiştir (78). Yine bu çalışmada herhangi bir DR ve PDR prevalansı, tip 1 diyabetlilerle karşılaştırıldığında, tip 2 diyabetlilerle göre daha yüksek saptanmıştır (78). (herhangi bir DR için % 25,2'ye karşılık % 77,3, PDR için % 32,4'e karşı % 3,0). DR gelişiminde diyabetin süresi en önemli risk faktörüdür (79). Tip 1 DM'li hastalarda 5 yıldan erken DR gelişmesi pek ihtimal dahilinde değildir (80). Bununla birlikte hastalık süresi 20 yıl üzerinde ise %90'ın üzerindeki hastada herhangi bir evre DR gözlenmektedir ve bu olguların yaklaşık %10'unda proliferatif DR tespit edilmektedir (79).

3.6.3. Diyabetik retinopati sınıflaması

DR için Diyabetik Retinopati Erken Tedavi Çalışma Grubu'nun belirlediği sınıflandırma kullanılmaktadır (16). DR, klinik bulgulara göre non-proliferatif DR ve proliferatif DR olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır.

3.6.3.1. Non-proliferatif diyabetik retinopati (NPDR)

Klinik bulguların şiddetine göre hafif, orta, ağır ve şiddetli olmak üzere dört gruba ayrılmaktadır (16).

Hafif NPDR: DR'nin başlangıç dönemidir. Arka kutupta retinal hemorajiler ve mikroanevrizmalar gözlenir. PDR gelişme riski, bir yıl içinde %5'tir. Beş yıl içinde ise %15 yüksek riskli PDR gelişme riski mevcuttur (16).

Orta NPDR: Retinal hemoraji ve/veya mikroanevrizmaların sayısı artmış, dört retinal kadranın en az birinde yaygın olarak bulunmaktadır. Yumusak eksuda, venöz boncuklanmalar ve intraretinal mikrovasküler anomaliler (IRMA) görülebilir. Bir yıl içinde PDR riski %12-27, 5 yıl içinde yüksek riskli PDR gelişme riski % 33 olarak tespit edilmiştir (16).

Ağır NPDR: Mikroanevrizmalar, retinal hemorajiler, venöz bulgular, yumusak eksudalar ve IRMA klinik muayenede belirgindir. tüm retinal kadrarlarda hemorajiler ve mikroanevrizmalar varken, venöz kalibrasyon değişiklikleri en az iki kadranda, IRMA ise en az bir kadranda mevcuttur. Bir yıl içinde gelişebilecek PDR riski %52, 5 yıl içinde, yüksek riskli PDR riski ise % 60'tır (16).

Şiddetli NPDR: Yaygın yumusak eksudalar, arteriollerde tıkanıklıklar, belirgin venöz değişiklikler ve IRMA görülür. Bu evredeki hastalarda takip eden yıl içinde PDR gelişme riski %75 olarak belirtilmiştir (16).

3.6.3.2. Proliferatif diyabetik retinopati (PDR)

Proliferatif diyabetik retinopati (PDR), optik diskin neovaskülarizasyonu, retinanın neovaskülarizasyonu, irisin neovaskülarizasyonu ve iridokorneal açının neovaskülarizasyonu, vitreus içi kanama ve/veya traksiyonel retina dekolmanı ile karakterizedir (16). Özellikle retinadaki neovaskülarizasyonlar fibröz doku ile çevrilidir. Bu nedenle traksiyonlar gözlenebilmektedir. PDR tanısı için retinada ve/veya optik disk

üzerinde neovaskülarizasyon olması şarttır (81). Diyabetik hastaların %5-10 kadarında PDR bulunmaktadır. Bu oran DM süresi 30 yılı aştığında %60 seviyesine ulaşmaktadır (16). PDR klinik olarak erken PDR ve yüksek riskli PDR olarak iki kısımda incelenmektedir. Erken PDR’de minimal fibrotik dokunun eşlik ettiği retinal neovaskülarizasyonlar bulunurken, yüksek riskli PDR’de neovaskülarizasyonların vitreusa doğru ilerlediği ve beraberindeki fibrotik dokunun belirgin olduğu bir tablo hakim olup, bu tabloya vitreus içi kanamalar eşlik edebilmektedir (82).

3.6.4. Diyabetik retinopatinin önlenmesi

Diyabetik hastaların çoğunda yeterince uzun yaşarlarsa retinopati gelişmektedir (15). Tip 1 diyabetli hastaların % 50'sinde ve tip 2 diyabetli hastaların % 30'unda, yaşamı boyunca görmeyi tehdit eden retinopati gelişebilir ve görme kaybı riskini azaltmak için müdahale gerekebilmektedir (83). İlaç tedavisi ile retinopati riskinin daha da azaltılması arzu edilen bir hedefdir ve bu etki için birkaç sınıf molekül denenmiştir. Aldoza redüktaz inhibitörleri, protein kinaz-C inhibitörleri, anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri, kalsiyum dobesilat ve ruboksistaurin gibi pek çok molekül diyabetik retinopati gelişimine etkisi değerlendirilmiş ancak faydası tam olarak gösterilememiştir (84–87).

DR gelişimini geciktirmek ve şiddetini azaltmak için kan glukoz seviyesi ve kan basıncı kontrolü oldukça etkilidir (88). Diyabetik hastalardaki glikolize hemoglobin oranı ile retinopati progresyonu ile arasında ilişki saptamıştır (89). Başka bir çalışmada yoğun glisemik kontrol uygulanan diyabetik hastalarda, DR başlama ihtimalinde belirgin azalma olduğu, DR progresyonunda %54, retinal laser ihtiyacında ise %56 azalma olduğu bildirilmiştir (90). Sistemik arteriyel basıncın regüle edilmesinin tip 2 DR’de görme kaybını önleyeceği bildirilmiştir (89). Sistolik kan basıncının ortalama değerindeki her 10 mmHg azalmanın, DM’ye bağlı mikrovasküler komplikasyonların görülmesini %13 oranında azalttığı bildirilmiştir (12).

Diyabetik hastalarda fiziksel egzersiz diyabete bağlı komplikasyonları azaltmada olumlu etki edebilir (91, 92). Ancak özellikle ileri evre DR olan olgularda göz içi kanama riskini arttırdığından aşırı efor gerektiren hareketlerden kaçınmak gerekir (92). Anemi de DR gelişimini olumsuz etkileyen bir diğer faktördür. Hemoglobin düzeyi düşük olan DM hastalarında DR progresyonu riskinin, hemoglobin düzeyi normal olanlara göre 5 kat fazla olduğu bildirilmiştir (93).

3.6.5. Diyabetik retinopatinin tedavisi

DR'nin gelişmesi veya ilerlemesinin önlenmesi, görmenin korunması için en etkili yaklaşımdır. Ancak her diyabetik hastada bu hedefe ulaşılamamaktadır. DR gelişen hastaların mevcut bulgularına göre uygun şekilde tedavi edilmesi ile görme kaybı azaltılabilmektedir (94). Sistemik risk faktörlerinin elimine edilemediği durumlarda DR tedavisi aslında komplikasyonların yönetimini ifade etmekte ve patofizyolojiye yönelik bir çözüm sunamamaktadır (94).

Diyabetik Retinopati Çalışma Grubu, yüksek riskli PDR'li gözlerde zamanında planlanan pan-retinal fotokoagülasyonunun ciddi görme kaybı riskini %50'nin üzerinde azalttığını bildirmişlerdir (95). Lazer fotokoagülasyon, iskemik retinanın mid-perifer bölgelerini tahrip ederek patolojik retinal neovaskülarizasyonun gerilemesine yol açar. Ancak, geniş retinal fotokoagülasyon alanları sebebiyle bu tedavi periferik görme azalması ve gece görüşünün bozulmasına neden olmaktadır (96).

Pan retinal fotokoagülasyon dışında lazer tedavisi makula ödemi tedavisinde de kullanılmaktadır. Pan retinal fotokoagülasyondan daha düşük enerji parametreleri ile makula bölgesine yapılan uygulama son yıllarda anti-vasküler endotelyal büyüme faktörü (anti-VEGF) tedavilerin kullanıma girmesi ile ikinci planda kalmıştır. Bunun yanında mikropuls lazer tedavisi makula ödeminde kullanılmaktadır. Bu tedavide lazer, fotoreseptörlere ve retina pigment epiteline kalıcı zarar vermeden düşük enerji ile, milisaniyelik lazer patlamaları sağlar (97). Standart fotokoagülasyondan farklı olarak, aynı alanlara uygulanan tedavi tekrarlanabilir.

Makula ödeminde anti-VEGF enjeksiyonlar, ödemin çözülmesi ve görme artışında oldukça etkilidirler (98). Klinik uygulamalarda ranibizumab, aflibercept, conbercept gibi moleküller kullanılmaktadır (99). Ancak bu tedavilerin en önemli dezavantajı belirli aralıklarla tekrar edilme gerekliliği ve göz içi enjeksiyonlara bağlı olarak retina dekolmanı, katarakt ve göz içi kanama gibi potansiyel komplikasyon riski taşımalarıdır (98).

Göz içi kanama ile komplike olan DR'de pars plana vitrektomi (PPV) uygulanmaktadır (100). PPV ayrıca proliferatif DR'de gözlenen traksiyonel retina dekolmanının tedavisinde sıklıkla uygulanan bir cerrahi işlemdir (101). Güncel bir metaanaliz çalışmasında, PPV ile diyabetik makula ödemi olan belirli gözlerde yapısal ve

işlevsel iyileşme sağlandığı, ancak görme artışının lazer veya gözlemeden daha iyi olmadığı bildirilmiştir (102).

3.7. Deneysel Diyabet Modelinin Oluşturulması

Özellikle kronik hastalıklarda patogenezin anlaşılması, hastalık henüz ortaya çıkmamış iken hastalıktan korunma ve tedavi seçeneklerinin incelenmesi için deneysel hayvan modelleri kullanımı oldukça yaygındır. İlaç ve kimyasalların insanlarda kullanılmadan önce deney hayvanlarında test edilmesi oldukça kısa sürede faydalı bilgiler verebilmektedir. Zira deney hayvanları insan yaşamı ile kıyaslandığında yaşam siklüslerinin kısa olması nedeniyle ilaç etkileşim sonuçlarının daha erken alınabilmesine imkan tanımaktadır. Hayvanlarda diyabet modeli oluşturmak maksadı ile çeşitli kimyasal maddeler kullanılmıştır. Bunlardan en önemlileri arasında STZ, alloksan, siproheptadin ve 2,4 dinitrophenol diazoksit yer almaktadır (103,104).

Alloxan ve STZ diyabet araştırmalarında şimdiye kadar kullanılan en etkili diyabetojenik kimyasallar arasında yer almaktadır (103,104). Her iki kimyasal madde, pankreas beta hücrelerinde glukoz taşıyıcı-2 vasıtasıyla biriken sitotoksik glukoz analogları olarak kullanılır (105).

STZ, nitrozüre analogu olarak etki eder ve STZ'nin toksisitesi metil-nitrozüre parçasının DNA alkilasyon aktivitesine bağlıdır (105). STZ'den metil grubunun DNA molekülüne aktarılması, tanımlanmış bir olaylar zinciri boyunca hasara neden olur ve DNA fragmantasyonuna yol açar (105). STZ pankreas beta hücrelerine toksik etki gösterebilmesi için en uygun ortam pH değeri 4-4,5 arası olmalıdır (106). Bu sebeple STZ çözündürülmesinde sitrat gibi asidik tamponlar kullanılmalıdır.

STZ ile indüklenen DM iki tiptir: yetişkin tipi ve neonatal tip. Yetişkin tipi STZ ile indüklenen diyabet durumunda, 140 ila 300 g ağırlığında ve bir gece boyunca aç bırakılan sıçanlar, 0.1 M sitrat tamponu (pH 4.5) içinde çözülmüş tek bir intraperitoneal STZ enjeksiyonuna (45-70 mg / kg) maruz bırakılmaktadır (107). Aynı yaştaki kontrol sıçanlarında sadece sitrat tamponu enjeksiyonu yapılmaktadır. Yenidoğmuş sıçanlarda intravenöz veya intraperitoneal enjeksiyonla 100mg/kg STZ verilmesi ile de insüline bağımlı olmayan diyabet modeli oluşturulmaktadır (108).

3.8. CAPE ve CAPE İçeren Maddeler

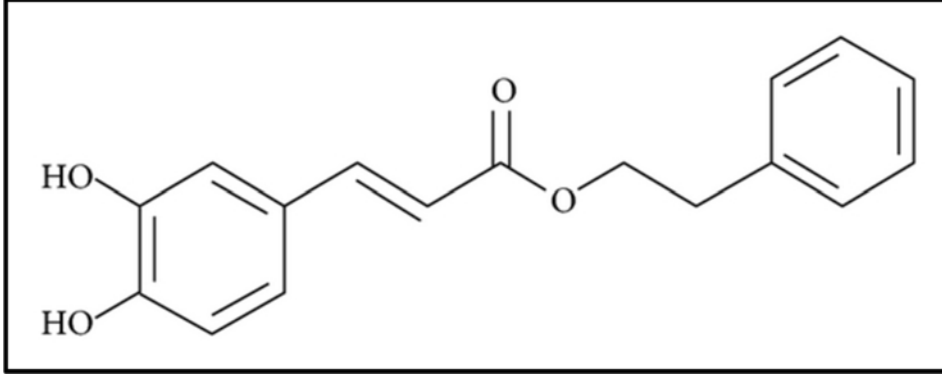
İlk kez, CAPE'yi Grunberger ve ark. tanımlamıştır (109). CAPE doğal fenolik bir kimyasal bileşik olup kafeik asit ve fenetil alkol esteridir. CAPE, pek çok çeşit bitkide bulunur (110). Aynı zamanda bal arısı kovanlarındaki propolisin önemli bir bileşenidir. Propolis yüzyıllar boyu, halk hekimliğinde M.Ö. 300 yıllarından beri anti-inflamatuar ilaç olarak kullanılmaya gelmiştir (111).

CAPE için hayvan modellerinde çeşitli in vitro etkileri ve farmakolojisi bildirilmiştir ancak bunların klinik önemleri bilinmemektedir. CAPE'nin in vitro olarak antimikotik, antikanserojenik, anti-inflamatuar ve immün modülatör özelliklere sahip olduğu bilinmektedir (24). Mevcut çalışmalar CAPE'nin, enfeksiyonlar, oksidatif stres, inflamasyon, kanser, diyabet, nörodejenerasyon ve anksiyete gibi çeşitli patolojilere karşı etkili bir molekül olduğunu bildirmektedir (112–116).

Bir başka çalışmada CAPE'nin akut bağışıklık ve inflamatuvar cevapları baskıladığı ve inflamasyonu azaltmak için terapötik kullanımlar için ümit verici olduğu bildirilmiştir (25). CAPE'nin transforme olmuş hücrelere karşı seçici olarak toksik olmasına rağmen normal hücreler üzerinde toksik etkileri yoktur (109). CAPE, propolisin en çok çalışılan bileşeni olup, insan nötrofillerinde ve sadece 10 mM konsantrasyonda xanthine/ xanthine oxidase sistemlerinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini inhibe edebilmektedir (117).

3.8.1. CAPE'nin biyosentezi ve kimyasal yapısı

CAPE'nin kimyasal adı 2-feniletıl (2E) -3- (3,4-dihidroksifenil) akrilattır. Ayrıca feniletıl kafeinat veya fenetil kafeinat olarak da adlandırılır ve molekül formülü $C_{17}H_{16}O_4$ 'tür (114). CAPE'nin kimyasal yapısı Şekil 1'de gösterilmektedir. Bu polifenolik ester ayrıca kafeik asitin fenetil alkollerle reaksiyona sokulması ile de sentezlenebilir (112,115). CAPE, pek çok biyolojik aktivitede önemli rolünden sorumlu olan katekol halkasında hidroksil grupları olan bir polifenoldür (116).



Şekil 1. CAPE'nin kimyasal yapısı (114).

3.8.2. CAPE'nin sistemler üzerine etkileri

CAPE'nin *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* ve *Haemophilus influenzae*'ya karşı antimikrobiyal aktivitesini gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (118,119). Bu sebeple, CAPE'nin diyetle alınmasının boğaz ağrısı, soğuk algınlığı ve enfektif yara iyileşmesi tedavisi için yararlı olduğu belirtilmiştir. CAPE'nin bu antibakteriyel aktivitesi, bakterilerin dış zarını yok eden ROS sentezlenmesine bağlanmıştır (120). Ayrıca CAPE'nin domatese bulaşan mantarlarda meyveye zarar vermeden fungisid etkinliğe sahip olduğuna dair umut verici kanıtlar mevcuttur (121). Bunun yanında CAPE'nin, HIV-1 integrazın önemli bir önleyicisi olduğu öne sürülmüştür (122). Bu nedenle CAPE'nin potansiyel bir anti-HIV tedavisi olduğuna inanılmaktadır. Başka bir çalışmada, Fesen ve ark. entegrasyon adımının CAPE tarafından HIV-1 integrazın ilk bölünme basamağında etkili bir şekilde inhibe edildiğini bildirmiştir (123). Buna ek olarak, CAPE ve esterleri hepatit C virüsünün çoğalmasına karşı etkili bulunmuştur, bu da umut verici bir anti-HCV bileşiğini göstermektedir (124).

CAPE'nin anti-inflamatuar etkinliği literatürde çok sayıda çalışmada gösterilmiştir (26,125–127). CAPE anti-enflamatuar etkinliğini, hücre zarı üzerindeki araşidonik asit salınımı ile siklooksijenaz-1 (COX-1) ve siklooksijenaz-2 (COX-2) aktivitesini inhibe ederek, COX-2 ekspresyonundan sorumlu genin aktivasyonunu baskılayarak göstermektedir (25,128,129). Karajenan ile indüklenen inflamasyonda, CAPE hem eksuda hacmini oluşmasını hem de lökositlerin yer değiştirmesini baskılamaktadır (130,131). CAPE'nin, insan histiyositik ve koroner arter endotel hücrelerinde ROS üreten ajanlar tarafından indüklenen NF- κ B aktivasyonunun baskılanmasında da etkili olduğu

gösterilmiştir (24). Bunun yanında, CAPE'nin immünsüpresif özellikleri T hücrelerinde değerlendirilmiştir (132). Başlangıç ve geç basamaklardaki T hücre reseptör aracılı T-hücresi aktivasyonunun CAPE aracılı inhibisyonunun gerçekleştirildiği ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca uyarılmış T hücrelerinde hem IL-2 gen transkripsiyonunun hem de IL-2 sentezinin CAPE ile inhibe edildiği de bildirilmiştir (27).

Sitotoksosite çalışmalarında CAPE ile ilgili kapsamlı bir literatür bulunmaktadır. CAPE varlığında, insan pankreatik ve kolon kanseri hücrelerinin apoptozise uğradığı bildirilmiştir (28,29).

CAPE'nin anti-proliferasyon aktivitesini ayrıntılı olarak ortaya koyan birçok kanıt bulunmaktadır (24,30). Normal hücre proliferasyonu için yeterli nükleer faktör NF- κ B aktivitesi seviyesi gerekmektedir. Bazı kanserlerde NF- κ B'nin aktivasyonunun arttığı gözlenmiştir. Bu NF- κ B aktivasyon artışını engellenmesinde, CAPE'nin etkili olduğu kanıtlanmıştır (24,133).

Bununla birlikte CAPE'nin, normal hücelere karşı sitotoksositeye neden olmayan antitümör özellikleri oluşturduğu bildirilmiştir (134,135). Su ve ark. CAPE'nin sitotoksitesinin apoptotik etki ile doğrudan ilişkili olduğunu öne sürmüşlerdir (136).

CAPE'nin anti-tümör aktivitesi, anjiogenezis, tümör invazyonu ve metastaz üzerine etkileri araştırılmıştır. Liao ve ark., kolon adenokarsinoma hücrelerinde (CT26) hücre canlılığında CAPE tedavisi ile doz bağımlı azalma bildirmişlerdir (137).

Buna ek olarak, Song ve ark. anjiyogenez ve kronik inflamasyonun birbirine bağlı olması nedeniyle CAPE'nin antianjiyojenik özelliğinin de antiinflamatuvar etkiden sorumlu olduğunu öne sürmüşlerdir (138).

Serbest radikal oluşumu ve oksidatif hasara bağlı olarak, kanser tedavisinde kullanılan birçok ilaç, birçok organın fizyolojik dengesini tahrip etmektedir. CAPE tedavisinin, kemoterapötik ajanların hücrel ve organlardaki olumsuz etkilerini azaltıcı etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (31,139,140). İyonize radyasyon ile birlikte CAPE ile tedavi edilen kolon adenokarsinom hücrelerin artmış ölümü bildirilmiştir (32).

Çalışmalar CAPE'nin nöroprotektif etkinliğe de sahip olduğunu göstermiştir (33,43). CAPE'nin serebellar granül hücrelerdeki apoptoziyi engelleyerek iskemi / reperfüzyona bağlı serebral ve spinal kord hasarını azalttığı bildirilmiştir (34,44).

Hücre metabolizması sonucunda hidrojen peroksit (H₂O₂), süperoksit anyonu, hidroksil iyonu ve reaktif azot türleri, özellikle nitrik oksit gibi ROS oluşmaktadır (141). Enzimatik süreçler genellikle bu ROS'u detoksifiye etmektedir (142). Öte yandan, oksidatif strese neden olan durumlarda da aşırı ROS oluşur. Aşırı ROS, DNA gibi makromoleküllerle tepkimeye girebilir ve hücreler için bazı zararlı yanıtlara neden olabilir (142). CAPE'nin antioksidan rolünü değerlendirmek için geniş çaplı araştırmalar yapılmıştır (42,119). Kanıtlar, CAPE'nin ROS'u süpürüp hücre membranını lipid peroksidasyona karşı koruyabilen kuvvetli bir antioksidan olduğunu ortaya koymaktadır (35,143).

Bu etkilerinin yanında CAPE'nin immüno-modülatör, antihepatotoksik, antiosteojenik, antiaterosklerotik etkisi ve kemik iyileşmesi üzerine olumlu etkileri literatürde bildirilmiştir (36,109,144–146).

3.8.3. CAPE'nin oküler çalışmalarda kullanımı

Katarakt, arka kapsül opasifikasyonu, çeşitli korneal hastalıklar, retina ve optik sinir hastalıklarında CAPE'nin etkileri çalışılmıştır. CAPE'nin fakoemülsifikasyon sonrası lens arka kapsül opasifikasyonunu belirgin oranda azalttığı belirtilmiştir (37). Frenkel ve ark. CAPE tedavisi ile katarakt gelişiminin azaltılabileceğini öne sürmüşlerdir (134). CAPE, alerjik konjonktivit modelinde çalışılmış ve %1 CAPE konsantrasyonunun klinik olarak %0,1 deksametazon ve olopatadine eşdeğer olduğu bildirilmiştir (147). CAPE'nin korneal neovaskülarizasyon üzerindeki inhibe edici etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, CAPE'nin korneal neovaskülarizasyonun azaltılması açısından indometasinden daha etkili olduğu ve deksametazon ile eşdeğer etkili olduğu gösterilmiştir (38). Bunun yanında CAPE'nin retinadan türetilmiş 661W hücrelerini, bazı antioksidan genlerin ve proteinlerin ekspresyonunda değişiklikler eşliğinde, in vitro H₂O₂ kaynaklı hücre ölümüne karşı koruduğu bildirilmiştir (39). Diyabetik olgularda, retinal vasküler endotel, kan damarı duvarı, koryokapillaris endoteli, koroidal neovasküler endotel ve göç eden insan retina pigment epiteli (RPE) hücrelerinde artmış VEGF immünreaktivitesi gözlenmektedir (148). Bian ve ark. tarafından RPE hücreleri üzerinde yapılan çalışmada indüklenen VEGF ekspresyonunun, bir NF-κB inhibitörü olan CAPE ve bir ROS inhibitörü olan N-asetilsistein tarafından tamamen kaldırıldığı belirtilmiştir (149). Şahin ve ark, antitüberküloz ilaçların optik sinir üzerine etkilerini araştırmışlar ve oksidatif stres parametreleri ile retina ganglion hücre kaybının CAPE tedavisi ile iyileştiğini

bildirmişlerdir (150). Metanol zehirlenmeleri optik sinirde hasara yol açarak geri dönüşümsüz körlük yapmaktadır. CAPE metanol zehirlenmesi modelinde denenmiş ve etanol ile benzer şekilde retina ganglion hücre kaybını engellemiş olduğu gösterilmiştir (40). Bu çalışmada *in silico* olarak CAPE'nin alkol dehidrojenaz enziminin aktif bölgesine yakınlığı gösterilmiş ve akut metanol zehirlenmesinde antidot olarak kullanılabilecek bir molekül olduğu öne sürülmüştür (40).

Retina dekolmanı cerrahisinde en önemli komplikasyonlardan birisi proliferatif vitreoretinopatidir. CAPE tedavisinin kısmen de olsa proliferatif vitreoretinopati gelişimini engellediği gösterilmiştir (151). CAPE, diyabette retinadaki oksidatif stres araştırılmasında da çalışılmıştır. Durmuş ve ark. CAPE tedavisi ile retinadaki oksidatif stres parametrelerinde iyileşme olduğunu bildirmişlerdir (152).

Retinal iskemi reperfüzyon modelinde CAPE tedavisi ile retinal hasarın ve oksidatif stresin azaldığı gösterilmiştir (153). Lipopolisakkarit enjeksiyonu ile indüklenen üveit modelinde CAPE tedavisi ile üveit şiddeti ve inflamatuvar yanıtı belirgin bir şekilde azalttığı bildirilmiştir (126). Endoftalmi modelinde subtenon enjekte edilen CAPE'nin deksametazona yakın etkinlikte olduğunu göstermişlerdir.

Yukarıdaki çalışmalarda da gösterildiği gibi, oküler hastalıkların tedavisinde CAPE etkili bir ajan olabilir (41). CAPE'nin intrakamaral ve intravitreal uygulamaları ile zararlı bir etkisi bildirilmemiştir (37). Bu nedenle CAPE ile ilgili özellikle inflamasyonun ve oksidatif stresin yer aldığı oküler hastalıklarda ümit vaad eden bir molekül olduğu belirtilmektedir. Ancak bu özelliği klinik çalışmalar ile doğrulanmalıdır.

4. GEREÇ ve YÖNTEM

4.1. Kimyasallar

Diyabetik rat modeli oluşturmak için hayvanlara 35mg/kg dozunda STZ intraperitoneal olarak enjekte edildi. CAPE grubunda CAPE (Sigma, St. Louis, MO), 10 µmol/kg dozunda uygulandı. CAPE uygulanmayan gruplarda eş miktarda serum fizyolojik sıvı intraperitoneal olarak verildi.

4.2. Deney Hayvanları

Çalışma öncesi, Dicle Üniversitesi Prof. Dr. Sabahattin Payzın Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu'nundan 14.01.2015 tarihli 2015/03 nolu etik kurul onayı alındı. Ratlar Dicle Üniversitesi Prof. Dr. Sabahattin Payzın Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edildi. Bu çalışmada 30 adet erkek Sprague Dawley rat kullanıldı. Sıçanlar 4 aylık olup ağırlıkları ortalama 250±50 gr olarak ölçüldü.

4.3. Diyabetik Rat Modelinin Oluşturulması

DeneySEL diyabet oluşturmak için pH=4,5 olan sitrat tamponu içindeki STZ tek doz 35 mg/kg şeklinde intraperitoneal olarak enjekte edildi. 48 saat sonra kan glukoz düzeyinin 250 mg/dl üzeri olan sıçanlar diyabetik olarak kabul edildi. STZ uygulanmasından sonra su ve yem alımı serbest bırakıldı. Ancak hipoglisemiyi önlemek amacı ile beslenme suyuna %10 olacak şekilde glukoz eklenmiştir.

4.4. Deney Tasarımı

Ratlar randomize edilerek aşağıdaki şekilde gruplara dağıtıldı.

- (1) non-diyabetik kontrol grubu (kontrol, n = 8);
- (2) diyabetik kontrol grubu (STZ, n = 11); ve
- (3) diyabetik rat CAPE alan grup (STZ+CAPE, n = 11).

Intraperitoneal ketamin enjeksiyonu sonrası, DM oluşturulacak gruplarda (Grup 2 ve Grup 3) 35mg/kg intraperitoneal streptozotosin verildi. Kontrol grubunda (Grup 1) ise aynı miktarda serum fizyolojik enjekte edildi. Kırksekiz saat sonra kan glukoz seviyesi bakılarak 250mg/dl üstü olanlar diyabetik kabul edildi. Diyabet oluşumu saptanan ratlardan STZ+CAPE grubunda (Grup 3) olanlara, CAPE 10 µmol/kg/gün dozunda 4 hafta boyunca her gün intraperitoneal olarak verildi. CAPE verilmeyen kontrol grubu (Grup 1) ve

diyabetik kontrol grubunda (STZ, Grup 2) ise eş miktarda serum fizyolojik her gün intraperitoneal olarak enjekte edildi.

Dört hafta sonunda deneyin sonlandırılacağı günde 50mg/kg ketamin anestezisi yapıldı. Sakrifikasyondan önce kardiyak ponksiyon ile kan örnekleri alındı. Ardından ratlar sakrifiye edildi ve bir gözleri histopatolojik değerlendirme için enükle edildi. Diğer gözleri biyokimyasal değerlendirme için enükle edilerek retina diseke edildi ve ependorf tüplerine konularak -80 C'de biyokimyasal işlemlere kadar saklandı.

4.5. Kan Glukoz Düzeylerinin Ölçümü

Hayvanların kan glukoz düzeyleri deney öncesi, streptozotosin verilmesini takip eden 48. saatte, 1. hafta, 21. günde ve 28. günde ölçüldü. Ölçümler için ratların kuyruğu alkol ile temizlendi. Akabinde iğne ucu ile kuyruk veninden alınan kan örnekleri glukoz oksidaz yöntemi ile çalışan glukometre cihazı (Clever chek glucose meter, Bioland, Germany) ile ölçüldü.

4.6. Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü

Diseke edilen retina dokuları -80°C de deney gününe kadar saklandı. Biyokimyasal ölçümlerin yapılacağı zaman oluşturulan doku homojenatları 30 dakika 14000 devirde santrifüj edilerek hazırlandı. Total antioksidan kapasite (TAS) Erel tarafından tanımlanan kolorimetrik yöntem ile ölçüldü. TAS ölçüm sonuçları nmol Trolox equivalent/mg protein olarak kaydedildi (154). Total oksidan kapasite (TOS) yine Erel tarafından tanımlanan kolorimetrik yöntem ile ölçüldü ve sonuçları nmol H₂O₂ equivalent/mg protein olarak kaydedildi (155). TOS değeri TAS değerine bölünerek oksidatif stres indeksi (OSI) hesaplandı. Paraoxonase-1 (PON-1) spektrofotometrik olarak modifiye Eckerson yöntemi ile ölçüldü (156).

4.7. Rat MMP-2 ve MMP-9 ELISA

Rat serumları her kuyucuğa 100 µl olmak üzere 10 mM bikarbonat tamponu pH 9,6 içerisinde 20 defa seyreltilerek 96 kuyucuklu ELISA plakalarının (Nunc-Immuno™ MicroWell™ 96 well solid plates, Katalog #M9410 Sigma) içerisine koyuldu ve plakaların serum içeriği ile kaplanması 4 °C'de 16 saatte yapıldı. Her kuyucuk 3 defa 450 µl PBS ile yıkandıktan sonra, her kuyucuk 200 µl %5 FCS, PBS ile bloklandı (37 °C'de 1 saat). Her kuyucuk 3 defa 450 µl PBS ile yıkandıktan sonra, 100 µl %1 FCS, PBS içerisinde, 1 µg/ml anti-MMP-2 fare monoklonal antikoru (Katalog # IM33, CALBIOCHEM) veya anti-

MMP-9 fare monoklonal antikorunu (Katalog # IM37, CALBIOCHEM) kuyucuklara eklendi ve 37 °C'de 1 saat bekletildi. Her kuyucuk 3 defa 450 µl PBS ile yıkandıktan sonra, 100 µl %1 FCS, PBS içerisinde 0,5 µg/ml HRP ile konjüge keçi anti-fare F(ab')₂ fragmanları (Katalog # F-21453, Novex) (kuyucuklara eklendi ve 37 °C'de 1 saat bekletildi. Her kuyucuk 5 defa 450 µl PBS ile yıkandıktan sonra, 100 µl renk geliştirme tamponu (1 mg/ml o-Phenylenediamine, 1 µl/ml 30% H₂O₂ 50 mM citrate-phosphate tamponu pH 5,0 içerisinde) kuyucuklara eklendi ve oda sıcaklığında renk geliştirildikten (yaklaşık 15 dakika) sonra 50 µl 6N H₂SO₄ eklenerek reaksiyon durduruldu ve 492 nm dalga boyunda optik densite (O.D.) ölçümleri yapıldı (Zenith, BioChrom Antos 200rt). Her örnek dublike olarak plakalara uygulandı. Konsantrasyon hesaplanırken blank (kör) O.D. değeri bütün diğer O.D. değerlerinden çıkartılmıştır.

4.8. Histopatolojik Değerlendirmeler

Patolojik inceleme için, glob bütünlüğü bozulmadan enükle edilen gözler formol çözeltisi içinde 2 gün bekletildikten sonra gözler parafin blok içerisine gömüldü. Parafin bloktan mikrotomla 5 mikrometre kalınlığında kesitler elde edildi. Ksilol ve dereceli alkol ile deparafinize ve dehidre edildikten sonra elde edilen kesitler hematoksilin ve eozin, caspase-3 ile boyandı. Bütün histopatolojik kesitler ışık mikroskobu ile incelendi ve dijital kamera ile fotoğrafları çekilerek kaydedildi.

4.9. Rat MMP-2 ve MMP-9 İmmünofloresan Boyama ve Görüntüleme

Göz parafin blokları 4 µm kalınlığında mikrotom ile kesildi. 54 °C sıcaklıktaki su içerisinde kesilen doku pozitif yüklü mikroskop lamı (Katalog # 22-037-246, Thermo Sci Erie) üzerine doku yerleştirildi. Dokular kuruduktan sonra, 60 °C sıcaklıkta 20 dakika, xylene içinde 5'er dakika 3 defa, %96 etanol içinde 5'er dakika 2 defa, %70 etanol içinde 5 dakika 1 defa ve deiyonize su içerisinde 5 dakika bekletilerek dokulardan parafin uzaklaştırılıp hidrate edilmiştir.

Antijen retrieval için 10 mM Tris EDTA, pH 9,5 içerisinde mikrodalgada 5 dakika kaynatılmış ve soğuması için oda sıcaklığında 20 dakika bekletilmiştir. Sonrasında, PBS içerisinde 5 dakika tutulduktan sonra sonraki basamağa geçilmiştir. Bundan sonraki basamaklar Shandon Coverplate (Katalog # 72110013, Thermo Scientific) ile kapatılmış lamalar üzerinde gerçekleştirilmiştir. Önce 500 µl PBS ile doku 5 dakika yıkanmıştır. 500 µl %10 FCS ve %1 Glycine içeren PBS ile non-spesifik antikor bağlanmasına engel olmak

için 37 °C sıcaklıkta 1 saat bloklanmıştır. 2 defa 500 µl %1 FCS PBS ile doku 5 dakika yıkanmıştır.

500 µl 5mM CuSO₄, 50 mM amonyum asetat, pH 5,0 dokuya 10 dakika uygulanarak otofloresan bloklaması yapılmıştır. 2 defa 500 µl %1 FCS PBS ile doku 5 dakika yıkanmıştır. 100 µl PBS içerisinde 0,5 µM POPO-3 iodide (Katalog # P3584, invitrogen, life technologies) oda sıcaklığında 20 dakika dokulara uygulanmış ve sonrasında 2 defa 500 µl %1 FCS PBS ile doku 5 dakika yıkanmıştır.

Alexa Fluor 350 Zenon Labeling Kit (Katalog # Z25000, Molecular Probes, life technologies) ile işaretlenmiş 5 µg/ml anti-MMP-2 fare monoklonal antikoru ve Alexa Fluor 488 Zenon Labeling Kit (Katalog # Z25000, Molecular Probes, life technologies) ile işaretlenmiş 5 µg/ml anti-MMP-9 fare monoklonal antikoru 100 µl %1 FCS PBS içerisinde 37 °C sıcaklıkta 1 saat dokulara uygulanmış ve sonrasında 2 defa 500 µl PBS ile doku 5 dakika yıkanmıştır. 500 µl %4 paraformaldehit içeren PBS ile dokular 15 dakika fikse edilmiş ve sonrasında 2 defa 500 µl PBS ile doku 5 dakika yıkanmıştır.

Shandon Coverplate ve lam birbirinden ayrılıp dokular lam üzerinde kurutulduktan sonra doku üzerine %2 N-Propyl Gallate, %90 Gliserin, PBS damlatılarak lamel kapatılmıştır.

Görüntüleme için Popo-3 iodide için Cy3 HYQ, anti-MMP-2-Alexa Fluor 350 için DAPI ve anti-MMP-9- Alexa Fluor 488 için FITC floresan filtreleri kullanılarak, DS-Qi1MC (Nikon) monokrom kamera ile NIS Elements Advaced Research version 4.10 (Nikon) yazılımıyla görüntü alınmıştır.

4.10. Rat Aktif Caspase-3 İmmünohistokimyası

Göz parafin blokları 4 µm kalınlığında mikrotom ile kesildi. 54 °C sıcaklıktaki su içerisinde kesilen doku pozitif yüklü mikroskop lamı üzerine doku yerleştirildi. Dokular kuruduktan sonra, 60 °C sıcaklıkta 20 dakika, xylene içinde 5'er dakika 3 defa, %96 etanol içinde 5'er dakika 2 defa, %70 etanol içinde 5 dakika 1 defa ve deiyonize su içerisinde 5 dakika bekletilerek dokulardan parafin uzaklaştırılıp hidrate edilmiştir.

Antijen retrieval için 10 mM Tris EDTA, pH 9,5 içerisinde mikrodalgada 5 dakika kaynatılmış ve soğuması için oda sıcaklığında 20 dakika bekletilmiştir. Sonrasında, PBS içerisinde 5 dakika tutulduktan sonra sonraki basamağa geçilmiştir.

Bundan sonraki basamaklar Shandon Coverplate ile kapatılmış lamalar üzerinde gerçekleştirilmiştir. Önce 500 µl PBS ile doku 5 dakika yıkanmıştır. 500 µl %10 FCS içeren PBS ile non-spesifik antikor bağlanmasına engel olmak için 37 °C sıcaklıkta 1 saat bloklanmıştır ve 2 defa 500 µl %1 FCS PBS ile doku 5 dakika yıkanmıştır. Endojen peroksidazlar için 500 µl %3 H₂O₂ %0,1 Sodyum Azid deiyonize su ile dokular 37 °C sıcaklıkta 20 dakika muamele edilmiştir ve 2 defa 500 µl %1 FCS PBS ile doku 5 dakika yıkanmıştır. 5 µg/ml anti-rat aktif caspase-3 tavşan poliklonal antikor (Katalog # AB3623, MILLIPORE) 100 µl %1 FCS PBS içerisinde 37 °C sıcaklıkta 1 saat dokulara uygulanmış ve sonrasında 2 defa 500 µl %1 FCS PBS ile doku 5 dakika yıkanmıştır. 2,5 µg/ml HRP ile konjüge keçi anti-tavşan IgG F(ab')₂ fragmanları (Katalog # A10547, Molecular Probes, life technologies) 100 µl %1 FCS PBS içerisinde 37 °C sıcaklıkta 1 saat dokulara uygulanmış ve sonrasında 2 defa 500 µl %1 FCS PBS ile doku 5 dakika yıkanmıştır. Renk geliştirme için, 200 µl substrat (0,5 mg/ml DAB, %0,3 H₂O₂ Deiyonize Su içerisinde) eklenerek oda sıcaklığında 15 dakika beklenmiş ve 2 defa 500 µl PBS ile doku 5 dakika yıkanmıştır. Kontrast için hematoxylin boyası kullanılmıştır. Işık mikroskobu ile dokular değerlendirilmiştir.

4.11. İstatistiksel analiz

Elde edilen veriler ortalama–standart sapma olarak ifade edildi. Histopatolojik değerlendirmelerde elde edilecek kategorik verileri karşılaştırmak için Ki-kare testi, numerik verileri karşılaştırmak için ise Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Anlamlı farkın olduğu karşılaştırmalarda Mann Whitney U testi kullanıldı. p<0,05 olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

5. BULGULAR

5.1. Kan Glukoz Seviyeleri

Kan glukoz düzeyleri ölçümü kontrol, STZ ve STZ+CAPE grubunda sırasıyla deneyin öncesinde yapılan ölçümde 107,75±4,75 mg/dl, 107,90±4,30 mg/dl, 105,90±5,10 mg/dl olarak saptandı (Tablo 1).

STZ enjeksiyonu sonrası ölçülen glukoz değerleri sırası ile 108,75±18,79 mg/dl, 527,50±108,50 mg/dl ve 455,56±114,10 mg/dl idi. Bu ölçümlerde STZ ve STZ+CAPE grupları arasında istatistiksel farklılık saptanmadı. 21. gündeki kan glukoz ölçümü STZ grubuna göre STZ+CAPE grubunda istatistiksel olarak düşük saptandı (kontrol, STZ ve STZ+CAPE grubunda sırasıyla 115,38±10,00 mg/dl, 608,82±70,00 mg/dl ve 406,45±186,01 mg/dl. 21. günde STZ grubu ile STZ+CAPE arasında anlamlılık p=0,003 olarak tespit edildi (Mann Whitney U) (Tablo 1 ve Şekil 2) .

Kan glukoz seviyeleri 28. günde kontrol, STZ ve STZ+CAPE gruplarında sırasıyla 107,38±6,54 mg/dl 555,20±118,75 mg/dl ve 606,00±83,5 mg/dl olarak saptandı. Ancak 28. günde STZ ile STZ+CAPE grupları arasında glukoz seviyelerinde farklılık tespit edilmedi (p=0,26) (Şekil 2). Kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki ölçümlerde 7., 21. ve 28. günlerde istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı (Tüm karşılaştırmalar için p<0,001).

Tablo 1. Gruplarda ölçülen glukoz değerlerinin (mg/dl) karşılaştırılması (ort±ss)

	Deney Öncesi	7. Gün	21. Gün	28. Gün
Kontrol	107,75±4,75	108,75±18,79	115,38±10,00	107,38±6,54
STZ	107,90±4,30	527,50±108,50	608,82±70,00	555,20±118,75
STZ+CAPE	105,90±5,10	455,56±114,10	406,45±186,01	606,00±83,5
p değeri*	0,254	0,003	<0,001	0,002

*Kruskall Wallis testi

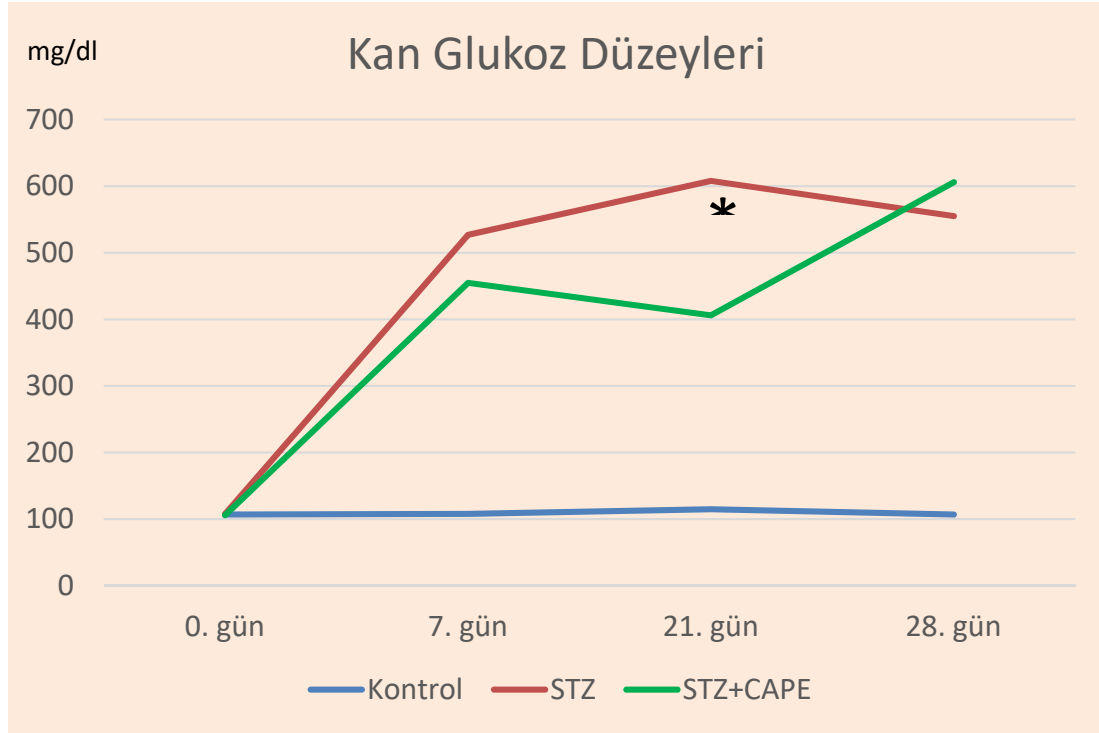
5.2. Retinal TAS, TOS ve PON Seviyeleri

Grupların TAS seviyeleri kontrol grubunda $1,65\pm 0,77$ nmol Trolox Eq/mg protein, STZ $1,64\pm 0,15$ nmol Trolox Eq/mg protein ve STZ+CAPE grubunda $1,60\pm 0,16$ nmol Trolox Eq/mg protein olarak ölçüldü, ancak gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p=0,71$ Kruskal Wallis testi) (Tablo 2).

Fakat TOS değeri STZ+CAPE grubunda ($30,93\pm 9,97$ nmol H₂O₂ Eq/mg protein) kontrol ($42,78\pm 9,90$ nmol H₂O₂ Eq/mg protein) ve STZ grubuna ($61,53\pm 24,7$ nmol H₂O₂ Eq/mg protein) göre anlamlı olarak düşük saptandı ($p=0,01$ Kruskal Wallis). Kontrol ile STZ grubu arasında istatistiksel farklılık saptanmadı ($p=0,073$ Mann Whitney U). Kontrol ile STZ+CAPE grubu arasında anlamlı farklılık saptanmazken ($p=0,070$ Mann Whitney U), STZ ile STZ+CAPE grubu arasında yapılan karşılaştırmalarda anlamlı farklılık saptandı ($p=0,007$ Mann Whitney U).

Bunun yanında PON seviyeleri Kontrol, STZ ve STZ+CAPE gruplarında sırasıyla $183,6\pm 18,4$ U/L, $124,5\pm 53,1$ U/L ve $122,1\pm 53,1$ U/L) ($p=0,002$ Kruskal Wallis testi). PON seviyeleri, STZ ve STZ+CAPE gruplarında benzer saptandı ($p=0,941$ Mann Whitney U). Ancak kontrol grubuna göre her ikisi de anlamlı olarak düşük saptandı (sırasıyla $p=0,006$ ve $p<0,0001$ Mann Whitney U) (Tablo 2).

Retina dokusundaki oksidatif stresi değerlendirmede OSI değerleri, STZ grubunda, kontrol ve STZ+CAPE gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek saptandı ($p=0,011$ Kruskal Wallis). OSI değeri STZ grubunda $37,90\pm 14,32$ iken, kontrol grubunda $26,35\pm 6,24$ STZ+CAPE grubunda ise $20,01\pm 5,87$ olarak tespit edildi. Kontrol grubu ile STZ grubu ve STZ+CAPE arasında farklılık saptanmazken (sırasıyla $p=0,101$ ve $p=0,055$ Mann Whitney U), STZ ile STZ+CAPE grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,007$ Mann Whitney U).



Şekil 2. Gruplara göre kan glukoz ölçümlerinin karşılaştırılması. 21. günde STZ grubunda STZ+CAPE grubuna göre anlamlı fark saptandı (p=0,003).

Tablo 2. Gruplara göre retinal oksidatif stres parametrelerinin karşılaştırılması (ortalama±standart sapma)

	Kontrol	STZ	STZ+CAPE	p değeri*
TAS (nmol Trolox Eq/mg protein)	1,65±0,77	1,64±0,15	1,60±0,16	0,71
TOS (nmol H ₂ O ₂ Eq/mg protein)	42,78±9,90	61,53±24,7	30,93±9,97	0,01
OSI	26,35±6,24	37,90±14,32	20,01±5,87	0,011
PON (U/L)	183,6±18,4	124,5±53,1	122,1±53,1	0,002

*Kruskall Wallis testi; TAS: Total anti-oxidant status; TOS: total oxidant status; PON: Paroxanase; OSI: Oksidatif Stres indeksi=TOS/TAS

5.3. Serum ve Retina MMP-2 ve MMP-9 Seviyeleri

Serum ve retina MMP-2 ve MMP-9 düzeyleri Tablo 3’de özetlenmiştir. Çalışmamızda gruplardaki serum MMP-2 ve MMP-9 seviyeleri arasında anlamlı farklılık saptanmadı (sırasıyla p=0,53 ve p=0,91). Benzer şekilde retina MMP-2 ve MMP-9 seviyeleri de karşılaştırılabilir idi (sırasıyla p=0,54 ve p=0,63) . Gruplara ait retinal MMP-2 ve MMP-9’un immünoflöresan yöntemle belirtildiği örnekler Resim 1’de gösterilmiştir.

5.4. Retina Caspase-3 İmmünohistokimyası

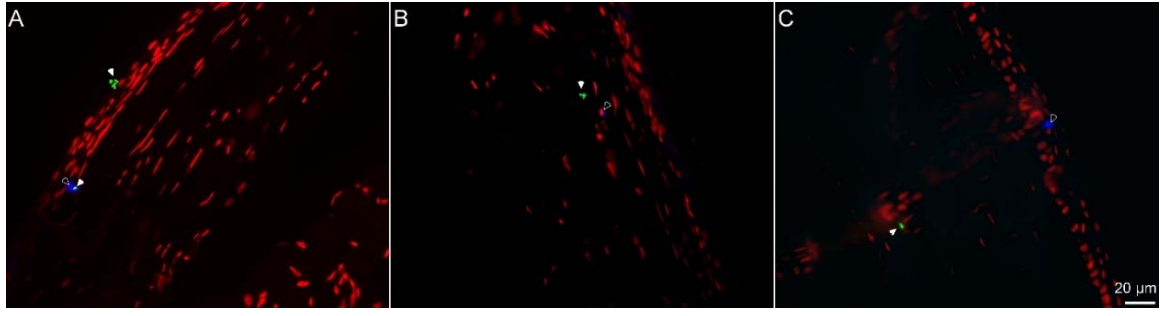
Tüm gruplarda yapılan immünohistokimyasal boyama ile retinada apoptotik durum Caspase-3 boyası ile değerlendirilmiş ve sonuç olarak tüm gruplarda benzer bulgular saptanmıştır (p=0,79). Grupların Caspase-3 boyama sonuçları Tablo 3’de, demonstratif boyama örnekleri ise Resim 2’de gösterilmiştir.

Tablo 3. Gruplardaki serum ve retina MMP-2 ve MMP-9 seviyeleri ile retinal Caspase-3 boyama sonuçlarının karşılaştırılması.

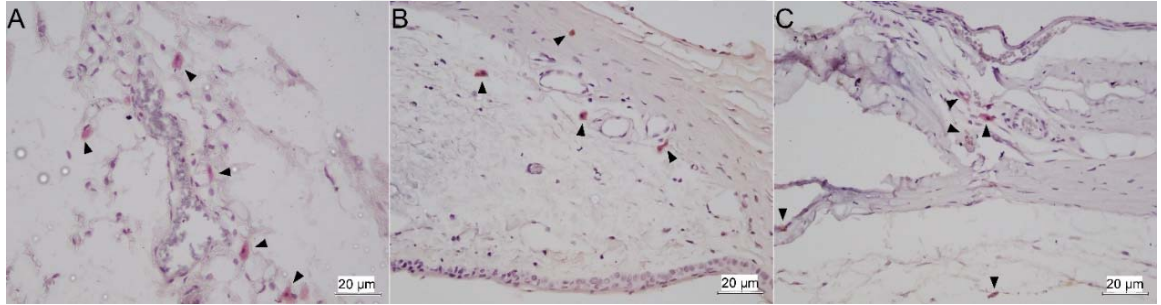
	Kontrol	STZ	STZ+CAPE	p değeri*
Serum MMP-2	2,28±0,37	2,47±0,26	2,46±0,34	0,53
Serum MMP-9	2,48±0,35	2,58±0,19	2,57±0,33	0,91
Retina MMP-2	5,42±2,82	4,22±2,27	2,55±1,23	0,54
Retina MMP-9	17,85±3,07	17,11±7,75	15,22±6,03	0,63
Retina Caspase-3	4,0±1,82	4,88±4,13	3,55±2,74	0,79

*Kruskall Wallis testi; MMP: Matriks metalloproteinaz

MMP-2 ve MMP-9 400 büyütmede en az 5 alanda pozitif boyanmış hücreler sayılıp ortalaması alınmıştır. Caspase-3 400 büyütmede en az 5 alanda pozitif boyanmış hücreler sayılıp ortalaması alınmıştır.



Resim 1. Diyabetik gözde MMP-2 ve MMP-9'un immünoflöresan yöntemle gösterilmesi. Hücre nükleusları POPO-3 iodyid ile kırmızıya boyanmıştır. Açık uçlu ok başı ile mavi renkle boyanmış MMP-2 pozitif hücreler gösterilmektedir. Kapalı ok başı ile yeşil renkle boyanmış MMP-9 pozitif hücreler gösterilmektedir. Kontrol (A), STZ+ CAPE (B) ve STZ (C) gruplarını temsil göstermektedir. 400 büyütmede fotoğraflanmıştır.



Resim 2. Diyabetik gözde aktif caspase-3'ün immünohistokimyasal yöntemle gösterilmesi. Hücre nükleusları hematoxilen ile mavi boyanmıştır. Kapalı ok başı ile kırmızı renkle boyanmış caspase-3 pozitif hücreler gösterilmektedir. Kontrol (A), STZ+ CAPE (B) ve STZ (C) gruplarını temsil göstermektedir. 400 büyütmede fotoğraflanmıştır.

6. TARTIŞMA

Çalışmamızda STZ ile indüklenmiş diyabetik rat modelinde CAPE'nin koruyucu etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. Ayrıca diyabete bağlı olarak hiperglisemiden en fazla etkilenen dokulardan olan retinal hücre hasarı ve apoptozis araştırılmıştır. İlave olarak oksidatif stres parametreleri ile oksidan antioksidan sistem dengesindeki değişikliklerin incelenmesi tasarlanmıştır.

DR son yıllarda DM'li hasta sayısındaki artışla birlikte sıklığında artma görülen ve uygun şekilde tedavi edilmediğinde kalıcı görme kaybı ve körlükle sonuçlanabilen bir klinik durumdur. Retinopati gelişiminde temel etken uzun süre yüksek düzeyde seyreden kan glukozudur (157). Hipergliseminin kontrolünde yaşanan sorunlar nedeniyle hastaların önemli bir kısmında komplikasyonlar ortaya çıkmaktadır. Retinopati, nefropati, kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıklar DM hastalarında önemli bir halk sağlığı sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Zira İtalya'da gerçekleştirilen bir çalışmada DM hastalarının yıllık bakım maliyeti 1909 Avro olduğu ve DM'ye eşlik eden hastalıklar varlığında harcama miktarının arttığı belirtilmiştir (158). Ülkemizde yakın zamanda yapılan bir çalışmada DM'den 7 milyona yakın hastanın etkilendiği ve sağlık giderlerinin yaklaşık 5,1 milyar Avro olduğu belirtilmiştir (159). Ayrıca DM komplikasyonlarının yönetiminin maliyetinin, hastalığın ilaçlar ile kontrolüne harcanan miktardan çok daha fazla olduğu bildirilmiştir.

Diyabetik hastaların yönetiminde en etkili yöntem hasta eğitimidir. Fiziksel egzersiz ile önemli oranda hastada kan glukoz düzeyleri kontrol altına alınabilmektedir. Komplikasyon riskini artıran durumlar, risk faktörleri, kan glukoz seviyesinin kontrolü, sistemik arter basıncı, kan lipid düzeylerinin kontrol altına alınmasının önemi hastalara anlatılmalıdır.

Diyabete bağlı komplikasyonların oluşmasının önlenmesine yönelik stratejiler, hastanın sağlığını iyileştirirken uzun vadede tıbbi maliyetleri de düşürebilmektedir. Bu nedenle hem diyabetin kontrol altına alınabilmesi hem de diyabete bağlı komplikasyonların önlenmesi ve geciktirilmesine yönelik tedaviler denenmiştir.

Diyabete bağlı komplikasyonlarda hiperglisemi ile oksidatif stres arasındaki ilişki daha önce gösterilmiştir (160). Hiperglisemide, hücrelere doğrudan zarar veren, yüksek miktarda süperoksit üretilmektedir. Bunun yanında polyol yolağı, artmış ileri

glikozillenmiş son ürünlerin üretimi, protein kinaz C izoformlarının ve heksosamin yolağının aktivasyonu da hücrel hasara yol açmaktadır (161). Oluşan serbest radikaller birçok başka yolu aktive ederek vasküler endotel hasarı indüklemektedir (162). Oksidatif stresin diyabetin vasküler komplikasyonların gelişimindeki rolü hem tip 1 DM'de hem de tip 2 DM'de prospektif çalışmalarla desteklenmiştir (163,164).

Diyabet komplikasyonlarını önlemek için DM tanısı konar konmaz hiperglisemi derhal ve yoğun bir şekilde tedavi edilmelidir. Ancak çoğu DM hastasında metabolik regülasyonu sağlamak pek mümkün olamamaktadır. Bu nedenle destek tedavileri ile kan glukoz seviyesi kontrol altına alınmaya çalışılmıştır. Hücre içi serbest radikal oluşumunun engellenmesi, oksidatif stres ve ilgili diyabetik vasküler komplikasyonları önlemek için yardımcı bir terapötik strateji sağlayabilir. Antioksidanlar serbest radikallerin oluşumunu inhibe ederek, serbest radikalleri temizleyerek veya antioksidan savunma enzim kapasitesini artırarak etki ederler.

Tip 2 DM'de antioksidanlarla yapılan destek tedavisi endotel disfonksiyonunu potansiyel olarak iyileştirebildiği öne sürülmüştür (165). Bununla birlikte, makrovasküler / mikrovasküler komplikasyonlar varlığında, antioksidanlarla yapılan tedavinin, kan basıncı ve lipid düzeylerinin kontrolü ve optimum glukoz seviyesinin sürdürülmesi ile birlikte yararlı olduğu gösterilmiştir (166). Genel olarak, ekzojen antioksidanlar, diyabetiklerde ve prediyabetiklerde sıklıkla gözlenen daha düşük plazma antioksidan seviyelerini telafi edebilir. Bu amaçla çok çeşitli antioksidan maddeler diyabette çalışılmıştır. Bunlar arasında C ve E vitaminleri, resveratrol, ellagic asid, naringenin, timokinon, kafein ve likopen gibi çok sayıda antioksidan molekül yer almaktadır (167–172).

Bu moleküller içinde en çok çalışılanlardan birisi CAPE'dir. CAPE'nin hipergliseminin kontrol edilmesinde ve glukozun hücre içinde modüle edilmesinde önemli bir potansiyel sergilediği gösterilmiştir (173). CAPE'nin antienflamatuvar etkisini açıklayabilen transkripsiyon nükleer faktör-KB'ye (NF-κB) spesifik bir inhibitör olduğu gösterilmiştir (138). Çeşitli deneysel nörotoksisite modellerinde, CAPE'nin hipokampus ve serebellumu toksik etkilerden koruduğu bildirilmiştir (33,43). Yine CAPE'nin serebellar granül hücrelerdeki apoptoziyi engelleyerek iskemi / reperfüzyona bağlı serebral ve spinal kord hasarını engellediği bildirilmiştir (34,44). Retina dokusunun sinir sisteminin bir

uzantısı olması nedeniyle CAPE'nin retina üzerine muhtemelen faydalı etkileri olabileceği akla gelmektedir.

Çalışmamız sonucunda diyabet modeli oluşturulan STZ ve STZ+CAPE gruplarında kan glukoz seviyeleri açısından farklılıklar saptanmıştır. Deneyin 7. ve 21. günlerinde kan glukoz düzeyi STZ+CAPE grubunda STZ grubuna göre daha düşük saptanmış olup, bu farklılık 21. günde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Deneyin sonlandırılacağı gün ölçülen glukoz düzeyleri ise karşılaştırılabilir saptanmıştır. Burada görüldüğü üzere, diğer antioksidan özellikleri olan maddelerde olduğu gibi CAPE'nin akut dönemde anti hiperglisemik bir etkisi olduğu görülebilmektedir. Lee ve ark, CAPE'nin bu etkisini, glukoz uptake artışına yol açarak yaptığını bildirmişlerdir (174).

CAPE'nin karaciğer glikolitik ve glikoneogenik yollardaki rolü, karbonhidrat metabolizması ve glukoz homeostazı, diyabetik sıçan modelinde araştırılmıştır (175). Bu çalışmada CAPE uygulaması ile hepatik glukokinaz ve piruvat kinazın mRNA ekspresyonunu önemli ölçüde arttırdığı ve fosfoenolpiruvat karboksikinaz seviyesini düşürdüğü gösterilmiştir. Ayrıca CAPE tedavisinden sonra, kan insülin konsantrasyonlarında bir artış, açlık glukoz, alanin aminotransferaz, kolesterol ve trigliserid düzeylerinde düşüş gözlenmiştir. Nie ve ark, CAPE'nin, farelerde ve HepG2 hücrelerinde JNK ve NF- κ B sinyal yolağının modülasyonu yoluyla insülin direncini iyileştirdiğini bildirmişlerdir (176). Abduljawad ve ark. CAPE ile tedavi edilen diyabetik farelerde hem kan glukoz seviyesinin düştüğünü hem de dolaşımdaki insülin seviyesinin yükseldiğini tespit etmişlerdir (177). Çalışmamızda CAPE'nin olası antihiperglisemik etkinliğinin 28 güne doğru azaldığı görülmektedir. Bunun nedeninin dolaşımdaki insülin seviyesinin azalmasına bağlı olabileceği akla gelmektedir.

Çalışmamız neticesinde retinada oksidatif stres parametrelerinin diyabetik ratlarda olumsuz etkilendiğini saptadık ve bu durum önceki literatür bilgisi ile de uyumlu idi (152,157,178,179). Çalışmamızda CAPE tedavisi ile TAS değerlerinde bir farklılık saptanmaz iken TOS seviyelerinin ve OSI değerlerinin düşük olması oksidan stresin CAPE tedavisi ile azaltılabileceğini göstermiştir. Çalışmamıza benzer şekilde Durmuş ve ark. diyabetik sıçan retinalarında, CAPE tedavisi ile lipid peroksidasyonunun ve nitrik oksit aşırı üretiminin inhibe olduğunu, superoksit dismutaz enzim aktivitelerinin düzenlendiğini bildirmişlerdir (152). Dokulardaki antioksidan enzimler dokuları oksidatif stresten korumaktadır. CAPE gibi antioksidan enzim seviyelerini arttıran maddeler ile reaktif

oksijen ve nitojen türlerinin zararlı etkileri engellenebilir. Diyabette kronik hiperglisemiye bağılı olarak dokulardaki artan oksidatif stresi engellemede antioksidan özellikleri olan moleküllerin kullanımının faydalı olacağını düşünmekteyiz.

Matriks metalloproteinazlar inflamasyon, oksidatif stres ve doku hasarı ile karakterize edilen hastalık durumlarının önemli belirteçlerindedir (180,181). Klinik ve deneysel çalışmalar, diyabet hastalarında MMP-2 ve MMP-9'un artmış ekspresyonunu göstermiştir (182,183). MMP-9 inflamatuvar hücrelerin ve makrofajların belirteci iken, MMP-2 aktif fibroblastların bir belirteçidir ve inflamasyonun geç fazında gözlenir (184). Diyabette düşük seviyede de olsa dokularda inflamasyon gözlenebilmektedir (185). Ancak çalışmamızda MMP-2 ve MMP-9 seviyelerini tüm gruplarda karşılaştırılabilir saptadık. Buna sebep olarak diyabet süresinin sonuçlara etki edecek kadar uzun olmaması akla gelmektedir. Ayrıca çalışmamızdaki diyabet modelinde inflamatuvar hücrelerin çok fazla etkin olmaması da bunun bir sebebi olabilir. Bunun yanında özellikle diyabetik ketoasidoz durumunda serumdaki MMP-2 düzeylerinin azaldığı da bildirilmiştir (186). Diyabette fibroblastik aktivite, daha ziyade diyabetin ileri evrelerinde gözlemlendiğinden, çalışmamızdaki MMP-2 ve MMP-9 seviyelerinin yüksek saptanmaması buna bağılı olabilir. Güncel bir diğerk çalışmada, Ali ve ark. ise, diyabetik rat modelinde siyatik sinirde MMP-2 ekspresyonunun azaldığını bildirmişlerdir (187).

Retinal apoptosisi caspase-3 immünohistokimyasal yöntem ile göstermeye çalıştık. Ancak yine sonuç olarak her üç grupta da birbirine benzer sonuçlar bulduk. Buna sebep olarak gruplardaki sayının az olması yanında diyabet süresinin kısa olmasının da etkili olabileceğini düşünmekteyiz.

Ayrıca erişkin ratlarda her 11,6 gün insan ömrünün 1 yılına denk geldiği de dikkate alınırsa çalışma modelimizde bu süre yaklaşık olarak insan hayatının 3 yılına denk gelmektedir (188). Klinik gözlemlerimize ve literatürdeki çalışmalar ve klinik gözlemlerimizde diyabetin erken evrelerinde retinopati oluşmayan hastalar olduğunu göstermektedir. Diyabet tanısı sonrası ilk yılda DR'nin görülme sıklığı % 18,2 olarak bildirilmiştir (189). Retinopati gelişen olguların da önemli bir kısmında DM tanısı semptomların başlaması ile fark edildiğinden tanı öncesi sürenin ne kadar olacağı bilinmemektedir. Fakat tip 1 DM olan hastalarda ilk göz muayenesinin 5. yılda yapılması önerilmektedir. Buradan yola çıkarak çalışmamızda diyabet modelindeki sürenin, retinopati oluşumu için yeterli seviyeye ulaşmadığı sonucunu düşündürmektedir.

7. SONUÇ

Sonuç olarak CAPE tedavisi ile STZ ile indüklenmiş diyabetik rat modelinde ilk haftalarda anti hiperglisemik etkinlik gösterebilmektedir. Ancak zamanla bu etki azalmaktadır. Bunun yanında oksidatif stresi düşürerek retinal dokulara oluşabilecek hasarı azaltabilir. Çalışmamızda apoptotik aktivite ve MMP-2 ve MMP-9 seviyelerinde farklılığın olmaması diyabet süresinin oluşturduğumuz deneyde kısa olmasına bağlanabilir. Bu nedenle diyabetik hayvan modellerinde bu konunun açıklığa kavuşturulması için daha uzun diyabet sürelerinin olduğu çalışmalara ihtiyaç olduğu kanaatindeyiz.



8. KAYNAKLAR

1. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2003;26:S5–S20.
2. Risérus U, Willett WC, Hu FB. Dietary fats and prevention of type 2 diabetes. *Prog Lipid Res*. 2009;48:44–51.
3. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract*. 2010;87:4–14.
4. Ziegler D, Fonseca V. From guideline to patient: a review of recent recommendations for pharmacotherapy of painful diabetic neuropathy. *J Diabetes Complications*. 2015;29:146–56.
5. Nunes S, Rolo AP, Palmeira CM, Reis F. Diabetic Cardiomyopathy: Focus on Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction and Inflammation. *Cardiomyopathies-Types Treat*. InTech; 2017.
6. Feldman EL, Nave K-A, Jensen TS, Bennett DLH. New Horizons in Diabetic Neuropathy: Mechanisms, Bioenergetics, and Pain. *Neuron*. 2017;93:1296–313.
7. Moss SE, Klein R, Klein BE. The 14-year incidence of visual loss in a diabetic population. *Ophthalmology*. 1998;105:998–1003.
8. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. National Diabetes Data Group. *Diabetes*. 1979;28:1039–57.
9. Edmonds ME, Roberts VC, Watkins PJ. Blood flow in the diabetic neuropathic foot. *Diabetologia*. 1982;22:9–15.
10. Caramori ML, Fioretto P, Mauer M. Low glomerular filtration rate in normoalbuminuric type 1 diabetic patients: an indicator of more advanced glomerular lesions. *Diabetes*. 2003;52:1036–40.
11. Beckman JA, Creager MA. Vascular Complications of Diabetes. *Circ Res*. 2016;118:1771–85.

12. Adler AI, Stratton IM, Neil HA, Yudkin JS, Matthews DR, Cull CA, et al. Association of systolic blood pressure with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 36): prospective observational study. *BMJ*. 2000;321:412–9.
13. Klein BEK. Overview of epidemiologic studies of diabetic retinopathy. *Ophthalmic Epidemiol*. 2007;14:179–83.
14. Hammes H-P, Lin J, Renner O, Shani M, Lundqvist A, Betsholtz C, et al. Pericytes and the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes*. 2002;51:3107–12.
15. Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy: II. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. *Arch Ophthalmol*. 1984;102:520–526.
16. Grading diabetic retinopathy from stereoscopic color fundus photographs--an extension of the modified Airlie House classification. ETDRS report number 10. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Ophthalmology*. 1991;98:786–806.
17. Al-Rowais NA. Herbal medicine in the treatment of diabetes mellitus. *Saudi Med J*. 2002;23:1327–1331.
18. Li WL, Zheng HC, Bukuru J, De Kimpe N. Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. *J Ethnopharmacol*. 2004;92:1–21.
19. Dias TR, Alves MG, Casal S, Oliveira PF, Silva BM. Promising Potential of Dietary (Poly)Phenolic Compounds in the Prevention and Treatment of Diabetes Mellitus. *Curr Med Chem*. 2017;24:334–54.
20. Bernardo MA, Silva ML, Santos E, Moncada MM, Brito J, Proença L, et al. Effect of Cinnamon Tea on Postprandial Glucose Concentration. *J Diabetes Res*. 2015;2015:913651.
21. Panahi Y, Khalili N, Sahebi E, Namazi S, Simental-Mendía LE, Majeed M, et al. Effects of Curcuminoids Plus Piperine on Glycemic, Hepatic and Inflammatory Biomarkers in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Trial. *Drug Res*. 2018;68:403–9.
22. Erbayraktar Z, Yilmaz O, Artmann AT, Cehreli R, Coker C. Effects of selenium supplementation on antioxidant defense and glucose homeostasis in experimental diabetes mellitus. *Biol Trace Elem Res*. 2007;118:217–26.

23. Drel VR, Sybirna N. Protective effects of polyphenolics in red wine on diabetes associated oxidative/nitrative stress in streptozotocin-diabetic rats. *Cell Biol Int.* 2010;34:1147–53.
24. Natarajan K, Singh S, Burke TR, Grunberger D, Aggarwal BB. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:9090–5.
25. Orban Z, Mitsiades N, Burke TR, Tsokos M, Chrousos GP. Caffeic acid phenethyl ester induces leukocyte apoptosis, modulates nuclear factor-kappa B and suppresses acute inflammation. *Neuroimmunomodulation.* 2000;7:99–105.
26. Kınıs V, Ozbay M, Akdag M, Alabalık U, Gul A, Yılmaz B, et al. Effects of caffeic acid phenethyl ester on wound healing of nasal mucosa in the rat: an experimental study. *Am J Otolaryngol.* 2014;35:482–6.
27. Márquez N, Sancho R, Macho A, Calzado MA, Fiebich BL, Muñoz E. Caffeic acid phenethyl ester inhibits T-cell activation by targeting both nuclear factor of activated T-cells and NF-κB transcription factors. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;308:993–1001.
28. Chen M-J, Chang W-H, Lin C-C, Liu C-Y, Wang T-E, Chu C-H, et al. Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis of human pancreatic cancer cells involving caspase and mitochondrial dysfunction. *Pancreatology.* 2008;8:566–576.
29. Xiang D, Wang D, He Y, Xie J, Zhong Z, Li Z, et al. Caffeic acid phenethyl ester induces growth arrest and apoptosis of colon cancer cells via the β-catenin/T-cell factor signaling. *Anticancer Drugs.* 2006;17:753–762.
30. Ho HC, Chang HC, Ting CT, Kuo CY, Yang VC. Caffeic acid phenethyl ester inhibits proliferation and migration, and induces apoptosis in platelet-derived growth factor-BB-stimulated human coronary smooth muscle cells. *J Vasc Res.* 2012;49:24–32.
31. Armagan A, Uzar E, Uz E, Yilmaz HR, Kutluhan S, Koyuncuoglu HR, et al. Caffeic acid phenethyl ester modulates methotrexate-induced oxidative stress in testes of rat. *Hum Exp Toxicol.* 2008;27:547–552.
32. Chen Y-J, Liao H-F, Tsai T-H, Wang S-Y, Shiao M-S. Caffeic acid phenethyl ester preferentially sensitizes CT26 colorectal adenocarcinoma to ionizing radiation without affecting bone marrow radioresponse. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005;63:1252–1261.

33. Huang Y, Jin M, Pi R, Zhang J, Chen M, Ouyang Y, et al. Protective effects of caffeic acid and caffeic acid phenethyl ester against acrolein-induced neurotoxicity in HT22 mouse hippocampal cells. *Neurosci Lett*. 2013;535:146–151.
34. Wei X, Ma Z, Fontanilla CV, Zhao L, Xu ZC, Tagliabracci V, et al. Caffeic acid phenethyl ester prevents cerebellar granule neurons (CGNs) against glutamate-induced neurotoxicity. *Neuroscience*. 2008;155:1098–105.
35. Yasui N, Nishiyama E, Juman S, Negishi H, Miki T, Yamori Y, et al. Caffeic acid phenethyl ester suppresses oxidative stress in 3T3-L1 adipocytes. *J Asian Nat Prod Res*. 2013;15:1189–1196.
36. Lee KJ, Choi JH, Khanal T, Hwang YP, Chung YC, Jeong HG. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. *Toxicology*. 2008;248:18–24.
37. Hepsen IE, Bayramlar H, Gultek A, Ozen S, Tilgen F, Evereklioglu C. Caffeic acid phenethyl ester to inhibit posterior capsule opacification in rabbits. *J Cataract Refract Surg*. 1997;23:1572–1576.
38. Totan Y, Aydin E, Cekiç O, Cihan Dağlıoğlu M, Borazan M, Dağlıoğlu K, et al. Effect of caffeic acid phenethyl ester on corneal neovascularization in rats. *Curr Eye Res*. 2001;23:291–7.
39. Chen H, Tran J-TA, Anderson RE, Mandal MNA. Caffeic acid phenethyl ester protects 661W cells from H₂O₂-mediated cell death and enhances electroretinography response in dim-reared albino rats. *Mol Vis*. 2012;18:1325–38.
40. Sahin A, Kaya S, Türkcü G, Cingü AK, Yüksel H, Türkcü FM, et al. The effects of caffeic acid phenethyl ester in acute methanol toxicity on rat retina and optic nerve. *Cutan Ocul Toxicol*. 2013;32:263–7.
41. Akyol S, Ugurcu V, Balci M, Gurel A, Erden G, Cakmak O, et al. Caffeic acid phenethyl ester: its protective role against certain major eye diseases. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2014;30:700–708.
42. Russo A, Longo R, Vanella A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia*. 2002;73:S21–S29.

43. Ferreira RS, dos Santos NAG, Martins NM, Fernandes LS, dos Santos AC. Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) Protects PC12 Cells from Cisplatin-Induced Neurotoxicity by Activating the NGF-Signaling Pathway. *Neurotox Res.* 2017;1–15.
44. Ilhan A, Koltuksuz U, Ozen S, Uz E, Ciralik H, Akyol O. The effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on spinal cord ischemia/reperfusion injury in rabbits. *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg.* 1999;16:458–63.
45. Federation ID. International Diabetes Federation: IDF Diabetes Atlas. Bruss Belg. 2013;
46. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care.* 2004;27:1047–1053.
47. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2010;33 Suppl 1:S62-69.
48. Daneman D. Type 1 diabetes. *Lancet Lond Engl.* 2006;367:847–58.
49. Rother KI. Diabetes treatment--bridging the divide. *N Engl J Med.* 2007;356:1499–501.
50. Narayan KV, Boyle JP, Thompson TJ, Sorensen SW, Williamson DF. Lifetime risk for diabetes mellitus in the United States. *Jama.* 2003;290:1884–1890.
51. Ferdinand KC, Nasser SA. Racial/ethnic disparities in prevalence and care of patients with type 2 diabetes mellitus. *Curr Med Res Opin.* 2015;31:913–23.
52. Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, Kronenberg HM. *Williams Textbook of Endocrinology*, 2011. Saunders Elsevier Phila. 1897;
53. Fletcher B, Gulanick M, Lamendola C. Risk factors for type 2 diabetes mellitus. *J Cardiovasc Nurs.* 2002;16:17–23.
54. Malik VS, Popkin BM, Bray GA, Després J-P, Hu FB. Sugar-sweetened beverages, obesity, type 2 diabetes mellitus, and cardiovascular disease risk. *Circulation.* 2010;121:1356–64.
55. Pan A, Wang Y, Talaei M, Hu FB, Wu T. Relation of active, passive, and quitting smoking with incident type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2015;3:958–67.

56. Gardner D, Shoback D. Greenspan's Basic and Clinical Endocrinology, Ninth Edition. Mcgraw-hill; 2011.
57. Groop LC, Bonadonna RC, DelPrato S, Ratheiser K, Zyck K, Ferrannini E, et al. Glucose and free fatty acid metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Evidence for multiple sites of insulin resistance. *J Clin Invest*. 1989;84:205–213.
58. Harrison's Principles of Internal Medicine Türkçe: 2 Cilt Set | İç Hastalıkları Kitapları (Internet). (cited 2018 Mar 5). Available from: <https://nobeltip.com/product/500/harrisons-principles-of-internal-medicine-turkce-2-cilt-set>
59. Abel ED, Peroni O, Kim JK, Kim YB, Boss O, Hadro E, et al. Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature*. 2001;409:729–33.
60. DeFronzo RA. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin North Am*. 2004;88:787–835, ix.
61. Ferrannini E, Buzzigoli G, Bonadonna R, Giorico MA, Oleggini M, Graziadei L, et al. Insulin resistance in essential hypertension. *N Engl J Med*. 1987;317:350–357.
62. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. 2006;444:840–6.
63. DeFronzo RA, Ferrannini E, Simonson DC. Fasting hyperglycemia in non-insulin-dependent diabetes mellitus: contributions of excessive hepatic glucose production and impaired tissue glucose uptake. *Metabolism*. 1989;38:387–95.
64. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes--2012. *Diabetes Care*. 2012;35 Suppl 1:S11-63.
65. O'Sullivan JB, Gellis SS, Dandrow RV, Tenney BO. The potential diabetic and her treatment in pregnancy. *Obstet Gynecol*. 1966;27:683–9.
66. Mack LR, Tomich PG. Gestational Diabetes: Diagnosis, Classification, and Clinical Care. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2017;44:207–17.
67. Damm P. Future risk of diabetes in mother and child after gestational diabetes mellitus. *Int J Gynaecol Obstet Off Organ Int Fed Gynaecol Obstet*. 2009;104 Suppl 1:S25-26.

68. Dabelea D. The predisposition to obesity and diabetes in offspring of diabetic mothers. *Diabetes Care*. 2007;30 Suppl 2:S169-174.
69. Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, Diamant M, Ferrannini E, Nauck M, et al. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach: position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care*. 2012;35:1364–79.
70. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. UK Prospective Diabetes Study Group. *BMJ*. 1998;317:703–13.
71. Larsen ML, Hørdler M, Mogensen EF. Effect of long-term monitoring of glycosylated hemoglobin levels in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1990;323:1021–5.
72. Ripsin CM, Kang H, Urban RJ. Management of blood glucose in type 2 diabetes mellitus. *Am Fam Physician*. 2009;79:29–36.
73. Gilbert MP. Screening and treatment by the primary care provider of common diabetes complications. *Med Clin North Am*. 2015;99:201–19.
74. Prokofyeva E, Zrenner E. Epidemiology of major eye diseases leading to blindness in Europe: a literature review. *Ophthalmic Res*. 2012;47:171–88.
75. Coyne KS, Margolis MK, Kennedy-Martin T, Baker TM, Klein R, Paul MD, et al. The impact of diabetic retinopathy: perspectives from patient focus groups. *Fam Pract*. 2004;21:447–53.
76. Kramer CK, Rodrigues TC, Canani LH, Gross JL, Azevedo MJ. Diabetic retinopathy predicts all-cause mortality and cardiovascular events in both type 1 and 2 diabetes: meta-analysis of observational studies. *Diabetes Care*. 2011;34:1238–44.
77. Kostev K, Rathmann W. Diabetic retinopathy at diagnosis of type 2 diabetes in the UK: a database analysis. *Diabetologia*. 2013;56:109–11.
78. Yau JWY, Rogers SL, Kawasaki R, Lamoureux EL, Kowalski JW, Bek T, et al. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 2012;35:556–64.

79. Klein R, Klein BE, Moss SE, Cruickshanks KJ. The Wisconsin Epidemiologic Study of diabetic retinopathy. XIV. Ten-year incidence and progression of diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol Chic Ill* 1960. 1994;112:1217–28.
80. Malone JJ, Morrison AD, Pavan PR, Cuthbertson DD, Diabetic Control and Complications Trial. Prevalence and significance of retinopathy in subjects with type 1 diabetes of less than 5 years' duration screened for the diabetes control and complications trial. *Diabetes Care*. 2001;24:522–6.
81. Engerman RL. Pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes*. 1989;38:1203–6.
82. Salzman J, Limb GA, Khaw PT, Gregor ZJ, Webster L, Chignell AH, et al. Matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in fibrovascular membranes of proliferative diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol*. 2000;84:1091–6.
83. Stefánsson E, Bek T, Porta M, Larsen N, Kristinsson JK, Agardh E. Screening and prevention of diabetic blindness. *Acta Ophthalmol Scand*. 2000;78:374–85.
84. Chung SSM, Chung SK. Aldose reductase in diabetic microvascular complications. *Curr Drug Targets*. 2005;6:475–86.
85. PKC-DMES Study Group. Effect of ruboxistaurin in patients with diabetic macular edema: thirty-month results of the randomized PKC-DMES clinical trial. *Arch Ophthalmol Chic Ill* 1960. 2007;125:318–24.
86. Haritoglou C, Gerss J, Sauerland C, Kampik A, Ulbig MW, CALDIRET study group. Effect of calcium dobesilate on occurrence of diabetic macular oedema (CALDIRET study): randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet Lond Engl*. 2009;373:1364–71.
87. Zhang J-Z, Xi X, Gao L, Kern TS. Captopril inhibits capillary degeneration in the early stages of diabetic retinopathy. *Curr Eye Res*. 2007;32:883–9.
88. Bek T, Lund-Andersen H, Hansen AB, Johnsen KB, Sandbaek A, Lauritzen T. The prevalence of diabetic retinopathy in patients with screen-detected type 2 diabetes in Denmark: the ADDITION study. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 2009;87:270–4.
89. Klein R. Prevention of visual loss from diabetic retinopathy. *Surv Ophthalmol*. 2002;47 Suppl 2:S246-252.

90. Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group, Lachin JM, Genuth S, Cleary P, Davis MD, Nathan DM. Retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes four years after a trial of intensive therapy. *N Engl J Med.* 2000;342:381–9.
91. Manders RJF, Van Dijk J-WM, van Loon LJC. Low-intensity exercise reduces the prevalence of hyperglycemia in type 2 diabetes. *Med Sci Sports Exerc.* 2010;42:219–25.
92. White RD, Sherman C. Exercise in diabetes management: maximizing benefits, controlling risks. *Phys Sportsmed.* 1999;27:63–76.
93. Aiello LP, Cahill MT, Wong JS. Systemic considerations in the management of diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol.* 2001;132:760–776.
94. Kollias AN, Ulbig MW. Diabetic retinopathy: Early diagnosis and effective treatment. *Dtsch Arzteblatt Int.* 2010;107:75–83; quiz 84.
95. Photocoagulation treatment of proliferative diabetic retinopathy. Clinical application of Diabetic Retinopathy Study (DRS) findings, DRS Report Number 8. The Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Ophthalmology.* 1981;88:583–600.
96. Pahor D. Visual field loss after argon laser panretinal photocoagulation in diabetic retinopathy: full- versus mild-scatter coagulation. *Int Ophthalmol.* 1998;22:313–9.
97. Nicolò M, Musetti D, Traverso CE. Yellow micropulse laser in diabetic macular edema: a short-term pilot study. *Eur J Ophthalmol.* 2014;24:885–9.
98. Colucciello M. Current intravitreal pharmacologic therapies for diabetic macular edema. *Postgrad Med.* 2015;127:640–53.
99. Xu Y, Rong A, Xu W, Niu Y, Wang Z. Comparison of 12-month therapeutic effect of conbercept and ranibizumab for diabetic macular edema: a real-life clinical practice study. *BMC Ophthalmol.* 2017;17:158.
100. Bahar I, Axer-Siegel R, Weinberger D. Pars plana vitrectomy: comparison of three techniques for the treatment of diabetic vitreous hemorrhage. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Off J Int Soc Imaging Eye.* 2006;37:364–9.
101. Wang Z-Y, Zhao K-K, Li J-K, Rossmiller B, Zhao P-Q. Four-port bimanual 23-gauge vitrectomy for diabetic tractional retinal detachment. *Acta Ophthalmol (Copenh).* 2016;94:365–72.

102. Jackson TL, Nicod E, Angelis A, Grimaccia F, Pringle E, Kanavos P. Pars plana vitrectomy for diabetic macular edema: A Systematic Review, Meta-Analysis, and Synthesis of Safety Literature. *Retina Phila Pa.* 2017;37:886–95.
103. Dunn JS, Duffy E, Gilmour MK, Kirkpatrick J, McLetchie NG. Further observations on the effects of alloxan on the pancreatic islets. *J Physiol.* 1944;103:233–43.
104. Pushparaj P, Tan CH, Tan BK. Effects of Averrhoa bilimbi leaf extract on blood glucose and lipids in streptozotocin-diabetic rats. *J Ethnopharmacol.* 2000;72:69–76.
105. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia.* 2008;51:216–26.
106. Motyl K, McCabe LR. Streptozotocin, type I diabetes severity and bone. *Biol Proced Online.* 2009;11:296–315.
107. Ganda OP, Rossini AA, Like AA. Studies on streptozotocin diabetes. *Diabetes.* 1976;25:595–603.
108. Portha B, Levacher C, Picon L, Rosselin G. Diabetogenic effect of streptozotocin in the rat during the perinatal period. *Diabetes.* 1974;23:889–95.
109. Grunberger D, Banerjee R, Eisinger K, Oltz EM, Efros L, Caldwell M, et al. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia.* 1988;44:230–2.
110. Demestre M, Messerli SM, Celli N, Shahhossini M, Kluwe L, Mautner V, et al. CAPE (caffeic acid phenethyl ester)-based propolis extract (Bio 30) suppresses the growth of human neurofibromatosis (NF) tumor xenografts in mice. *Phytother Res PTR.* 2009;23:226–30.
111. EL G. Propolis: a review. *Bee World.* 1979;60:59–84.
112. Chen H-C, Chen J-H, Chang C, Shieh C-J. Optimization of ultrasound-accelerated synthesis of enzymatic caffeic acid phenethyl ester by response surface methodology. *Ultrason Sonochem.* 2011;18:455–459.
113. Chen H-C, Ju H-Y, Twu Y-K, Chen J-H, Chieh-ming JC, Liu Y-C, et al. Optimized enzymatic synthesis of caffeic acid phenethyl ester by RSM. *New Biotechnol.* 2010;27:89–93.

114. Kumazawa S, Ahn M-R, Fujimoto T, Kato M. Radical-scavenging activity and phenolic constituents of propolis from different regions of Argentina. *Nat Prod Res.* 2010;24:804–812.
115. Kurata A, Kitamura Y, Irie S, Takemoto S, Akai Y, Hirota Y, et al. Enzymatic synthesis of caffeic acid phenethyl ester analogues in ionic liquid. *J Biotechnol.* 2010;148:133–138.
116. Wang X, Stavchansky S, Bowman PD, Kerwin SM. Cytoprotective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and catechol ring-fluorinated CAPE derivatives against menadione-induced oxidative stress in human endothelial cells. *Bioorg Med Chem.* 2006;14:4879–4887.
117. Sud'Ina GF, Mirzoeva OK, Pushkareva MA, Korshunova G, Sumbatyan NV, Varfolomeev SD. Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. *FEBS Lett.* 1993;329:21–24.
118. Kishimoto N, Kakino Y, Iwai K, Mochida K, Fujita T. In vitro antibacterial, antimutagenic and anti-influenza virus activity of caffeic acid phenethyl esters. *Biocontrol Sci.* 2005;10:155–161.
119. Velazquez C, Navarro M, Acosta A, Angulo A, Dominguez Z, Robles R, et al. Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. *J Appl Microbiol.* 2007;103:1747–1756.
120. Lee HS, Lee SY, Park SH, Lee JH, Ahn SK, Choi YM, et al. Antimicrobial medical sutures with caffeic acid phenethyl ester and their in vitro/in vivo biological assessment. *MedChemComm.* 2013;4:777–782.
121. Ojeda-Contreras A-J, Hernández-Martínez J, Domínguez Z, Mercado-Ruiz J-N, Troncoso-Rojas R, Sánchez-Estrada A, et al. Utilization of caffeic acid phenethyl ester to control *Alternaria alternata* rot in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit. *J Phytopathol.* 2008;156:164–173.
122. Johnson AA, Marchand C, Pommier Y. HIV-1 integrase inhibitors: a decade of research and two drugs in clinical trial. *Curr Top Med Chem.* 2004;4:1059–1077.
123. Fesen MR, Kohn KW, Leteurtre F, Pommier Y. Inhibitors of human immunodeficiency virus integrase. *Proc Natl Acad Sci.* 1993;90:2399–2403.

124. Shen H, Yamashita A, Nakakoshi M, Yokoe H, Sudo M, Kasai H, et al. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester derivatives on replication of hepatitis C virus. *PLoS One*. 2013;8:e82299.
125. Jo S-Y, Lee N, Hong S-M, Jung HH, Chae S-W. Caffeic Acid Phenethyl Ester Inhibits Diesel Exhaust Particle—Induced Inflammation of Human Middle Ear Epithelial Cells via NOX4 Inhibition. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2013;122:595–600.
126. Yilmaz A, Yildirim Ö, Tamer L, Öz Ö, Cinel L, Vatanserver H, et al. Effects of caffeic acid phenethyl ester on endotoxin-induced uveitis in rats. *Curr Eye Res*. 2005;30:755–762.
127. Da Cunha FM, Duma D, Assreuy J, Buzzi FC, Niero R, Campos MM, et al. Caffeic acid derivatives: in vitro and in vivo anti-inflammatory properties. *Free Radic Res*. 2004;38:1241–1253.
128. Michaluart P, Masferrer JL, Carothers AM, Subbaramaiah K, Zweifel BS, Koboldt C, et al. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on the activity and expression of cyclooxygenase-2 in human oral epithelial cells and in a rat model of inflammation. *Cancer Res*. 1999;59:2347–2352.
129. Mirzoeva OK, Calder PC. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1996;55:441–449.
130. Gabor M, Razga Z. Effect of benzopyrone derivatives on simultaneously induced croton oil ear oedema and carrageenin paw oedema in rats. *Acta Physiol Hung*. 1991;77:197–207.
131. Borrelli F, Maffia P, Pinto L, Ianaro A, Russo A, Capasso F, et al. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia*. 2002;73:S53–S63.
132. Zhao W-X, Wang L, Yang J-L, Li L-Z, Xu W-M, Li T. Caffeic acid phenethyl ester attenuates pro-inflammatory and fibrogenic phenotypes of LPS-stimulated hepatic stellate cells through the inhibition of NF- κ B signaling. *Int J Mol Med*. 2014;33:687–694.
133. Bharti AC, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy. *Biochem Pharmacol*. 2002;64:883–888.

134. Frenkel K, Wei H, Bhimani R, Ye J, Zadunaisky JA, Huang M-T, et al. Inhibition of tumor promoter-mediated processes in mouse skin and bovine lens by caffeic acid phenethyl ester. *Cancer Res.* 1993;53:1255–1261.
135. Komericki P, Kränke B. Maculopapular exanthem from propolis: case report and review of systemic cutaneous and non-cutaneous reactions. *Contact Dermatitis.* 2009;61:353–355.
136. Su ZZ, Lin J, Prewett M, Goldstein NI, Fisher PB. Apoptosis mediates the selective toxicity of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) toward oncogene-transformed rat embryo fibroblast cells. *Anticancer Res.* 1995;15:1841–1848.
137. Liao H-F, Chen Y-Y, Liu J-J, Hsu M-L, Shieh H-J, Liao H-J, et al. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on angiogenesis, tumor invasion, and metastasis. *J Agric Food Chem.* 2003;51:7907–7912.
138. Song YS, Park E-H, Jung KJ, Jin C. Inhibition of angiogenesis by propolis. *Arch Pharm Res.* 2002;25:500–504.
139. Van't Land B, Blijlevens NMA, Marteiijn J, Timal S, Donnelly JP, de Witte TJM, et al. Role of curcumin and the inhibition of NF- κ B in the onset of chemotherapy-induced mucosal barrier injury. *Leukemia.* 2004;18:276.
140. Özen S, Akyol Ö, Iraz M, Söğüt S, Özüğurlu F, Özyurt H, et al. Role of caffeic acid phenethyl ester, an active component of propolis, against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *J Appl Toxicol.* 2004;24:27–35.
141. Bostek CC. Oxygen toxicity: an introduction. *AANA J.* 1989;57:231–237.
142. Olczyk P, Ramos P, Bernas M, Komosinska-Vassev K, Stojko J, Pilawa B. Application of electron paramagnetic resonance spectroscopy to comparative examination of different groups of free radicals in thermal injuries treated with propolis and silver sulphadiazine. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013.
143. Ozguner F, Altinbas A, Ozaydin M, Dogan A, Vural H, Kisioglu AN, et al. Mobile phone-induced myocardial oxidative stress: protection by a novel antioxidant agent caffeic acid phenethyl ester. *Toxicol Ind Health.* 2005;21:223–230.

144. Erdem M, Gulabi D, Sen C, Sahin SA, Bozdog E. Effects of caffeic acid phenethyl ester and melatonin on distraction osteogenesis: an experimental study. *SpringerPlus*. 2014;3:8.
145. Hishikawa K, Nakaki T, Fujita T. Oral flavonoid supplementation attenuates atherosclerosis development in apolipoprotein E-deficient Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:442–446.
146. Uçan MC, Koparal M, Ağaçayak S, Gunay A, Ozgoz M, Atilgan S, et al. Influence of caffeic acid phenethyl ester on bone healing in a rat model. *J Int Med Res*. 2013;41:1648–1654.
147. Aydin E, Demir HD, Özyurt H, Erkorkmaz Ü. Comparative efficacy of caffeic acid phenethyl ester (CAPE), olopatadine hydrochloride, and dexamethasone sodium phosphate in experimental allergic conjunctivitis. *Turk J Med Sci*. 2010;40:605–612.
148. Luty GA, McLeod DS, Merges C, Diggs A, Plouët J. Localization of vascular endothelial growth factor in human retina and choroid. *Arch Ophthalmol Chic Ill* 1960. 1996;114:971–7.
149. Bian Z-M, Elner SG, Elner VM. Regulation of VEGF mRNA expression and protein secretion by TGF-beta2 in human retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res*. 2007;84:812–22.
150. Şahin A, Kürşat Cingü A, Kaya S, Türkcü G, Arı Ş, Evliyaoğlu O, et al. The protective effects of caffeic acid phenethyl ester in isoniazid and ethambutol-induced ocular toxicity of rats. *Cutan Ocul Toxicol*. 2013;32:228–33.
151. Turkoz Y, Er H, Borazan M, Yılmaz H, Mizrak B, Parlakpınar H, et al. Use of caffeic acid phenethyl ester and cortisone may prevent proliferative vitreoretinopathy. *Mediators Inflamm*. 2004;13:127–30.
152. Durmuş M, Yılmaz HR, Uz E, Oezcelik N. The effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) treatment on levels of MDA, NO and antioxidant enzyme activities in retinas of streptozotocin-induced diabetic rats. *Turk J Med Sci*. 2008;38:525–530.
153. Shi Y, Wu X, Gong Y, Qiu Y, Zhang H, Huang Z, et al. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester on retinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Curr Eye Res*. 2010;35:930–937.

154. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem.* 2004;37:277–285.
155. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.* 2005;38:1103–1111.
156. Eckerson HW, Romson J, Wyte C, La Du BN. The human serum paraoxonase polymorphism: identification of phenotypes by their response to salts. *Am J Hum Genet.* 1983;35:214.
157. Leal EC, Santiago AR, Ambrosio AF. Old and new drug targets in diabetic retinopathy: from biochemical changes to inflammation and neurodegeneration. *Curr Drug Target-CNS Neurol.* Bentham Science Publishers; 2005. p. 421–434.
158. Morsanutto A, Berto P, Lopatriello S, Voinovich D, Gelisio R, Mantovani LG. Major diabetes complications have an impact on total annual medical cost of type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2004;27:1841–1842.
159. Malhan S, Öksüz E, Babineaux SM, Ertekin A, Palmer JP. Assessment of the Direct Medical Costs of Type 2 Diabetes Mellitus and its Complications in Turkey. *Turk J Endocrinol Metab.* 2014;18.
160. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care.* 1996;19:257–267.
161. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001;414:813.
162. Ceriello A. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a “causal” antioxidant therapy. *Diabetes Care.* 2003;26:1589–1596.
163. Costacou T, Evans RW, Schafer GL, Orchard TJ. Oxidative stress and response in relation to coronary artery disease in type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2013;36:3503–3509.
164. Broedbaek K, Siersma V, Henriksen T, Weimann A, Petersen M, Andersen JT, et al. Association between urinary markers of nucleic acid oxidation and mortality in type 2 diabetes: a population-based cohort study. *Diabetes Care.* 2013;36:669–676.
165. Hamilton SJ, Chew GT, Watts GF. Therapeutic regulation of endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Diab Vasc Dis Res.* 2007;4:89–102.

166. Jakus V. The role of free radicals, oxidative stress and antioxidant systems in diabetic vascular disease. *Bratisl Lek Listy*. 2000;101:541–551.
167. Allagui MS, Feriani A, Bouoni Z, Alimi H, Murat JC, El Feki A. Protective effects of vitamins (C and E) and melatonin co-administration on hematological and hepatic functions and oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. *J Physiol Biochem*. 2014;70:713–723.
168. Yazgan ÜC, Taşdemir E, Bilgin HM, Deniz Obay B, Şermet A, Elbey B. Comparison of the anti-diabetic effects of resveratrol, gliclazide and losartan in streptozotocin-induced experimental diabetes. *Arch Physiol Biochem*. 2015;121:157–161.
169. Raghu G, Akileshwari C, Reddy VS, Reddy GB. Attenuation of diabetic retinopathy in rats by ellagic acid through inhibition of AGE formation. *J Food Sci Technol*. 2017;54:2411–2421.
170. Al-Dosari DI, Ahmed MM, Al-Rejaie SS, Alhomida AS, Ola MS. Flavonoid Naringenin Attenuates Oxidative Stress, Apoptosis and Improves Neurotrophic Effects in the Diabetic Rat Retina. *Nutrients*. 2017;9:1161.
171. Fouad AA, Alwadani F. Ameliorative effects of thymoquinone against eye lens changes in streptozotocin diabetic rats. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2015;40:960–965.
172. Ozmen O, Topsakal S, Haligur M, Aydogan A, Dincoglu D. Effects of caffeine and lycopene in experimentally induced diabetes mellitus. *Pancreas*. 2016;45:579–583.
173. Sforcin JM, Bankova V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J Ethnopharmacol*. 2011;133:253–260.
174. Lee ES, Uhm K-O, Lee YM, Han M, Lee M, Park JM, et al. CAPE (caffeic acid phenethyl ester) stimulates glucose uptake through AMPK (AMP-activated protein kinase) activation in skeletal muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;361:854–858.
175. Celik S, Erdogan S, Tuzcu M. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) exhibits significant potential as an antidiabetic and liver-protective agent in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacol Res*. 2009;60:270–276.
176. Nie J, Chang Y, Li Y, Zhou Y, Qin J, Sun Z, et al. Caffeic Acid Phenethyl Ester (Propolis Extract) Ameliorates Insulin Resistance by Inhibiting JNK and NF-κB

Inflammatory Pathways in Diabetic Mice and HepG2 Cell Models. *J Agric Food Chem.* 2017;65:9041–9053.

177. Abduljawad SH, El-Refaei MF, El-Nashar NN. Protective and anti-angiopathy effects of caffeic acid phenethyl ester against induced type 1 diabetes in vivo. *Int Immunopharmacol.* 2013;17:408–414.

178. Rahimi R, Nikfar S, Larijani B, Abdollahi M. A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. *Biomed Pharmacother.* 2005;59:365–373.

179. Umeno A, Horie M, Murotomi K, Nakajima Y, Yoshida Y. Antioxidative and antidiabetic effects of natural polyphenols and isoflavones. *Molecules.* 2016;21:708.

180. Matsumoto Y, Park I-K, Kohyama K. Matrix metalloproteinase (MMP)-9, but not MMP-2, is involved in the development and progression of C protein-induced myocarditis and subsequent dilated cardiomyopathy. *J Immunol.* 2009;183:4773–4781.

181. Chang Y-H, Lin I-L, Tsay GJ, Yang S-C, Yang T-P, Ho K-T, et al. Elevated circulatory MMP-2 and MMP-9 levels and activities in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Clin Biochem.* 2008;41:955–959.

182. Giebel SJ, Menicucci G, McGuire PG, Das A. Matrix metalloproteinases in early diabetic retinopathy and their role in alteration of the blood–retinal barrier. *Lab Invest.* 2005;85:597.

183. Jin M, Kashiwagi K, Iizuka Y, Tanaka Y, Imai M, Tsukahara S. Matrix metalloproteinases in human diabetic and nondiabetic vitreous. *Retina.* 2001;21:28–33.

184. Rodríguez D, Morrison CJ, Overall CM. Matrix metalloproteinases: what do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochim Biophys Acta BBA-Mol Cell Res.* 2010;1803:39–54.

185. Fuliang HU, Hepburn HR, Xuan H, Chen M, Daya S, Radloff SE. Effects of propolis on blood glucose, blood lipid and free radicals in rats with diabetes mellitus. *Pharmacol Res.* 2005;51:147–152.

186. Garro A, Chodobski A, Szmydynger-Chodobska J, Shan R, Bialo SR, Bennett J, et al. Circulating matrix metalloproteinases in children with diabetic ketoacidosis. *Pediatr Diabetes.* 2017;18:95–102.

187. Ali S, Driscoll HE, Newton VL, Gardiner NJ. Matrix metalloproteinase-2 is downregulated in sciatic nerve by streptozotocin induced diabetes and/or treatment with minocycline: Implications for nerve regeneration. *Exp Neurol*. 2014;261:654–65.
188. Quinn R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition*. 2005;21:775.
189. Lee KMC, Sum WMR. Prevalence of diabetic retinopathy in patients with recently diagnosed diabetes mellitus. *Clin Exp Optom*. 2011;94:371–375.





TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



ÖZGEÇMİŞ

Adı	Alparslan	Soyadı	ŞAHİN
Doğum Yeri	Afşin	Doğum Tarihi	22/08/1977
Uyruğu	T.C.	Tel	0 505 4849446
E-posta	dralparslansahin@gmail.com		

EĞİTİM DÜZEYİ

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık	Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi/ Göz Hastalıkları	2007
Tezsiz Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi	2001
Lisans	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi	2001
Lise	Tarsus Abdulkerim Bengi Anadolu Lisesi	1995

İŞ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre
Dr. Araştırma Görevlisi	Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı	2002-2006
Uzman Dr.	Elazığ Harput Devlet Hastanesi Göz Hastalıkları Kliniği	2007-2009
Yardımcı Doçent Dr.	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı	2009-2014
Doçent Dr.	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı	2014-2017
Doçent Dr.	Özel Batman Hastanesi Göz Hastalıkları Kliniği	2017-2018
Doçent Dr.	Özel Zilan Hastanesi Göz Hastalıkları Kliniği	2018-Halen

Yabancı Dil Sınav Notu							
ÜDS	YDS	YÖKDİL	IELTS	TOEFL	FCE	CAE	CPE
2006-Mart 71,25 puan (İngilizce)	2014-Sonbahar 81,25 puan (İngilizce)						

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı (2011-İlkbahar)	72,727	68,050	54,760
TUS Puanı (2002-Nisan)	67,293 (temel)	65,431 (Klinik)	

10. EKLER

10.1. Etik Kurul Raporu

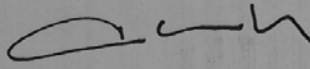
T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
PROF. DR. SABAHATTİN PAYZIN SAĞLIK BİLİMLERİ
ARAŞTIRMA VE UYGULAMA MERKEZİ
DENEY HAYVANLARI YEREL ETİK KURULU
(DÜHADEK)

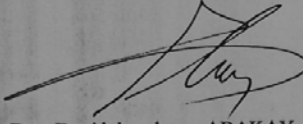
ETİK KURUL KARARI

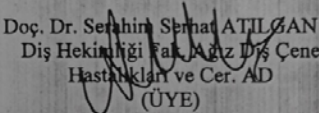
TOPLANTI TARİHİ	KARAR NO	ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ
14.01.2015	5	Prof.Dr. Mukadder ATMACA

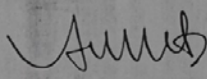
KARAR

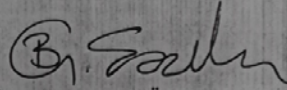
“Diabetik rat modelinde Kafeik asit ve Kafeik asit fenetil esterinin göz dokularındaki koruyucu etkilerinin araştırılması” konulu ve 2015/03 protokol numaralı araştırma projesi Etik Kurulumuzca görüşülmüş olup araştırmanın etik kurallara uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.

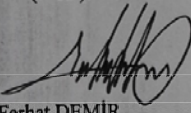

Prof. Dr. M. Serdar KEMALOĞLU
Tıp Fak. Beyin Cer. AD
(BAŞKAN)

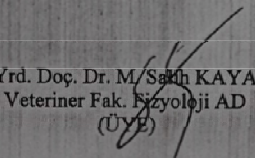

Doç. Dr. Abdurrahman ABAKAY
Tıp Fak. Göğüs Hast. AD
(Raportör)


Doç. Dr. Serahin Serhat ATILGAN
Diş Hekimliği Fak. Ağız Diş Çene
Hastalıkları ve Cer. AD
(ÜYE)


Prof. Dr. Ahmet ONAY
Fen Fak. Biyoloji AD
(ÜYE)


Doç. Dr. Berna GÜNEY SARUHAN
Veteriner Fak. Hist. ve Embr. AD
(ÜYE)


Ferhat DEMİR
Veteriner Hekim
(ÜYE)


Yrd. Doç. Dr. M. Serhat KAYA
Veteriner Fak. Fizyoloji AD
(ÜYE)

10.2. Doktora öğrencisi ilgili makalesi

Şahin A, Kürşat Cingü A, Kaya S, Türkcü G, Arı Ş, Evliyaoğlu O, et al. The protective effects of caffeic acid phenethyl ester in isoniazid and ethambutol-induced ocular toxicity of rats. *Cutan Ocul Toxicol.* 2013;32:228–33.

**Cutaneous and
Ocular Toxicology**

http://informahealthcare.com/cot
ISSN: 1556-9527 (print), 1556-9535 (electronic)

Cutan Ocul Toxicol, 2013; 32(3): 228–233
© 2013 Informa Healthcare USA, Inc. DOI: 10.3109/15569527.2012.759958

informa
healthcare

RESEARCH ARTICLE

The protective effects of caffeic acid phenethyl ester in isoniazid and ethambutol-induced ocular toxicity of rats

Alparslan Şahin¹, Abdullah Kürşat Cingü¹, Savaş Kaya², Gül Türkcü³, Şeyhmus Arı¹, Osman Evliyaoğlu⁴, Yasin Çınar¹, Fatih Mehmet Türkcü¹, Harun Yüksel¹, Mehmet Murat¹, İhsan Çaça¹, and Osman Gökalp⁵

¹Department of Ophthalmology, ²Department of Immunology, ³Department of Pathology, ⁴Department of Biochemistry, and ⁵Department of Pharmacology, Dicle University, School of Medicine, Diyarbakır, Turkey

Abstract

Purpose: This study intended to examine the effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on isoniazid (INH) and/or ethambutol (ETM)-induced retina and optic nerve toxicity in a rat model.

Methods: This study included eight groups, each containing 10 rats. The groups were Control, INH, ETM, CAPE, INH+CAPE, ETM+CAPE, INH+ETM and INH+ETM+CAPE. Rats were given orally 50 mg/kg/d of INH and 50 mg/kg/d of ETM in tap water for 30 d. 10 µmol/kg of CAPE were intraperitoneally injected for 30 d. The first dose of CAPE was given 24 h before the INH and ETM treatment and continued until sacrifice. Control group was given only tap water for 30 d. Rats were anaesthetized and sacrificed on the 30th day of experiment. Superoxide dismutase (SOD) activities, malondialdehyde (MDA), total anti-oxidant status (TAS), total oxidant status (TOS) were measured on the dissected and excised retina and optic nerve samples. Fellow eyes were used for histopathologic evaluation and the retinal ganglion cell (RGC) count. In addition, CAPE, INH and ETM interaction with SOD isoforms were calculated *in silico*.

Results: The SOD activity and TAS levels were found significantly higher in CAPE-treated groups compared to INH and/or ETM-treated groups ($p < 0.0001$). But the MDA, and TOS levels were significantly lower in CAPE-treated groups ($p < 0.0001$). The mean RGC count is significantly decreased in INH, ETM and INH+ETM groups compared with INH+CAPE, ETM+CAPE and INH+ETM+CAPE groups, respectively (p values 0.001, 0.042, and 0.001 respectively). Besides, *in silico* calculations showed that binding affinity of CAPE to SOD isotypes was higher than that of INH and ETM.

Conclusion: This study demonstrates that CAPE treatment may decrease the oxidative stress in the retina and optic nerve of INH- and ETM-treated rats and may prevent RGC loss. As an underlying mechanism, CAPE and SOD interaction seems crucial for alleviation of ocular oxidative stress and RGCs toxicity.

Keywords

Caffeic acid phenethyl ester, ethambutol, isoniazid, neuropathy, optic nerve, oxidative stress, retina, retinopathy, toxicity

History

Received 5 November 2012
Revised 28 November 2012
Accepted 10 December 2012
Published online 25 January 2013

Introduction

One-third of the world's population has latently infected with *Mycobacterium tuberculosis*, according to the World Health Organization. Approximately 10% of these infected individuals will develop active tuberculosis at some point in their lifetime¹. The treatment of tuberculosis is taking at least 6–12 months with the combination of antibiotics such as isoniazid (INH), ethambutol (ETM), rifampin, pyrazinamide and streptomycin. Among these antibiotics INH and ETM are widely used anti-tuberculosis agents. However, INH-associated neurotoxicity is an important clinical issue². Also, INH treatment may cause optic neuropathy³. Recent investigations have proposed that oxidative stress is one of the mechanisms responsible for

INH-induced cytotoxicity⁴. Ethambutol is one of the other drug of choice that commonly associated with toxic optic neuropathy⁵. Drug resistant strains of tuberculosis are often necessitating the use of ETM, and one half of tuberculosis patients take ETM. What is more, after successful anti-tuberculosis agent therapy and despite of clinical improvement dramatically, there is ongoing high-level oxidative stress in patients with pulmonary tuberculosis, which is indicating anti-tuberculosis agents themselves contribute the maintenance of oxidative stress⁶.

Superoxide dismutase (SOD) is the major anti-oxidant enzyme-reducing superoxide. SOD catalyzes the dismutation of superoxide into oxygen and H₂O₂. Besides that, there are three isoforms of SOD: SOD1, SOD2 and SOD3, which are located in cytoplasm, mitochondria and vascular extracellular space, respectively⁷.

Recently, caffeic acid phenethyl ester (CAPE), the active component isolated from the propolis of honeybee hives, has come to the attention of the researchers. It has anti-oxidant,

Address for correspondence: Dr Alparslan Şahin, Department of Ophthalmology, Dicle University, School of Medicine, Diyarbakır, Turkey. E-mail: dralparslansahin@gmail.com

anti-inflammatory, antiviral and immunomodulatory properties^{8,9}. In our previous works, it is shown that CAPE-protected hippocampus and erythrocytes of rats from INH induced oxidative injury^{8,10}.

In this case, we think that INH and ETM owe their toxic effect in retina and optic nerve partially to oxidative stress they induce. The aim of this study is to investigate the protective role of CAPE on retina and optic nerve tissues subjected to oxidative stress induced by INH and/or ETM in a rat model. Furthermore, an *in silico* solution is offered to understand the mechanism underlined protective effect of CAPE based on CAPE-SOD interaction.

Materials and methods

We hereby declare that the experiments reported here comply with the current laws and regulations of the Turkish Republic on the care and handling of experimental animals. The study was performed with the approval of the Experimental Animal Ethics Committee of Dicle University, Diyarbakir (Approval number 2010–22).

Animals and treatment

A total of 80 adult male Sprague–Dawley rats were divided into eight experimental groups, with 10 animals in each group as follows: Control (Group I), CAPE (Group II), INH (Group III), ETM (Group IV), INH+CAPE treated (Group V), ETM+CAPE treated (Group VI), INH + ETM treated (Group VII) and INH+ETM+CAPE treated (Group VIII).

INH and ETM were obtained from Diyarbakir Tuberculosis Dispensary, and dissolved in tap water. INH-treated groups were given orally with a dose of 50 mg/kg/d of INH with the tap water for 30 d. ETM-treated groups were given orally with ETM 50 mg/kg daily and with the tap water for 30 d. CAPE was obtained from Sigma (St Louis, MO), and intraperitoneally injected for 30 d with a dose of 10 µmol/kg per day in CAPE-treated groups. The first dose of CAPE was given 24 h before the INH and ETM treatment and continued until sacrifice. Control group was given only tap water for 30 d¹⁰.

Equal amounts of vehicles instead of all drugs were given to the rats of control and study groups. After all rats were received the abovementioned treatments, they were fed *ad libitum* until the midnight. On the experiment day, rats were anaesthetized with intraperitoneal injection of ketamine (50 mg/kg), decapitated and tissue samples were obtained.

Biochemical measurements

The dissected and excised retina, and optic nerve samples were weighed, immediately stored at –50 °C. Assays were performed on the supernatant of the homogenate that is prepared at 14000 rpm for 30 min at +4 °C¹¹. The protein concentration of the tissue samples were measured by the method of Lowry et al.¹². SOD activity was measured according to the method described by Fridovich¹³. MDA level was measured according to the procedure given by Ohkawa et al.¹⁴. The total anti-oxidant status (TAS) of supernatant fractions was evaluated by using a novel automated and colorimetric measurement method developed by Ereli¹⁵. The

TAS results were expressed as nmol Trolox equivalent/mg protein. The total oxidant status (TOS) of supernatant fractions was evaluated by using a novel automated and colorimetric measurement method developed by Ereli¹⁶. The assay is calibrated with hydrogen peroxide, and the results are expressed in terms of nmol H₂O₂ equivalent/mg protein.

Histological procedure

Fellow eyes were enucleated for histopathological evaluation. The enucleated eyes were fixated in 10% formalin solution. Dissected eyes were sliced into two pieces horizontally passing through the optic nerve. Then, they were dehydrated and embedded in wax. Paraffin blocks were sliced in 4–5 µm thickness and the sections were stained with hematoxylin–eosin (HE). All specimens were examined under light microscopy by a pathologist blinded to the study groups. The number of ganglion cells were counted for each eye at ×400 magnification and densities obtained in the eight separate areas were pooled to calculate a mean retinal ganglion cell (RGC) density per retina.

Preparation of the protein and the ligand structure for docking

Protein Data Bank (PDB) entry of SOD isoforms are downloaded from www.rcsb.org with PDB ID codes 2C9V, 1LUV and 2JLP for SOD1, SOD2 and SOD3, respectively. If there is more than one SOD chain in PDB file, just chain A is kept and the other chains are removed. Then, H₂O molecules and the ligands, if there are, are deleted. On the other hand, Cu⁺² and Zn⁺² ions in active sites of both SOD1 and SOD3, and Mn⁺² in active site of SOD2 were kept untouched. Finally, polar hydrogen atoms are added and Gasteiger charges are calculated; consequently, outcome files are saved with PDBQT extension via AutoDockTools (ADT) MGLTools 1.5.4. The SDF files of the ligands are downloaded from NCBI PubChem Compound with the compound ID number 14052, 3767 and 5281787 for ETM, INH and CAPE, respectively. SDF files are converted into PDB files with free version of Discovery Studio 3.1 (Accelrys, Inc., San Diego, CA). Then, hydrogen atoms are added to the ligands and saved as PDBQT files. Docking of the SOD molecules with indicated ligands was performed with Autodock Vina 1.1.2 (The Scripps Research Institute). The nine best positions of the ligands are taken into consideration to evaluate their affinity. Indicated images are created with Python Molecular Viewer (PMV) MGLTools 1.5.4 (The Scripps Research Institute).

Statistical analyses

Statistical analysis was carried out by using Statistical Package for the Social Sciences version 11.5 (SPSS 11.5 for Windows, Chicago, IL). The results are expressed as mean ± standard deviation. Mann–Whitney *U* test was used for group comparisons. The one-way analysis of variance (ANOVA) and *post hoc* multiple comparison tests (LSD) were performed on the data of the variables to examine the difference among groups. A *p* value of <0.05 was considered as statistically significant.

Table 1. The effect of CAPE on SOD activity, MDA level, TAS and TOS in the optic nerve tissue.

Group	SOD (U/mg protein)	MDA (nmol/g protein)	TAS (mmol Trolox Eq./g protein)	TOS (mmol H ₂ O ₂ Eq./g protein)
Control (I)	1.204 ± 0.028	0.673 ± 0.018	0.078 ± 0.005	1.061 ± 0.083
CAPE (II)	1.309 ± 0.130	0.589 ± 0.042	0.073 ± 0.011	1.163 ± 0.105
INH (III)	0.681 ± 0.056	1.214 ± 0.051	0.040 ± 0.004	3.188 ± 0.247
ETM (IV)	0.665 ± 0.043	1.011 ± 0.044	0.033 ± 0.002	3.281 ± 0.207
INH + CAPE (V)	1.101 ± 0.104	0.686 ± 0.629	0.076 ± 0.008	1.628 ± 0.132
ETM + CAPE (VI)	1.161 ± 0.118	0.680 ± 0.070	0.065 ± 0.007	1.602 ± 0.149
INH + ETM (VII)	0.607 ± 0.048	1.056 ± 0.057	0.036 ± 0.007	3.414 ± 0.273
INH + ETM + CAPE (VIII)	1.078 ± 0.117	0.778 ± 0.038	0.067 ± 0.012	1.744 ± 0.218
<i>p</i> Values				
I-II	0.247	0.211	0.630	0.501
I-III	0.001	0.001	0.002	0.001
I-IV	0.000	0.000	0.000	0.000
I-VII	0.001	0.001	0.002	0.001
III-V	0.007	0.001	0.003	0.001
IV-VI	0.003	0.003	0.000	0.001
VII-VIII	0.007	0.002	0.093	0.005

p < 0.0001 Kruskal-Wallis; *n* = 10 in each group.

Table 2. The effect of CAPE on SOD activity, MDA level, TAS and TOS in the retinal tissue.

Group	SOD (U/mg protein)	MDA (nmol/g protein)	TAS (mmol Trolox Eq./g protein)	TOS (mmol H ₂ O ₂ Eq./g protein)
Control (I)	5.221 ± 0.103	0.746 ± 0.029	0.352 ± 0.029	17.401 ± 1.698
CAPE (II)	5.787 ± 0.527	0.673 ± 0.043	0.340 ± 0.085	13.325 ± 1.122
INH (III)	2.349 ± 0.105	1.396 ± 0.058	0.161 ± 0.017	35.425 ± 2.748
ETM (IV)	2.326 ± 0.161	1.171 ± 0.056	0.131 ± 0.009	36.085 ± 2.545
INH + CAPE (V)	4.714 ± 0.469	0.793 ± 0.081	0.306 ± 0.036	18.069 ± 1.670
ETM + CAPE (VI)	4.946 ± 0.503	0.782 ± 0.080	0.263 ± 0.028	17.803 ± 1.656
INH + ETM (VII)	2.276 ± 0.181	1.214 ± 0.066	0.097 ± 0.015	37.938 ± 3.041
INH + ETM + CAPE (VIII)	3.720 ± 0.406	0.899 ± 0.041	0.271 ± 0.051	19.388 ± 2.425
<i>p</i> Values				
I-II	0.329	0.385	0.386	0.083
I-III	0.002	0.002	0.002	0.003
I-IV	0.001	0.001	0.001	0.002
I-VII	0.002	0.002	0.002	0.002
III-V	0.001	0.001	0.005	0.002
IV-VI	0.001	0.004	0.001	0.001
VII-VIII	0.007	0.003	0.007	0.005

p < 0.0001 Kruskal-Wallis; *n* = 10 in each group.

Results

CAPE-preserved rat retina and optic nerve from oxidative stress

SOD activities and TAS is decreased significantly in retina and optic nerves of INH, ETM, and INH+ETM treated groups (Tables 1 and 2), while MDA level and TOS is increased. However, SOD activities and TAS is elevated to normal values in retina and optic nerves of INH+CAPE, ETM+ CAPE and INH+ETM+CAPE-treated groups, while MDA level and TOS is decreased. In other words, SOD activity is impaired in the presence of INH, ETM and INH+ETM in retina and optic nerve. Nevertheless, SOD activity is preserved with co-treatment of CAPE with INH and/or ETM. In parallel to the sustained SOD activity, TAS is increased and MDA level and TOS decreased in CAPE given groups. These findings may indicate a direct destructive effect of INH, ETM on SOD activity and protective influence of CAPE on SOD activity.

CAPE prevented the RGC loss

Parallel to the biochemical results, the RGC number is significantly decreased in INH, ETM, and INH+ETM groups. In Figure 1, RGC number decrease is marked with nucleus (in blue color) loss. However, in CAPE-treated groups the RGC number is almost as high as control group (Table 3). This result may suggest that CAPE-protected RGC from the INH and/or ETM toxicity.

CAPE may inhibit binding of INH and ETM to SOD molecule

Maintenance of SOD activity in retina and optic nerve tissues of rat, when CAPE is combined with INH and/or ETM, suggest that CAPE, INH and ETM may have direct effect on SOD molecule by binding. To show this, *in silico*, binding energies of ligands, ETM, INH and CAPE, and receptors, SOD1, SOD2 and SOD3, are calculated with Autodock Vina 1.1.2 software (The Scripps Research Institute). The best

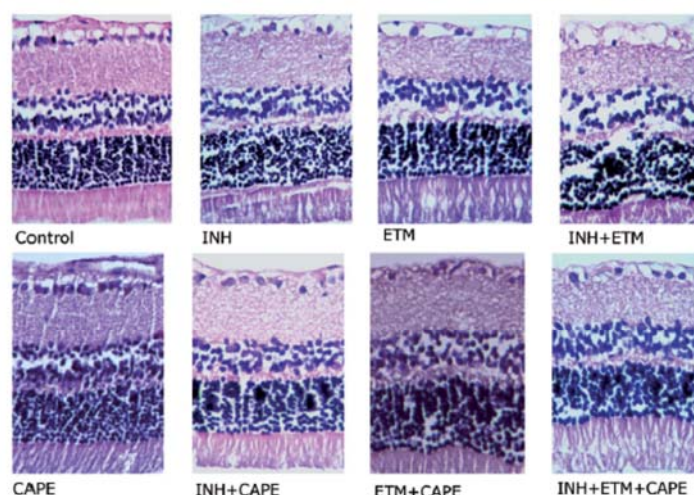


Figure 1. CAPE treatment prevents RGC loss (HE, $\times 400$). Note the regularity of ganglion cells in the control and CAPE groups. There is apparent ganglion cell loss in INH, ETM and ETM+INH groups.

Table 3. The mean RGC counts in the study groups.

Groups	Control (I)	CAPE (II)	INH (III)	ETM (IV)	INH + CAPE (V)	ETM + CAPE (VI)	INH + ETM (VII)	INH + ETM + CAPE (VIII)
GCC	38.95 \pm 2.75	35.21 \pm 1.82	28.37 \pm 0.86	29.83 \pm 1.61	33.03 \pm 0.43	33.60 \pm 0.87	23.04 \pm 0.51	32.57 \pm 0.95

GCC: Ganglion cell count (mean \pm SD), Cell count was performed under $\times 400$ magnification.

p Values: I-II = 0.445; I-III = 0.02; I-IV = 0.012; I-VII = 0.002; III-V = 0.001; IV-VI = 0.042; VII-VIII = 0.001.

Table 4. Affinity of INH, ETM and CAPE for the best position of CAPE.

	ETM	INH	CAPE
SOD1	-4.2	-4.8	-5.2
SOD2	-3.2	-4.1	-6.0
SOD3	-3.9	-4.5	-6.2

ΔG of ligands and SOD isoforms interactions are presented in kcal/mol.

position of CAPE on each SOD isoform succeeds the lowest binding energy (ΔG) score, means highest binding capacity or lowest *K_d* in comparison to INH and ETM (Table 4). In other words, the concentration of CAPE to saturate SOD isoforms is approximately 1/10th concentration of ETM and INH. All the ligands show affinity to active sites of the SOD molecules (Figure 2). These findings may suggest that in the presence of CAPE, INH and ETM cannot bind to the active site of SOD isoforms. Besides that, binding of CAPE may not affect the activity of SOD isoforms whereas INH and ETM may inhibit.

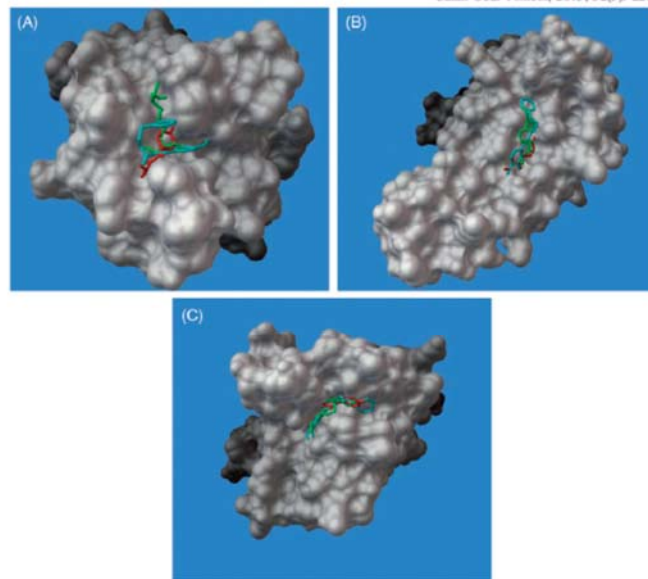
Discussion

In the current study, it is shown that INH and ETM induce oxidative stress in retina and optic nerve. According to our knowledge, this is the first paper shows that ETM induce oxidative stress. Besides that, it is presented here for the first

time that CAPE protects retina and optic nerve from oxidative stress developed by INH and ETM. Furthermore, it is a novel finding that CAPE also prevented INH and/or ETM-induced RGC loss. Moreover, at least *in silico* it is shown here for the first time that CAPE, INH and ETM have an affinity to the active sites of SOD isoforms, which may suggest a role for anti-oxidant effect of CAPE and oxidant effect of INH and ETM.

High MDA amount, increased TOS and decreased TAS display in INH and ETM-treated rats' retina and optic nerve reflect strong oxidant nature of these anti-tuberculosis agents. In parallel to our reports, several other papers show oxidant capacity of INH^{8,17}. However, there is no any other report for ETM oxidant power in literature, at least in our searches. The oxidative stress generated by INH and ETM may be a main cause of or a contributor to damage given to optic nerve or retina. Not only these anti-tuberculosis agent but also *Mycobacterium tuberculosis* itself develops a strong oxidative stress environment in patients⁵. Nonetheless, *Mycobacterium tuberculosis* has a mechanism to protect itself from harmful effect of reactive oxygen species¹⁸. This fact suggests that anti-bacterial effect of INH and ETM on *Mycobacterium tuberculosis* may not depend on their oxidant power. CAPE is a very powerful anti-oxidant reagent that is used in many other experiments^{19,20}. Consequently, the combination of CAPE with INH and ETM will not decrease the therapeutic

Figure 2. ETM, INH and CAPE can bind active sides of SOD isoforms SOD1 (A), SOD2 (B) and SOD3 (C). Surfaces of SOD isoforms are presented in gray color. ETM, INH and CAPE are presented in green, red and turquoise respectively.



effect of these agents but will alleviate the adverse effect caused by oxidative stress induction.

It has been demonstrated that SOD is a valuable component of anti-oxidant defence system in retinal cells, providing protection against loss of function from oxidative stress²¹. According to our *in silico* calculations, it is suggested here that INH and ETM may reveal their oxidant potential by binding the active site of SOD isoforms. That is why, INH and ETM inhibit the conversion of superoxide to hydrogen peroxide by blocking SOD isoforms. On the other hand, CAPE may bind active sites of SOD isoforms stronger than INH and ETM. However, interestingly CAPE may not inhibit the function of SOD isoforms in a way we could not clarify the underlying mechanism at the moment. Due to weakness and limitations, *in silico* experiment in comparison with *in vitro* and *in vivo* experiments, further studies with recombinant SOD isoforms are required to make clear this issue.

In addition to biochemical results, we first confirmed that CAPE co-treatment significantly reduced ganglion cell loss in INH, ETM and INH+ETM-treated groups. In the literature, there is no paper mentioned that INH and ETM have a devastating effect on RGCs. However, our findings obviously present their RGCs toxicity. We think that this devastating effect is the result of oxidant capacity of these drugs. And anti-oxidant effect of CAPE prevented the RGC loss. Yuki et al. reported that SOD1-deficient mice showed an increased level of oxidative stress in their RGCs²². It has been demonstrated that oxidative stress can induce apoptosis of RGCs^{23,24}. Treatment with several anti-oxidant agents have been shown to prevent the oxidative stress-induced apoptosis in RGCs^{25,26}.

In the current study, INH and ETM treatment individually cause significant increase in the oxidative stress. Interestingly, INH and ETM have no additive oxidant effect. So, we can say that, combined treatment of INH and ETM did not potentiate the oxidative stress in comparison to single agent use. But combined use of INH and ETM caused significant RGC loss.

In conclusion, we found that CAPE is able to prevent RGC loss with its strong anti-oxidant activity. CAPE might be a promising agent to protect optic nerve, retina and possibly other organs from INH and ETM-induced oxidative damage in tuberculosis patient. The protective effect of CAPE seems to be due to its anti-oxidant capacity. We thought that CAPE has a role on the regulation of anti-oxidant enzyme activity, particularly SOD isoforms. Further studies are needed to define the effect of CAPE on *M. tuberculosis* infected animal models.

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of this paper.

This study is supported by Dicle University Scientific Research Project Committee (Project number is 10-TF-66).

References

1. Shi R, Sugawara I. Development of new anti-tuberculosis drug candidates. *Tohoku J Exp Med* 2010;221:97-106.
2. Shah BR, Santucci K, Sinert R, Steiner P. Acute isoniazid neurotoxicity in an urban hospital. *Pediatrics* 1995;95:700-4.
3. Noguera-Pons R, Borrás-Blasco J, Romero-Crespo I, et al. Optic neuritis with concurrent etanercept and isoniazid therapy. *Ann Pharmacother* 2005;39:2131-5.

4. Cioek E, Sutcu R, Gokalp O, et al. The effects of isoniazid on hippocampal NMDA receptors: protective role of erdosteine. *Mol Cell Biochem* 2005;277:131–5.
5. Lee EJ, Kim SJ, Choung HK, et al. Incidence and clinical features of ethambutol-induced optic neuropathy in Korea. *J Neuroophthalmol* 2008;28:269–77.
6. Plit ML, Theron AJ, Fickl H, et al. Influence of antimicrobial chemotherapy and smoking status on the plasma concentrations of vitamin C, vitamin E, beta-carotene, acute phase reactants, iron and lipid peroxides in patients with pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998;2:590–6.
7. Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal* 2011;15:1583–606.
8. Gokalp O, Uz E, Cioek E, et al. Ameliorating role of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) against isoniazid-induced oxidative damage in red blood cells. *Mol Cell Biochem* 2006;290:55–9.
9. Ozer MK, Parlakpınar H, Cigremis Y, et al. Ischemia-reperfusion leads to depletion of glutathione content and augmentation of malondialdehyde production in the rat heart from overproduction of oxidants: can caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protect the heart? *Mol Cell Biochem* 2005;273:169–75.
10. Cioek E, Sutcu R, Gokalp O, et al. The effects of isoniazid on hippocampal NMDA receptors: protective role of erdosteine. *Mol Cell Biochem* 2005;277:131–5.
11. Senoglu M, Nacitarhan V, Kurutas EB, et al. Intraperitoneal alpha-lipoic acid to prevent neural damage after crush injury to the rat sciatic nerve. *J Brachial Plex Peripher Nerve Inj* 2009;4:22. doi: 10.1186/1749-7221-4-22.
12. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biochem Chem* 1951;19:265–75.
13. Fridovich I. Superoxide dismutase. *Adv Enzymol* 1974;41:35–97.
14. Ohkawa H, Ohishi N, Tagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95:351–8.
15. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 2004;37:277–85.
16. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 2005;38:1103–11.
17. Saad EI, El-Gowilly SM, Sherhaa MO, Bistawroos AE. Role of oxidative stress and nitric oxide in the protective effects of alpha-lipoic acid and aminoguanidine against isoniazid-rifampicin-induced hepatotoxicity in rats. *Food Chem Toxicol* 2010;48:1869–75.
18. Mehra S, Dutta NK, Mollenkopf HJ, Kaushal D. Mycobacterium tuberculosis MT2816 encodes a key stress-response regulator. *J Infect Dis* 2010;202:943–53.
19. Ozguner F, Bardak Y, Comlekci S. Protective effects of melatonin and caffeic acid phenethyl ester against retinal oxidative stress in long-term use of mobile phone: a comparative study. *Mol Cell Biochem* 2006;282:83–8.
20. Wang T, Chen L, Wu W, et al. Potential cytoprotection: antioxidant defence by caffeic acid phenethyl ester against free radical-induced damage of lipids, DNA, and proteins. *Can J Physiol Pharmacol* 2008;86:279–87.
21. Dong A, Shen J, Krause M, et al. Superoxide dismutase 1 protects retinal cells from oxidative damage. *J Cell Physiol* 2006;208:516–26.
22. Yuki K, Ozawa Y, Yoshida T, et al. Retinal ganglion cell loss in superoxide dismutase 1 deficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:4143–50.
23. Maher P, Hanneken A. The molecular basis of oxidative stress-induced cell death in an immortalized retinal ganglion cell line. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:749–57.
24. Munemasa Y, Kim SH, Ahn JH, et al. Protective effect of thioredoxins 1 and 2 in retinal ganglion cells after optic nerve transection and oxidative stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:3535–43.
25. Shi Y, Wu X, Gong Y, et al. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester on retinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Curr Eye Res* 2010;35:930–7.
26. Nakayama M, Aihara M, Chen YN, et al. Neuroprotective effects of flavonoids on hypoxia-, glutamate-, and oxidative stress-induced retinal ganglion cell death. *Mol Vis* 2011;17:1784–93.

11. Orijinallik Raporu

Diyabetik Rat Modelinde Kafeik Asit ve Kafeik Asit Fenetil Esterin Göz Dokularındaki Koruyucu Etkilerinin Araştırılması

ORJİNALLİK RAPORU

%6 BENZERLİK ENDEKSİ	%4 İNTERNET KAYNAKLARI	%2 YAYINLAR	%2 ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
--------------------------------	-------------------------------------	-----------------------	-------------------------------

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.kocatepetipdergisi.aku.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
2	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	%1
3	Submitted to Trakya University Öğrenci Ödevi	%1
4	"Poster Özetleri / Poster Abstracts", Turkish Journal of Biochemistry, 2015 Yayın	<%1
5	acikerisim.dicle.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	acikerisim.deu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
7	en.m.wikipedia.org İnternet Kaynağı	<%1
8	www.ankaraderm.org	



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ SAVUNABİLİRLİK VE ORJİNALLİK
BEYAN FORMU

I. ÖĞRENCİ BİLGİLERİ

Adı ve Soyadı: Alparslan ŞAHİN

Numarası: 12859002

Eğitim - Öğretim Yılı: 2018-2019

Varyant: GÜZ BAHAR

Anabilim Dalı: Fizyoloji

Programı: DOKTORA

Lisansüstü Eğitime Başlama Tarihi: 27.09.2011

Tez Konusu: Diyabetik rat modelinde kafeik asit ve kafeik asit fenetil esterinin göz dokularındaki keruyucu etkilerinin araştırılması

II. İNTEHAL RAPORU BİLGİLERİ

Rapor Türü: TEZ SAVUNMA SINAVI ÖNCESİ TEZ SAVUNMA SINAVI SONRASI

Sayfa Sayısı: 65

Benzerlik Oranı: % 6

Raporlama Tarihi: 11/12/2018

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın kapak sayfası, giriş, ana bölümler, tartışma ve sonuç kısımlarından oluşan toplam 65 sayfalık kısmına ilişkin, 11/12/2018 tarihinde şabım/tez danışmanım tarafından TURNITIN adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan intihal raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 6'dır.

Uygulanan filtrelemeler:

- Kabul-Onay, Beyan, Teşekkür, İçindekiler, Kısaltma ve Simgeler, Şekil, Resim ve Tablolar sayfaları hariç,
 Kaynakça (Bibliyografi) hariç
 Alıntılar hariç
 Tez Danışmanı onayıyla kelime ve %'lik filtresi uygulaması (% 1)

Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Programlarda Tez Çalışması İntihal Raporu Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edilmesi durumunda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Yukarıda bilgileri verilen tezi bilimsel, şekilsel ve etik kurallar çerçevesinde inceledim. Tezin Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği ve Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzu kurallarına uygun olduğunu onaylıyorum. Jüri karşısında savunabilir olduğumu bilgilerinize arz ederim.

(İmza)

11/12/2018

Alparslan ŞAHİN
Öğrenci

(İmza)

11/12/2018

Prof Dr Makadder BAYLAN
Danışman