

MERVE ANAPALI

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2018





T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS

FRUKTOZ VE STREPTOZOTOCİN İLE OLUŞTURULAN DİYABET
MODELİNDE RESVERATROL VE VİTAMİN D TEDAVİSİNİN KARACİĞER
VE ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİNE ETKİLERİ

MERVE ANAPALI

DANIŞMAN
PROF. DR. TURGUT ULUTİN

II. DANIŞMAN
DOÇ. DR. FATMA KAYA DAĞISTANLI

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI


İSTANBUL-2018

TEZ ONAYI

Bu çalışma 10.12.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı Yüksek Lisans
Tezi olarak kabul edilmiştir.

TEZ JÜRİSİ

Prof. Dr. Turgut ULUTIN
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Tıp Fakültesi



Prof. Dr. Melek ÖZTÜRK SEZGİN
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Tıp Fakültesi



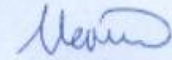
Doç. Dr. Ayşe Evrim BAYRAK
İstanbul Üniversitesi
Aziz Sancar Deneysel Tıp Enstitüsü



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 beyan ederim.

Merve ANAPALI



İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince tüm fikirlerime açık olan ve beni hep destekleyen İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı başkanımız ve aynı zamanda danışmanım sayın Prof. Dr Turgut Ulutin'e,

Çalışmalarımın her aşamasında bilgisi ve tecrübesiyle yanımda olan, her zaman beni destekleyen ve yol gösterici olduğuna inandığım 2. danışmanım sayın Doç. Dr Fatma Kaya Dağıstanlı'ya,

Bilgisi, tecrübesi ve eğitimci kişiliğiyle bana çok şey kattığını düşündüğüm sevgili hocam sayın Prof. Dr Melek Öztürk Sezgin'e,

Çalışmalarımın İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Enstitüsünde geçen kısmında çalışmalarım süresince yanımda olan sayın Doç Dr Ayşe Evrim Bayrak ve Arş. Gör Gizem Çelebi'ye,

Çalışmalarım süresince desteklerini her zaman hissettiğim sevgili çalışma arkadaşlarım MSc Ayşe Seda Akdemir ve MSc Mehmet Can Çakın'a,

Tez bulgularımın analiz ve değerlendirilmesinde bilgi ve tecrübesinden faydalandığım sayın Prof. Dr Memiş Özdemir'e,

Eğitim hayatım boyunca her zaman yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili aileme teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2017-26139

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ii
BEYAN.....	iii
İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xii
ÖZET	xv
ABSTRACT.....	xvi
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1.KARACİĞER.....	4
2.1.1.KARACİĞERİN YAPISAL ORGANİZASYONU.....	5
2.1.2.KARACİĞERDE ONARIM.....	8
2.2.DİABETES MELLİTUS.....	10
2.2.1.DİABETES MELLİTUS'UN SINIFLANDIRILMASI.....	11
2.2.1.1.TİP 1 DİABETES MELLİTUS.....	11
2.2.1.2.TİP 2 DİABETES MELLİTUS1.....	12
2.2.1.3.GESTASYONEL DİYABET.....	12
2.2.1.4.DİĞER DİYABET TÜRLERİ (MONOGENİK DİYABET).....	12
2.2.1.5.DENEYSEL TİP 2 DİABETES MELLİTUS MODELLERİ.....	13
2.2.1.5.1.SPONTAN TİP 2 DİABETES MELLİTUS MODELİ.....	13
2.2.1.5.2.DİYET YA DA BESLENME İÇERİĞİNDE DÜZENLEMELERLE OLUŞTURULAN TİP 2 DİABETES MELLİTUS MODELİ.....	13
2.2.1.5.3.CERRAHİ YÖNTEMLERLE OLUŞTURULAN TİP 2 DİABETES MELLİTUS MODELLERİ.....	14
2.2.1.5.4.TRANSGENİK VE KNOCKOUT TİP 2 DİABETES MELLİTUS MODELLERİ.....	14

2.2.1.5.5.KİMYASAL AJANLARLA OLUŞTURULAN TİP 2 DİABETES MELLİTUS MODELİ.....	15
2.3.STREPTOZOTOCİN.....	15
2.3.1.STZ İLE OLUŞTURULAN TİP 2 DİABETES MELLİTUS MODELLERİ.....	16
2.3.1.1.YAĞLI DİYET VE STZ İLE OLUŞTURULMUŞ TİP 2 DİYABET.....	16
2.3.1.2.NİKOTİNAMİD-STZ İLE OLUŞTURULAN TİP 2 DİYABET MODELİ.....	17
2.3.1.3.YENİDOĞAN STZ DİYABET MODELİ.....	17
2.3.1.4.FRUKTOZ DİYETİ VE STZ İLE OLUŞTURULAN TİP 2 DİYABET.....	17
2.4. FRUKTOZ.....	18
2.4.1.FRUKTOZUN KİMYASAL YAPISI.....	18
2.4.2.FRUKTOZ KAYNAKLARI.....	19
2.4.3.FRUKTOZ METABOLİZMASI.....	19
2.4.4.FRUKTOZUN ABSORBSİYONU VE İNTESTİNAL METABOLİZMASI.....	20
2.4.5.HEPATİK FRUKTOZ METABOLİZMASI.....	20
2.4.6.FRUKTOZ VE TİP 2 DİYABET.....	22
2.4.7.FRUKTOZ VE ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ.....	22
2.4.8.FRUKTOZ VE İNFLAMASYON.....	23
2.5.ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ VE KATLANMAMIŞ PROTEİN CEVABI (UPR).....	24
2.5.1.PROTEİN KALİTE KONTROLÜ.....	24
2.5.2.KATLANMAMIŞ PROTEİN CEVABI SİNYAL YOLLARI.....	25
2.5.2.1.İNOSİTOL GEREKTİREN KİNAZ-1 (IRE-1) SİNYAL YOLAĞI.....	25
2.5.2.2.PROTEİN KİNAZ RNA (PKR) BENZERİ ENDOPLAZMİK RETİKULUM KİNAZ (PERK) SİNYAL YOLAĞI.....	26
2.5.2.3.AKTİVE EDİCİ TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ 6 (ATF6) SİNYAL YOLAĞI.....	26
2.5.3.ER STRESİ VE DİABETES MELLİTUS.....	27
2.5.4.ER STRESİ VE KARACİĞER.....	28
2.5.5.ER STRESİ VE APOPTOZ.....	29
2.6.TİP 2 DİYABET PATOGENEZİNDE METABOLİK İNFLAMATUAR YOLAKLAR.....	29
2.6.1.METABOLİK İNFLAMASYONUN İNTRASELÜLER MEDİATÖRLERİ.....	30
2.6.1.1.NÜKLEER FAKTÖR KAPPA BETA (NF-KB).....	30

2.6.1.2.İNTERLÖKİN-1 BETA (IL-1B).....	31
2.6.1.3.TÜMÖR NEKROZİS FAKTÖR ALFA (TNF-A).....	32
2.6.1.4.İNTERLÖKİN-6 (IL-6).....	32
2.7.RESVERATROL.....	33
2.7.1.RESVERATROLÜN FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ.....	34
2.7.2.RESVERATROLÜN BİYOLOJİK ETKİLERİ.....	35
2.7.3.RESVERATROLÜN BİYOSENTEZİ VE YIKIMI.....	35
2.7.4.RESVERATROL VE KARACİĞER.....	36
2.7.5.RESVERATROLÜN HEPATİK METABOLİZMASI.....	36
2.7.6.RESVERATROLÜN KANDA TAŞINMASI, HÜCREYE ALINMASI, HÜCRE İÇİ RESEPTÖRLERİ VE VÜCUTTAKİ DAĞILIMI.....	37
2.7.7.RESVERATROL VE DİYABET.....	37
2.7.8.RESVERATROL, ER STRESİ VE İNFLAMASYON.....	38
2.8.VİTAMİN D.....	39
2.8.1.VİTAMİN D SENTEZİ, METABOLİZMASI VE BİYOLOJİK FONKSİYONLARI.....	39
2.8.2.VİTAMİN D RESEPTÖRÜ (VDR).....	40
2.8.3.VİTAMİN D BAĞLAYAN PROTEİN (DBP).....	41
2.8.4.VİTAMİN D VE TİP 2 DİABETES MELLİTUS.....	42
2.8.5.VİTAMİN D VE HEPATİK METABOLİZMA.....	42
2.8.6.VİTAMİN D, İNFLAMASYON VE ER STRESİ.....	43
2.9.İMMUNOHİSTOKİMYA YÖNTEMİ.....	44
2.9.1.BİOTİN-STREPTAVİDİN YÖNTEMİ.....	44
2.9.1.1.SİNYAL OLUŞTURAN SİSTEMLER (HABERCİ MOLEKÜLLER).....	44
2.9.1.1.1.FLUOROKROMLAR.....	45
2.9.1.1.2.ENZİMLER.....	45
2.9.1.1.3.METALLER.....	45
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	46
4. BULGULAR.....	55
5. TARTIŞMA.....	81
KAYNAKLAR.....	92
HAM VERİLER.....	115
FORMLAR.....	116

ETİK KURUL KARARI	117
PATENT HAKKI İZİNİ	118
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	119
ÖZGEÇMİŞ	120



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3.1: Deney düzeneği.....	49
Tablo 3.2: Kullanılan antikorlar.....	52
Tablo 3.3: Hayvan deneyinde kullanılan kimyasallar.....	53
Tablo 3.4: İmmünohistokimyada kullanılan kimyasallar.....	53
Tablo 3.5: Kullanılan cihazlar.....	54
Tablo 3.6: Kullanılan sarf malzemeler.....	54
Tablo 4.1: Tüm deney gruplarına ait açlık kan glukozlarının (mg/dl) istatistiksel değerlendirilmesi.....	56
Tablo 4.2: Tüm deney gruplarına ait vücut ağırlıklarının (gr) istatistiksel değerlendirilmesi.....	57
Tablo 4.3: Tüm deney gruplarına ait kalori alımının (kcal/kg) istatistiksel değerlendirilmesi.....	59
Tablo 4.4: Tüm deney gruplarına ait NF- κ B immün pozitif hücre yüzdesinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	61
Tablo 4.5: Tüm deney gruplarına ait IL-6 immünpozitifliğinin HSCORE analizi ile istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	64
Tablo 4.6: Tüm deney gruplarına ait IL-1 β immünpozitifliğinin HSCORE analizi ile istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	67
Tablo 4.7: Tüm deney gruplarına ait TNF- α immünpozitifliğinin HSCORE analizi ile istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	70
Tablo 4.8: Tüm deney gruplarına ait GRP78 immünpozitifliğinin HSCORE analizi ile istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	73
Tablo 4.9: Tüm deney gruplarına ait kaspaz-3 immün pozitif hücre yüzdesinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	76
Tablo 4.10: Tüm deney gruplarına ait PCNA immün pozitif hücre yüzdesinin istatistiksel değerlendirilmesi.....	79

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Karaciğerin anatomik yapısı.....	7
Şekil 2.2. Karaciğer rejenerasyonu.....	9
Şekil 2.3. Streptozotocinin kimyasal yapısı.....	15
Şekil 2.4. Fruktoz, glukoz ve sükrozun kimyasal yapısı.....	19
Şekil 2.5. Karaciğerde fruktoz ve glukoz metabolizması.....	21
Şekil 2.6. Endoplazmik retikulum stres yolları.....	25
Şekil 2.7. Trans ve cis resveratrolün kimyasal yapısı.....	34
Şekil 2.8. Vitamin D metabolizması.....	40
Şekil 4.1: NF- κ B Antikoru ile İmmünohistokimya yöntemiyle boyanan örneklerin mikroskop görüntüleri.....	62
Şekil 4.2: IL-6 Antikoru ile İmmünohistokimya yöntemiyle boyanan örneklerin mikroskop görüntüleri.....	65
Şekil 4.3: IL-1 β Antikoru ile İmmünohistokimya yöntemiyle boyanan örneklerin mikroskop görüntüleri.....	68
Şekil 4.4: TNF- α Antikoru ile İmmünohistokimya yöntemiyle boyanan örneklerin mikroskop görüntüleri.....	71
Şekil 4.5: GRP78 Antikoru ile İmmünohistokimya yöntemiyle boyanan örneklerin mikroskop görüntüleri.....	74
Şekil 4.6: Kaspaz 3 Antikoru ile İmmünohistokimya yöntemiyle boyanan örneklerin mikroskop görüntüleri.....	77
Şekil 4.7: PCNA Antikoru ile İmmünohistokimya yöntemiyle boyanan örneklerin mikroskop görüntüleri.....	80

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- WHO: Dünya Sağlık Örgütü
- IUPAC: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
- DM: Diabetes Mellitus
- T1DM: Tip 1 Diabetes Mellitus
- T2DM: Tip 2 Diabetes Mellitus
- MODY: Maturity-Onset Diabetes in youth
- GLUT: Glukoz taşıyıcı
- GK: Glukokinaz
- PARP: Poli ADP-Riboz polimeraz
- NAD⁺: Nikotinamid adenin dinükleotit
- ATP: Adenozin trifosfat
- GTP: Guanozin trifosfat
- GIP: Gastrik inhibitör peptit
- STZ: Streptozotocin
- GTG: Goldthioglukoz
- PCNA: Prolifere edici hücre nükleer antijen
- NF- κ B: Nükleer faktör kappa beta
- IKB: κ B inhibitör
- IKK: I κ B kinaz
- NEMO: NF- κ B esansiyel modülatör
- MAPK: Mitojen ile aktive olan protein kinaz
- IL: İnterlökin
- TNF: Tümör nekrozis faktör
- TNFR: Tümör nekrozis faktör reseptör
- TGF: Dönüştürücü büyüme faktörü
- NK: Doğal öldürücü hücre
- MCP: Monosit kemoatraktan protein
- EGF: Epidermal büyüme faktörü

HGF: Hepatosit büyüme faktörü
LSEC: Karaciğer sinüzoidal endotelyal hücre
HepG2: İnsan karaciğer kanser hücre serisi
HCS: Hepatik stellat hücresi
KC: Kupffer hücresi
AMCA: Amino-metil-kumarin asetik asit
Shh: Sonik hedgehog
Gc: Grup spesifik komponent
ER: Endoplazmik retikulum
UPR: Katlanmamış protein cevabı
ERAD: Endoplazmik retikulum ilişkili protein degradasyonu
CHOP: CCAAT artırıcı bağlayıcı homolog protein
GRP: Glukoz düzenlenmiş protein
PERK: Protein kinaz benzeri ER kinaz
eIf: Ökaryotik başlatıcı faktör
ATF: Siklik AMP bağımlı transkripsiyon faktör
XBP: X bağlayıcı protein
ChREBP: Karbonhidrat cevap element-bağlayıcı protein
SREBP: Sterol düzenleyici element-bağlayıcı protein
WFS: Wolfram sendromu
TLR: Toll benzeri reseptör
IRE: İnositol gerektiren enzim
PKR: Protein kinaz RNA
PKC γ : Protein kinaz c gama
c-ABL: Abelson tirozin kinaz
JNK: Janus kinaz
SOCS: Sitokin sinyal baskılayıcısı
CNX: Kalneksin
CRT: Kalretikulin
CRP: c reaktif protein

SSA: serum amiloid A

AST: Aspartat amino transferaz

ALT: Alanin amino transferaz

SOD: Süperoksit dismutaz

CAT: Katalaz

COX: Siklooksigenaz

VLDL: Çok düşük yoğunluklu lipoprotein

VDR: Vitamin D reseptörü

DBP: Vitamin D bağlayıcı protein

VDRE: Vitamin D cevap elementi

RxR: Retinoik asit reseptörü

CCl₄: Karbontetra klorür

ÖZET

Anapalı, M. (2018). Fruktoz ve Streptozotocin ile Oluşturulan Diyabet Modelinde Resveratrol ve Vitamin D Tedavisinin Karaciğer ve Endoplazmik Retikulum Stresine Etkileri. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Bu çalışmada yüksek fruktoz diyeti ve düşük doz streptozotocin (STZ) uygulaması ile oluşturulan Tip 2 Diabetes Mellitus (T2DM) modelinde resveratrol, vitamin D ve kombin resveratrol/vitamin D tedavisinin karaciğer dokusunda inflamasyon, endoplazmik retikulum (ER) stresi, apoptoz ve proliferasyon üzerine etkisi araştırıldı. Her grupta 7 adet 8 haftalık erkek Sprague-Dawley sıçan olmak üzere 8 deney grubu oluşturuldu. Diyabet gruplarına 2 hafta süre ile %10'luk fruktoz uygulaması yapıldı. 2. haftanın sonunda tek doz streptozotocin enjeksiyonu (40 mg/kg) yapıldı. Ardından 3 hafta süreyle %10'luk fruktoz diyeti uygulanarak T2DM modeli oluşturuldu. 5. haftanın sonunda ilgili deney gruplarındaki sıçanlara resveratrol (1 mg/kg/gün, i.p), vitamin D (oral 170 IU/hafta) ve resveratrol/vitamin D kombin uygulaması yapıldı. 9. haftanın sonunda sıçanlar kontrol grupları ile beraber sakrifiye edilerek karaciğer dokuları alındı. Karaciğer doku kesitlerine PCNA, NF- κ B, TNF- α , IL-6, IL-1 β , GRP78 ve Kaspaz-3 antikorları kullanılarak immünohistokimya yöntemi uygulandı. Elde edilen tüm sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi. Tedavi uygulanmayan diyabet kontrol (F) grubunun STZ uygulamasının ardından deney sonuna kadar açlık kan şekeri değerleri yüksek giderken tedavi uygulanan FR, FD ve FDR gruplarında açlık kan şekerinin düştüğü saptandı. F grubunda NF- κ B, TNF- α , IL-6, IL-1 β , GRP78 ve Kaspaz-3 proteinlerinin ekspresyonlarının diğer gruplara göre anlamlı olarak yükseldiği saptandı (p<0.001). Resveratrol, vitamin D ve kombin tedavilerinin ise bu proteinlerin ekspresyonlarını anlamlı olarak azalttığı saptandı (p<0.001). Bu çalışma ile Wilson ve İslam'ın Tip 2 diyabet modeli modifiye edilerek diyabet tedavisinin araştırılmasında kullanılmak üzere yeni bir model geliştirildi. Resveratrol ve vitamin D'nin, inflamasyon ve ER stresi üzerine benzer etkileri olduğu saptandı. Resveratrol/vitamin D kombin tedavisinin kan şekerini düşürmede, inflamasyon, ER stresi ve apoptozu önlemede daha etkili olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Fruktoz, Streptozotocin, Resveratrol, Vitamin D, Endoplazmik retikulum Stresi

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2017-26139

ABSTRACT

Anapalı, M. (2018). Effects of Resveratrol and Vitamin D Treatment on Liver and Endoplasmic Reticulum Stress in Fructose and Streptozotocin induced Diabetes Mellitus Model. İstanbul University, Institute of Health Science, Medical Biology. Master Thesis. İstanbul.

In this study, we researched that effect of resveratrol and vitamin D treatment on liver endoplasmic reticulum stress, inflammation, apoptosis and proliferation in fructose and streptozotocin induced T2DM model. In our study, 8-week-old male Sprague-Dawley rats were randomly subdivided into 8 groups of 7 animals in each group. T2DM groups were supplied with 10% fructose solution *ad libitum* and after 2 weeks fructose fed rats were injected streptozotocin (40 mg/kg bw.). Then supplied with 10% fructose solution for 3 weeks. At the end of 5 weeks related-group rats were treated with resveratrol (1 mg/kg/day bw), vitamin D (oral 170/IU/week) or resveratrol (1 mg/kg/day bw) and vitamin D (oral 170/IU/week) for 4 weeks. At the end of 9 weeks rats were sacrificed and liver tissues were taken with ketamin/ksilazin anesthesia. For histological evaluation, immunopositivity scoring was performed by liver of PCNA, NF- κ B, TNF- α , IL-6, IL-1 β , GRP78 and Caspase- 3 proteins expression levels of these 7 proteins by immunohistochemical staining method. All findings were statistically analyzed. After STZ injection, fasting blood glucose was high in fructose control group in contrast to others. In diabetic group PCNA, NF- κ B, TNF- α , IL-6, IL-1 β , GRP78 and Caspase-3 were higher than other groups ($p < 0,001$). Resveratrol and vitamin D combined treatment significantly decreased expression of these proteins ($p < 0,001$). A new T2DM model was developed with this study by modifying Wilson-İslam T2DM model. We suggest that resveratrol and vitamin D have same effects on inflammation and ER stress. Resveratrol and vitamin D are effective on inflammation, ER stress, apoptosis and fasting blood glucose.

Key Words: Fructose, Streptozotocin, Resveratrol, Vitamin D, Endoplasmic reticulum Stress

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No.TYL-2017-26139

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetes Mellitus, tüm dünyada yaygın olarak görülen kronik metabolik bir hastalıktır. Tip 2 Diabetes Mellitus (T2DM), beta hücrelerinin fonksiyon bozukluğu ve kaybı, buna bağlı olarak periferik dokularda insülin rezistansı ve insülin duyarlılığında azalma sonucunda gelişen hiperglisemi ile karakterizedir (1, 2). Yakın gelecekte diyabetin görülme sıklığının ve diyabet kaynaklı ölümlerin ciddi oranda artacağı öngörülmektedir (3).

Diyabet komplikasyonlarının araştırılması ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için çeşitli deneysel hayvan modelleri kullanılmaktadır (4). T2DM için; genetik olarak Tip 2 diyabetine yatkın hayvan modelleri ve çeşitli diyabetojenik ajanlarla (streptozotocin, alloksan) ya da diyet ile (yüksek fruktoz veya yüksek yağlı diyet) oluşturulan modeller kullanılmaktadır. Genetik olarak Tip 2 diyabetik hayvan soylarının kullanımı hem pahalı hem de zordur. Kimyasal ajan kullanılarak oluşturulan Tip 2 diyabet modeli, Tip 1 modele benzerlik göstermektedir. Yüksek fruktoz ya da yağlı diyet ile beslenerek oluşturulan modeller ise araştırmanın deneysel maliyetini artıran uzun bir diyabet oluşum süresine ihtiyaç duymaktadır.

Yakın bir zamanda Wilson ve Islam (2012) tarafından yüksek konsantrasyonlu fruktoz diyeti ve düşük doz streptozotocin (STZ) enjeksiyonu ile indüklenen yeni bir tip 2 diyabet modeli geliştirilmiştir (5). Bu yeni model, T2DM oluşturmak için alternatif bir model olarak kullanılmaya başlamıştır. %10'luk fruktoz diyeti ve düşük doz streptozotocin (40 mg/kg) enjeksiyonu ile geliştirilen tip 2 diyabetli sıçan modelinde genetik olmayan ancak hastalığın kendi patogeneze en yakın olan bir model geliştirilmiştir. Bu modelde deney grubunda kan glukozu, serum lipidleri, karaciğer glikojenleri, karaciğer enzimleri, insülin direnci, vücut ağırlığı, oral glukoz toleransı, pankreatik beta hücrelerinin sayısı ve fonksiyonu ve anti diyabetik ilaçlara verilen cevap incelenmiş ve modelin diyabet araştırması için iyi bir perspektife sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Yüksek yağ ve Streptozotocin (STZ) ile indüklenen diyabet modeliyle kıyaslandığında maliyetinin daha düşük ve kullanılan metotla diyabetin daha kolay indüklendiği görülmüştür.

Fruktoz, glukoz ile aynı moleküler formüle sahip ($C_6H_{12}O_6$) ancak kimyasal yapıları ve metabolik yönleri farklı basit altı karbonlu bir monosakkarittir. Fruktoz sanayi toplumlarında endüstriyel bir tatlandırıcı olarak yiyecek ve içeceklerde kullanılmaktadır (6). Tüketimindeki artışın obezite insidansı ile yakın ilişkili olduğu düşünülmektedir (7). Fruktozun neredeyse tamamı karaciğerde metabolize edilmektedir (8). Hepatik fruktoz metabolizması artmış lipogenesis ve vLDL üretimi ile sonuçlanır. Fruktoz hepatic lipogenesis ile artışla hipertrigliseremiye indükler (9, 10). Sadece 1 hafta yüksek fruktoz diyeti uygulanan sağlıklı genç bireylerin karaciğer ve bağırsaklarında ektopik yağ depolanmasında artış görülmüştür (11).

Yüksek fruktoz ile beslenmenin oksidatif stres (12-14) ve endoplazmik retikulum stresi ile karakterize edilen (15-18) hepatic stres cevabını tetiklediği (19) yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Endoplazmik Retikulum (ER) stresi, karaciğerde lipid metabolizması ile ilişkilidir (20). ER, proteinlerin sentez ve katlanmasından sorumlu ağ yapısında bir organeldir. ER stresi, katlanmamış ya da yanlış katlanmış protein birikimi ile karakterize edilen fonksiyon bozukluğudur (21). ER stresinin T2DM ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (22).

Resveratrol, 70'den fazla bitkide bulunan antioksidan, anti-inflamatuar ve anti-tümör özelliğe sahip toksik olmayan fitoöstrojen bir maddedir (23, 24). Resveratrolün insülin duyarlılığını düzenleyen thiazolidinedionelar ile benzer etkiye sahip olması resveratrolü T2DM tedavisi için alternatif bir seçenek haline getirmiştir (25). Deneysel obez sıçan modelinde resveratrolün karaciğerde ER stresine karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğu (26), ayrıca T2DM sıçan modelinde sıçanlara uygulanan resveratrol tedavisi ile inflamasyonun önlendiği gösterilmiştir (27).

Anti-diyabetik ilaç kullanımına alternatif olarak, vitamin D'nin T2DM tedavisinde kullanılabileceği yapılan çalışmalarla desteklenmiştir (28). Kolekalsiferol (vitamin D₃) hormon öncülü olup, karaciğer ve böbrekte hidroksilasyon sonrası biyolojik olarak aktif formuna dönüşür (29). Vitamin D₃'ün, immün regülatör etkileri gibi pleiotropik fonksiyonları yapılan çalışmalarda öne sürülmüştür (30). Ayrıca vitamin D₃'ün ER stresini baskıladığı (31, 32) ve insülin duyarlılığını geliştirdiği (33) yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. İnsülin molekülü ve insülin reseptörlerinin

sentezinden sorumlu genlerin transkripsiyonel aktivasyonuna aracılık ettiği (34), ve bu özelliğinden dolayı kolekalsiferolün T2DM ile karakterize edilen insülin direncinde ve azalmış insülin sekresyonunda iyileşme sağlayabildiği (35) ve anti inflamatuvar özellikte olduğu (36, 37) gösterilmiştir.

Resveratrolün tek başına T2DM tedavisinde kullanılmasının yanı sıra metformin gibi farklı anti-diyabetik ilaçlarla birlikte kullanıldığında daha iyi sonuçlar elde edildiği bulunmuştur (25). Resveratrolün vitamin D'nin etkinliğini artırarak ER stresinin azaltılmasında gösterdiği etki (31, 38) yapılması planlanan projenin çıkış noktası olmuştur. Bu çalışma ile Wilson-İslam'ın yüksek fruktoz ve düşük doz STZ ile oluşturduğu T2DM modeli modifiye edilerek literature yeni bir T2DM modelinin eklenmesi amaçlandı. Geliştirilen bu model ile diyabet oluşturulduktan sonra yüksek fruktoz diyetinin tedavi ile ne kadar geri döndürülebildiği sorusuna cevap arandı. Bu sebeple geliştirdiğimiz model ilk olma özelliği taşımaktadır. Bu çalışmada yüksek fruktoz diyeti ve düşük doz streptozotocin (STZ) uygulaması ile oluşturulan T2DM modelinde resveratrol, vitamin D ve resveratrol/vitamin D kombin tedavisinin karaciğer dokusunda ER stresi, apoptoz ve inflamasyon üzerine etkilerinin araştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KARACİĞER

Karaciğer, birbiriyle zayıfça sınırlanmış sağ ve sol olmak üzere iki büyük lob ve kuadrat ve kaudat olmak üzere iki küçük lobtan oluşan insan vücudunun en büyük organıdır (39). Glisson kapsülü olarak adlandırılan kollajen ve elastik lif içeren kapsül ile çevrenmiştir ve periton ile kaplıdır (40). Karaciğerin fonksiyonel ve yapısal birimi hepatik lobül olarak bilinen karaciğer lopçuğudur. Karaciğer lopçuğu birbirleri ile anastomoz yapan ve sinüzoid boşluklarla çevrili hepatosit plaklardan oluşmaktadır (40).

Karaciğer kandan besinlerin ve vitaminlerin alınması, depolanması ve dağıtılmasında önemli rol oynamaktadır. Enerji gereksinimine bağlı olarak, glikoz-6-fostat ya karaciğerde glikojen formunda depolanır ya da glikolitik yollarda kullanılır. Açlık esnasında glikojen glikojenoliz süreci ile parçalanır ve glukoz kan dolaşımına salınır. Lipid metabolizmasında da rol alan karaciğerde plazmadan türetilen yağ asitleri enerji sağlamak amacıyla beta-oksidasyon ile hepatositler tarafından tüketilir. Demirin depolanmasında, metabolizmasında ve homeostazında görev almaktadır. Bunun yanında çok sayıda toksik madde ve ilacı elimine etmektedir (39).

Karaciğer ayrıca ürettiği safra tuzları, fosfolipidler ve kolesterol içeren safra salgısı ile ekzokrin organ özelliğine sahiptir. Sindirim kanalı, pankreas ve dalaktan gelen maddeler de dahil olmak üzere çok sayıda metabolik dönüşümde görev almaktadır. Ekzokrin fonksiyonunun yanı sıra karaciğer vitamin D, tiroksin, büyüme hormonu, insülin ve glukagon gibi birçok hormonunun yapı ve fonksiyonunu modifiye ederek endokrin fonksiyon da göstermektedir (39).

2.1.1. KARACİĞERİN YAPISAL ORGANİZASYONU

1. Parankim

Sinüzoid kapillerle birbirinden ayrılan organize hepatosit plaklardan oluşmaktadır.

2. Bağ dokusu yapısındaki stroma

Glisson kapsülünün devamı niteliğinde olan bağ dokusu yapısındaki stromanın içinde kan damarları, sinirler, lenf damarları ve safra kanalları ilerlemektedir.

3. Sinüzoidler (sinüzoidal kapillerler)

Hepatosit plakların arasında bulunan vasküler kanallardır.

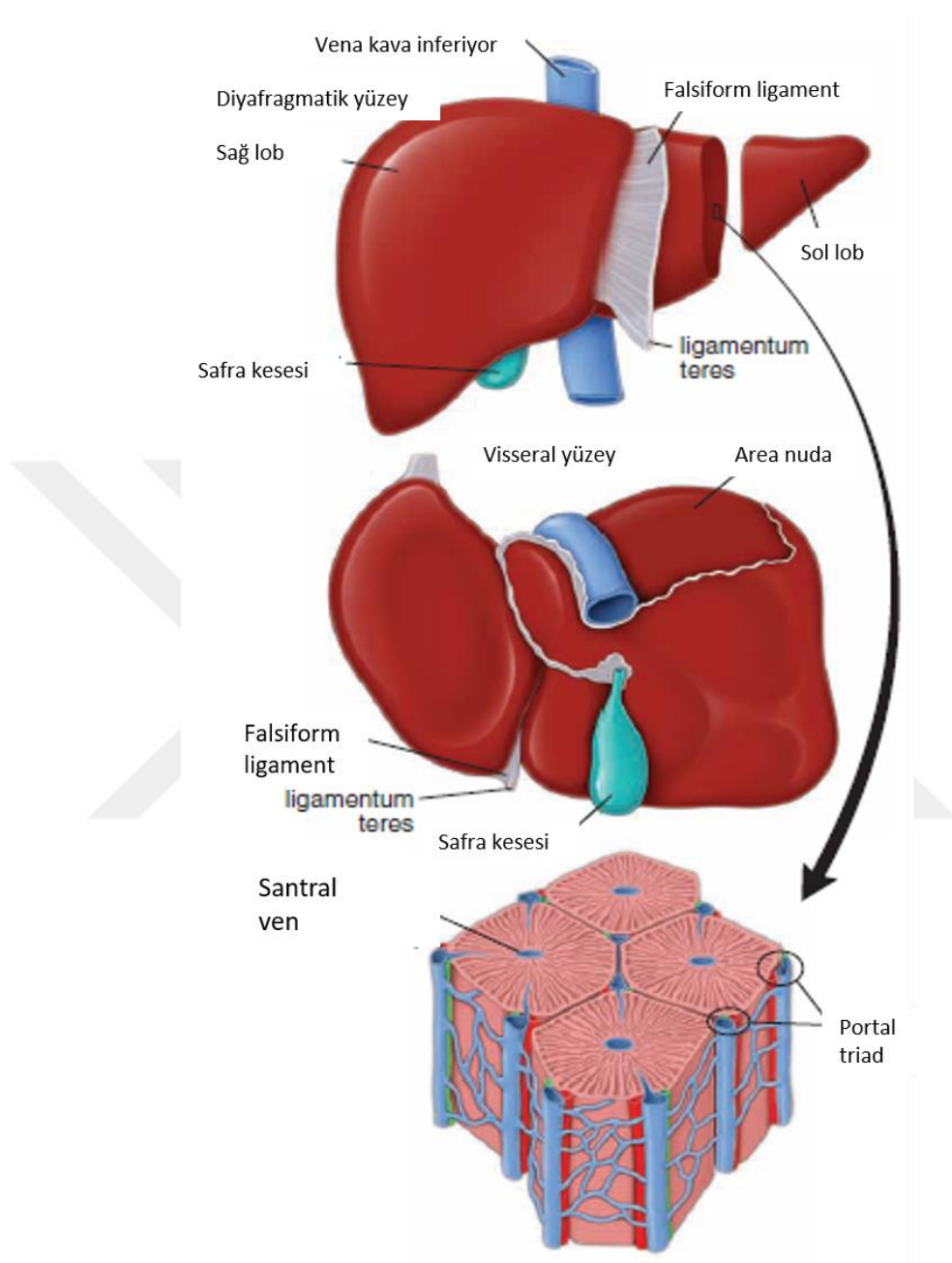
4. Disse aralıkları (perisinüzoidal aralıklar)

Hepatositler ile sinüzoid endoteli arasında bulunmaktadır.

Hepatik sinüzoidlerin duvarlarında ikinci bir hücre tipi olan yıldızsı sinüzoidal makrofaj ya da Kupffer hücresi bulunmaktadır. Kupffer hücreleri mononükleer fagositik sisteme aittir. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve transmisyon elektron mikroskobu (TEM), Kupffer hücrelerinin sinüzoidlerin bir parçası olduğunu göstermektedir. Kupffer hücrelerinin yapısında bulunan ferritin formundaki alt fragmentler ve demir bunların dalaktan karaciğere ulaşan bazı hasarlı ya da yaşlı kırmızı kan hücrelerinin elimine edilmesinde rol alabileceğini düşündürmektedir (39).

Perisinüzoidal boşlukta bulunan diğer bir hücre tipi ito hücresi olarak da bilinen hepatik yıldızsı hücreleridir. Mezenkimal orijinli bu hücrelerde hepatik A vitamini depo edilmektedir. Kronik inflamasyon ya da karaciğer sirozu gibi patolojik durumlarda hepatik yıldızsı hücreleri lipid ve A vitamini depolama yeteneklerini kaybederek miyofibroblastlara farklılaşır ve kollajen sentezler. Perisinüzoidal alanda biriken tip I ve tip III kollajen, karaciğer fibrozu ile sonuçlanmaktadır. Bu hücrelerin hepatik fibrojenizde önemli rol aldığı düşünülmektedir (39).

Hepatosit, hepatik lobülün fonksiyonel olan ekzokrin ve endokrin hücrelerdir. Karaciğer lobülünün anastomoz yapan hücre plakalarını oluşturmaktadır (40). Geniş, çok kenarlı ve yaklaşık 20-30 µm büyüklüğündeki hücrelerdir. Karaciğer popülasyonunun yaklaşık %80'ini oluşturmaktadır (39). Ömürleri yaklaşık 5 aydır ve hücreler kendini yenileyebilir özelliktedir. Hepatositler hücre başına 200 ile 300 arasında değişen peroksizomları ile hidrojen peroksiti oksijen ve suya parçalamaktadır. Kandan kaynaklanan maddelerin emiliminde, albümin, fibrinojen, protrombin ve koagülasyon faktörleri gibi plazma proteinlerinin salgılanmasında, kolesterol ve safra tuzlarının sentezinde, bilirubin, steroidler ve ilaçların glükuronid ile konjugasyonunda, glukojenin glukoza yıkımında, serbest yağ asitlerinin trigliseritlere esterleşmesinde, tiroid hormonları olan triiyodotironinden ve tiroksinden iyodun uzaklaştırılmasında görev almaktadır (40). Bunun yanı sıra içerdiği enzimlerle toksin ve ilaçların degradasyonunda görev almaktadır.



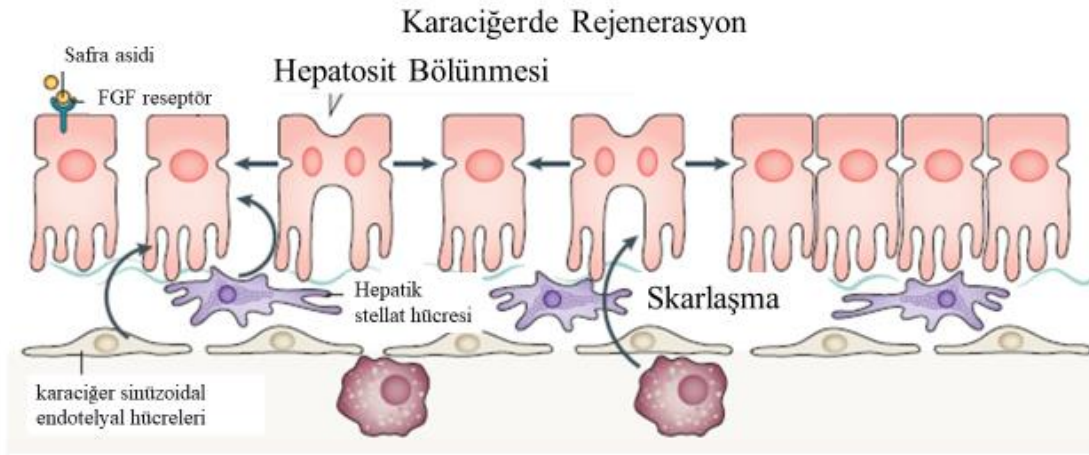
Şekil 2.1: Karaciğerin anatomik yapısı. Karaciğerin diyafragmatik ve viseral yüzeylerinde bulunan her bir bölge gösterilmiştir. Karaciğerin (altta) genişlemiş kesit alanı görülmektedir. Her bir lobülün periferinde hepatik portal triadlar ve lobülün merkezinde santral ven olarak bilinen terminal hepatik venül bulunmaktadır (39)'dan değiştirilerek.

2.1.2. KARACİĞERDE ONARIM

Hepatositlerin mitoz yetkinlikleri sebebiyle bu hücreler sürekli kendini yenilemektedir. Meydana gelen hasar durumunda geniş çaplı bir onarım başlar ve karaciğer $\frac{3}{4}$ 'ünü yaklaşık 6 ay içinde onarır. Bu yenilenmede hepatositler, yıldız hücreleri (İTO), kolanjiyositler ve yaşam boyu varlığını sürdüren kök hücreler görev alır. Karaciğer lobülündeki yenilenme genellikle periportal taraftan perisentral (merkez venülün olduğu bölge) tarafa doğrudur. Rejeneratif süreç çoklu uyarılarla karşılaşıldığında hepatositlerde hücre döngüsü G0 fazından G1 fazına alınmaktadır bu başlangıç fazıdır. Bu aşamayı, mitojenlerin yardımıyla mitozu başlatan proliferasyon fazı ve TGF- β , activin gibi negatif faktörlerin kontrolü altında proliferasyonunun durdurulduğu terminasyon fazı takip etmektedir (41).

Yıldız hücreleri (İTO) tarafından sentezlenen HGF hepatositlerde DNA ve protein sentezini uyararak hücrelerin çoğalmasını ve olgunlaşmasını sağlar (41). Kupffer hücrelerinin hepatik yaralanmalarda uyarıcı ve engelleyici etkiye sahip immün düzenleyici mediatörleri ve sitokinleri ürettiği bilinmektedir. Hepatik makrofajlar NF- κ B sinyal yolu aracılığıyla TNF- α ve IL-6'nın ana kaynağıdır. IL-6 pleiotropik bir sitokindir. TNF- α bağımlı ya da bağımsız durumlarda inflamasyon boyunca salgılanır. Karaciğer hasarına cevapta IL-6 akut faz proteinleri düzenler ve hem sitoprotektif hem de mitojenik fonksiyonları uyarır (41). Klinikte karaciğer onarımı anti-inflamatuvar bir olay olarak kabul edildiğinden NK hücrelerinin bu süreçte rolü olduğu düşünülmektedir. NK hücreleri onarım yanıtını geciktirici etki göstermektedir (42, 43).

Proliferasyon fazında hücrelerin G1 fazından mitozla geçişleri tetiklenmektedir. Bu fazda görev alan hepatosit büyüme faktörü (HGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), dönüştürücü büyüme faktörü- α (TGF- α) gibi mitojenik faktörler DNA sentezi ve hücre proliferasyonunun uyarılmasını sağlayan genleri aktive etmektedir (41). Normal karaciğer kitlesi/vücut kitlesi %2.5 civarında olduğunda karaciğer rejenerasyonu sonlandırılır. Sonlanma mekanizması net olarak anlaşılmış olmasa da en iyi bilinen anti-proliferatif faktörlerin TGF- β (dönüştürücü büyüme faktörü) ve TGF- β ilişkili aile üyeleri olduğu bilinmektedir (44). Ayrıca son aşamada sayıca fazla olan hepatositler Shh sinyal yolağının etkisiyle apoptoz ile azaltılarak doku şekillenmesi tamamlanır (43).



Şekil 2.2: Karaciğer rejenerasyonu (45)'den değiştirilerek

Kısmi hepatektomi ya da çeşitli uyarılarla oluşturulan karaciğer hasarı modelinde normal karaciğerde rejenerasyon uyarılır. Safra asitlerinin regülasyonu hızlı bir şekilde artar ve karaciğerde serum faktörleri rejenerasyonu uyarır. Makrofajlar, hepatik yıldız hücreleri (HSC) ve karaciğer sinüzoidal endotelial hücreleri (LSECs) hepatositlere sinyal göndererek mitotik olarak sessiz fazdan ayrılıp mitoz girmelerini uyarır. Hepatik yıldız hücreleri miyofibroblastlara aktif değildir ve burada çok az yara dokusu bulunur ya da hiç bulunmaz. (şekil 2.2) (45).

1980'lere kadar karaciğerde kök hücre bulunmadığına inanılmaktaydı. Karaciğer hücresinde mitozun artışı cerrahi hepatektomi ya da kimyasal ajanlarla parankime hasar vererek hepatositlerin yenilenmesi ile gerçekleşmektedir. Örneğin, karaciğerinin %70'i çıkarılan bir sıçanın karaciğer kütlelerinin yerine gelme süresi 5-7 gündür. Benzer şekilde CCl_4 ile hasar verilmiş olan merkez kanal etrafındaki parankim, çevredeki hepatositler tarafından kısa sürede onarılmaktadır. Hepatosit yenilenmesinde kök hücrelerin rolü olduğunun somut bir ifadesi henüz olmasa da normal hepatositlerin çoğalmasının baskılandığı durumlarda karaciğer kök hücrelerinin devreye girerek hepatositleri oluşturduğu kabul edilmektedir (46).

Yetişkin bir insanda Hering kanalı olarak bilinen safra kanalcıklarının küçük son uçlarına yerleşmiş öncül hücreler bulunmaktadır (43, 46). Bu hücreler karaciğer kök hücresi olarak kabul edilmektedir; tanım olarak kemiricilerde yıllardır bilinen oval hücrelere denk gelmektedir (43, 47). Oval hücreler küçük boyutta, oval şekilli nukleusa ve sınırlı sitoplazmaya sahiptir (48, 49). Bu hücreler toksinle uyarılmış yaralanma ve hepatokarsinogenez modellerinde görülmektedir (50, 51). Oval hücrelerinin yanı sıra karaciğer kök hücreleri duktular hepatositler, ara hepatobiliar hücreler olarak bilinmektedir (52). Hering kanallarındaki SK19 içeren bu hücreler hasar durumunda lobülün içine doğru göç ederek hepatositlere dönüşmektedir (43, 53).

2.2. DIABETES MELLİTUS

Diabetes Mellitus (DM), karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmasındaki bozulmaya bağlı kronik hiperglisemi ile karakterize metabolik bir hastalıktır. İnsanlığın ilk zamanlarından beri görülen en eski hastalıklardan biridir. İlk olarak 3000 yıl önce Mısır yazıtlarında rapor edilmiştir. 1936 yılında Tip 1 ve Tip 2 diyabet arasındaki fark net bir şekilde ortaya çıkarılmıştır (54).

Hastalığın orijin ve etiyolojisi farklılık göstermekle beraber en sık görülen tipleri hiperglisemi, insülin direnci ve insülin eksikliği ile karakterize edilmiş idiopatik Tip 1 Diabetes Mellitus (T1DM) ve insülin bağımlı olmayan Tip 2 Diabetes Mellitus (T2DM)'dur (55).

Dünya genelindeki prevalansı fazladır ve gün geçtikçe artmaktadır. Yakın gelecekte diyabet kaynaklı ölümlerin artacağı düşünülmektedir. Diyabetli ya da pre-diyabetli hastaların erken dönemde tespiti gelecekte oluşması muhtemel komplikasyonların azaltılmasında oldukça önemlidir (3).

2.2.1. DİABETES MELLİTUS'UN SINIFLANDIRILMASI

WHO tarafından 1980 ve 1985 yılında önerilen İnsülin Bağımlı ve İnsülin Bağımsız Diyabet yerini T1DM, T2DM, Gestasyonel ve diğer diyabet türleri olmak üzere temelde 4 başlığa bırakmıştır.

2.2.1.1. TİP 1 DİABETES MELLİTUS (T1DM)

Jüvenil diyabet olarak bilinen T1DM, insülin eksikliğine sebep olan otoimmün bir sürecin neden olduğu beta hücre yıkımı ile karakterize edilmektedir (56). T1DM'li hastalar normogliseminin sürdürülmesi için insülin kullanmak zorundadır. Bu hastalarda kilo kaybı, poliüre, polidipsi, polifaji, kramplar ve bulanık görme gibi semptomların yanı sıra hastalığın ilerleyen seyrinde mikrovasküler ve makrovasküler hastalıklar görülmektedir (57, 58).

Hastalığın patofizyolojisinde T1DM'i otoimmün bir hastalık olarak tanımlayan bazı özellikler bulunmaktadır.

1. Adacık hücre spesifik oto-antikorlarının varlığı
2. Özellikle CD4+ T hücrelerinde, T hücre ilişkili immünregülasyonda meydana gelen değişimler
3. Hastalık sürecinde interlökin üreten TH1 hücreleri ve monokinler
4. MHC'nın sınıf II genleriyle birlikte hastalığa karşı gösterdiği duyarlılık
5. İmmünoterapiye karşı verilen cevap
6. Hastalıktan etkilenen bireyde ya da aile üyelerinde diğer organlarda sıklıkla görülen organ spesifik oto-immün hastalıklar

2.2.1.2. TİP 2 DİABETES MELLİTUS (T2DM)

T2DM, pankreatik beta hücre kaybı ya da fonksiyon bozukluğu sonucu ortaya çıkan hipergliseminin periferik dokularda neden olduğu insülin direnci ile karakterize metabolik bir hastalıktır (59). Genetik yatkınlığın yanı sıra yaş, obezite, hipertansiyon, hiperlipidemi T2DM riskini artırmaktadır (59, 60). T2DM tedavisinde insülinin yanı sıra 4 ana başlıkta oral antidiyabetik ajan kullanılmaktadır.

1. Pankreastan insülin salınımını stimüle eden ilaçlar. Bunlar glibenclamide, glipizide gibi sülfonilürea ve insulintropiklerdir
2. Hepatik glukoz üretimini azaltan ilaçlar. Bunlar metformin gibi biguanidlerdir.
3. İntestinal karbonhidratın absorpsiyonunu ve sindirimini geciktiren ilaçlar. Bunlar akarboz gibi α -glukozidaz inhibitörleridir.
4. İnsülin hareketini artıran ilaçlar. Bunlar pioglitazone ve rosiglitazone gibi thiazolidinedione'lardır (61).

2.2.1.3. GESTASYONEL DİYABET

Kadınlarda gebelik döneminde görülebilen diyabet tipidir. Gebeliği süresince T1DM geliştiren ve gebeliği süresince tanısı konmamış asemptomatik T2DM olan kadınlarda keşfedilen bu diyabet tipi gestasyonel diyabet olarak sınıflandırılmıştır (62).

2.2.1.3. DİĞER DİYABET TÜRLERİ (MONOGENİK DİYABET)

Bu grup diyabete sahip insanlarda;

1. MODY (Maturity-Onset Diabetes in youth) olarak tanımlanan beta hücre fonksiyonunda ve insülin salınımında bozulmaya sebep olan genetik bir hastalık
2. Pankreatitis ya da ekzokrin pankreas hastalığına sahip olmaları sebebiyle insülin salınımında görülen kusur ve
3. İlaç, kimyasal ya da enfeksiyon sebebiyle pankreas fonksiyonunda ortaya çıkan kusur bulunmaktadır (63).

2.2.1.5 DENEYSSEL TİP 2 DİABETES MELLİTUS MODELLERİ

Hayvanlar üzerinde uygulanan diyabet modelleri hastalığın patogenezi aydınlatmada kullanışlı bir seçenek haline gelmiştir. Hayvanlardaki T2DM modelleri diyet, kimyasal ajanlar, cerrahi uygulamalar ya da genetik olarak yatkın hayvanlarda spontan olarak oluşturulmaktadır. Son yıllarda moleküler teknikler kullanılarak diyabet çalışmalarında kullanılmak üzere transgenik ve knockout diyabetik hayvan modelleri geliştirilmiştir.

Sıçanlarda oluşturulan T2DM modeli glukoz metabolizmasındaki bozulmanın yanı sıra değişen lipid metabolizmasının diyabetik insanlardaki durumlarla benzer olması sebebiyle diyabet çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca, aterosklerozis, hipertansiyon, nefropati, nöropati ve kardimiyopati gibi diyabet komplikasyonları da T2DM modeli oluşturulan hayvanlarda görülebilmektedir (64, 65).

2.2.1.5.1. SPONTAN TİP 2 DİABETES MELLİTUS MODELİ

ob/ob, db/db fareler gibi bazı deney hayvanları genellikle tek gen ya da çoklu gen mutasyonlarına sahiptir. Goto Kakizaki sıçan gibi bazı soylar diyabetik olmayan hiperglisemik hayvanlardan seçilerek birkaç nesil çoğaltılarak elde edilir (66).

2.2.1.5.2. DİYET YA DA BESLENME İÇERİĞİNDE DÜZENLEMELERLE OLUŞTURULAN TİP 2 DİABETES MELLİTUS MODELİ

Bu modelde deney hayvanları yüksek enerjili besinlerle beslenir. Hayvanlarda hiperinsülinemi, obezite, insülin direnci, pankreatik beta hücre deformasyonu ve glukoz intoleransı gözlenir. Sand rat, Tuco-Tuco ve Spiny Mouse beslenme içeriğinin düzenlenmesiyle indüklenen obezite ve Tip 2 diyabet modelinde kullanılan hayvanlardır (67).

2.2.1.5.3. CERRAHİ YÖNTEMLERLE OLUŞTURULAN TİP 2 DİABETES MELLİTUS MODELLERİ

Bu metotla hayvanların pankreasının tamamı ya da bir kısmı alınarak T1DM ve T2DM diyabet modeli oluşturulmaktadır. Oskar Minkowski köpekler üzerinde yaptığı pankreatektomi ile cerrahi yöntemle oluşturulmuş ilk diyabet modelini yapmıştır (68). Köpek, domuz, tavşan ve sıçanlar üzerinde yapılan kısmi panreatektomi (yaklaşık %90) ile ilgili çalışmalar mevcuttur (64, 65) . Bu diyabetin şiddetli formuna sebep olmaz. Uzun vadede diyabetin sağlanması ve glisemi seviyesinin daha net olması için pankreatektomi ile birlikte STZ veya alloxan uygulaması yapılır (69). Anti-diyabetik ajanlarla ile hiperglisemi ve insülin direncinde iyileşme görülmüştür (70).

2.2.1.5.4. TRANSGENİK ve KNOCKOUT TİP 2 DİABETES MELLİTUS MODELLERİ

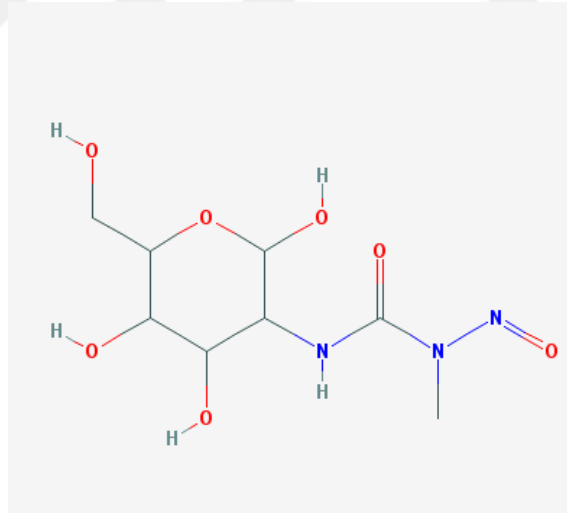
Son yıllarda gelişen moleküler tekniklerle beraber hastalığın patogenezinin altında yatan spesifik gen ürünleri ve çevresel koşulların hastalık üzerine etkisi, yeni hedefler ve tedavi daha net şekilde ortaya konulmaktadır. Transgenik çalışmalar ilgili alanda yapılan çalışmalara büyük ivme kazandırmıştır. Teknik, fonksiyonel genlerin ekspresyonundaki değişiklikler ve spesifik endojen genlerin silinmesi ya da promotör bölgelerin kontrolü altında yer değiştirilmesi esasına dayanır (71). T2DM ile ilişkili olarak çalışmalarda kullanılmak üzere insülin reseptörü, glukoz taşıyıcı GLUT4, GLUT2, TNF- α , glukokinaz (GK), adacık amiloid peptid gibi genler için transgenik ve knockout modeller geliştirilmektedir. Genetik olarak modifiye edilmiş bu hayvanlar hiperglisemi, insülin direnci, bozulmuş glukoz toleransı göstermektedir (72-75). Maliyet ve elde edilmesinin zorluğu sebebiyle çalışmalarda kullanılmak üzere pek tercih edilmemektedir.

2.2.1.5.5. KİMYASAL AJANLARLA OLUŞTURULAN TİP 2 DİABETES MELLİTUS MODELİ

Kimyasal ajanlarla uyarılan ve obez olmayan T2DM modelinde streptozotocin (STZ) ve alloxan kullanılır. Obez diyabetik fare modeli oluşturmak için goldthioglucose (GTG) enjeksiyonu ile farelerde obezite ile birlikte T2DM oluşturulur. Enjeksiyondan 16-20 hafta sonra kademeli olarak obezite, hiperinsülinemi, hiperglisemi ve insülin direnci gözlenir (76).

2.3. STREPTOZOTOSİN

Deneyel diyabet modeli oluşturmada kullanılan kimyasal ajanlardan en yaygın olanı streptozotocin (STZ) ve alloxandır. Bir Antibiyotik olan streptozotocin (2-deoxy-2-(3-(methyl-3-nitrosoureido)-Dglucopyranose) *Streptomyces achromogenes* tarafından sentezlenir (77). Hidrofilik yapıdadır, glukoz benzeri yapısı olması sebebiyle glukozu benzer yolla beta hücrelerine girer. Beta hücre toksik glukoz analogu olarak sınıflandırılabilir. Ayrıca, STZ anti-mikrobiyal aktiviteye sahiptir ve kemoterapötik alkilleyici ajan olarak kullanılabilir (78).



Şekil 2.3 Streptozotocin kimyasal yapısı (PubChem) (79)

STZ'nin hidrofilik içeriği GLUT2 taşıyıcıları aracılığıyla hücre membranından geçişini kolaylaştırır (78). GLUT2 taşıyıcılarının azalan ekspresyonunun STZ'nin diyabetojenik etkisini azalttığı bulunması, GLUT2'nin STZ hareketinde rolü olduğunu destekler niteliktedir (80, 81). Ancak, *in vivo* ve *in vitro* şartlarda STZ'nin çoklu doz uygulamalarında GLUT2 taşıyıcılarının ekspresyonunu azaltabilmektedir.

GLUT2 taşıyıcıları sadece pankreasta eksprese edilmez, karaciğer ve böbrekte de bulunur. Bu sebeple STZ yalnızca pankreasa hasar vermez (82).

STZ uygulaması sonrası 3 farklı mekanizma ile insülin-bağımlı diyabet oluşmaya başlar (78). Tüm bu mekanizmalar DNA'nın yıkımı ile sonuçlanır. Bunlardan ilk ve en önemlisi DNA alkilenmesidir (83, 84). STZ'nin alkilleyici etkisi β hücrelerinde toksik etkiyi uyarır (85). β hücre DNA'sına STZ'den transfer edilen metil grubunun transferi DNA'nın yıkımı ile sonuçlanır (78). Diğer mekanizmada, DNA'nın yıkılması STZ'nin toksik etkisini daha da kuvvetlendirir. DNA hasarı poli(ADP-riboz polimeraz-1 PARP1)'yi aktive eder ve hücrel NAD⁺ ve ATP depolarını tüketir (78). β hücrelerinde azalan ATP β hücre nekrozu ile sonuçlanır. STZ ile indüklenmiş NAD⁺ tüketimi insülin salınım ve biyosentezinin engellenmesine neden olur (78). STZ nitrozo grupları içerdiğinden saldığı nitrik oksid ile mekanizmaya etki eder. İntraselüler nitrik oksid salınımı STZ hareketinde ana mekanizma olarak düşölmese de alternatif mekanizma olarak önemlidir. Son olarak, ROS üretimi STZ'nin diyabetojenik etkisini tetikler, serbest oksijen radikalleri β hücre yıkımını ve insülin bağımlı diyabet gelişimini hızlandırır. STZ enjeksiyonunu takiben 48 saat sonra hiperglisemi görölmeye başlar (78). Enjeksiyondan yaklaşık olarak 72 saat sonra maksimum glukoz seviyesine erişilir glukoz seviyesi hangi tip diyabetin geliştiğinin tespit edilmesine yardımcı olur. Bu noktadan sonra glukoz seviyesi normal seviyenin üstünde seyreder (78).

2.3.1. STZ İLE OLUŞTURULAN TİP 2 DİABETES MELLİTUS MODELLERİ

2.3.1.1. Yağlı Diyet ve STZ ile Oluşturulmuş T2DM

İnsan metabolizmasında kademeli olarak gözlenen değişimleri ve doğal süreci taklit eden diyabet modelidir. Yağdan zengin diyetin insülin direnci oluşumundaki etkisi gösterilmiş bunu hiperinsülinemi oluşumu takip etmiştir. Reed ve ark (86) yaptığı çalışma ile 7 haftalık Sprague-dawley sıçanları 2 haftanın üstünde %40 yağlı diyet uygulamış sonrasında intravenöz olarak 50 mg/kg STZ enjeksiyonu yapmıştır. STZ enjeksiyonu sonrası sıçanlar yağlı diyet ile beslenmeye devam etmiştir. Kontrol grubuyla kıyaslandığında deney grubundaki sıçanlarda artmış insülin, glukoz, serbest yağ asidi ve trigliserid gözlenmiştir. Bu sıçanlar uygulanan metformin gibi anti-diyabetik ajanlara cevap vermiş kan glukoz seviyelerinde düşüş gözlenmiştir. Bu modeli takiben farklı modellerde geliştirilmiştir. Diyet içeriği ve uygulanan STZ dozundaki

modifikasyonlarla farklı hayvan türlerine yağlı diyet ve STZ ile uyarılmış diyabet modeli oluşturmak mümkündür (87-89).

2.3.1.2. Nikotinamid-STZ ile Oluşturulan T2DM Modeli

Masiello ve arkadaşları tarafından geliştirilen T2DM modelidir. Nikotinamid, STZ'nin neden olduğu ciddi β hücre fonksiyon kaybını önleyerek insülin üretme yeteneğini korumuş olur ve hayvanlarda T2DM oluşumunu uyarır. Nikotinamidin koruyucu etkisi STZ'nin neden olduğu DNA hasarını tamir etmekte görevli PARP-1 aktivitesini engelleyerek gerçekleştirir (90).

2.3.1.3. Yenidoğan STZ Diyabet Modeli

Bu modelde yenidoğan Wistar Albino ya da Sprague-Dawley sıçanlara (doğumları 0 kabul edilerek) 0.-7. günler arasında tek yüksek doz (60-100 mg/kg) STZ uygulaması ile diyabet oluşturulur. Bu hayvanlar 16-20 haftalık erişkin sıçan olduklarında pankreasları incelendiğinde insan T2DM'de olduğu gibi adacıklarda insülin olduğu fakat β hücrelerinin glukozu cevaplarının bozulduğu saptanmıştır (91-93).

2.3.1.4. Fruktoz Diyeti ve STZ ile Oluşturulan T2DM

Wilson ve İslam 2012 yılında yaptığı çalışma ile T2DM oluşturmada hastalığın patogenezi en iyi taklit ettiği düşünülen genetik olmayan alternatif bir model geliştirmiştir. Metabolik sendrom oluşturmak için kullanılan fruktozun diyabet modeli oluşturmak için kullanılabilmesi düşünüldü. Fruktoz diyeti ile oluşturulan modellerde T2DM yanı sıra insülin direncinin tetiklenmesi birkaç haftayı almakta ve bu durum çalışmanın maliyetini artırmaktadır. Bu nedenle yeni bir model geliştirilmeliydi. Wilson ve İslam yaptığı çalışma ile 6 haftalık Sprague-Dawley sıçanlara 2 hafta boyunca %10, 20, 30 ve 40'luk fruktozlu su diyeti uyguladı. 2 haftanın sonunda 40 mg/kg intraperitoneal STZ enjeksiyonu uyguladı. 40 mg/kg ya da daha düşük dozlardaki STZ enjeksiyonunun T2DM modeli oluşturmada 50 mg/kg STZ enjeksiyonundan daha az etkili olduğu bilinmektedir. Ancak fruktoz diyeti uygulanan hayvanlarda fruktozun insülin direncini tetiklediği gösterilmiştir (94). Enjeksiyon sonrası sıçanlara normal içme suyu verilmiştir. Sıvı alımı, kan glukozu, serum lipidleri, karaciğer glikojeni, karaciğer enzimleri, insülin direnci, vücut ağırlığı, oral glukoz toleransı, pankreatik β

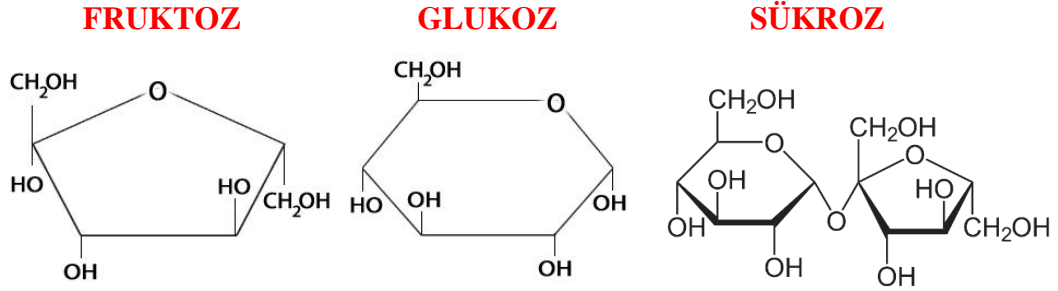
hücrelerinin sayı ve fonksiyonu değerleri dikkate alındığında %10'luk fruktozlu su verilen grupta istenen model oluşturulduğu saptanmıştır. Gruptaki sıçanlara uygulanan metformin ve glibenclamide gibi anti-diyabetik ilaçlara karşı olumlu yanıt alınmıştır (5). Erkek Syrian Golden hamster ile yapılan çalışmada 10 gün süreyle uygulanan %60 fruktoz diyetinin artan plazma insülini, serbest yağ asitleri, trigliserid ve azalmış hepatik insülin sinyali görülmüştür (95). Yağlı diyetle kıyaslandığında fruktozla indüklenen T2DM modeli daha ucuz ve model oluşum süreci daha kısadır.

2.4. FRUKTOZ

Geçmişte insanoğlunun yaşam düzeninin avcılık ve toplayıcılık olması sebebiyle günlük diyetinin çoğunu proteinden az bir kısmını da karbonhidrattan sağlamaktaydı. Şeker tüketimi 18. yy'a kadar oldukça azdı. Gelişen teknoloji sebebiyle artan rafine şeker üretimini takiben kıtalararası ticaretinin gelişmesi ve tüketiminin artması şekeri son zamanların popüler gıdası haline getirmiştir (96). 6 karbonlu bir monosakkarit olan fruktoz yüksek fruktoz içeren mısır şurubu şeklinde pek çok gıdada bulunmaktadır. Yüksek fruktoz içeren mısır şurubunda %42-55 arasında değişen fruktoz bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar insanlarda yüksek fruktoz tüketiminin metabolik hastalıklar için bir risk faktörü olduğunu göstermiştir. T2DM, insülin direnci, obezite, metabolik sendrom, dislipidemi ve alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı gibi birçok patolojinin fruktozun aşırı tüketimi ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Dünya Sağlık Örgütü ve birçok uluslararası sağlık kuruluşu yaptığı çalışmalarla fruktoz tüketimindeki artış ile obezite arasında paralellik olduğu sonucuna varmıştır (96).

2.4.1. FRUKTOZUN KİMYASAL YAPISI

Glukoz ile aynı kimyasal formüle sahip olmasına karşın yapısal olarak farklılık gösteren fruktoz birçok meyve ve sebze de bulunan basit bir şekerdir. Glukoz, 6'lı halka yapısından oluşmaktadır ve 1. karbon atomunda aldehit grubu taşır. Fruktoz ise glukozdan farklı olarak 5'li halka yapısına sahiptir ve karbon zincirinin 2. pozisyonunda keton grubu taşımaktadır. 1 molekül glukoz ve 1 molekül fruktoz α -1,4 glikozit bağı ile oluşturdukları sükroz disakkarit olarak yiyeceklerin yapısına katılır (97, 98).



Şekil 2-4 Fruktoz, glukoz ve sükrozun kimyasal yapısı (99)

2.4.2. FRUKTOZ KAYNAKLARI

Bitkisel pek çok kaynakta yüksek oranda bulunan sükroz, diyetle alınan fruktozun doğal kaynaklarıdır. Ayrıca, endüstriyel bir tatlandırıcı olan yüksek fruktozlu mısır şurubunun kullanımının artması ile fruktoz yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Yüksek fruktozlu mısır şurubu glukozun fruktoza izomerizasyonu ve şurubun çeşitli oranlarda mısır bazlı glukoz şurubu ile karıştırılması ile oluşturulur. Tatlandırıcı özelliği yüksektir, uzun raf ömrüne sahiptir ve maliyeti düşüktür. Tüm bu avantajlar yüksek fruktozlu mısır şurubunun gıda endüstrisinin pek çok alanında kullanımını yaygınlaştırmıştır (97, 100).

Günlük tüketilen fruktoz miktarı gün geçtikçe artmaktadır ve 1970'lerde kişi başına düşen fruktoz miktarı 0,5 gram civarındayken bu oran günümüzde 85-100 gram arasındadır. Bu değer bu denli artmasının altında yatan faktör fruktozun doyma hissini geciktirmesi ve ikinci acıkma hissini öne çekmesidir (101, 102).

2.4.3. FRUKTOZ METABOLİZMASI

Diyetle alınan fruktoz ince bağırsakta absorbe edilir ve neredeyse tamamı karaciğerde metabolize edilir (97). Açlık kan fruktoz düzeyi sağlıklı bir insanda 1 mg/dl veya daha azdır. Oral olarak alınan 0,25 gr/kg fruktoz sonrası plazma/serum konsantrasyonu ortalama 4,5-13 mg/dl olarak ölçülmüştür. Artan fruktoz dozuna bağlı olarak plazma/serum konsantrasyonunda artış görülmüştür (101).

2.4.4. FRUKTOZUN ABSORBSİYONU VE İNTESTİNAL METABOLİZMASI

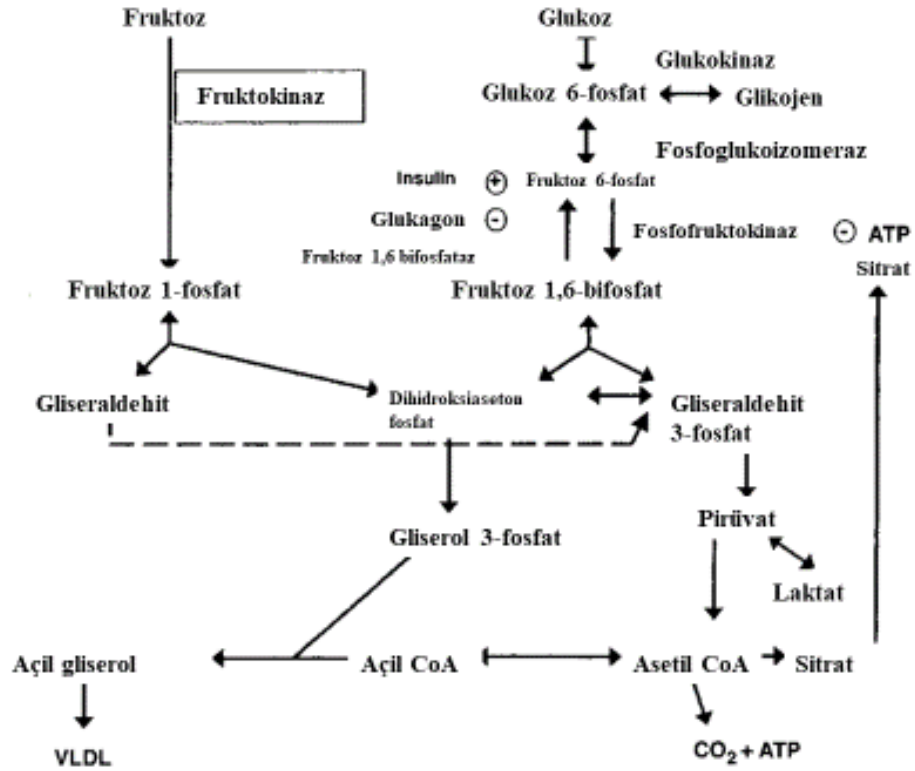
İnsülden bağımsız bir mekanizma ile işleyen fruktoz metabolizması glukoz metabolizmasından farklıdır. Enterositlerin apikal yüzeyinde glukoz taşıyıcı ailesinin bir üyesi olan glukoz taşıyıcı 5 (GLUT5) bulunur. Esasen jejunumda eksprese olurken diğer pek çok hücre tipinde de eksprese olmaktadır. GLUT5 fruktoza karşı yüksek afiniteye sahipken glukoz için kısmen daha az afinite göstermektedir. Fruktozun diyetle alımını takiben bu taşıyıcılar ile ATP hidrolizi gerektirmeden kolaylaştırılmış difüzyonla hücre içine alınır. Enterositlerin bazolateral membranlarında yer alan GLUT2 taşıyıcıları aracılığıyla kan damarlarına difüze olur (97, 101, 103). GLUT2; glukoz, fruktoz ve galaktozun taşınmasında tek yönlü olarak görev almaktadır (104). Fruktoz absorpsiyonu bireyler arasında farklılık göstermektedir. Oral yolla alınan fruktozun çoğu bağırsakta absorbe edilirken az bir kısmı laktata dönüştürülerek portal dolaşıma aktarılır. Glukoz metabolizmasıyla kıyaslandığında fruktoz metabolizmasında laktata dönüşen yüzdenin daha fazla olduğu tespit edilmiştir (105).

2.4.5. HEPATİK FRUKTOZ METABOLİZMASI

Absorpsiyon sonrası, fruktoz portal ven aracılığı ile karaciğere taşınır. Hepatositlere GLUT2 yoluyla alınır. Fruktozun metabolize edilmesi insülden bağımsız olarak gerçekleşir (106). Fruktoz, Fruktokinaz (ketoheksokinaz) enzimi ile fosforillenerek fruktoz-1-fosfata dönüştürülür. Fruktoz-1-fosfat, aldolaz B enzimi ile metabolize edilerek gliseraldehit, dihidroksiaseton fosfat ve gliseraldehit-3-fosfat gibi trioz fosfat denen 3 karbonlu ara bileşikler oluşur. Bu ürünler direkt olarak glikolitik yolla piruvat oluştururken piruvat mitokondride krebs döngüsüne katılarak uzun zincirli yağ asitlerinin *de novo* sentezinde görev alır (107).

Fruktozdan farklı olarak karaciğere gelen glukoz GLUT4 ile hücre içine alınır ve insülin bağımlı bir olaydır. Glikolitik yolağa glukokinaz (heksokinaz IV) kontrolünde girer. Enzim glukozu, glukoz-6-fosfata fosforiller. Glukoz-6-fosfat, fruktoz-6-fosfat ve fruktoz-1,6-difosfata dönüştürülerek krebs döngüsüne katılır. Fruktoz-6-fosfatın fruktoz-1,6-bifosfata dönüşümü glikolitik yolağın yan ürünleri olan ATP ve sitrat ile inhibe edilebilen fosfofruktokinaz enzimi ile gerçekleştirilir. Glukoz metabolizması hücrenin enerji durumuna göre kontrol edilir, glikojen üretimi tetiklenir ve böylece karaciğer fazla glukoz alımını önlenmiş olur. Bu sebeple glukoz metabolizmasından

farklı olarak fruktoz metabolizmasının lipojenik etkisi olduğu bilinmektedir (97, 98, 106, 108, 109).



Şekil 2.5 Karaciğerde fruktoz ve glukoz metabolizması (110)'den değiştirilerek

Glukagon benzeri peptid-1 ve kolesistokinin gibi hormonlar metabolizmada kısa dönemde etki ederken, insülin, leptin, ghrelin gibi hormonlar metabolizmada uzun dönemde etki etmektedir (111). Glukozdan farklı olarak fruktoz için etkin bir hormonal düzenleme bulunmamaktadır. Glukoz pankreastan insülin salınımını uyandırırken pankreatik β hücrelerinde fruktozun taşınmasını sağlayan GLUT5'in olmaması ve fruktozun GIP (gastrik inhibitör peptid) salınımını uyandırmaması nedeni ile insülin salınımı gerçekleştirilemez (111, 112).

Fruktoz, tokluk sinyali ilgili leptin hormonunun artmasına ve iştah sinyali ile ilgili ghrelin hormonunun azalmasına neden olmamaktadır. Bu sebeple tokluk hissinin oluşmaması fruktozlu besinlerin daha çok tüketimini artırmaktadır (7, 98).

2.4.6. FRUKTOZ ve TİP 2 DİABETES MELLİTUS

Fruktozun glukozu dönüşümü T2DM riskini artırır. Fruktoz, karaciğere alındıktan sonra oksidize edilme, glukoz, glikojen ya da laktik aside çevrilme, *de novo* lipogenezise girme gibi birçok metabolik yolağa girebilir (113). Fruktoz kısa dönemde insülini artırmaz. Deney hayvanlarında uzun süreli fruktoz diyetinin insülin direnci ve obeziteye, bunların sonucunda da hiperinsülinemiye yol açtığı gösterilmiştir (110). Hiperinsülinemi daha sonra T2DM ya da hipoglisemiyi neden olabilmektedir.

Çeşitli dokularda insüline yanıt olarak glukoz alımının bozulması sonucunda insülinin etkisini gösterememesi insülin direnci olarak tanımlanır. İnsülin direnci, T2DM, obezite ve metabolik sendrom durumlarında ortak olarak görülen patofizyolojik bir durumdur (8). Karaciğer ve iskelet kasında meydana gelir (102). Fruktoz, hepatik *de novo* lipogenezi artırır ve hepatik yağ asidi oksidasyonunu azaltır. Tüm bunlar karaciğerde yağ birikimini artırır, inflamasyonu ve hepatik insülin direncini tetikler (114, 115). Hepatik insülin direnci β hücre fonksiyon bozukluğuna neden olan aşırı insülin üretimini artırır (116). Zamanla β hücrelerinde meydana gelen bozulma insülin salınımında aksamaya, inflamasyona ve oksidatif strese neden olur (117-121). İnsülin direncinin negatif etkisini karşılamak için daha fazla insülin üretilir. İnsülin düzeyindeki artış kompensatuvar hiperinsülinemi olarak tanımlanır. Uzun süreli fruktoz tüketiminin insülin direncine sebep olduğu ve glukoz homeostazını bozduğu bildirilmiştir (112, 122). Fruktoz ile beslenen sıçanlarda yüksek plazma glukoz seviyesi gözlenmiştir (8). Fruktoz tüketimi ile insülin reseptör mRNA ekspresyonu arasında ilişki bulunmuştur. Fruktoz tüketimindeki artışın ekspresyon seviyesini azalttığı bildirilmiştir (123).

2.4.7. FRUKTOZ VE ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ

Çalışmalar ER stresinin, alkolik olmayan hepatik steatozis ile ilişkili olduğunu göstermiştir (124). Kronik fruktoz tüketimi lipid metabolizması ya da VLDL'nin stimülasyonu aracılığıyla ER'nin tetiklenmesine neden olur. ER membran proteinleri fruktozile edilebilir ya da lipidler ER stresine ve katlanmamış protein cevabı (UPR)'ye neden olacak şekilde ER membranına doğru birikebilir. UPR aktivasyonu öncelikli olarak ER homeostazının restorasyonuna izin verse de devam etmekte olan fruktoz maruziyeti ile inflamasyon, oksidatif stres ve apoptoza neden olan ER stresi görülür (125, 126). Bu ayrıca insülin direnci ve hepatik steatozisin oluşumunu indükler (127).

Dahasında ER stres PERK/eIF2 α /ATF4 yolağıyla aktive edilen protein kinaz ile de novo lipogenezisi aktive ederek ve IRE1 yolağı ile VLDL'nin oluşum ve salınımını sınırlandırarak karaciğerde lipid metabolizmasına etki eder. ER stres ayrıca indirekt olarak hepatik ve adipoz dokuda insülin direncini indükleyerek karaciğerde trigliseridlerin birikiminde rol alır. Dahası ER stres, inflamatuvar süreçte ve hücre ölümünde önemli rol alan transkripsiyon faktör Janus kinaz (JNK), NF κ B, CHOP, ChREBP ve SREBP'nin aktivasyonunu tetikler (127). Yapılan çalışmalarla yüksek fruktoz ile beslenmenin ER stres ile ilişkili hepatik stres cevabını tetiklediği (19, 97) ve fruktoz uyarımlı hiperlipidemi ve hipergliseminin sistemik ER stresi ve oksidatif strese katkı yapabileceği (13, 97) gösterilmiştir.

2.4.8. FRUKTOZ ve İNFLAMASYON

Fruktoz diyetinin inflamasyon üzerindeki etkisi bilinmektedir (128). Yüksek yağlı ve yüksek sükroz ile uyarılmış steatohepatitise karşı knockout fruktokinazın koruyucu etkisi ile karaciğer inflamasyonunda hepatik fruktoz metabolizmasının etkili rolü gösterilmiştir (129). Ektopik karaciğer yağ birikimi hepatositlerde hücrenel stresi tetikleyerek inflamatuvar süreci başlatır (130). Karaciğerde fruktozun TLR4 (toll benzeri reseptör 4)'i aktive edebilen palmitat gibi doymuş yağ asitlerinin sentezini artırdığı bilinmektedir. Hücrenel stres Kupffer hücrelerinde TLR4 aktivasyonu ile uyarılmış inflamasyonu daha da artırabilir (131). TLR4/uyarılabilir nitrik oksit sentaz(İNOS)/NF κ B yolağının aktivasyonu Kupffer hücreleri aracılığıyla TNF- α gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin üretimi yoluyla hepatositlerde oksidatif stresi uyarmaktadır (132).

%60 fruktozlu yem ile beslenen sıçanların karaciğerlerinde inflamasyon ve oksidatif stres üzerine yapılan bir çalışmada fruktoz diyeti uygulanan sıçanlarda TNF- α , IL-6 ve gibi transkripsiyon faktörlerindeki artışın yanı sıra insülin ve glukoz düzeylerinde de artış görülmüştür (133).

2.5. ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ ve KATLANMAMIŞ PROTEİN CEVABI (UPR)

Endoplazmik Retikulum (ER), membran ve salgı proteinlerinin transkripsiyon sonrası doğru bir şekilde katlanarak hedef bölgeye gitmelerinden sorumlu önemli bir organeldir. Proteinlerin fonksiyonlarını kazanmaları için doğru bir biçimde katlanarak 3 boyutlu yapılarını kazanmaları gerekmektedir. Katlanma sürecinin doğru bir şekilde gerçekleşmesi için hücre çeşitli kontrol mekanizmaları geliştirmiştir. Normal şartlarda hatalı katlanan proteinler ER'den sitoplazmaya yönlendirilerek proteozomal yıkıma (ERAD) uğramaktadır (134). Aminoasit eksikliği, viral ve toksik etkiler, katlanmamış ya da hatalı katlanmış proteinlerin fazlalığı gibi çeşitli etkenler ile ER homeostazı değişebilmektedir ve bu durum ER stresine neden olabilmektedir (135). ER, ER stresine karşı normal işlevlerini yerine getirebilmek için strese duyarlı sinyal yolağı olan katlanmamış protein cevabını (UPR) aktif hale getirmektedir (136). 1988 yılında Kozutsumi tarafından hatalı katlanmış protein birikiminin azaltılmasını sağlamasının yanında protein katlanma kapasitesini artıran adaptif mekanizma olarak tanımlanmıştır (137). UPR, ER stresine karşı koruyucu bir yanıt olarak ortaya çıkmaktadır, adaptif yanıt, geri bildirim kontrolü ve hücre kaderinin belirlenmesi olmak üzere esas olarak 3 görevi bulunmaktadır. Proteinlerin düzgün üretiminden işlenmesinden ve katlanma homeostazını ayarlanmasından sorumludur (135). Sentezlenen şaperon proteinler ile aşırı protein birikimi ve hatalı katlanması önlenmiş olur (138).

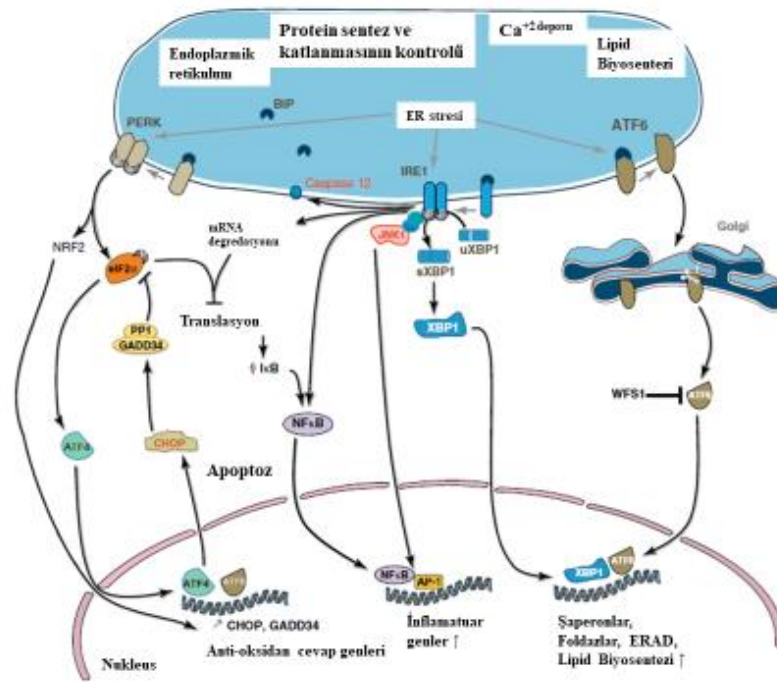
2.5.1. PROTEİN KALİTE KONTROLÜ

Kalite kontrol mekanizması ER'de protein biyosentezinin sürdürülüp doğru şekilde katlanmaların kontrolünü içeren kompleks bir mekanizmadır (139). Katlanma sürecine yardımcı moleküler şaperonlara ve katlanma enzimlerine bağlıdır. Bu enzim ve şaperonlar 3 gruba ayrılmaktadır:

1. Bağlayıcı protein/glukoz düzenlenmiş protein (BİP/GRP) 78,
2. GRP94 Kalneksin (CNX) ve kalretikulin (CRT)
3. Protein disülfid izomeraz (ER protein (ERp) 57 ve ERp72 gibi)

ER membranında stres sensörü olarak görev alan aktive edici transkripsiyon faktör 6 (ATF6), inositol gerektiren enzim-1 (IRE1) ve protein kinaz RNA (PKR) benzeri ER kinaz (PERK) olmak üzere 3 membran proteini bulunmaktadır (135, 140, 141). Bu proteinler normal koşullar altında şaperon olarak görev alan ve stres durumlarında

ekspresyonu artan GRP78 (142, 143) ile birlikte inaktif durumda bulunur (144, 145). GRP78 glikoprotein olup yeni sentezlenmiş proteinlerin katlanmaya hazır halde tutulmasını ve bu şekilde ER'nin kararlı durumda kalmasını sağlayarak hücreleri apoptoza karşı korumaktadır (146). Hatalı katlanmış proteinlerin ER lümeninde artarak birikmesiyle GRP78 membran proteinlerinden ayrılır ve hatalı katlanmış ya da katlanmamış proteinlere bağlanarak ATP-bağımlı katlanma işlemlerini gerçekleştirmektedir. GRP78'in ayrılmasıyla membran proteinleri aktif hale gelmektedir (147, 148).



Şekil 2.6 Endoplazmik retikulum stresi (149)'dan değiştirilerek

2.5.2. KATLANMAMIŞ PROTEİN CEVABI SİNYAL YOLLARI

2.5.2.1. İNOSİTOL GEREKTİREN KİNAZ-1 (IRE-1) SİNYAL YOLAĞI

IRE-1, sitozolik kinaz ve endoribonükleaz aktivitesine sahip, ER'de yerleşik Tip 1 transmembran proteinidir. Hücreyi stresten ve apoptozdan koruma aşamasında önemli role sahiptir. Memelilerde IRE-1 α ve IRE-1 β olmak üzere 2 izoformu bulunmaktadır (150). Embriyonik dönemde IRE-1 α gen bölgesinde meydana gelebilecek bir hasarın ölümle sonuçlanabileceği bilinmektedir (151). IRE-1 α tüm hücrelerde eksprese edilirken, IRE-1 β , gastrointestinal epitel hücrelerde sınırlı miktarda eksprese olmaktadır. IRE-1'in her iki izoformu da ER membranında lokalize halde olup stresle ilişkili olan sinyal yollarını aktifleştirebilmektedir (152).

Normal koşullarda GRP78 ile inaktif halde bulunan IRE-1, GRP78'in ayrılmasıyla dimerize olup otofosforillenebilmektedir. IRE-1'de meydana gelen bu konformasyonel değişiklik IRE-1'in RNaz aktivitesini ortaya çıkarmaktadır. IRE-1'in RNaz aktivitesi ile birlikte normalde sitoplazmada kırılmamış halde bulunan XBP1 (X bağlayıcı protein 1)'den 26 nükleotid uzaklaştırılır. Kırılmış XBP1 potent bazik lösin transkripsiyon faktörüne dönüşerek ER şaperonlarının ve katlanmaya yardımcı enzimlerin düzenlenmesini sağlamaktadır (153). Hücre çekirdeğine girerek ERAD, lipid biyosentezi, ER biyogenezi, fetal gelişim ve birçok moleküler yolakta rol almaktadır (154). XBP1'in transkripsiyon faktörü olması ER stresine karşı adaptif yanıtın düzenleyicisi olarak rol almasını sağlamaktadır. XBP1'den eksik hücreler oksidatif stres ve inflamasyon kaynaklı apoptoza karşı daha yatkındır (155-157).

2.5.2.2.PROTEİN KİNAZ RNA (PKR) BENZERİ ENDOPLAZMİK RETİKULUM KİNAZ (PERK) SİNYAL YOLAĞI

Tip 1 transmembran protein olan PERK, serin/treonin kinaz aktivitesine sahiptir. IRE-1α'dan farklı olarak sitozolik kısmında RNaz aktivitesi bulunmamaktadır (158, 159). Aktif PERK ökaryotik başlatıcı faktör α (eIF2α)'nın 51. pozisyonunda serini fosforillemektedir. Bununla birlikte eIF2β, eIF2α'ya guanozin trifosfat (GTP) aktarmadığından eIF2α/GTP/Met-tRNA olarak bilinen translasyonunun başlangıç kompleksi engellenmektedir (158, 159). PERK bu sayede translasyonu azaltarak, ER'ye binen iş yükünü düşürmektedir.

2.5.2.3.AKTİVE EDİCİ TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ 6 (ATF6) SİNYAL YOLAĞI

ATF6, Tip 2 transmembran proteindir. Memelilerde ATF6α ve ATF6β olmak üzere 2 alt tipi bulunmaktadır (160). GRP78 ile inaktif halde bulunan ATF6, GRP78'den ayrıldıktan sonra Golgi'ye göç etmektedir. Burada site 1 ve site 2 proteazlar ile kesilerek aktif hale geçmektedir. Aktif parça transkripsiyon faktörüne dönüşerek nükleusta ER ile ilişkili protein degradasyonunda ve apoptozda rol almaktadır.

ATF6 ayrıca XBP1'e doğrudan bağlanarak UPR ile ilgili proteinlerin düzenlenmesini sağlamaktadır. Nükleusta, ER stres yanıt elemanları (1 ve 2), UPR elemanı ve cAMP yanıt elemanı genlerinin transkripsiyonunda rol almaktadır.

2.5.3. ER STRESİ ve DİABETES MELLITUS

Pankreatik beta (β) hücreleri insülinin sentez, depo ve salınımindan sorumludur (161). Artan kan glukoz seviyesine cevap olarak önce salgı granüllerinde paketlenmiş olan depo insülin, β hücreleri tarafından salınır. Periferal dokularda insülin, insüline cevap veren hücrelerdeki ilgili reseptörlere bağlandığında sinyal kaskadı harekete geçer. Kan glukoz seviyesi normal düzeye geldiğinde insülin uzaklaştırılır. Bu glukostatik döngü diyabet gibi hastalıklarda β hücrelerinden yeterli insülinin üretilmemesi, açlık ya da tokluk koşullarında normogliseminin sürdürülmemesi gibi nedenlerle bozulmaktadır (162).

Yüksek seviyede insülin salınımını sağlamak için β hücreleri oldukça gelişmiş ER içermektedir. İnsülin biyogenezi, β hücre ER'de başlatılan moleküler kompleks bir seriyi gerektirmektedir (163). İnsülinin prekürsörü olan preproinsülin ER lümenine taşınmaktadır, burada kırılarak proinsülin haline gelmektedir. ER'de bulunan oksidoredüktazlar proinsülinin intramoleküler disülfid bağlarını katalize etmektedir. Bu kritik oksidatif katlanma basamağı proinsülin varyant protein Ins2 (C96Y)'yi eksprese eden Akita diyabetik fare mutantlarında kesintiye uğramaktadır. Ins2 ER'de katlanmaya yardımcı intramoleküler disülfid bağların oluşması için gerekli olan sistein eksiktir. Bu sebeple, endoproteazlar salgı granüllerinde olgun insülinin oluşması için proinsülindeki C-peptidi uzaklaştırılmazlar (164-167). ER'de doğru katlanmayan insülin birikimi GRP78 ve CHOP ekspresyonunun aktifleşmesine ve apoptozun uyarılmasına sebep olur.

Farelerde PERK kodlayan gende meydana gelen homozigot delesyon erken dönemde diyabete neden olan β hücre apoptozuna neden olmaktadır (168). Farelerde β hücrelerinde XBP1 geninde görülen delesyon proinsülin sürecinde bozulmaya ve insülin salınımlarında azalmaya neden olmaktadır (169). Benzer şekilde ATF6 diyabetik fare modellerinde β hücre kaybını önlemede kritik öneme sahiptir (170).

PERK tarafından eIF2 α 'nın fosforilasyonu aracılığıyla translasyonun azalması, β hücreleri tarafından kanda glukoz seviyelerindeki değişime cevapta proinsülinin yapısal olarak olgunlaşması için kullanılabilir (171).

Diğer bir ER stres ile uyarılan diyabet tipi Wfs1 genindeki mutasyondan kaynaklanan ve insanlarda görülen Wolfram sendromudur. WFS1, ER transmembran proteini olup eksikliği erken başlangıçlı diyabete, nörodejenerasyona, görme ve duyma da bozukluklara neden olmaktadır (172). WFS1 proteini pek çok dokuda eksprese edilmektedir ve ATF6 kontrol sürecinin yanı sıra ERAD sürecine yardımcı olduğu düşünülmektedir (173, 174).

Tüm bunların ER’de biriken katlanmamış protein birikimine ve anahtar UPR fonksiyonlarında meydana gelen bozulma ile β hücrelerinde diyabete neden olan apoptozu teşvik ettiği gösterilmiştir. Tüm diyabet tiplerinin altında β hücrelerinde oluşan fonksiyon bozukluğu yatmaktadır. Pankreastaki β hücreleri hastalık ve yaşlanma sebebiyle diğer komşu β hücrelerini kompanse ettiklerinden artan ve çözülemeyen ER stresine maruz kalabilmektedir.

2.5.4.ER STRESİ ve KARACİĞER

Karaciğer vücutta safra asidi, lipoproteinler, albümin, globülin, fibrinojen gibi majör plazma proteinlerini salgılamaktadır. Salgı fonksiyonu ile birlikte karaciğer fizyolojik olarak UPR’yi aktive etmektedir. IRE1 sinyalinin sirkadyan ritmi fare karaciğer lipid metabolizmasının sirkadyan regülasyonu ile yakın ilişkilidir (175). Fizyolojik ER stresi açlık sonrası kemirgen karaciğerinde tespit edilmiştir ve saatler içinde ortadan kalkmıştır (176). Ancak kronik hepatik ER stresi, obez insan ve hayvanlarda görülmüştür (22, 177).

ER stresi, karaciğer lipid metabolizması ve insülin direnci ile karaciğer yağlanması (steatozis) önemli rol almaktadır. Ob/ob farelerde steatozis lipogenezis ve kolesterol metabolizmasının kontrolünden sorumlu 2 transkripsiyon faktörü SREBP1 ve SREBP2’nin proteolitik kesimine sebep olan ER stresine neden olmaktadır (178). Ob/ob farelerde hepatik adenoviral BİP’in aşırı ekspresyonu SREBP1c aktivasyonunu, hepatik trigliserid ve kolesterol içeriğini azaltır ve insülin duyarlılığını artırır. PERK/eIF2 α , IRE1/XBP1 ve ATF6 sinyal iletimi, genetik olarak modifiye edilmiş farelerde ER stresi ile steatozis arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir.

Hepatik XBP1’de meydana gelen delesyon azalan serum trigliseridi, kolesterol ve serbest yağ asitleriyle *de novo* lipogeneziste ciddi bozukluklara neden olur (179). IRE1 α ya da XBP1 knockdown, SREBP1 ve FAS’ın insülinle uyarılan promoter aktivitelerine engel olmaktadır (180).

2.5.5.ER STRESİ ve APOPTOZ

Stres çözülmediğinde hücreler apoptoza girmektedir. ER stresi ile bağlantılı olan apoptoz ile ilgili pek çok mekanizma bulunmaktadır. İlk çalışmalar ER stresi ile ilişkili kaspaz 12, -4, ve -7 gibi kaspazların mitokondriden bağımsız hücre ölümünden sorumlu olduğu düşünülmüştür (181, 182). Daha sonra kaspaz 12 ve 4’ün ER stresiyle ilişkili apoptozda gerekli olmadığını ortaya çıkarmıştır (183). ER stresinin 3 ana yolağının apoptozu başlatabilmesinin yanı sıra diğer bazı protein ve mekanizmalar ER aracılıklı apoptozu başlatabilmektedir. Örneğin, ER membranında bulunan c-ABL tirozin kinaz mitokondriye geçerek ER stresini başlatan ve PKC δ fosforilasyonuna neden olan sitokrom c salınımını tetiklemektedir (184). ER stresi tarafından uyarılan apoptozda kaspaz 2 tartışmalıdır, ancak bazı çalışmalar da IRE1 α ’nın kaspaz 2 aktivasyonunu artırdığı gösterilmiştir (185).

2.6. T2DM PATOGENEZİNDE METABOLİK İNFLAMATUAR YOLAKLAR

T2DM insülin direnci ve insülin üretiminde meydana gelen bozulmalarla karakterize edilmektedir (186). İnsülin direnci ve insülin yetersizliği; genetik bozukluklar, diyet, sedenter yaşam ve endokrin bozukluklar ile uyarılmaktadır (186-190). İnflamasyon da insülinin üretim ve salınımına etki eden faktörlerden biridir (188, 189, 191, 192). ilk olarak 1924’te enfeksiyonlu hastalarda diyabet komplikasyonlarının klinik olarak tanımı yapılmıştır (193). Tüm vücut metabolizmasını ve kan glukoz seviyesinin kontrolünü etkileyebilen farklı enfeksiyon tipleri rapor edilmiştir (194-197). Pek çok çalışma inflamasyonun T2DM’de β hücre fonksiyonunun bozulmasında önemli rolü olduğunu göstermiştir (198-200).

2.6.1. METABOLİK İNFLAMASYONUN İNTRASELÜLER MEDIATÖRLERİ

2.6.1.1. Nükleer Faktör Kappa Beta (NF-κB):

Transkripsiyon faktörü olan NF-κB, Sen ve Baltimore'nin 1986 yılında yaptığı çalışma ile ilk kez aktif B hücrelerinin immünglobülin kappa hafif zincirinin enhancer elementine bağlanan bir nükleer faktör olarak keşfedilmiştir (201). NF-κB ailesi immünite ve inflamasyon gibi süreçleri başlatmada rol alan transkripsiyon faktörlerinden oluşur. Memelilerde p65 (RelA), RelB, c-Rel, NFκB1 (p105/p50) ve NFκB2 (p100/p52) olmak üzere tanımlanmış 5 üyesi bulunmaktadır. Diğer aile üyelerinden farklı olarak NF-κB1 ve NF-κB2 pro-form olarak sentezlenir, proteolitik işlemlerden sonra p50 ve p52'ye dönüştürülür (202). NF-κB ailesinin tüm üyeleri fosforilasyon ve translasyon sonrası modifikasyonlar ile homodimer ve heterodimer yapıdadır. DNA'ya bağlanıp çeşitli genlerin ekspresyonunu kontrol eder (203).

NF-κB, inflamasyon, immün cevap, apoptoz, proliferasyon ve hücre büyümesi gibi hücreyel süreçlerin kontrolünde yer alan transkripsiyon faktörüdür (204, 205). NF-κB, çoğu hücrede NF-κB inhibitör proteini IKB'ye bağlı olarak bulunur (206). Sinyalin oluşmasının ardından IKB proteini fosforile edilir ve NF-κB serbest kalarak aktif hale geçer. NF-κB'nin aktivasyonu, IKB kinaz (IKK1 ve IKK2) enzim kompleksi ya da katalitik olmayan aksesuar protein (NF-κB esansiyel modülatör (NEMO)) tarafından katalizlenen (202) NF-κB-ICKB kompleksinin ya da p100 ve p105'in inhibitör ankirin tekrar domainlerinin ayrılması ile başlar (206-208). Aktiflenen NF-κB nukleusa giriş yapar ve hedef genlerin enhancer veya promotor bölgelerine bağlanarak transkripsiyonu başlatır.

Bir transkripsiyon faktörü olan NF-κB inflamatuvar ve immün yanıtların düzenleyicisidir. Diyabet durumlarında karaciğerde inflamasyon ve apoptoz yüksek seviyede görülmektedir. Hiperglisemi, IKB kinaz tarafından NF-κB'nin aktifleştirilmesine neden olur (209).

Toll benzeri reseptörler, tümör nekrozis faktör reseptörleri, antijen reseptörleri ve interlökin 1 reseptörleri gibi çeşitli reseptörler aracılığıyla düzenlenen uyaranlar NF-κB aktivasyonunu uyarır (202, 210). Bu kanonikal yolak, genellikle anti-apoptotik, tümör indükleyici ve kronik inflamatuvar hastalıkları içine alır (211).

NF- κ B'nin kanonikal olmayan alternatif yolağı IKK2 ve NEMO aktivitesinden bağımsızdır ve tümör baskılama ve apoptozu kolaylaştırma gibi farklı fonksiyonları bulunmaktadır (212). Bu yolakta NF- κ B aktivasyonu farklı promoter'lerin etkileşimi ve DNA bağlanma afinitesinde bulunan farklılıklar ile değişir (206, 210, 213-215).

Pek çok çalışma IKK- NF- κ B'nin T2DM, obezite ve ateroskleroz gibi metabolik hastalıkların patogeneğinde rol aldığını göstermiştir (216-218). T2DM'nin deneysel modellerinde, obezitede ve insülin direncinde insülin reseptör substrat 1'in kısıtlayıcı serin fosforilasyonuna neden olan IKK aktive edilmektedir (218-220). T2DM'li insan ve hayvanlara uygulanan IKK inhibitörleri ile glukoz intoleransında kısmi iyileşme görülmüştür (218, 221).

2.6.1.2.İnterlökin-1 Beta (IL-1 β):

IL-1 β 17 kDa ağırlığında akut, lokal ve kronik inflamasyonla ilişkili olan çok fonksiyonlu pro-inflamatuar sitokindir (222, 223). Makrofaj, monosit ve dentritik hücreler tarafından salgınır (224). İmmün cevapta erkenden salgınır. IL-1 β 'nın aktifleşebilmesi için işlenmeye hazırlık ve aktivasyon basamaklarından geçmesi gerekir (225, 226). İşlenmeye hazırlık basamağında TNF- α ve IL-1 reseptörü gibi faktörlerin etkileşimiyle (227) NF- κ B ve MAPK sinyal yolağı aracılığıyla başlayan süreç 35-ku pro-IL-1 β 'nın kaspaz-1 bağımlı proteolitik kesimi ile 17-ku olgun IL-1 β oluşumu ile tamamlanır (228, 229).

30 yılı aşkın süredir IL-1 β 'nın T2DM, insülin direnci ve obezite patogeneğinde önemli bir rolü olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (230-232). IL-1 β aktivitesinin metabolik hastalıkların gelişiminde önemli role sahip olduğu çeşitli deneysel modellerle gösterilmiştir (233, 234).

Hiperglisemi sebebi ile beta hücreleri tarafından üretilen IL-1 β 'nın beta hücrelerinde azalan hücre proliferasyonuna, artan beta hücre disfonksiyonuna ve apoptoza neden olduğu bulunmuştur (235). Bu sebeple, IL-1 β 'nın diyabet patogeneğinde rol alabileceği düşünülmektedir. Ayrıca kemik iliğinden *in vitro* elde edilen makrofajların diyabette IL-1 β üretimini tetiklediği bildirilmiştir (236).

Diyabet hastalarında artmış pro-inflamatuar sitokinlerin çoğunun IL-1 bağımlı olduğu düşünülmektedir ve IL-1'in inhibisyonu ile pro-inflamatuar faktörlerin konsantrasyonunun azaldığı bildirilmiştir (237).

2.6.1.3.Tümör Nekrozis Faktör alfa (TNF- α):

TNF- α T2DM, obezite ve insülin direnci patogeneğinde tanımlanan ilk pro-inflamatuar sitokindir (238). Makrofajlar, CD4+ T lenfositler, doğal öldürücü hücreler ve nötrofiller tarafından üretilir. TNF- α , 24 kDa ağırlığında transmembran prekürsör (mTNF- α) olarak sentezlenir, metalloproteinaz TNF- α dönüştürücü enzim (TACE) ile 17 kDa ağırlığında biyolojik olarak aktif formuna (sTNF- α) dönüştürülür. T2DM ve obezitede her iki izoformu da artar. Adipoz doku, karaciğer ve diğer metabolik olarak ilişkili dokularda TNF- α , reseptörleri TNFR1 (p55) ve TNFR2 (p75)'e bağlanarak biyolojik işlevlerini başlatır (239, 240). TNF- α , insülin sinyal yolağına etki ederek insülin direncine sebep olur ve bu sebeple T2DM ve obezite patogeneğine katkı sağlar (241-244). Uzun süreli TNF- α antagonistlerinin kullanımı açlık glukozunun yanı sıra inflamasyonu azalttığı gösterilmiştir (245, 246).

2.6.1.4.İnterlökin-6 (IL-6):

IL-6, aktif T hücrelerinden salınan B hücrelerinin proliferasyonunu ve farklılaşmasını artıran sitokindir. IL-6, 21-26 kDa ağırlığındadır. Akut faz cevabı, inflamasyon, immün düzenleme, hematopoesis ve doku rejenerasyonunda görev alır. Adiposit, monosit, pankreatik adacık hücreleri, endotelyal ve immün hücreleri kapsayan çok geniş spektrumlu hücrelerden üretilen pleiotropik sitokindir (247). IL-6, lökosit, hepatosit ve diğer pek çok hücrede bulunan IL-6R'e bağlanır (248, 249).

IL-6, reseptörüne bağlandıktan sonra, sitokinler, antiapoptotik proteinleri, kemokinleri ve akut-faz proteinlerinin ekspresyonunu uyarır (247, 250). IL-6 ekspresyonu geçicidir, hasar durumunda ekspresyonu artar. Doku homeostazı yeniden restore edildiğinde IL-6 ekspresyonu azalır. Ancak, IL-6'nın kronik ve anormal üretimi T2DM, obezite ve insülin direnci gibi pek çok hastalığın patogeneğinde önemli rol alır (249, 251, 252).

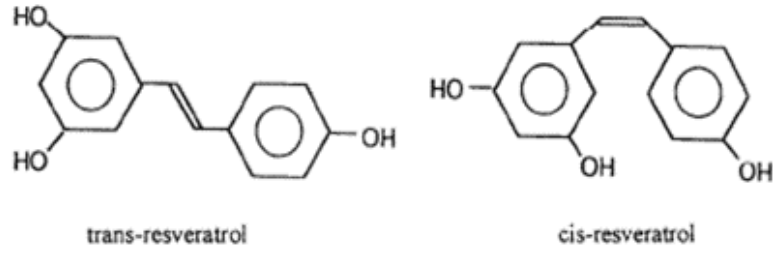
İlginç olarak, IL-6 hedef dokuya ve metabolik duruma bağlı olarak hem pro hem anti inflamatuvar sitokin olarak hareket eder. IL-6'nın artan plazma seviyesi T2DM gelişimi, vücut kitle ağırlığı ve dolaşımdaki serbest yağ asitleri ile paraleldir (252, 253). Karaciğer ve adipoz dokuda IL-6, IR/IRS1 fosforilasyonunu bozan SOCS3 ekspresyonunu artırarak insülin direncini indükleyen proinflamatuvar özelliklere sahiptir (254-256). Bu sebeple IL-6 akut olarak salındığında insülin direnci ve inflamasyonu pozitif olarak, kronik olarak salındığında T2DM ve obezitede görüldüğü gibi negatif olarak düzenlemektedir. İnflamasyon durumunda, hepatosit uyarıcı faktörler akut faz proteinleri olarak bilinen proteinlerin sentezi için karaciğeri indüklemektedir (257) İnsanlarda en fazla bilinen akut faz proteinleri C-reaktif protein (CRP), serum amiloid A (SSA) ve fibrinojendir. Hepatik akut faz proteinlerinin en önemli indükleyicisi, makrofajlar, monositler ve nötrofiller tarafından salınan IL-6'dır (258, 259).

2.7. RESVERATROL

Resveratrol (3,4',5-trihidroksistilben), üzüm kabuğu ve yaprağında bulunan, serbest radikallerin neden olduğu hücresel hasarı engelleyen (260) ayrıca bitkiler tarafından fungal ya da bakteri kaynaklı enfeksiyonlara cevap olarak üretilen fitoaleksinin özelliği gösteren stilben grubu bileşiktir (261).

Dr. Takaoka tarafından 1940 yılında *Veratrum grandiflorum* bitkisinden izole edilmesiyle literatürde ilk olarak bahsedilmiştir. 1963'te geleneksel Çin ve Japon tıbbında çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere *Polygonum cuspidatum* bitkisinin köklerinden izole edilmiştir.

Resveratrolün *cis* ve *trans* formu olmak üzere 2 izomer formu bulunmaktadır (262). 1976 yılında Langcake ve Pryce yaptığı çalışma ile resveratrolün biyolojik olarak aktif formu olan *trans* resveratrolün üzüm ve türevlerinde ultraviyole ışığa maruz kalma ya da *Botrytis cinerea* gibi fungal enfeksiyonlarda yaprak dokularında sentezlendiği gösterilmiştir (262). Günümüzde resveratrolün farklı pek çok doku ve organ üzerindeki çeşitli etkileri yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (261).



Trans ve cis resveratrolün kimyasal yapısı 3,4',5 trihidroksistilben

Şekil 2.7 Trans ve cis resveratrolün kimyasal yapısı (263)

2.7.1. RESVERATROLÜN FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ

IUPAC tarafından E-5-(4-hidroksisitiril) benzen-1,3-diol olarak adlandırılan resveratrolün moleküler formülü $C_{14}H_{12}O_3$ ve molekül ağırlığı 228,5 gr/mol'dür. Yüksek lipofilik ve hidrofilik özelliği ile vitamin C ve vitamin E gibi diğer antioksidanlara kıyasla daha etkili olduğu düşünülmektedir (264). Suda çözünürlüğü zayıf olmasına karşın yüksek membran geçirgenliğine sahiptir.

Metilen köprüleriyle bağlanmış iki aromatik halka içeren resveratrolün sahip olduğu karboksil gruplarının sayısı ve pozisyonu, molekül için H^+ bağları, çift bağların varlığı ve stereo izomerisi gibi yapısal özelliklerin resveratrolün biyolojik aktivitesine etki ettiği ve düzlemsel olmayan konformasyonun trans-resveratrol formunun cis-resveratrole göre biyolojik olarak daha aktif olmasına sebep olduğu düşünülmektedir (265, 266).

2.7.2. RESVERATROLÜN BİYOLOJİK ETKİLERİ

Resveratrolün majör biyolojik etkileri:

- Anti-inflamatuar etki
- Serbest radikallerin ortadan kaldırılması
- İnsülin ve glukoz homeostazının sağlanması
- Lipid metabolizmasının düzenlenmesi
- Lipid peroksidasyonunun önlenmesi
- Anti-kanser etki
- Platelet bikiminin önlenmesi
- Bakırın şelatlanması
- Östrojenik aktivite

Resveratrolün membran ve hücre içi reseptörleri, sinyal molekülleri, oksidatif enzimler, nükleer transkripsiyon faktörleri ve DNA tamirinde rol alan faktörler gibi çok sayıda spesifik protein ile etkileşim halinde olduğu bilinmektedir. Yapılan *in-vivo* ve *in-vitro* pek çok çalışmayla resveratrolün anti-diyabetik, antioksidan, anti-kanser, anti-inflamatuar etkisi gösterilmiştir (261).

Resveratrolün membran ve hücre içi reseptörleri, sinyal molekülleri, oksidatif enzimler, nükleer transkripsiyon faktörleri ve DNA tamirinde rol alan faktörler gibi çok sayıda spesifik protein ile etkileşim halinde olduğu bilinmektedir. Yapılan *in-vivo* ve *in-vitro* pek çok çalışmayla resveratrolün anti-diyabetik, antioksidan, anti-kanser, anti-inflamatuar etkisi gösterilmiştir.

2.7.3. RESVERATROLÜN BİYOSENTEZİ ve YIKIMI

Resveratrolün biyosentezi özellikle bitkilerde *Botrytis cinera*'nın sebep olduğu fungal enfeksiyon ve ultraviyole ışınlar gibi artan stres koşulları ile birlikte tetiklenmektedir. Resveratrol, malonil-koenzim A ve p-kumaroil-koenzim A gibi öncül moleküllerin varlığında fenilalanin-polimalonat yolu ile üretilen stilben sentaz ile sentezlenmektedir. 48-72 saatlerde devreye giren stilben oksidaz ile resveratrolün oksidatif yıkımı başlatılır (266, 267). Eritrositlere pasif difüzyonla alınan resveratrol, glukuronosil transferaz ve aril-sülfataz enzimleri ile glukorinik asit ve sülfata dönüştürülür (268).

2.7.4. RESVERATROL ve KARACİĞER

Resveratrol, karbontetraklorür (269), etanol (270), aflatoksin- β 1 (271) gibi karaciğer toksinlerine ve çeşitli indükleyicilerle oluşturulan karaciğer hasarına (272, 273) karşı anti-inflamatuar ve antioksidan özellik gösterdiği bilinmektedir. Bu çalışmalarla değişen süre ve dozlarda uygulanan resveratrolün AST ve ALT düzeyindeki artışı engellediği, hepatositlerde SOD, CAT aktivitesini artırdığı ve TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi proinflamatuar sitokinlerin artışı engellediği bildirilmiştir.

Hiperlipidemiye indükleyen diyetle beslenen sıçanlarda, resveratrolün triaçilgliserol ve kolesterolün hepatik birikimini önlediği gösterilmiştir (274). Etanol ile indüklenmiş yağlı karaciğer modelinde resveratrolün hepatik lipid metabolizmasındaki yolları kontrol eden sinyal moleküllerinin aktivitelerini artırarak karaciğerde oksidatif stres ve hücre ölümünü azalttığı tespit edilmiştir (275).

2.7.5. RESVERATROLÜN HEPATİK METABOLİZMASI

HepG2 olarak bilinen insan hepatoblastoma hücrelerinde yapılan çalışmalarda resveratrolün pasif difüzyon veya bir taşıyıcının aracılığı ile karaciğer hücrelerine alındığı gösterilmiştir (276). Resveratrolün hepatik metabolizması temelde glukuronidasyon ve sülfasyon basamaklarından oluşmaktadır. Karaciğerde faz II enzimleri ile metabolize edilen trans resveratrol için başlıca metabolitler trans-resveratrol-3-O-glukuronit, trans-resveratrol-3-sülfat, trans-resveratrol-3,5-disülfat ve trans-resveratrol-3-4'-disülfat olarak sayılabilir (277). Hepatositlerde ise resveratrol glukuronit ve resveratrol sülfatlar çoklu ilaç direnciyle ilişkili olan MRP-2 proteini ile safra kanalına taşınmaktadır (268, 278).

2.7.6. RESVERATROLÜN KANDA TAŞINMASI, HÜCREYE ALINMASI, HÜCRE İÇİ RESEPTÖRLERİ ve VÜCUTTAKİ DAĞILIMI

Resveratrol konsantrasyonu insanlarda serum ve plazmada oldukça düşüktür. Sudaki çözünürlüğünün az olması sebebiyle serumda konjuge formda ya da proteinlere bağlı olmak zorundadır.

Albümin resveratrolün taşınması yanında hücre içi biyolojik etkilerinin ortaya çıkmasında da görev almaktadır. Albümin-resveratrol kompleksi hücre yüzeyinde bulunan albümin reseptörüne bağlanmakta ve böylece resveratrol hücre içine alınmaktadır (279). Ayrıca resveratrol lipoproteinlere kovalent olmayan bağlarla bağlanabilme özelliği ile albüminle yaptığı kompleks yapıya benzer şekilde hücre membranında bulunan LDR reseptörüne bağlanarak hücre içine alınmaktadır (278, 279) Resveratrol, 21 kDa'luk *caveolin (cav)* proteini ile kaplı, sfingomyelin ve kolesterolce zengin veziküller aracılığıyla endositoz ile hücre içine alınmaktadır. Resveratrol cav-1 proteininin ekspresyonunu düzenleyebilmektedir (280, 281).

Resveratrol, transmembran glikoprotein ailesi üyesi olan integrinler ve mitojen ile aktive olan protein kinazların (MAPK) aktivasyonu aracılığıyla hücre içi sinyal kaskadını başlatabilir (278).

Rodentlerde yapılan çalışmada karaciğerin resveratrol ve resveratrol metabolitleri için temel birikim bölgesi olduğu rapor edilmiştir (102,119). Diğer organlarda konsantrasyonunun karaciğere göre daha az olduğu tespit edilmiştir (282).

2.7.7. RESVERATROL VE DİYABET

Diyabet, dünya genelinde prevalansı yüksek metabolik bir hastalıktır. Kemirgenlerde yapılan çalışmalarla resveratrolün hiperglisemik hayvanlarda kan glukoz düzeyini azaltarak glukoz homeostazını sağladığı, insülinin etkisini geliştirdiği ve pankreatik β hücrelerini koruduğu gösterilmiştir (283). Obez Zucker sıçanlarda ve yüksek yağlı diyet uygulanmış farelerde resveratrolün adipoziteyi azaltarak insülin duyarlılığını geliştirdiği rapor edilmiştir (284, 285). 62 T2DM'li hasta üzerinde yapılan çalışmada 3 ay boyunca kontrol grubuna yalnızca oral hipoglisemik ajan verilirken diğer gruba oral hipoglisemik ajanın yanı sıra 250 mg/d resveratrol tedavisi uygulanmış

ve 3 ayın sonunda resveratrol takviyesi yapılan grupta hemoglobin A1c, sistolik kan basıncı, total kolesterol ve total protein seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla iyileşme görülmüştür. Ancak, vücut ağırlığında, HDL ve LDL seviyelerinde dikkate değer bir fark görülmemiştir (286).

Resveratrolün diyabet nedeniyle ortaya çıkan nefropati (287-289), nöropati (290-292), retinopati (293-296), hipertansiyon (297), kardiyovasküler hastalıklar (298-300), karaciğer hasarı durumlarında (301) T1DM ve T2DM hayvan modellerinde biyokimyasal ve klinik parametreleri iyileştirdiği gösterilmiştir. Bu sebeple resveratrol, glisemik kontrolün düzenlenmesinde efektif olabilir ve diyabet tedavisinde adjuvan olarak kullanılabilir (286).

Diyabetle birlikte artan kan glukoz seviyesi insülin salınımının artırılması ile dengelenmeye çalışılır. İnsülin salınımı için pankreatik β hücrelerinin aşırı uyarımı hücrelerin zamanla tükenmesine ve yıkımına yol açmaktadır. Resveratrol, insülin salınımını azaltarak pankreatik β hücrelerinin yıkımını önlemektedir.

STZ ile T1DM STZ-nikotinamid ile T2DM modeli oluşturulan sıçanlarda ve obez Zucker sıçanlarda resveratrolün periferik dokular tarafından glukoz alımı üzerinde uyarıcı etkisi olduğu gösterilmiştir. GLUT4 taşıyıcıları ile düzenlenmekte olan glukoz transportunun resveratrol ile arttığı rapor edilmiştir (283, 302).

Resveratrolün obezite ve diyabetin gelişmesine engel olduğu (283, 286, 303) ve obez hayvanlarda hepatik steatozisi engellediği rapor edilmiştir (304-306) Yüksek fruktoz diyeti uygulanmış sıçanlarda da resveratrolün hiperinsülinemiyi, hipertrigliseridemi ve vasküler disfonksiyonu iyileştirdiği gösterilmiştir (307).

2.7.8. RESVERATROL, ER STRESİ ve İNFLAMASYON

Resveratrol proinflamatuvar sitokinlerin sentez ve salınımına etki ederek inflamasyon sürecinde rol almaktadır. Resveratrolün IL-1, IL-6 ve IL-8 gibi sitokin ve monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1)'in mRNA ve gen ekspresyonlarını ve salınımını kontrol edebildiği rapor edilmiştir (268, 308).

Fruktoz obezite insidansı ile yakın ilişkilidir. Neredeyse tamamen karaciğerde metabolize edilen fruktozun aşırı tüketimi hepatik stres cevabını tetiklemektedir (19, 97). Hepatik stres cevabı ER stresi ve ilgili olarak inflamasyon ile oksidatif stresle karakterize edilmektedir (12-19). Dolayısıyla ER stresi, obezite ve hepatik steatozis ile ilişkili olan insülin direnci, inflamasyon, lipotoksisite ve oksidatif streste önemli rol oynar (126). ER stresi ile bağlantılı olan PERK, ATF6 ve IRE1 α yollarının tümü inflamasyonla ilişkili olan NF κ B'yi aktive edebilir (309). NF κ B, inflamatuvar cevaba neden olan TNF- α ve IL-1 β gibi proteinlerin ekspresyon ve transkripsiyonlarını başlatan spesifik DNA dizilerine bağlanır (310). Proinflamatuvar sitokin ve kemokinlerin üretimi ve salınması inflamasyon ve oksidatif stresle sonuçlanan hasara neden olur. Resveratrolün NF κ B aktivasyonunu engelleyerek inflamasyonu ve TNF- α , IL-6, ve COX-2 (siklooksijenaz 2) gibi inflamatuvar proteinlerin seviyesini azalttığı gösterilmiştir (311, 312). Uzun süreli ya da yüksek dozda uygulanan resveratrol tedavisinin ER stresi ile ilişkili olan T2DM, obezite ve insülin direncinin engellenmesinde rol aldığı düşünülmektedir.

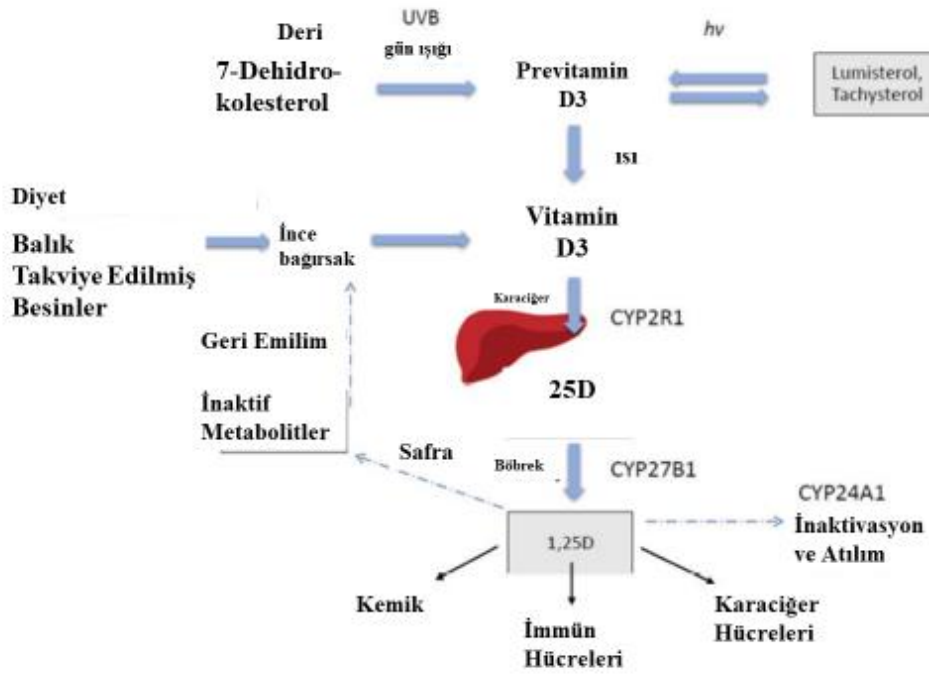
2.8. VİTAMİN D

İlk olarak 1923 yılında Goldblatt ve Soames tarafından tanımlanan (313, 314) vitamin D yağda çözünebilen çok işlevli bir hormondur (315). Günlük vitamin D ihtiyacının az bir kısmı besinlerle sağlanmakla beraber kalanı epidermiste bulunan 7-dehidrokolesterolün güneş ışığı ile fotokimyasal tepkimeye girmesi ile karşılanır (316). Vitamin D eksikliği, gelişme sürecinde kemiklerde deformasyonla ilişkili olan hastalıklara neden olurken yetişkinlerde osteomalazi ve kalsiyum dengesinin bozulmasıyla kas metabolizmasında bozukluklara sebep olur (317, 318).

2.8.1. VİTAMİN D SENTEZİ, METABOLİZMASI ve BİYOLOJİK FONKSİYONLARI

Vitamin D'nin kemik ve kalsiyum metabolizmasının düzenlenmesinde görev aldığı bilinmektedir. Kolekalsiferol (vitamin D₃) ve ergokalsiferol (vitamin D₂) olmak üzere 2 ana formu bulunmaktadır. İnsanlarda vitamin D öncelikli olarak güneş ışığından ultraviyole ışınlar aracılığıyla 7-dehidrokolesterol hidroksilasyonunun kolekalsiferole katalize edilmesiyle deri hücrelerinde endojen biyosentez yoluyla gerçekleşir (319). Biyolojik olarak inaktif endojen ve diyet kaynaklı vitamin D şilomikronlar ile sistemik

olarak taşınır ve bir dizi seri reaksiyon ile metabolik olarak aktif 1,25-dihidroksivitamin D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$)'e dönüştürülür. Karaciğerde, vitamin D, karaciğerde 25-hidroksilaz enzimi ile 25-hidroksivitamin D ($25(\text{OH})\text{D}_3$)'ye dönüştürülür. Pre-hormon olarak düşünülen $25(\text{OH})\text{D}_3$ böbrekte 1- α -hidroksilaz enzimi ile biyolojik olarak aktif $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'e hidroksillenir (320). Vitamin D'nin aktif formu olan $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ vitamin D reseptörüne (VDR) bağlanır ve birçok transkripsiyon faktörünü aktifleştirir. Kolekalsiferol balık, yumurta, kırmızı et gibi pek çok diyet kaynağında bulunur.



CYP: sitokrom P450. Hv: fotokimyasal reaksiyonu

Şekil 2-8 Vitamin D metabolizması (321)'den değiştirilerek

2.8.2. VİTAMİN D RESEPTÖRÜ (VDR)

İlk olarak 1974 yılında tanımlanan VDR (322), vitamin D'nin aktif formuna ($1,25\text{D}$) biyolojik olarak bağlanarak etki eden bir reseptördür (321). DNA-bağlayan N terminal çift çinko parmak domaini, $1,25\text{D}$ 'ye bağlanan C terminal domaini ve 2 fonksiyonel domainle ilişkili olan 3 ayrı bölgeden oluşan nükleer hormon reseptördür. Kromozom 12q13.1 üzerinde 14 ekzondan oluşan ve geniş promotor bölgesiyle çoklu doku-spesifik transkriptlerini oluşturabilme yeteneğine sahiptir (323). VDR farklı hücre tiplerinde farklı ekspresyon seviyesi göstermekle beraber neredeyse tüm dokularda eksprese edilir (324).

1,25D'nin VDR'ye bağlanmasıyla VDR hücre içinde transkripsiyon faktörü olarak rol oynar. VDR, retinoik asit reseptörleri (R α R) ile heterodimer oluşturarak ilgili genlerin transkripsiyonlarını aktif hale getirir. Reseptörler arasındaki çeşitli fonksiyonlara sahip heterodimerizasyon hormonal uyarı sonucunda oluşan transkripsiyon cevap sayısını artırır. Bu etkileşimler DNA'da vitamin D cevap elementlerine (VDREs) bağlanarak (325) gen transkripsiyonunu başlatır. VDR homodimerleri R α R olmaksızın gen ekspresyonunu düzenlemek üzere DNA'ya bağlanabilir (326). Safra asidi, litokolik asit gibi sentetik VDR analogları da 1,25D'nin etkinliğinin düzenlenmesinde reseptörün ikincil ligandı olarak görev almaktadır (327). VDR geninde meydana gelen mutasyonlar, vitamin D'ye dirençli raşitizm gibi nadir monogenetik hastalıklara sebep olabilmektedir (328). VDR lokusunda bugüne kadar 25 den fazla farklı polimorfizm tespit edilmiştir (329). VDR geninde bulunan allellik farklılıklar hastalıklara karşı genetik yatkınlık oluşturabilmektedir. Vitamin D insülin salınımını düzenlediğinden, VDR geninin ve ilişkili olarak VDR geninde meydana gelebilecek mutasyonların T2DM gelişimini tetikleyebileceği düşünülmektedir (330).

2.8.3. VİTAMİN D BAĞLAYAN PROTEİN (DBP)

Calbindin-d_{28K} olarak bilinen DBP vitamin D metabolitlerinin spesifik taşıyıcısı olarak görev alan Gc (grup spesifik komponent) geni tarafından kodlanan (331, 332) ve karaciğer tarafından sentezlenip salınan polimorfik tek zincir serum glikoproteinidir (333). Vitamin D endositozu ve metabolizması için önemlidir (334). immünmodülasyona ve globüler aktin ve yağ asidi bağlanmasına etki etmektedir (335) DBP vitamin D ile birlikte kompleks bir halde bulunur ve hedef dokulara vitamin D'nin taşınmasını sağlar (333). DBP'de meydana gelen polimorfizmler ile T2DM arasında bir bağlantının olabileceği düşünülmektedir. Siyah ırkta DBP polimorfizmi ve T2DM arasında bir ilişki olduğu bulunmuştur (336, 337). Farklı DBP varyantları farklı afinitelerde vitamin D metabolitlerine bağlandığı ve β hücrelerinde vitamin D'nin intraselüler miktarını etkilediği ve adacık hücrelerinde artan yağ asidi konsantrasyonunun β hücre anormalliklerini indüklediği düşünülmektedir (336).

2.8.4. VİTAMİN D ve T2DM

Vitamin D, T2DM'in etyopatogenezinde ve önlenmesinde önemi giderek artan bir hormondur. Vitamin D eksikliğinin glukoz intoleransı için bir risk faktörü olduğu ve osteomalazi tedavisinde uzun süreli vitamin D kullanımının insülin salınımını artırıp glukoz toleransını iyileştirdiği (317, 338) dolayısıyla vitamin D eksikliğinin T2DM riskini artırdığı bilinmektedir (34, 339).

T2DM'in gelişimini tanımlayan ana sorunlar; pankreatik beta hücre fonksiyon bozukluğu, insülin direnci ve sistemik inflamasyondur. Pankreas adacıklarında bulunan beta hücrelerindeki fonksiyon bozukluğu veya beta hücre kaybı hiperglisemi ve hiperlipidemiye neden olur (340). Pankreatik adacık fizyolojisi vitamin D'yi de kapsayan pek çok faktörle düzenlenmektedir. Vitamin D eksikliği insülin salınımını bozmakta T2DM ve diğer metabolik hastalıklarla ilişkili olan insülin direncini artırmaktadır (341, 342). Glukozla uyarılmış insüline cevap deneyleri erken dönemde uygulanan vitamin D takviyesinin insülin salınım fonksiyonuna koruyucu etki gösterebileceği ancak geç dönemde uygulanan vitamin D takviyesinin etkili olmayacağı düşünülmektedir (343).

Vitamin D sitokinlerin etki ve oluşumlarını düzenleyerek de insülin salınımını artırır. Fas/Fas Ligand yolaklarının etkinliğini azaltarak anti-apoptotik etki gösterir (344, 345). Vitamin D dolaylı olarak kalsiyum bağlayıcı proteinleri düzenleyerek insülin salınımını etkileyebilmektedir (345). Yapılan çalışmalarla uzun süreli vitamin D tedavisinin insülin salınımını artırarak glukoz seviyesini normal hale getirdiğini göstermiştir (338).

2.8.5. VİTAMİN D ve HEPATİK METABOLİZMA

Hepatik metabolik fonksiyonların normal seyrinde devam edebilmesi için hepatik insülin direnci ve T2DM gelişiminin engellenmesi gerekmektedir. Vitamin D hepatik lipogenezise ve glukoneogenezise etki etmektedir. Vitamin D takviyesi hepatik insülin direncini düzenleyerek T2DM'i azaltmaktadır.

İnsan, sıçan ve farelerden elde edilen hepatositlerde VDR mRNA ve proteinlerinin çok az eksprese edildiği ya da hiç eksprese edilmediği bulunmuştur (346, 347). Diğer bir deyişle, hepatik yıldız hücreleri, sinüzoidal endotelyal hücreler ve Kupffer hücreleri gibi parankimal olmayan hücreler güçlü bir şekilde VDR ekspresyonunu yapar (348). Ancak inflamasyon ile birlikte hepatositlerde VDR seviyesinde artış görülmektedir. Ayrıca, inflamasyon ile artan hepatik stellat hücreleri ve Kupffer hücreleri ve diğer dokularda tanımlanmış VDR'nin immün fonksiyonları karaciğer hastalıkları ile ilişkili olabilmektedir (321).

2.8.6. VİTAMİN D, İNFLAMASYON ve ER STRESİ

T2DM sistemik inflamasyonla ilişkilidir. Aktif T lenfositlerde, makrofajlarda ve timüs dokusunda bulunan VDR, vitamin D'nin immün modülatör olarak rol alabileceği yönünde fikir oluşturmuştur (349-351). Vitamin D, makrofajların lenfositlere antijen sunma aktivitesini azaltmakta, dentritik hücre olgunlaşmasını, B hücrelerinde T lenfosit-ilişkili immünglobulin sentezini ve gecikmekli-tip-hiperduyarlılık reaksiyonlarını engellemektedir (317, 328, 329, 350, 352, 353). Sitokinlere etki ederek pankreatik beta hücrelerinde insülin duyarlılığını artırabilmektedir (354). Vitamin D'nin sitokin genlerinin ekspresyonunda rol oynayan NF- κ B üzerine etki ettiği gösterilmiştir (355). Vitamin D ve 25(OH)D₃ 1- α -dihidroksilaz enzimi monosit ve makrofajlarda bulunmaktadır. Vitamin D'nin aktif formu olan 1,25(OH)₂D monosit hücrelerinin adhezyonunu kolaylaştırır ve VDR aracılığıyla myeloid progenitörlerin makrofajlara farklılaşmasını uyarır (356, 357). T2DM ve diyabetik olmayan hastalardan izole edilen lipopolisakkarit ile uyarılmış monositlere uygulanan vitamin D'nin TNF- α , IL-6 ve IL-1 gibi pro-inflamatuar sitokinlerin üretimini engellediği gösterilmiştir (355, 358). Ayrıca vitamin D, doğal öldürücü hücrelerin oluşum ve aktivitesini bastırırken aktif lenfositler üzerinde anti-proliferatif etki göstermektedir (335, 350).

ER stresinin ve oksidatif stresin hücre ölümünü, doku hasarını ve organ disfonksiyonunu tetiklediği bilinmektedir. Tunicamycin ve yüksek dekstrozu konsantrasyonu ile oluşturulan ER stres modelinde 1,25-(OH)₂D₃ uygulamasının ER stresini inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca diğer vitamin D analoglarının tunicamycin ile uyarılmış ER stresini azalttığı gösterilmiştir. Tüm bu bulgular vitamin D'nin VDR ile

etkileşim halinde olan ko-aktivatör/ko-reseptörlerinin ekspresyonunun düzenlenmesinde rol aldığını göstermektedir (359).

2.9. İMMÜNOHİSTOKİMYA YÖNTEMİ

İmmunohistokimya radyoaktif olmayan çeşitli işaretleyiciler yardımıyla dokularda bulunan birtakım proteinlerin buldukları yerde, ışık mikroskopik seviyede görünebilir hale getirildiği bir yöntemdir. Yöntem tek aşamalı ya da iki aşamalıdır. Bu yöntem için yaygın olarak parafin kesitler, bunun dışında dondurma ve rezin kesitler de kullanılmaktadır. Parafin kesitlerde dokunun doğru bir prosedürle tespit edilmesi şarttır böylelikle dokuya ait antijenik yapı korunmuş olur. Yöntemde dokuda aranacak proteine karşı geliştirilmiş poliklonal veya monoklonal antikolar kullanılmaktadır. Dokuda aranan proteine karşı geliştirilmiş antikolar protein ile bağlanmakta ve bir antijen-antikor kompleksi oluşmaktadır. Oluşan bu kompleksin ışık mikroskopu altında gösterilebilmesi için birtakım işaretleyiciler kullanılmaktadır. Tek aşamalı yöntemde sinyal oluşturan haberci moleküller işarete karşı oluşturulan primer (birincil) antikora bağlanmaktadır. İki aşamalı yöntemde primer antikorun elde edildiği türe karşı oluşturulan sekonder (ikincil) bir antikor haberci molekülü taşımaktadır. İki aşamalı yöntem her bir primer antikora sinyal taşıyan birkaç sekonder antikorun birden bağlanabilmesi sebebiyle tek aşamalı yöntemden daha duyarlıdır (360).

2.9.1. Biotin-Streptavidin Yöntemi

Avidin, biotine karşı ilgisi olan bir glikoproteindir. Biotin ile işaretlenmiş proba haberci molekülü ya da sinyali içeren avidinin bağlanması ile biotin saptanır. Bir avidin molekülü dört biotin molekülü bağlayabildiğinden sinyal ileri derecede artırılmış olur. Streptavidin *Streptococcus avidini*'den elde edilmektedir. Yüksüz bir molekül olması ve özgül olmayan elektrostatik bağlanmaların az olması nedeniyle avidine alternatif olarak kullanılmaktadır (360).

2.9.1.1. Sinyal Oluşturan Sistemler (Haberci Moleküller)

İşaretlenen bölgelerin görünür hale getirilmesinde antikora ya da streptavidine bağlanan sinyal oluşturan sistemler diğer bir deyişle haberci moleküllerle sağlanır. Bunlar fluorokromlar, enzimler ve metaller olmak üzere 3'e ayrılır.

2.9.1.1.1. Fluorokromlar: streptavidine ya da antikora bağlanan fluorokromlar uygun dalga boyundaki ışıkta floresan ışımaya verir. En çok kullanılan fluorokromlara floresein izotiyosiyanat (FITC), Teksas kırmızısı, rodamin kırmızı ve amino-metil-kumarin asetik asit (AMCA) örnek verilebilir. Duyarlılığı yüksek, çözünürlüğü daha iyidir. Birden fazla probun aynı anda saptanmasına olanak vermektedir. Morfolojik görüntünün zayıflığı ve sinyalin çabuk solması gibi nedenleri ile dezavantajları bulunmaktadır.

2.9.1.1.2. Enzimler: En çok kullanılan enzimler peroksidaz ve alkalın fosfatazlardır. İşaretlenen bölgede görülebilen bir ürünün çökmesi mantığına dayanarak çalışır. Morfoloji daha iyi görüldüğünden işaretlenen bölgenin kesin yerleşimi belirlenebilir. Sinyal normal ışık mikroskopunda tespit edilebilir. Dayanıklı reaksiyon ürünü ile preparatların uzun süre saklanmasına olanak verir.

2.9.1.1.3. Metaller: Streptavidin ya da antikora bağlanmış halde bulunan kolloidal altın ile işaretlenen bölgenin tespiti yapılır. Sinyal hem ışık hem de elektron mikroskopunda gözlenebilir (360).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda 2017-2018 yılları arasında yapıldı. İstanbul Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu'ndan (205280 nolu) alınan etik kurul onayı ile çalışma İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Laboratuvar Hayvanları Anabilim Dalı'ndan temin edilen 56 adet 8 haftalık erkek Sprague-Dawley sıçan ile gerçekleştirildi. Her birinde 7 adet deney hayvanı olacak şekilde 8 adet deney grubu oluşturuldu.

Deney Grupları

Deney grubuna alınan tüm sıçanlar deneye başlamadan bir gece öncesinde aç bırakıldı. Kuyruk veninden alınan kandan glukometre cihazı ile açlık kan glukozu ölçümü yapıldı ve ardından deney başlatıldı. Ayrıca tüm grupların 2, 5, 7 ve 9. haftaların sonunda açlık kan glukoz ölçümleri tekrarlandı. Deney süresince her hafta tüm hayvanların ağırlık ölçümleri yapıldı. Her gün yem ve su tüketimleri ölçülerek her bir sıçanın aldığı günlük kalori hesaplandı. 1 gram standart yem 2,6 kalori, 1 gram fruktoz 4 kalori olarak kabul edildi. Günlük kalori; (tüketilen yem miktarı x 2,6) + (tüketilen fruktozlu su miktarı x40)/100 formülü ile hesaplandı.

Deney süresince tüm kontrol gruplarına çeşme suyu ve standart yem verildi. T2DM modeli oluşturulan gruplara ise 5 hafta süre ile her gün taze olarak hazırlanan %10'luk fruktozlu su çözeltisi ve standart yem verildi. 5. haftanın sonunda 4 haftalık tedavi süresince bu gruplara da çeşme suyu ve standart yem vermeye başlandı.

Kontrol Grupları

Her bir grupta 7 hayvan olacak şekilde 4 kontrol grubu oluşturuldu. Bu gruplara deney süresince çeşme suyu ve standart yem verildi. Deneyin 2. haftasının sonunda açlık kan glukozu ölçümünün ardından tek doz intraperitoneal (i.p) serum fizyolojik enjeksiyonu (%0,9 NaCl) yapıldı. 5. haftanın sonunda açlık kan glukozuna bakıldıktan sonra model oluşturma süreci tamamlanarak deneyin 4 hafta süren tedavi sürecine geçildi.

Grup I (n=7): Sağlıklı kontrol grubu (K)

Enjeksiyona bağlı oluşabilecek stresin her grupta aynı olması için 5. haftanın sonunda 4 hafta boyunca her gün tek doz i.p serum fizyolojik enjeksiyonu ve haftada 1 kez oral serum fizyolojik uygulaması yapılarak deney tamamlandı.

Grup II (n=7): Resveratrol uygulanan kontrol grubu (KR)

5. haftanın sonunda açlık kan glukozu ölçümünün ardından deneyin 4 hafta süren resveratrol tedavi sürecine geçildi. 4 hafta süre ile 1 mg/kg/gün dozunda i.p resveratrol uygulaması yapıldı. Resveratrol hazırlanırken önce DMSO ile çözüldükten sonra PBS ile dilüe edildi.

Grup III (n=7): Vitamin D uygulanan kontrol grubu (KD)

5. haftanın sonunda açlık kan glukozu ölçümü yapıldı ve deneyin 4 hafta süren vitamin D tedavi sürecine geçildi. 4 hafta boyunca haftada 1 kez oral vitamin D uygulaması (170 IU/hafta) yapılarak deney tamamlandı.

Grup IV (n=7): Resveratrol + vitamin D uygulanan kontrol grubu (KDR)

5. haftanın sonunda açlık kan glukozu ölçümünün ardından deneyin 4 hafta süren resveratrol ve vitamin D kombine tedavisi sürecine geçildi. 5. haftanın sonunda açlık kan glukozu ölçümünün ardından deneyin 4 hafta süren resveratrol tedavi sürecine geçildi. 4 hafta süre ile 1 mg/kg/gün dozunda i.p resveratrol uygulaması yapıldı. Resveratrol hazırlanırken önce DMSO ile çözüldükten sonra PBS ile dilüe edildi. Ayrıca bu gruba 4 hafta boyunca haftada 1 kez vitamin D uygulaması (170 IU/hafta, oral) yapılarak deney tamamlandı.

Diyabet Grupları

Her bir grupta 7 hayvan olacak şekilde 4 diyabetik grup oluşturuldu. Bu gruplara 2 hafta süre ile her gün taze olarak hazırlanan %10'luk fruktozlu su çözeltisi ve standart yem verildi. 2. haftanın sonunda açlık kan glukozu ölçümü yapıldı ve gruplardaki her bir sıçanın ağırlığı ölçülerek ağırlık ortalaması hesaplandı. Serum fizyolojik içerisinde çözdürülmüş Streptozotocin (STZ) 40 mg/kg tek doz i.p. olarak uygulandı. 48 saat sonra açlık kan glukozları ölçülerek 160 mg/dl olanlar diyabetik kabul edildi. 5. haftanın sonuna kadar sıçanlara içme suyu olarak %10'luk fruktozlu su verildi.

Grup V (n=7): Diyabet kontrol grubu (F)

5. haftanın sonunda açlık kan glukozu ölçümünün 4 hafta süren tedavi sürecine geçildi. 4 hafta boyunca her gün tek doz i.p PBS enjeksiyonu ve haftada 1 kez oral serum fizyolojik uygulaması yapılarak deney tamamlandı.

Grup VI (n=7): Resveratrol Uygulanan Diyabet Grubu (FR)

5. haftanın sonuna kadar sıçanlara içme suyu olarak %10'luk fruktozlu su verildi. 5. haftanın sonunda açlık kan glukozu ölçümünün 4 hafta süren tedavi sürecine geçildi. 4 hafta süre ile 1mg/kg/gün dozunda i.p resveratrol uygulaması yapıldı. Resveratrol hazırlanırken önce DMSO ile çözüldükten sonra PBS ile dilüe edildi.

Grup VII (n=7): Vitamin D Uygulanan Diyabet Grubu (FD)

5. haftanın sonunda açlık kan glukozu ölçümünün ardından 4 hafta süren tedavi sürecine geçildi. 4 hafta boyunca haftada 1 kez vitamin D uygulaması (170 IU/hafta, oral) yapılarak deney tamamlandı.

Grup VIII (n=7): Resveratrol + Vitamin D Uygulanan Diyabet Grubu (FDR)

5. haftanın sonunda açlık kan glukozu ölçümünün ardından deneyin 4 hafta süren resveratrol tedavi sürecine geçildi. 4 hafta süre ile 1 mg/kg/gün dozunda i.p resveratrol uygulaması yapıldı. Resveratrol hazırlanırken önce DMSO ile çözüldükten sonra PBS ile dilüe edildi. Ayrıca bu gruba 4 hafta boyunca haftada 1 kez vitamin D (170 IU/hafta, oral) uygulaması yapılarak deney tamamlandı.

9. haftanın sonunda tüm deney gruplarına ait sıçanlar açlık kan glukozu ölçümünün ardından ketamin/ksilazin (60 mg/kg/ 10 mg/kg) anestezisi altında sakrifiye edilerek karaciğer dokuları alındı.

Tablo 3.1 Deney düzeneği

GRUPLAR	0-2 Hafta	2.Haftanın Sonu	2-5 Hafta	5-9 Hafta
Sağlıklı Kontrol	İçme suyu Standart yem	Serum Fizyolojik Enjeksiyonu	İçme suyu Standart yem	İçme suyu Standart yem
Resveratrol Kontrol	İçme suyu Standart yem	Serum Fizyolojik Enjeksiyonu	İçme suyu Standart yem	İçme suyu Standart yem Resveratrol 1 mg/kg/gün,
Vitamin D Kontrol	İçme suyu Standart yem	Serum Fizyolojik Enjeksiyonu	İçme suyu Standart yem	İçme suyu Standart yem Oral vitamin D 170 IU/hafta
Resveratrol+Vitamin D Kontrol	İçme suyu Standart yem	Serum Fizyolojik Enjeksiyonu	İçme suyu Standart yem	İçme suyu Standart yem Resveratrol 1 mg/kg/gün Oral vitamin D 170 IU/hafta
Diyabet Kontrol	%10'luk fruktozlu su Standart yem	STZ enjeksiyonu 40 mg/kg, ip, tek doz	%10'luk fruktozlu su Standart yem	İçme suyu Standart yem
Diyabet-Resveratrol	%10'luk fruktozlu su Standart yem	STZ enjeksiyonu 40 mg/kg, ip, tek doz	%10'luk fruktozlu su Standart yem	İçme suyu Standart yem Resveratrol enjeksiyonu 1 mg/kg/gün, ip
Diyabet-Vitamin D	%10'luk fruktozlu su Standart yem	STZ enjeksiyonu 40 mg/kg, ip, tek doz	%10'luk fruktozlu su Standart yem	İçme suyu Standart yem Oral vitamin D 170 IU/hafta
Diyabet-Resveratrol+Vitamin D	%10'luk fruktozlu su Standart yem	STZ enjeksiyonu 40 mg/kg, ip, tek doz	%10'luk fruktozlu su Standart yem	İçme suyu Standart yem Resveratrol 1 mg/kg/gün Oral vitamin D 170 IU/hafta

Dokular

Anestezi altında alınan karaciğer doku örnekleri, %10'luk tamponlanmış nötral formalin ile +4°C bir gece fikse edildikten sonra, doku rutin takip prosedürüne uygun olarak göre sırasıyla %70, %90, %96 ve %100'lük alkol serilerinden geçirilerek parafin bloklara gömüldü. Mikrotom (Leica) yardımıyla alınan 5 µm'luk parafin doku kesitleri pozitif şarjlı lamlar üzerine alınıp bir gece 37°C'deki etüvde bekletilerek kesitlerin lam üzerine adhezyonu sağlandı.

Alınan doku kesitlerine monoklonal ve poliklonal antikorlar kullanılarak Streptavidin-Biotin- Peroksidaz yöntemi ile immünohistokimyasal boyama uygulandı.

İmmünohistokimyasal Boyama:

İmmünohistokimyasal boyama için ZytoChem Plus HRP Kit, Broad Spectrum kiti ve fare monoklonal GRP 78 (Santa Cruz Biotechnology, sc-376768CA), fare MAb PCNA Ab-1 (NeoMarkers, 106P1203A), Rb pAb NFκB p65 (Abcam, ab7970-1 435981), mAb tavşan Cleaved Caspase 3 (Cell Signaling, 9664S), IL-1β (Biorbyt, A0956), IL-6 (Biorbyt, A0928), poliklonal tavşan TNFα (Biorbyt, orb371962) antikorları kullanıldı. Kitin içinde tavsiye edilen boyama işlem sırası antikorlara göre modifiye edilerek takip edildi.

1. Pozitif şarjlı lamlara alınmış olan kesitler toluolde deparafinize edildikten sonra sırasıyla %100'lük, %96'lık ve %70'lik alkol serilerinden 3'er dakika süreyle geçirilerek distile suya indirilerek rehidrate edildi.
2. Parafin doku kesitleri antijen iyileştirilmesi için mikrodalgada sitrat tampon (pH:6.0) içerisinde 2 kez 3 dakika kaynatıldı.
3. Metanol ile hazırlanmış %3'lük H₂O₂ çözeltilisinde 10 dakika bekletildi. (Endojen peroksidaz lar bloke edildi.)
4. Kesitler PBS ile 2 kez 2 dakika yıkandı.
5. Zemin boyanmasının engellenmesi için kesitler bloklama solüsyonuyla 5 dakika inkübe edildi.
6. TNFα (1:150), IL-6 (1:150), IL-1β (1:150), Aktif Caspase-3 (1:300), GRP-78 (1:50), PCNA (1:100) ve NFκB (1:50) primer antikorları antikor dilüent (Zytomed Systems, G829-2) içinde çözüldükten sonra +4°C'de 1 gece inkübe edildi.

7. Kesitler 3 kez 2'şer dakika PBS ile yıkandı.
8. Kesitler 2. antikor ile 13 dakika inkübe edildi.
9. Kesitler 3 kez 2'şer dakika PBS ile yıkandı.
10. Kesitler Streptavidin-peroksidaz kompleksi ile 13 dakika inkübe edildi.
11. Kesitler 3 kez 2'şer dakika PBS ile yıkandı.
12. Substrat-kromojen (AEC; 3-amino-9-ethylcarbazole) solusyonu ile renk reaksiyonu elde edildi.
13. Işık mikroskobu altında gerçekleştirilen reaksiyon distile su ile durduruldu.
14. Mayer's hematoksilen ile 40 saniye süreyle çekirdek boyaması yapıldı.
15. Çeşme suyunda yıkanan kesitler PBS ile morartıldıktan sonra distile suya alındı.
16. Kesitler gliserin jel kapama solüsyonu ile kapatıldı.
17. Leica DM 2500 model ışık mikroskobu ve kamera sistemi kullanılarak görüntülendi ve Leica LAS programı ile değerlendirildi.

Boyama özgüllüğünün kontrolü: İmmün boyamanın kontrolü için bir negatif kontrol kullanıldı. Negatif kontrol olarak kullanılan kesite immün boyama işlemi aynen uygulandı sadece birinci antikor yerine PBS konularak bu safha atlandı.

İmmünohistokimya sonuçlarının değerlendirilmesi:

GRP78, TNF- α , IL-1 β ve IL-6 antikorlarının immün boyamalarının değerlendirilmesi için HSCORE analizi yapıldı. Tüm deney gruplarına ait doku kesitlerinde rastgele seçilmiş 8 farklı alanda hem immün pozitif hücre sayısı ve hem de boyanma yoğunluğu dikkate alınarak semi-kantitatif değerlendirme yapıldı. Her bir antikorun immün boyanma yoğunluğuna göre 4 kategori oluşturuldu. Buna göre: 0 (boyanma yok), 1+ (zayıf ancak tespit edilebilir boyanma), 2+ (orta yoğunlukta boyanma), 3+ (yoğun boyanma). Her bir kesit için HSCORE değeri [(1+Boyanma yoğunluk skoru) x (Hücre yüzdesi)] (269).

Işık mikroskobu altında (x400 büyütmede) tüm doku kesitlerinde rastgele seçilen 10 alanda PCNA, NF- κ B ve Kaspaz 3 immün pozitif hücreler sayıldı. "**İmmün pozitif hücre yüzdesi = (immün pozitif hücre sayısı/ toplam hücre sayısı)x100 formülü**" ile hesaplandı (361).

ANTİKOR	MARKA/KATALOG NUMARASI	DİLÜSYON ORANI
NF-κB p65	Abcam, Bristol, United Kingdom Ab7970-1 435981	1:50
PCNA	NeoMarkers, Fremont, CA, USA 106P1203A	1:100
Caspase 3	Cell Signaling, The Netherlands (D175) (5A1E) 9664S	1:300
IL-6	Biorbyt, Cambridge, England Orb6210 A0928	1:150
TNF-α	Biorbyt, Cambridge, England Orb371962	1:150
IL-1β	Biorbyt, Cambridge, England Orb10903 A0956	1:150
GRP78	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA sc-376768	1:50

İstatistiksel yöntemler

Tüm elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde SPSS 20.0 paket program kullanıldı. 3 ve daha fazla grubun kıyaslanmasında varyans analizi yapıldı. İkili grupların analizinde bağımsız T testi kullanıldı. Anlamlılık seviyesi $p < 0,05$ kabul edildi.

Hayvan Deneyinde Kullanılan Kimyasallar	Markası
Streptozotocin (STZ)	Adipogen LifeScience AG-CN2-0046
Resveratrol (C ₁₄ H ₁₂ O ₃)	Glentham Life Sciences GP5884
DMSO	Santa Cruz
Vitamin D	DEVİT-3 300.000 IU/ml I.M/ORAL Ampul, Deva İlaç
D-(-)-Fruktoz	Glentham Life Sciences GC9966
Ksilazin	Rompun %2 Bayer
Ketamin	Ketalar Pfizer
Steril Apirojen İzotonik NaCl çözeltisi	Medifleks Eczacıbaşı

Tablo 3.3 Hayvan deneyinde kullanılan kimyasallar

İmmünohistokimya da Kullanılan Kimyasallar	Markası
Fosfat Tamponu (PBS Tablet)	Sigma LifeScience
%10'luk Nötral Formalin	Manuel Hazırlandı
Sitrat Tamponu (pH:6)	Manuel Hazırlandı
%3'lük H ₂ O ₂ Çözeltisi	Manuel Hazırlandı
Toluen Gr For Analysis, 2,5 lt	Merck
Ethanol Absolute Gr For Analysis, 2,5 lt	Merck

Tablo 3.4 İmmünohistokimya da kullanılan kimyasallar

Kullanılan cihazlar

Cihaz	Markası
Etüv	Elektro-Mag M420B
Hassas terazi	Ohaus Galaxy 4000
Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	Elektro-Mag M221
Mikrodalga fırın	Beko 1550
Mikropipetler	MediSis, Ependorf
pH metre	Scheat pH-meter CG825
Saf su cihazı	Millipore Elix3
Vorteks	Elektro-Mag M16
Işık Mikroskobu	Olympus optical (CHL2-FM3)
Işık Mikroskobu	Leica (DM 2500)
Işık mikroskobu kamerası	Leica (DFC 280)
Sterilizatör	Elektro-Mag M420
Su banyosu	Köttermann
Mikrotom	Reichert 390965
Buzdolabı	Profilo
Derin dondurucu (-20)	Bosch
Boyama kabı	

Tablo 3.5: Kullanılan cihazlar

Kullanılan Sarf Malzemeler

Pozitif Yüklü Lam (72'lik Kutu)
Lamel 24x60
Mikrotom Bıçağı
İmmünohistokimya Kabı (Chamber)
Cam Malzemeler (Şale, Beher)
Sıcaklık Ölçer

Tablo 3.6: Kullanılan sarf malzemeler

4. BULGULAR

4.1. Açlık Kan Glukozu

Deney başlangıcında tüm deney hayvanlarının açlık kan glukoz değerleri ölçülerek deney grubuna dahil edildi. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı fark bulunamadı ($p=0,671$). 2 hafta süre ile %10'luk fruktoz uygulamasının ardından açlık kan şekeri ölçüldü. Fruktoz uygulanan diyabet-kontrol (F), vitamin D-diyabet (FD), resveratrol-diyabet (FR) ve vitamin D-resveratrol-diyabet (FDR) grupları ile fruktoz uygulanmayan sağlıklı kontrol (K), vitamin D-kontrol (KD), resveratrol-kontrol (KR) ve vitamin D-resveratrol-kontrol (KDR) grupları arasında çok ileri derecede anlamlı fark bulundu ($p<0.001$). STZ uygulamasından (40 mg/kg, i.p) 48 saat sonra yapılan açlık kan glukoz ölçümlerinde F, FD, FR ve FDR grupları ile K, KD, KR ve KDR grupları arasında çok ileri derecede anlamlı fark saptandı ($p<0.001$). 3 hafta sonra tedavi başlangıcında yapılan açlık kan glukozu ölçümleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde F, FD, FR ve FDR grupları ile K, KD, KR ve KDR grupları arasında çok ileri derecede anlamlı farkın devam ettiği görüldü ($p<0.001$). Tedaviye başladıktan 2 hafta sonra yapılan açlık kan glukozu ölçümlerinde fruktoz ve STZ uygulamasının uygulanan gruplarda tedavi ile birlikte kan glukozunun düşmeye başladığı görüldü. F grubu ile FD ($p<0,01$), FR ($p<0,05$) ve FDR ($p<0.001$) grupları arasında anlamlı fark bulundu. Ayrıca F grubu ile K, KD, KR, KDR grupları arasında çok ileri derecede anlamlı fark saptandı ($p<0,001$). FD ve FR grupları ile FDR grubu arasında da anlamlı fark bulundu (sırasıyla $p<0.05$ ve $p<0.01$). FD, FR ve FDR grupları ile kontrol grupları arasında da anlamlı fark saptandı ($p<0.001$). 4 haftalık tedavinin ardından yapılan ölçümde açlık kan glukozunun tedavili gruplarda düştüğü gözlemlendi. F grubu ile tüm gruplar arasında çok ileri derecede anlamlı fark ($p<0.001$) devam ederken, FR ile FDR grubu arasında anlamlı fark bulundu ($p<0.05$). Tüm kontrol grupları ile FD grubu ($p<0,01$) ve FR grubu ($p<0,001$) arasında anlamlı fark bulunurken, FDR grubu ile aralarında anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$) (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: Tüm deney gruplarına ait açlık kan glukozlarının (mg/dl) istatistiksel değerlendirilmesi

	F	FD	FR	FDR	K	KD	KR	KDR	P
0.GÜN	72,57±2,99	74,71±3,99	76,29±4,42	74,14±5,55	74,43±3,31	73,29±2,43	74,86±1,68	75,00±2,52	0,671
STZ ÖNCESİ	100,43±14,61 ^a	105,86±11,49 ^a	93,57±8,58 ^a	99,57±8,696 ^a	73,14±4,74	74,14±3,24	74,14±2,91	71,14±2,03	0,000
48.SAAT AKŞ	208,57±27,34 ^a	206,43±41,32 ^a	203,86±41,71 ^a	205,57±37,36 ^a	74,14±2,27	74,71±4,82	77,00±1,83	73,86±2,73	0,000
TEDAVİ BAŞLANGICI	207,29±24,74 ^a	200,71±34,33 ^a	203,71±35,84 ^a	192,43±26,79 ^a	75,43±2,22	76,00±3,05	74,14±4,22	72,43±2,37	0,000
TEDAVİ ORTASI	206,00±28,05	162,00±23,53 ^a	164,86±43,82 ^b	123,43±10,49 ^{c,d,f}	74,14±1,68 ^{c,e,g,i}	76,14±2,19 ^{c,e,g,h}	75,14±3,34 ^{c,e,g,h}	72,43±2,4 ^{c,e,g,i}	0,000
TEDAVİ SONU	207,14±24,9	114,29±17,93 ^a	120,71±44,04 ^a	87,14±6,77 ^{a,c}	74,71±3,30 ^{a,b,d}	73,14±1,77 ^{a,b,d}	74,71±2,98 ^{a,b,d}	74,43±1,62 ^{a,b,d}	0,000

STZ ÖNCESİ: ^ap<0,001 K, KD, KR ve KDR gruplarına kıyasla

48.SAAT: ^ap<0,001 K, KD, KR ve KDR gruplarına kıyasla

TEDAVİ BAŞLANGICI: ^ap<0,001 K, KD, KR ve KDR gruplarına kıyasla

TEDAVİ ORTASI: ^ap<0,01, ^bp<0,05 ve ^cp<0,001 F grubuna kıyasla; ^dp<0,05 ve ^ep<0,001 FD grubuna kıyasla; ^fp<0,01 ve ^gp<0,001 FR grubuna kıyasla; ^hp<0,01 ve ⁱp<0,001 FDR grubuna kıyasla.

TEDAVİ SONU: ^ap<0,001 F grubuna kıyasla; ^bp<0,01 FD grubuna kıyasla; ^cp<0,05 ve ^dp<0,001 FR grubuna kıyasla.

(K: Sağlıklı kontrol, KD:Kontrol-vitaminD, KR:Kontrol-resveratrol, KDR:Kontrol-vitaminD-resveratrol, F:Diyabet kontrol, FD:Diyabet-vitaminD, FR:Diyabet-resveratrol, FDR: Diyabet-vitaminD-resveratrol)

4.2. Vücut Ağırlığı

Deney grubuna dahil edilen tüm deney hayvanlarının ağırlık ölçümleri yapıldı. KD grubuna ait deney hayvanlarının ağırlık ortalaması diğer gruplara göre daha düşük bulundu. KD grubu (158,43±11,30) ile FR (241,07±55,63) ve FDR (236,07±67,39) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı (sırasıyla $p<0,01$ ve $<0,05$). KD grubu (199,21±15,52) ile FR (243,14±88,1) ve FDR (276,43±63,1) grupları arasındaki anlamlı fark STZ uygulamasının yapıldığı 2. Haftada da devam etti ($p<0,05$). Tedavilerin başladığı 5. Haftada ve deneyin sonlandığı 9. Haftada tüm gruplar birbirleriyle kıyaslandığında aralarında anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$) (Tablo 4.2).

Tablo 4.2: Tüm deney gruplarına ait vücut ağırlıklarının (gr) istatistiksel değerlendirilmesi

	F	FD	FR	FDR	K	KD	KR	KDR
Deney Başlangıcı	216,93±43,92	223,43±46,33	241,07±55,63 ^a	236,07±67,39 ^b	175,57±10,47	158,43±11,30	217,79±9,69	216,29±9,83
2.Hafta	259,14±52,48	260,14±47,68	271,5±49,3 ^a	276,43±63,1 ^a	239,14±12,87	199,21±15,52	257,14±14,98	254±13,16
5.Hafta	234,3±80,11	279,9±41,5	243,14±88,1	300,9±55,51	303,3±18,41	232,9±17,04	271,43±19,43	295±14,43
9.Hafta	258,71±69,16	279,57±37,15	286,14±91,82	322,29±56,95	331,29±14,81	248±28,13	302±30,64	308,86±14,51

Deney Başlangıcı: ^a $p<0,01$, ^b $p<0,05$ KD grubuna kıyasla. **2.Hafta:** ^a $p<0,05$ KD grubuna kıyasla.

(K: Sağlıklı kontrol, KD:Kontrol-vitaminD, KR:Kontrol-resveratrol, KDR:Kontrol-vitaminD-resveratrol, F:Diyabet kontrol, FD:Diyabet-vitaminD, FR:Diyabet-resveratrol, FDR: Diyabet-vitaminD-resveratrol)

4.3. Kalori Alımı

Tüm deney gruplarına ait sıçanların günlük tükettiği yem ve fruktozlu su miktarları ölçülerek aldıkları günlük kalori hesaplandı. Sıçanlara 2 hafta fruktoz uygulamasının sonu olan 2. haftanın, STZ uygulamasından bir hafta sonra 3. haftanın, üç hafta daha %10'luk fruktoz diyeti uygulanıp T2DM model oluşturma süreci tamamladığı 5. haftanın ve tedavi sürecinin tamamlandığı 9. hafta kalori değerleri dikkate alındı.

2., 3., 5. ve 9. haftalarda diyabet grubu (F), vitamin D tedavisi uygulanan diyabet grubu (FD) ve resveratrol tedavisi uygulanan diyabet grubu (FR) sağlıklı kontrol gruplarına (K, KD, KR, KDR) kıyasla ileri derecede anlamlı bulundu ($p \leq 0,001$). Sadece 3., 5. ve 9. haftalarda F grubu ile kombine tedavi uygulanan diyabetik grup (FDR) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0.05$).

Resveratrol ve vitamin D'nin birlikte uygulandığı diyabet grubu (FDR) 2., 3., 5.ve 9. haftalarda sağlıklı kontrol (K) ve resveratrol ve vitamin D'nin birlikte kullanıldığı sağlıklı kontrol grubuna (KDR) kıyasla ileri derecede anlamlı bulunurken vitamin D tedavisi uygulanan sağlıklı kontrol (KD) ve resveratrol tedavisi uygulanan sağlıklı kontrol (KR) grubuna kıyasla anlamlı bulundu ($p < 0,01$).

Tablo 4.3: Tüm deney gruplarına ait kalori alımının (kcal/kg) istatistiksel değerlendirilmesi

	F	FD	FR	FDR	K	KD	KR	KDR	<i>p</i>
2.HAFTA	74,05±6,83 ^a	70,23±4,68 ^a	69,5±4,11 ^a	66,32±2,64 ^a	55,3±2,94	59,81±5,06	57,43±4,33	52,72±2,41	0,000
3.HAFTA	75,43±4,28 ^{a,b}	69,98±4,41 ^a	70,41±3,40 ^a	67,21±2,38	53,9±3,53 ^d	60,08±4,7 ^b	58,15±5,28 ^c	52,34±2,1 ^d	0,000
5.HAFTA	75,51±5,04 ^{a,b}	69,68±5,07 ^a	74,02±2,79 ^a	67,63±3,84	53,9±3,53 ^c	58,11±4,28 ^d	58,93±6,32 ^d	55±2,09 ^c	0,000
9.HAFTA	73,85±4,17 ^{a,b}	72,86±1,52 ^a	74,65±3,02 ^{a,b}	68,7±1,13	56,31±2,5 ^c	59,15±1,18 ^c	62,19±5,38 ^d	57,39±2,18 ^c	0,000

2. HAFTA ^ap<0,001 K, KD, KR, KDR grubuna kıyasla

3.HAFTA ^ap<0,001 K, KD, KR, KDR grubuna kıyasla. ^bp<0,05, ^cp<0,01, ^dp<0,001; FDR grubuna kıyasla.

5.HAFTA ^ap≤0,001 K, KD, KR, KDR grubuna kıyasla. ^bp<0,05, ^dp<0,01, ^cp<0,001; FDR grubuna kıyasla.

9. HAFTA ^ap<0,001, K, KD, KR, KDR grubuna kıyasla. ^bp<0,05, p<0,01ve p<0,001 FDR grubuna kıyasla.

(K: Sağlıklı kontrol, KD:Kontrol-vitaminD, KR:Kontrol-resveratrol, KDR:Kontrol-vitaminD-resveratrol, F:Diyabet kontrol, FD:Diyabet-vitaminD, FR:Diyabet-resveratrol, FDR: Diyabet-vitaminD-resveratrol)

4.4.1. NF-κB:

NF-κB antikorunu kullanılarak immünohistokimyasal boyama yapılan karaciğer doku kesitlerinde, inaktif formdaki NF-κB, hücrelerin sitoplazmasında, aktif formdaki NF-κB ise nükleusta pozitif reaksiyon verdi. Nükleusları boyanan hücreler aktif NF-κB pozitif hücreler olarak kabul edildi.

Karaciğer dokularında NF-κB immünopozitif hücre sayılarının ortalama değerleri, F grubunda ($36,29 \pm 1,77$); FD grubunda ($20,06 \pm 3,52$); FR grubunda ($24,3 \pm 2,69$); FDR grubunda ($3,07 \pm 0,93$); K grubunda ($0,147 \pm 0,25$), KD grubunda ($0,118 \pm 0,2$); KR grubunda ($0,132 \pm 0,28$) ve KDR grubunda ($0,27 \pm 0,55$) olarak bulundu (Tablo 4.4)

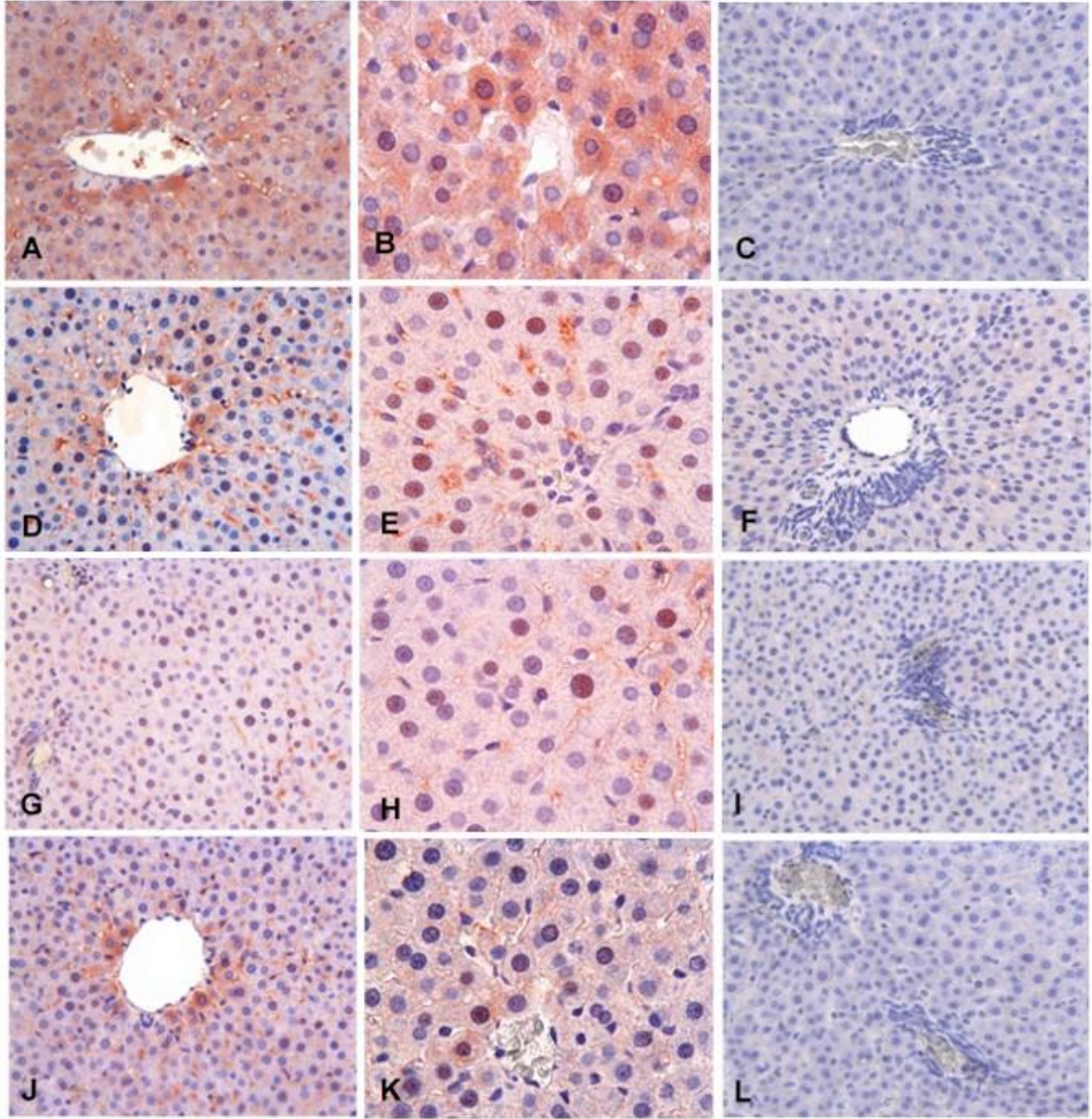
F grubu ile diğer tüm gruplar arasında NF-κB immün pozitif hücre sayısı bakımından çok ileri derecede anlamlı fark bulundu ($p < 0,001$). Ayrıca FD ($p < 0,001$), FR ($p < 0,001$) ve FDR ($p < 0,05$) gruplarına ait doku kesitlerindeki immün pozitif hücre sayısı ile K, KD, KR ve KDR grupları arasında anlamlı fark bulundu (Şekil 4.1).

Tablo 4.4: Tüm deney gruplarına ait NF- κ B immün pozitif hücre yüzdesinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.

	F	FD	FR	FDR	K	KD	KR	KDR	P
NF-κB	36,29 \pm 1,77	20,06 \pm 3,52 ^a	24,3 \pm 2,69 ^{a,b}	3,07 \pm 0,93 ^{a,b,c}	0,147 \pm 0,25 ^{a,b,c}	0,118 \pm 0,2 ^{a,b,c,d}	0,132 \pm 0,28 ^{a,b,c,d}	0,27 \pm 0,55 ^{a,b,c}	0,000

NF- κ B; ^ap<0,001 F grubuna kıyasla, ^bp<0,001 FD grubuna kıyasla, ^cp<0,001 FR grubuna kıyasla, ^dp<0,05 FDR grubuna kıyasla.

(K: Sağlıklı kontrol, KD:Kontrol-vitaminD, KR:Kontrol-resveratrol, KDR:Kontrol-vitaminD-resveratrol, F:Diyabet kontrol, FD:Diyabet-vitaminD, FR:Diyabet-resveratrol, FDR: Diyabet-vitaminD-resveratrol)



Şekil 4.1: NF- κ B antikoruna ile İmmünohistokimya yöntemiyle boyanan örneklerin mikroskop görüntüleri. **A, B:** F grubu, **C:** K grubu, **D,E:** FR grubu, **F:** KR grubu, **G, H:** FD grubu, **I:** KD grubu, **J, K:** FDR grubu, **L:** KDR grubu. İmmün boyama: Streptavidin- biotin- peroksidaz. Zıt boya: Hematoksilen. Büyütme: A,C,D,F,G,I,J,L: x20 ; B,E,H,K: x40.

(K: Sağlıklı kontrol, KD:Kontrol-vitaminD, KR:Kontrol-resveratrol, KDR:Kontrol-vitaminD-resveratrol, F:Diyabet kontrol, FD:Diyabet-vitaminD, FR:Diyabet-resveratrol, FDR: Diyabet-vitaminD-resveratrol)

4.4.2. IL-6:

IL-6 antikorunu kullanılarak immünohistokimya yöntemi ile boyanan karaciğer doku kesitlerinde, sitoplazmaları ve nukleusları boyanan hücreler IL-6 immün pozitif hücreler olarak değerlendirildi.

Karaciğer dokularında IL-6 immün pozitif hücreler hem pozitif hücre sayısı hem de boyanma şiddetine göre değerlendirilerek HSCORE analizi yapıldı. HSCORE ortalama değerleri, F grubunda (307,14±36,17); FD grubunda (127,68±20,74); FR grubunda (160,45±43,1); FDR grubunda (119,88±10,71); K grubunda (104,7±0,6), KD grubunda (102,32±0,42); KR grubunda (102,98±0,7) ve KDR (101,21±0,63) grubunda olarak bulundu (Tablo 4.5).

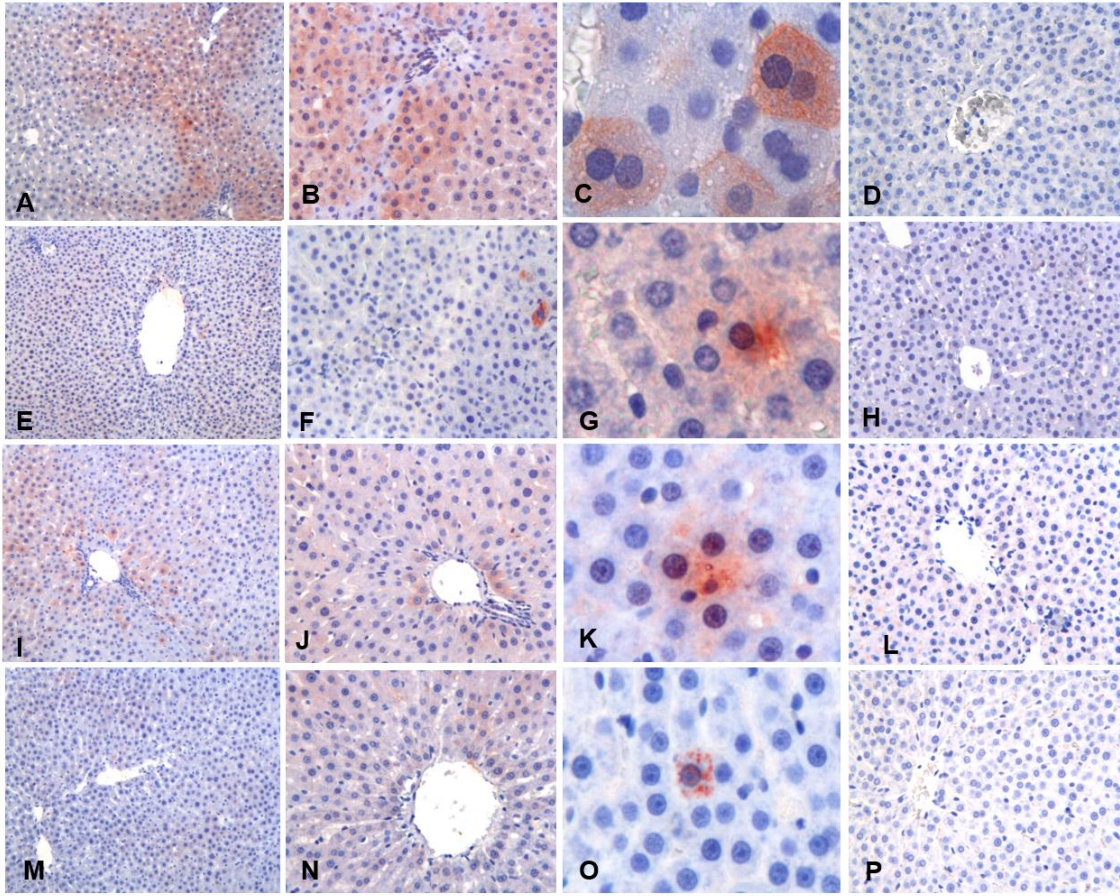
IL-6 immün pozitif hücrelerin genellikle santral ven ve portal ven çevresinde bulunduğu, nadir olarak hepatositlerin arasında dağılmış tek tek hücreler olduğu görüldü (Şekil 4.2). F grubunun diğer tüm deney grupları ile kıyaslandığında hem pozitif hücre sayısının çokluğu hem de boyanma şiddetleri nedeni ile HSCORE ortalamasının çok ileri derecede anlamlı olarak farklı olduğu saptandı ($p<0.001$). FR grubunun ise FDR grubu ve tüm kontrol grupları ($p<0,001$) ile arasında çok ileri derecede anlamlı fark olduğu tespit edildi. Vitamin D tedavisi uygulanan FD ve FDR gruplarında IL-6 immün pozitif hücre dağılımlarının kontrol grupları ile benzer olduğu ve aralarında istatistiksel olarak bir fark olmadığı saptandı ($p>0.05$) (Tablo 4.5) (Şekil 4.2).

Tablo 4.5: Tüm deney gruplarına ait IL-6 immünpozitifliğinin HSCORE analizi ile istatistiksel olarak değerlendirilmesi.

	F	FD	FR	FDR	K	KD	KR	KDR	P
IL-6	307,14±36,17	127,68±20,74 ^a	160,45±43,1 ^a	119,88±10,71 ^{a,b}	104,7±0,6 ^{a,b}	102,32±0,42 ^{a,b}	102,98±0,7 ^{a,b}	101,21±0,6 ^{a,b}	0,000

IL-6; ^ap<0,001 F grubuna kıyasla ^bp<0,001 FR grubuna kıyasla

(K: Sağlıklı kontrol, KD:Kontrol-vitaminD, KR:Kontrol-resveratrol, KDR:Kontrol-vitaminD-resveratrol, F:Diyabet kontrol, FD:Diyabet-vitaminD, FR:Diyabet-resveratrol, FDR: Diyabet-vitaminD-resveratrol)



Şekil 4.2: IL-6 antikoruna ile İmmünohistokimya yöntemiyle boyanan örneklerin mikroskop görüntüleri. **A:** F grubu x10, **B:** F grubu x20, **C:** F grubu x40, **D:** K grubu x20, **E:** FD grubu x10, **F:** FD grubu x20, **G:** FD grubu x40, **H:** KD grubu x20, **I:** FR grubu x10, **J:** FR grubu x20, **K:** FR grubu x40, **L:** KR grubu x20, **M:** FDR grubu x10, **N:** FDR grubu x20, **O:** FDR grubu x40, **P:** KDR grubu x20. İmmün boyama: Streptavidin- biotin- peroksidaz. Zıt boya: Hematoksilen. Büyütme: x20

(K: Sağlıklı kontrol, KD:Kontrol-vitaminD, KR:Kontrol-resveratrol, KDR:Kontrol-vitaminD-resveratrol, F:Diyabet kontrol, FD:Diyabet-vitaminD, FR:Diyabet-resveratrol, FDR: Diyabet-vitaminD-resveratrol)

4.4.3. IL-1 β :

Karaciğer doku kesitlerinde IL-1 β beta antikoru kullanılarak yapılan immünohistokimya yönteminde sitoplazmaları boyanan hücreler immün pozitif hücreler olarak kabul edildi ve HSCORE ile analiz edildi.

HSCORE ortalama değerleri, F grubunda (269,57 \pm 28,97); FD grubunda (196,85 \pm 13,1); FR grubunda (163,45 \pm 54,68); FDR grubunda (113,4 \pm 11,23); K grubunda (104,7 \pm 0,6), KD grubunda (102,31 \pm 0,42); KR grubunda (103,00 \pm 0,68) ve KDR (101,2 \pm 0,6) grubunda olarak bulundu (Tablo 4.6).

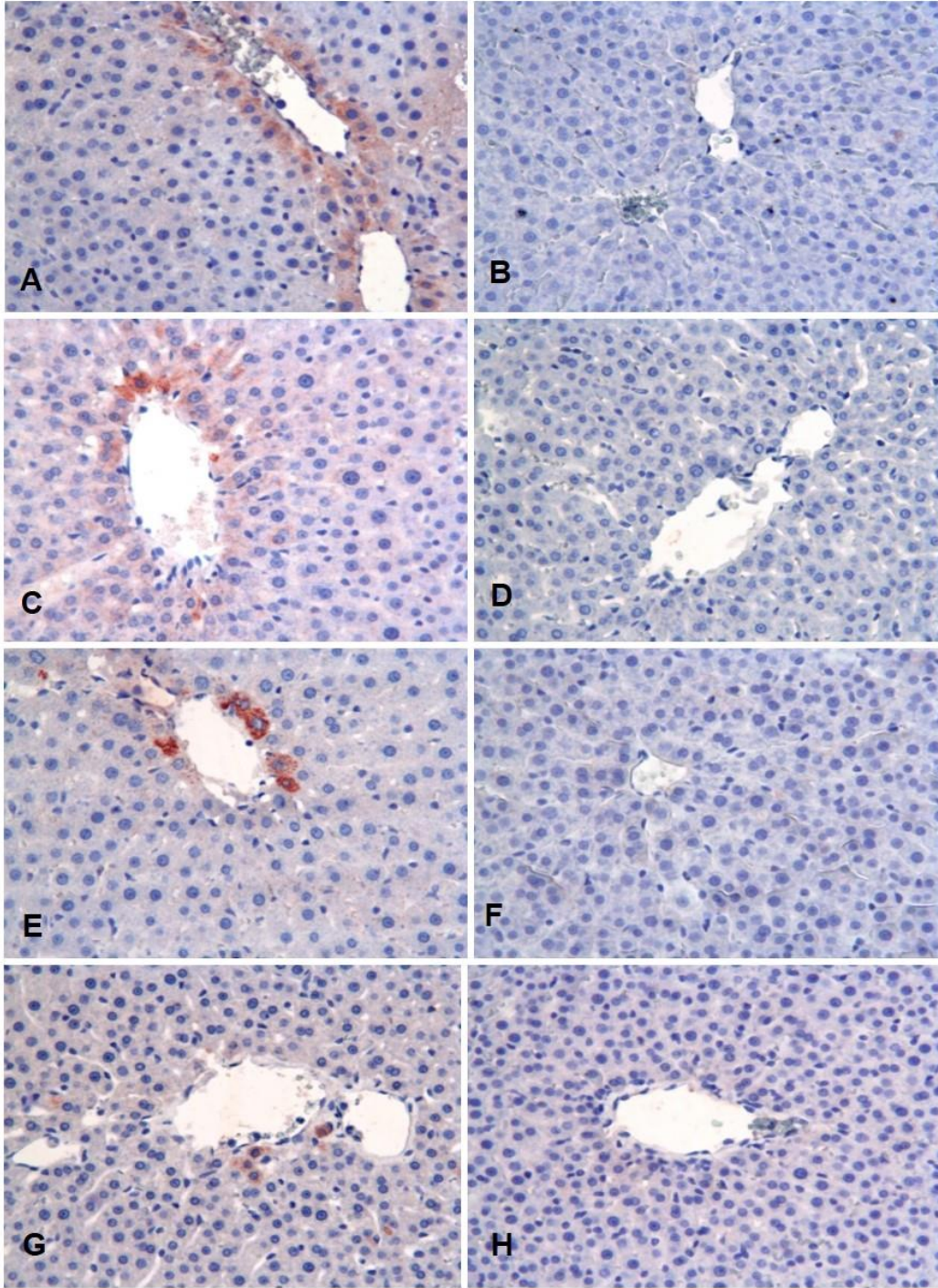
IL-1 β immün pozitif hücrelerin genellikle santral ven çevresinde buldukları gözlemlendi (Şekil 4.3). İmmünohistokimya HSCORE ortalamalarının F grubunda diğer tüm gruplara oranla yüksek olduğu ve istatistiksel olarak çok ileri derecede anlamlı fark bulunduğu saptandı (p<0.001). FD ve FR gruplarının hem FDR grubu (sırasıyla p<0,001 ve p<0,01) hem de kontrol gruplarıyla (p<0,001) aralarında anlamlı fark olduğu saptandı (Tablo 4.6) (Şekil 4.3).

Tablo 4.6: Tüm deney gruplarına ait IL-1 β immünpozitifliğinin HSCORE analizi ile istatistiksel olarak değerlendirilmesi.

	F	FD	FR	FDR	K	KD	KR	KDR	P
IL-1β	269,57 \pm 28,97	196,85 \pm 13,1 ^a	163,45 \pm 54,68 ^a	113,4 \pm 11,23 ^{a,b,d}	104,7 \pm 0,6 ^{a,b,c}	102,31 \pm 0,42 ^{a,b,c}	103,00 \pm 0,68 ^{a,b,c}	101,2 \pm 0,6 ^{a,b,c}	0,000

IL-1 β ; ^ap<0,001 F grubuna kıyasla; ^bp<0,001 FD grubuna kıyasla ^cp<0,001 ve ^dp<0,01 FR grubuna kıyasla

(K: Sağlıklı kontrol, KD:Kontrol-vitaminD, KR:Kontrol-resveratrol, KDR:Kontrol-vitaminD-resveratrol, F:Diyabet kontrol, FD:Diyabet-vitaminD, FR:Diyabet-resveratrol, FDR: Diyabet-vitaminD-resveratrol)



Şekil 4.3: IL-1 β antikoruna ile İmmünohistokimya yöntemiyle boyanan örneklerin mikroskop görüntüleri. **A:** F grubu x20, **B:** K grubu x20, **C:** FD grubu x20, **D:** KD grubu x20, **E:** FR grubu x20, **F:** KR grubu x20, **G:** FDR grubu x20, **H:** KDR grubu x20 (K: Sağlıklı kontrol, KD:Kontrol-vitaminD, KR:Kontrol-resveratrol, KDR:Kontrol-vitaminD-resveratrol, F:Diyabet kontrol, FD:Diyabet-vitaminD, FR:Diyabet-resveratrol, FDR: Diyet-vitaminD-resveratrol)

4.4.4. TNF- α :

TNF- α antikoru kullanılarak immünohistokimya yöntemi ile boyanan karaciğer doku kesitlerinde, sitoplazmaları boyanan hücreler TNF- α immün pozitif hücreler olarak değerlendirildi.

İmmün pozitif hücre dağılımı ve boyanma şiddetine göre yapılan HSCORE analizi sonucu ortalama değerleri, F grubunda (268,86 \pm 30,47); FD grubunda (148,79 \pm 36,09); FR grubunda (141,2 \pm 18,38); FDR grubunda (118,97 \pm 10,96); K grubunda (104,7 \pm 0,6), KD grubunda (102,98 \pm 0,68); KR grubunda (101,21 \pm 0,63) ve KDR (101,2 \pm 0,63) grubunda olarak bulundu (Tablo 4.7).

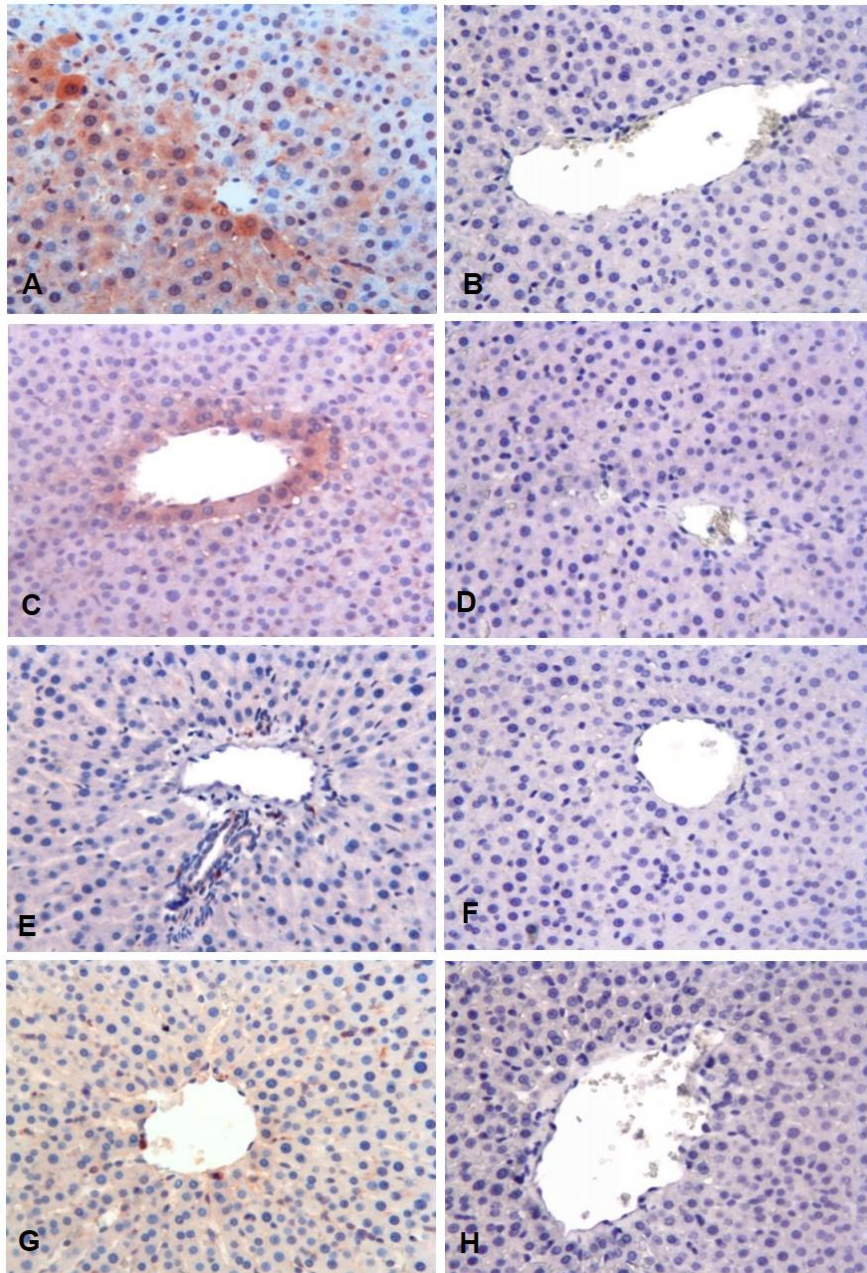
TNF- α immün pozitif hücrelerin genellikle santral ven çevresinde nadir olarak portal alanda buldukları gözlemlendi (Şekil 4.4). İmmünohistokimya HSCORE ortalamalarının F grubunda diğer tüm gruplara oranla yüksek olduğu ve istatistiksel olarak çok ileri derecede anlamlı fark bulunduğu saptandı ($p < 0.001$). FD ve FR gruplarının FDR grubu ile aralarında anlamlı bir fark bulunmazken ($p > 0.05$), tüm kontrol gruplarıyla ($p < 0,001$) aralarında çok ileri derecede anlamlı fark olduğu tespit edildi ($p < 0.001$) (Tablo 4.7).

Tablo 4.7: Tüm deney gruplarına ait TNF- α immünpozitifliğinin HSCORE analizi ile istatistiksel olarak değerlendirilmesi.

	F	FD	FR	FDR	K	KD	KR	KDR	P
TNF-α	268,86 \pm 30,47	148,79 \pm 36,09 ^a	141,2 \pm 18,38 ^a	118,97 \pm 10,96 ^a	104,7 \pm 0,6 ^{a,b,c}	102,98 \pm 0,68 ^{a,b,c}	101,21 \pm 0,6 ^{a,b,c}	101,2 \pm 0,63 ^{a,b,c}	0,000

TNF- α ; ^ap<0,001 F grubuna kıyasla. ^bp<0,001 FD grubuna kıyasla. ^cp<0,001 FR grubuna kıyasla

(K: Sağlıklı kontrol, KD:Kontrol-vitaminD, KR:Kontrol-resveratrol, KDR:Kontrol-vitaminD-resveratrol, F:Diyabet kontrol, FD:Diyabet-vitaminD, FR:Diyabet-resveratrol, FDR: Diyabet-vitaminD-resveratrol)



Şekil 4.4: TNF- α antikoruna ile İmmünohistokimya yöntemiyle boyanan örneklerin mikroskop görüntüleri. **A:** F grubu, **B:** K grubu, **C:** FD grubu, **D:** KD grubu, **E:** FR grubu, **F:** KR grubu, **G:** FDR grubu, **H:** KDR grubu. İmmün boyama: Streptavidin-biotin- peroksidad. Zıt boya: Hematoksilen. Büyütme: x20

(K: Sağlıklı kontrol, KD:Kontrol-vitaminD, KR:Kontrol-resveratrol, KDR:Kontrol-vitaminD-resveratrol, F:Diyabet kontrol, FD:Diyabet-vitaminD, FR:Diyabet-resveratrol, FDR: Diyet-vitaminD-resveratrol)

4.4.5. GRP78:

Karaciğer doku kesitlerinin immünohistokimya yöntemi ile boyanması sonucu, sitoplazmaları boyanan hücreler aktif GRP78 pozitif hücreler olarak değerlendirildi.

Karaciğer dokularında GRP78 HSCORE ortalama değerleri, F grubunda ($350 \pm 21,04$); FD grubunda ($177,65 \pm 55,6$); FR grubunda ($169,43 \pm 39,62$); FDR grubunda ($127,91 \pm 44,01$); K grubunda ($104,7 \pm 0,6$), KD grubunda ($102,3 \pm 0,42$); KR grubunda ($102,31 \pm 0,42$) ve KDR grubunda ($101,21 \pm 0,63$) olarak bulundu.

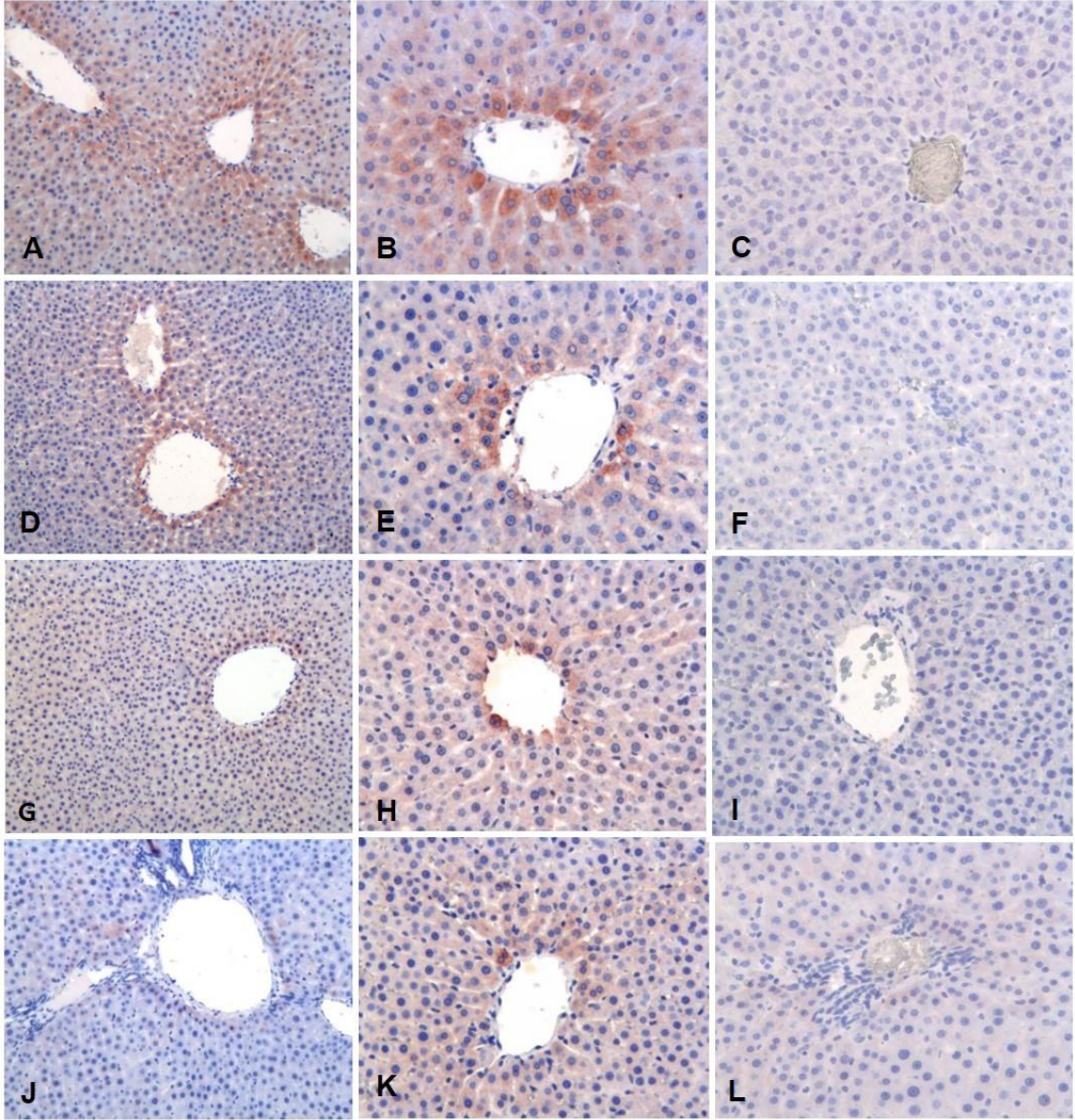
HSCORE analizi, hem GRP78 pozitif hücre sayısının ve hem de boyanma yoğunluğunun F grubunda diğer tüm gruplara göre istatistiksel olarak çok ileri derecede anlamlı olarak yüksek olduğunu gösterdi ($p < 0.001$). GRP78 pozitif hücrelerin özellikle santral ven çevresinde bulunan hepatositler olduğu gözlemlendi (Şekil 4.5) FD ve FR gruplarında HSCORE analiz ortalamalarının kontrol gruplarına kıyasla anlamlı olarak yüksek olduğu saptandı (sırasıyla $p < 0.001$ ve $p < 0.01$). FDR grubunda ise santral ven çevresinde birkaç GRP78 immün pozitif hücre gözlemlendi. FD, FR ve tüm kontrol grupları ile arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p > 0.05$) (Tablo 4.8) (Şekil 4.5)

Tablo 4.8: Tüm deney gruplarına ait GRP78 immünpozitifliğinin HSCORE analizi ile istatistiksel olarak değerlendirilmesi.

	F	FD	FR	FDR	K	KD	KR	KDR	P
GRP78	350±21,04	177,65±55,6 ^a	169,43±39,62 ^a	127,91±44,01 ^a	104,7±0,6 ^{a,b,c}	102,3±0,42 ^{a,b,c}	102,31±0,42 ^{a,b,c}	101,2±0,63 ^{a,b,c}	0,000

GRP78; ^ap<0,001 F grubuna kıyasla; ^bp<0,001 FD grubuna kıyasla; ^cp<0,01 FR grubuna kıyasla

(K: Sağlıklı kontrol, KD:Kontrol-vitaminD, KR:Kontrol-resveratrol, KDR:Kontrol-vitaminD-resveratrol, F:Diyabet kontrol, FD:Diyabet-vitaminD, FR:Diyabet-resveratrol, FDR: Diyabet-vitaminD-resveratrol)



Şekil 4.5: GRP78 antikoruna ile İmmünohistokimya yöntemiyle boyanan örneklerin mikroskop görüntüleri. **A**., **B**.: F grubu x20, **C**: K grubu **D**: **E**: FD grubu **F**: KD grubu, **G**, **H**: FR grubu, **I**: KR grubu, **J**, **K**: FDR grubu, **L**: KDR grubu. İmmün boyama: Streptavidin- biotin- peroksidaz. Zıt boya: Hematoksilen. Büyütme: x20

(K: Sağlıklı kontrol, KD:Kontrol-vitaminD, KR:Kontrol-resveratrol, KDR:Kontrol-vitaminD-resveratrol, F:Diyabet kontrol, FD:Diyabet-vitaminD, FR:Diyabet-resveratrol, FDR: Diyabet-vitaminD-resveratrol)

4.4.6. Kaspaz-3:

Karaciğer doku kesitlerinin immünohistokimyasal boyanması sonucu, nukleusları ve sitoplazmaları boyanan hücreler kaspaz-3 pozitif hücreler olarak değerlendirildi.

Karaciğer dokularında kaspaz-3 immünpozitif hücre sayılarının ortalama yüzde değerleri, F grubunda ($2,93\pm 0,39$); FD grubunda ($1,12\pm 0,25$); FR grubunda ($0,22\pm 0,18$); FDR grubunda ($0,09\pm 0,007$); K grubunda ($0,047\pm 0,006$), KD grubunda ($0,04\pm 0,007$); KR grubunda ($0,034\pm 0,008$) ve KDR grubunda ($0,025\pm 0,01$) olarak bulundu (Tablo 4.9).

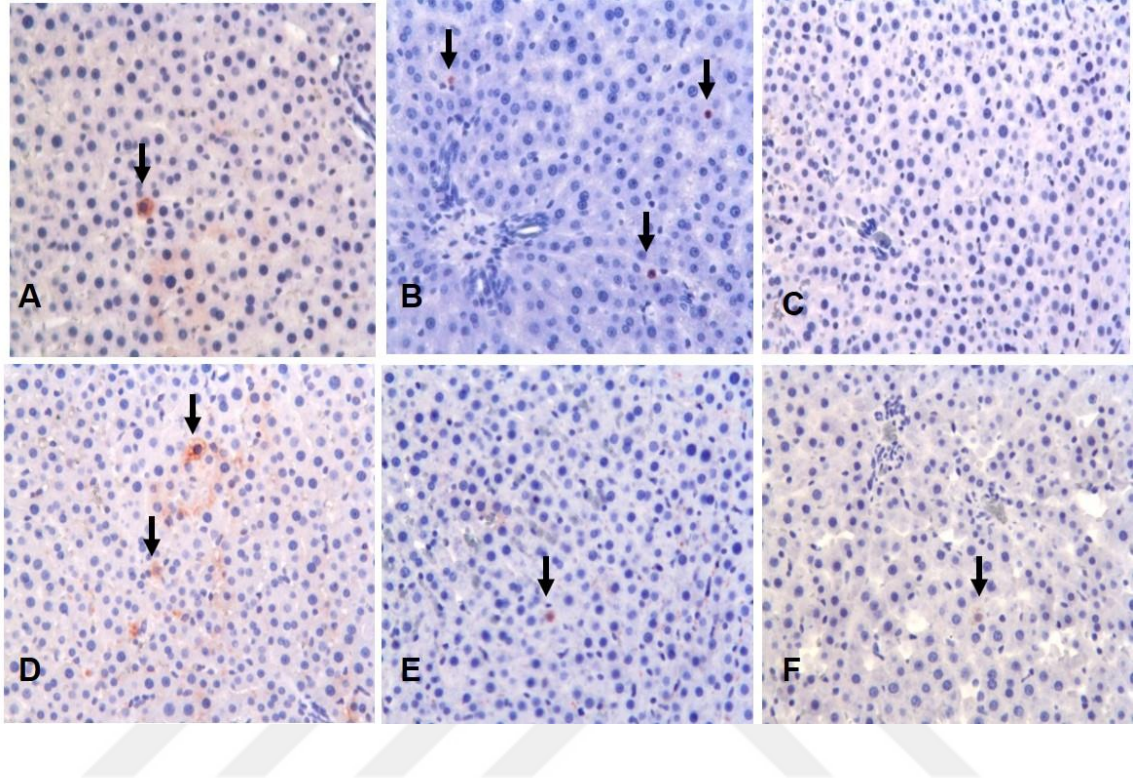
Sadece F ve FD gruplarında her alanda 2-3 aktif kaspaz-3 immün pozitif hücreye rastlandı ve bu gruplardaki immün hücre sayıları ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak çok ileri derecede anlamlı fark bulundu ($p<0,001$). Ayrıca F ($2,93\pm 0,39$) ve FD gruplarında ($1,12\pm 0,252$) grupları arasında kaspaz-3 immün pozitif hücre sayısı bakımında çok ileri derecede anlamlı fark bulundu ($p<0,001$). Diğer deney gruplarında tüm kesit alanında çok nadir birkaç immün pozitif hücreye rastlandı (Şekil 4.6).

Tablo 4.9: Tüm deney gruplarına ait kaspaz-3 immün pozitif hücre yüzdesinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.

	F	FD	FR	FDR	K	KD	KR	KDR	P
Kaspaz-3	2,93±0,39	1,12±0,252 ^b	0,22±0,18 ^a	0,09±0,007 ^a	0,047±0,006 ^a	0,04±0,007 ^a	0,034±0,008 ^a	0,025±0,01 ^a	0,000

Kaspaz-3; ^ap<0,001 F ve FD grubuna kıyasla. ^bp<0,001 F grubuna kıyasla

(K: Sağlıklı kontrol, KD:Kontrol-vitaminD, KR:Kontrol-resveratrol, KDR:Kontrol-vitaminD-resveratrol, F:Diyabet kontrol, FD:Diyabet-vitaminD, FR:Diyabet-resveratrol, FDR: Diyabet-vitaminD-resveratrol)



Şekil 4.6: Kaspaz 3 antikoruna ile İmmünohistokimya yöntemiyle boyanan örneklerin mikroskop görüntüleri. **A, B:** F grubu **C:** K grubu x20, **D, E:** FD grubu, **F:** KD grubu İmmün boyama: Streptavidin- biotin- peroksidaz. Zıt boya: Hematoksilen. Büyütme: x20.

(K: Sağlıklı kontrol, KD:Kontrol-vitaminD, KR:Kontrol-resveratrol, KDR:Kontrol-vitaminD-resveratrol, F:Diyabet kontrol, FD:Diyabet-vitaminD, FR:Diyabet-resveratrol, FDR: Diyabet-vitaminD-resveratrol)

4.4.7. PCNA:

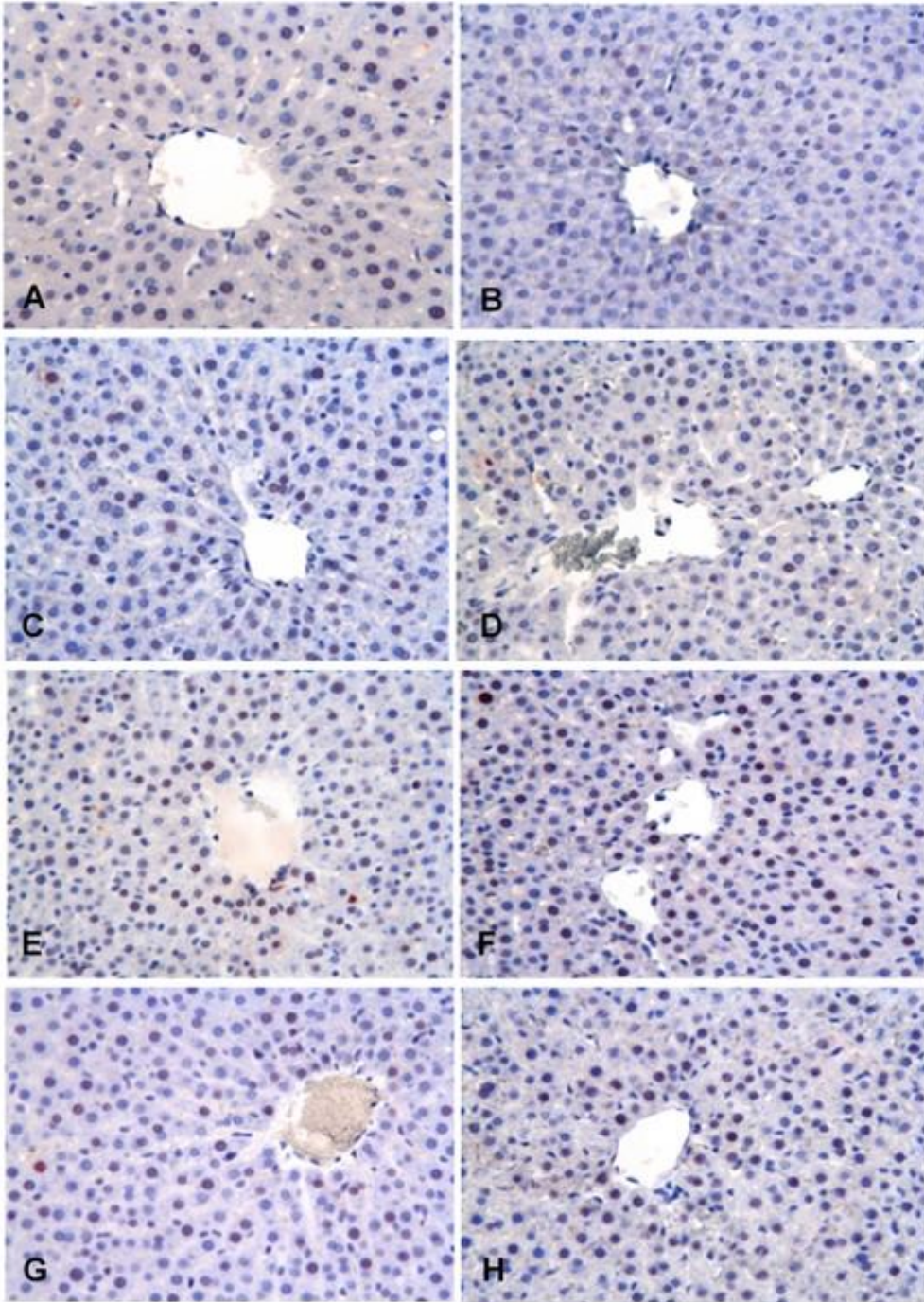
Karaciğer doku kesitlerinin immünohistokimyasal boyanması sonucu, nukleusları boyanan hücreler PCNA pozitif hücreler olarak değerlendirildi. Karaciğer dokularında PCNA immünpozitif hücre sayılarının ortalama yüzde değerleri, F grubunda (16,484±0,56); FD grubunda (28,522±1,91); FR grubunda (42,142±5,11); FDR grubunda (38,696±2); K grubunda (14,84±12,74), KD grubunda (37,72±1,47); KR grubunda (51,83±1,12) ve KDR grubunda (48,83±6,24) olarak bulundu (Tablo 4.10). %10'luk fruktoz ve 40 mg/kg STZ uygulanıp tedavi uygulanmayan diyabetik grup ile tedavi uygulanan diyabetik ve kontrol gruplar PCNA immün pozitif hücre sayıları bakımında kıyaslandığında aralarında ileri derecede anlamlı fark bulundu ($p<0,001$). Sadece F grubu grubu (16,484±0,56) ile K grubu (14,84±12,74) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$). Resveratrol uygulamasının, vitamin D ve kombine resveratrol+vitamin D uygulamasına göre hem diyabetik hem de kontrol gruplarında PCNA ekspresyonunu daha fazla uyardığı saptandı. Kombine resveratrol + vitamin D tedavisinin tek başına vitamin D tedavisine göre PCNA pozitif hücre sayısını daha fazla arttırdığı hem kontrol hem de diyabetik gruplarda tespit edildi (Şekil 4.7).

Tablo 4.10: Tüm deney gruplarına ait PCNA immün pozitif hücre yüzdesinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi

	F	FD	FR	FDR	K	KD	KR	KDR	P
PCNA	16,484±0,56	28,522±1,91 ^a	42,142±5,11 ^{b,d}	38,696±2,56 ^{b,c}	14,84±12,74 ^{d,e,g}	37,72±1,47 ^{b,i}	51,83±1,12 ^{b,d,f,g,i,j}	48,83±6,24 ^{b,d,h,i,k}	0,000

PCNA; ^ap<0,01 ve ^bp<0,001 F grubuna kıyasla ^cp<0,05 ve ^dp<0,001 FD grubuna kıyasla, ^ep<0,05 ve ^fp<0,001 FR grubuna kıyasla, ^gp<0,001 ve ^hp<0,05 FDR grubuna kıyasla, ⁱp<0,001 K grubuna kıyasla, ^jp<0,001 ve ^kp<0,01 KD grubuna kıyasla

(K: Sağlıklı kontrol, KD:Kontrol-vitaminD, KR:Kontrol-resveratrol, KDR:Kontrol-vitaminD-resveratrol, F:Diyabet kontrol, FD:Diyabet-vitaminD, FR:Diyabet-resveratrol, FDR: Diyabet-vitaminD-resveratrol)



Şekil 4.7: PCNA antikoru ile İmmünohistokimya yöntemiyle boyanan örneklerin mikroskop görüntüleri. **A:** F grubu, **B:** K grubu, **C:** FD grubu, **D:** KD grubu, **E:** FR grubu, **F:** KR grubu, **G:** FDR grubu, **H:** KDR grubu. İmmün boyama: Streptavidin-biotin- peroksidaz. Zıt boya: Hematoksilen. Büyütme: x20.

(K: Sağlıklı kontrol, KD:Kontrol-vitaminD, KR:Kontrol-resveratrol, KDR:Kontrol-vitaminD-resveratrol, F:Diyabet kontrol, FD:Diyabet-vitaminD, FR:Diyabet-resveratrol, FDR: Diyabet-vitaminD-resveratrol)

5. TARTIŞMA

Tip 2 Diabetes Mellitus (T2DM), pankreatik beta hücre kaybı ya da fonksiyon bozukluğu sonucu ortaya çıkan hipergliseminin periferik dokularda neden olduğu insülin direnci ile karakterize metabolik bir hastalıktır (59, 362). Genellikle yetişkinler arasında yaygın olan T2DM'un, son yıllarda çocukluk ve ergenlik dönemindeki bireylerde de görülme sıklığı artmaktadır (363).

T2DM'un dünya genelinde artan prevalansı, yeni tedavi seçenekleri ve ilaçları geliştirebilmek için hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmaları artırmıştır (364). Wilson ve Islam (2012), T2DM hastalığının patogenezinin en yakın olduğu düşünülen genetik olmayan alternatif bir model geliştirmiştir. Geliştirilen model ile sıçanlara 2 hafta boyunca %10'luk, %20'lik, %30'luk veya %40'luk fruktozlu su ve standart yem diyetini takiben 2. haftanın sonunda intraperitonel 40 mg/kg STZ enjeksiyonu uygulamıştır. STZ enjeksiyonundan 1 hafta sonra kan glukozu ölçülmüş ve tokluk kan glukoz seviyesi 200-300 mg/dl'den büyük olanlar diyabetik olarak kabul edilmiştir (5). Bu model daha sonra birçok araştırmacı tarafından da kullanılmıştır (365-368).

Bu çalışmada, 2 hafta boyunca %10'luk fruktozlu su ve standart yem diyetini takiben 2. haftanın sonunda 40 mg/kg STZ enjeksiyonu uygulandı. STZ uygulamasından 48 saat sonra açlık kan glukozu ölçüldü, açlık kan glukozu >160mg/dl olanlar diyabetik kabul edildi. Wilson ve Islam'ın modelinden farklı olarak STZ enjeksiyonu sonrasında 3 hafta daha %10'luk fruktozlu su ve standart yem diyetine devam edildi. 5. haftanın sonunda da tedavi uygulamalarına başlandı. Buradaki amaç diyabet oluşuktan sonra fruktozdan zengin diyetle beslenmenin yol açtığı hasarların tedavi ile ne kadar geri döndürebildiği sorusuna cevap aramaktır. Literatürde uyguladığımız deney protokolüne rastlanmamıştır, bu model ilk olacaktır.

Wilson ve Islam'ın modelinde olduğu gibi araştırmacılar 2 hafta %10 ya da %20'lik fruktoz uygulamasını takiben 35 veya 40 mg/kg STZ uygulaması yaptıktan 72 saat ya da bir hafta sonra kan glukozunu ölçtüklerinde, kan şekeri >250-300 mg/dl olan sıçanları diyabet olarak kabul etmiştir. Bu çalışmada açlık kan glukoz ölçümü 48.

saatte yapılmış, tüm diyabetik gruplarda ortalama açlık kan glukoz değeri >200mg/dl bulunmuştur. Herhangi bir tedavi uygulanmayan diyabet kontrol grubunun (F grubu) deney sonuna kadar 9 haftalık süreçte açlık kan şekerinin >200mg/dl civarında devam ettiği tespit edildi. Bu da çalışmamızda Wilson ve Islam'ın modelini modifiye ederek geliştirdiğimiz yeni T2DM deney modelinin oluşturulduğunun en önemli kanıtıydı.

Resveratrol (3,5,4'-trihidroksistilben) pek çok bitki türünde bulunan biyolojik olarak aktif bir bileşiktir. Anti-oksidan (369), anti-kanser (370), nöroprotektif (290) ve kardiyoprotektif (371) etkiye sahiptir. Resveratrolün en önemli diğer özelliklerinden biri de glukotoksosite olarak bilinen hiperglisemiye engel olmak, kan glukoz seviyesini azaltmak ve insülin salınımını düzenlemektir (372). Resveratrol antidiyabetik ilaç olan glibenclamide ile benzer etkiyle sülfonilüre reseptörlerine bağlanır ve insülin salınımını kontrol eder (373). Ayrıca thiazolidinedionelar ile benzer etkiye sahip olması (25) resveratrolü T2DM tedavisinde alternatif bir seçenek haline getirmiştir. Yapılan çalışmalar vitamin D'nin kemik metabolizmasındaki ana etkisinin yanı sıra insülin duyarlılığı ve insülin direncini de düzenlediğini göstermiştir (33, 374). Uzun süreli vitamin D tedavisinin insülin salınımını artırarak glukoz seviyesini normal hale getirdiğini göstermiştir (354).

Bu çalışmada diyabetik gruplara resveratrol, vitamin D ve resveratrol/vitamin D kombine tedavisi uygulandı. Tek başına resveratrol ve vitamin D uygulanan diyabetik gruplarda açlık kan şekerinin 9. haftada literatürle uyumlu olarak düştüğü saptandı. Özellikle resveratrol ve vitamin D kombin tedavisi uygulanan grupta açlık kan şekerinin belirgin bir şekilde düştüğü ve sağlıklı gruplarla arasında anlamlı fark kalmadığı tespit edildi. Bu da resveratrolün vitamin D'nin etkinliğini artırdığını desteklemektedir (31).

Wilson ve Islam (5) ve Obafemi ve arkadaşları (365) %10 fruktoz ve STZ (40 mg/kg) uygulanan diyabetik grupta vücut ağırlıklarında azalma saptamıştır. İbrahim ve arkadaşları (367) ise aynı modelle yapılmış başka bir çalışmada diyabetik grubun kilo kaybetmediğini ama diğer gruplara kıyasla vücut ağırlıklarındaki artışın daha az olduğunu saptamıştır. Bu çalışmada tedavi uygulanmayan diyabet kontrol (F) grubunun vücut ağırlığında 9 haftanın sonunda yaklaşık %20'lik bir artış olurken herhangi bir uygulama yapılmayan sağlıklı kontrol (K) grubunda bu artışın yaklaşık %89 olduğu

saptandı. Yapılan literatür araştırmalarında STZ diyabetik sıçanlara resveratrol ya da vitamin D tedavisi uygulanan gruplarda tedavi uygulanmayan diyabetik gruba göre vücut ağırlıklarının arttığı bildirilmiştir (375-377). Resveratrol, vitamin D ve kombin resveratrol/vitamin D tedavisi uygulanan hem diyabetik hem kontrol gruplarında bu artışın %25-50 arasında değiştiği görüldü.

Fruktoz, glukoz ile aynı kimyasal formüle sahip olmasına karşın yapısal olarak farklılık gösteren birçok meyve ve sebze de bulunan basit bir şekerdir. Fruktoz absorbe edildikten sonra portal ven aracılığı ile karaciğere taşınır. Hepatositlere GLUT2 yoluyla alınır. Fruktozun metabolize edilmesi insülin den bağımsız olarak gerçekteşir (11). Aşırı fruktoz tüketimi T2DM riskini artırmaktadır. Fruktoz, karaciğere alındıktan sonra oksidasyona uğrama, glukoz, glikojen ya da laktik aside çevrilme, *de novo* lipogeneze girme gibi birçok metabolik yolağa girebilir (113).

Yüksek fruktoz diyetinin sıçanlarda insülin direnci, hipertrigliseridemi ve yağlı karaciğer ile karakterize edilen pek çok metabolik bozukluğa yol açtığı bilinmektedir (378). Karaciğer kan glukozu homeostazının düzenlenmesinde rol oynayan önemli bir organdır (379). İnsülin direnci ve hipoinsülinemi, diyabet nedenli karaciğer komplikasyonlarının gelişiminde majör bir risk faktörü olan hiperglisemi ile sonuçlanmaktadır. Hiperglisemi karaciğerde lokal ve sistematik hasara neden olan yağ birikimini artırmaktadır (380). Fruktozla uyarılmış hepatik trigliserid birikiminin karaciğerde inflamasyona neden olduğu gösterilmiştir (381, 382). Karaciğer çok miktarda Kupffer hücresi içermektedir. Bu hücreler karaciğer hasarı durumunda aktif hale geçebilir, TNF- α ve IL-1 β gibi inflamatuvar sitokinleri içeren ürünleri salabilir. Bu faktörler hepatik inflamasyonu tetikleyebilir (383). Ayrıca transkripsiyon faktörü NF- κ B'nin hepatositlerin yaşam ve ölümü arasındaki çizgide önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir (384). Cai D ve arkadaşları (2005) diyabetik karaciğerdeki NF- κ B aktivitesinin dikkate değer bir şekilde arttığını bildirmiştir (219).

NF- κ B, inflamasyon, immün cevap, apoptoz, hücre sel adhezyon, proliferasyon ve hücre büyümesi gibi hücre sel süreçlerin kontrolünde yer alan transkripsiyon faktörüdür (204, 205). Bir transkripsiyon faktörü olan NF- κ B inflamatuvar ve immün yanıtların düzenleyicisidir. Diyabet durumlarında karaciğerde inflamasyon ve apoptoz

yüksek seviyede görülmektedir. Hiperglisemi, IKB kinaz tarafından NF-κB'nin aktifleştirilmesine neden olur (209). NF-κB aktivasyonu ise IL-6, TNF-α ve IL-1β gibi proinflamatuvar sitokinlerin sentezini uyarmaktadır (385). Yüksek fruktoz diyetinin karaciğerde NF-κB aktivasyonu bağlı olarak IL-6, TNF-α ve IL-1β sentezini artırdığı birçok çalışma ile gösterilmiştir (385-387). Bu bilgiler ışığında bu çalışmada, yüksek fruktoz diyeti ve düşük doz STZ uygulamasıyla oluşturulan diyabet koşullarında karaciğer dokusunda olası inflamasyonu NF-κB, IL-6, IL-1β ve TNF-α proteinlerini tespit ederek göstermek için doku kesitlerine immünohistokimya boyama yapıldı. Tedavi uygulanmayan diyabet kontrol (F) grubunda NF-κB aktivasyonunun arttığı buna bağlı olarak IL-6, IL-1β ve TNF-α ekspresyonlarında diğer gruplarla kıyaslandığında anlamlı bir yükselme olduğu saptandı. Bu sonuçlar diğer çalışmaları destekler niteliktedir.

Resveratrol (3,4',5-trihidroksistilben) serbest radikallerin neden olduğu hücresel hasarı engelleyen (260) stilben grubu bileşiktir (261). Yapılan *in vivo* ve *in vitro* pek çok çalışmayla resveratrolün anti-diyabetik, antioksidan, anti-kanser, anti-inflamatuvar etkisi gösterilmiştir (261). Resveratrolün karaciğerde oksidatif hasarı azaltan glutatyon peroksidaz aktivitesini artırdığı bildirilmiştir (388). Ayrıca resveratrolün proinflamatuvar sitokinlerin sentez ve salınımına etki ederek inflamasyon sürecinde rol aldığı bilinmektedir (389). Li ve arkadaşlarının (2014) yapmış olduğu yüksek yağlı diyet modelinde, resveratrolün insülin direnci, glukoz metabolizması bozukluğu, fibrozis, oksidatif stres, inflamasyon ve NF-κB'nin aktivasyonu gibi çeşitli kilit olayları hafiflettiği bildirilmiştir (311). Ayrıca yüksek yağlı diyet uygulanan hayvanların karaciğerlerinde makrofaj infiltrasyonunu azalttığı da gösterilmiştir (390). Pan ve arkadaşlarının (2015) yaptığı bir başka çalışmada resveratrol tedavisinin karaciğerde IL-1β ve TNF-α ekspresyonunu azalttığını göstermesi resveratrolün inflamasyonu önlediğini destekler niteliktedir (26).

Bu çalışmada resveratrol tedavisi uygulanan diyabet (FR) grubunda NF-κB ekspresyonunun baskılanmasına bağlı olarak IL-6, IL-1β ve TNF-α ekspresyonlarının tedavi uygulanmayan diyabet kontrol (F) grubu ile kıyaslandığında belirgin olarak düştüğünün saptanması resveratrolün anti-inflamatuvar özelliğini destekler niteliktedir. Diyabetin neden olduğu karaciğer hasarı inflamatuvar cevabı, lipid birikimini ve

karaciğer fibrozisini indüklemektedir (391). T2DM sistemik inflamasyonla ilişkilidir. T2DM, ROS üretiminde artışa neden olan insülin direnci ve kronik hiperglisemiye neden olmaktadır. ROS birikimi karaciğer inflamasyonuna neden olan NF-κB yolağını aktifleştirebilmektedir (392). Lipopolisakkarit (LPS) ile uyarılmış murin makrofajlarda vitamin D'nin NF-κB inhibitörünün regülasyonunu artırarak NF-κB'nin nükleer translokasyonunu azalttığı gösterilmiştir (393). Peroksizom proliferatör-aktive edilmiş reseptör α (PPAR-α), esas olarak karaciğerde eksprese edilmektedir ve hepatik lipid metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Ning ve ark (2015) diyabetik sıçan karaciğerlerinde 1,25(OH)₂D₃'ün NF-κB ve ilişkili inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu inhibe edebildiği ve diyabetik karaciğer hasarında koruyucu etkisi olabilen CPT-1 ve PPAR-α ekspresyonunu artırabildiği bildirmiştir (394).

Son yıllarda vitamin D'nin T2DM (395) ve metabolik sendrom (396) gibi pek çok kronik hastalığın riskini azaltmada önemli rol oynadığı bildirilmiştir. Makrofaj ve dentritik hücreler vitamin D reseptörü eksprese ettiğinden vitamin D inflamatuvar cevabın düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (316, 397). Pek çok çalışma vitamin D'nin inflamatuvar cevabı düzenleyici etkisini göstermiştir (398, 399).

Vitamin D'nin proinflamatuvar sitokin genlerinin ekspresyonunda rol oynayan NF-κB üzerine etki ettiği gösterilmiştir. Biyolojik olarak Vitamin D'nin aktif formu 1,25(OH)₂D₃'dur (400). 1,25(OH)₂D₃'ün lipid metabolizmasını, NF-κB sinyal yolağını ve inflamasyonu düzenleyerek diyabetik sıçanların karaciğeri üzerinde koruyucu etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. 1,25(OH)₂D₃'ün NF-κB sinyal yolağını, NF-κB inhibitörü IκB-α fosforilasyonunu azaltarak ve mRNA stabilitesini artırarak düzenlediği gösterilmiştir (393). Ayrıca diyabetik hastalardan ve sağlıklı bireylerden izole edilen lipopolisakkarit ile uyarılmış monositlere vitamin D uygulamasının TNF-α, IL-6 ve IL-1 gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin üretimini engellediği gösterilmiştir (355, 358). Benzer olarak Liu ve ark. (2016) çalışmalarında vitamin D uygulaması yapılan TD2M'li sıçanların karaciğerlerinde IL-1β ve TNF-α seviyelerinde azalma meydana geldiği sonucuna varmıştır (380).

Bu çalışmada vitamin D ve resveratrol/vitamin D kombin tedavisi uygulanan diyabet gruplarında (FD ve FDR grupları) NF- κ B, IL-6, IL-1 β ve TNF- α ekspresyonlarının, tedavi uygulanmayan diyabet kontrol grubu ile kıyaslandığında belirgin olarak düştüğü ancak en etkili sonucun diyabet-vitamin D-resveratrol (FDR) grubunda olduğu tespit edildi. Vitamin D'nin NF- κ B sinyal yolağı üzerine düzenleyici etkisine bağlı olarak NF- κ B'nin inhibitörüne bağlı kaldığı ve IL-6, IL-1 β ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonlarını uyaramadığı sonucuna varıldı. Resveratrolün de kan glukozunun regülasyonunu sağlaması ve oksidatif stresi azaltmasına bağlı olarak NF- κ B aktivasyonunu engellediği bilinmektedir (311, 389). Hem resveratrolün hem de vitamin D'nin NF- κ B aktivasyonu üzerine düzenleyici etkileri, ayrıca resveratrolün vitamin D etkinliğini artırması nedeni ile resveratrol/vitamin D kombin tedavisinin inflamasyonu önlemede daha etkili olduğu sonucuna varıldı.

Endoplazmik retikulum (ER) üzerindeki ribozomlarda sentezlenen membran ve salgı proteinleri transkripsiyon sonrasında ER lümenine geçerler. Burada proteinler katlanarak üç boyutlu yapılarına kavuşur. Proteinlerin fonksiyonel olabilmesi için doğru katlanmaları şarttır. Katlanma sürecinin doğru bir şekilde gerçekleşmesi için hücre çeşitli kontrol mekanizmaları geliştirmiştir. Hatalı katlanan proteinler, ER'den sitoplazmaya yönlendirilerek proteozomal yıkıma uğramaktadır (134). Aminoasit eksikliği, viral ve toksik etkiler, katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinleri gibi patolojik koşullarda ER homeostazı bozulmakta ve ER stresine neden olabilmektedir (135). Çalışmalar ER stresini, alkolik olmayan steato-hepatitis oluşumunda hepatik steatozisin bir mekanizması olduğunu göstermiştir (124). Kronik fruktoz tüketimi, ER stresinin tetiklenmesine neden olur. ER membran proteinleri fruktozile edilebilir ya da lipidler ER stresine ve katlanmamış protein cevabı (UPR)'ye neden olacak şekilde ER membranına doğru birikebilir. ER homeostazı tekrar sağlanmaya çalışılsa da devam etmekte olan fruktoz maruziyeti ile inflamasyon, oksidatif stres ve apoptoza neden olan ER stresi görülür (125, 126). ER'de bulunan şaperon proteini GRP78 önemli bir UPR düzenleyicisidir. GRP78, IRE1, PERK ve ATF6'nın aktivasyonunda ve ER stresine cevabın oluşturulmasında önemli bir role sahiptir. Normal şartlar altında bu üç ER transmembran proteini GRP78 bağlı olarak bulunduğu inaktif haldedir (401). Yanlış katlanmış ya da hatalı katlanmış bir protein ortaya çıkarsa, GRP78 yerinden ayrılarak bu proteinlerin hidrofobik kısımlarına bağlanır. GRP78 den ayrılan IRE1,

PERK ve ATF6 transmembran proteinleri kendilerini aktifleştirip UPR cevabını başlatabilmektedir (402-404). Yüksek fruktoz ile beslenmenin ER stres ile ilişkili hepatik stres cevabını tetiklediği (19, 97) ve fruktozla uyarılmış hiperlipidemi ve hipergliseminin sistemik ER stresi ve oksidatif strese katkı yapabileceği (13, 97) gösterilmiştir.

Bu çalışmada yüksek fruktoz diyeti ve düşük doz streptozotocin (STZ) ile oluşturulan T2DM modelinde resveratrol ve vitamin D'nin ayrı ayrı etkilerinin yanı sıra birlikte kullanımlarının karaciğerde endoplazmik retikulum stresi üzerine etkilerinin incelenmesi için GRP78 ekspresyonuna bakıldı. Tedavi uygulanmamış diyabet kontrol (F) grubunda GRP78 ekspresyonunun tüm gruplara kıyasla anlamlı derecede arttığı saptanması, hiperglisemiye bağlı glukoz toksisitesi nedeni ile ER stresinin uyarıldığını düşündürdü.

Yüksek yağlı diyet ile beslenen sıçanlarda resveratrolün, hepatik steatoz ve ER stresine karşı koruyucu etkisinin olabileceği bildirilmiştir. Yüksek yağlı diyet ile beslenme sonucu ATF4, GRP78 ve CHOP protein seviyelerinin artmış olduğu ancak resveratrol tedavisi ile ATF4, GRP78 ve CHOP protein seviyelerinin anlamlı derecede düştüğü saptanmıştır (26). Bir başka çalışmada, resveratrolün CHOP ve GRP78 ekspresyonunun down regülasyonu ile ER stresini iyileştirdiği bildirilmiştir (405). Çalışmalar vitamin D'nin insülin duyarlılığını artırmasının yanında (33) immün düzenleyici etkisinin (30) olduğunu ayrıca ER stresini de baskıladığını (31, 32) göstermiştir. Riek ve ark (2012) vitamin D yetersizliği olan kişilerden izole edilen monositlerde ER stresinin arttığını ve bu monositlere uygulanan vitamin D ile ER stresinin azaltıldığını göstermiştir (32). Stone ve ark (2015) vitamin D'nin etkinliğinin dört farklı hücre serisinde resveratrol ile artırılabilirliğini bildirmiştir (38). Resveratrolün, $1,25\alpha(OH)_2D_3$ 'ün VDR'ye bağlanmasını artırdığı ve VDR hedef genlerinin epigenetik kontrolünü düzenlediği ileri sürülmüştür. Cheng ve ark (2016) SH-SY5Y hücrelerinde ER stresini azaltmada vitamin D ve resveratrolün sinerjetik etkisini rapor etmiştir (31).

Bu çalışmada fruktoz diyeti ve streptozotocin (STZ) ile oluşturulan T2DM modelinde resveratrol ve vitamin D'nin ayrı ayrı etkilerinin yanı sıra birlikte kullanımlarının karaciğerde endoplazmik retikulum stresi üzerine etkisi araştırıldı. Tek başına resveratrol uygulanan diyabet-resveratrol (FR) grubunda GRP78 ekspresyonunun diyabet-vitamin D (FD) grubuna göre azaldığını ama asıl etkinin birlikte kullanılan diyabet-vitamin D-resveratrol (FDR) grubunda daha belirgin olduğunu görüldü. Vitamin D ve resveratrol tedavisinin hiperglisemiye engellemesi ve immün düzenleyici etkileri ile ER stresini de engellemiş olabileceği düşünüldü.

Katlanmamış protein cevabı (UPR) ER stresini çözmek için yetersiz kaldığında apoptoz yolağı aktif hale geçmektedir. UPR'nin anahtar düzenleyicilerden bazıları çeşitli yolaklarla apoptozu başlatmaktadır. IRE1alfa, TNF reseptör-ilişkili faktör 2 (TRAF2) adaptör proteini ve c-Jun N-terminal kinaz (JNK)'ı aktive eder (406, 407). IRE1/TRAF2 kompleksi hücre tipi ve içeriğine bağlı olarak pro ya da anti-apoptotik etki gösteren (408) NF- κ B aktivasyonuna neden olabilmektedir (409, 410). Uzun süreli PERK yolağının aktivasyonunun da hücre ölümüne neden olduğu bilinmektedir (411). ATF4'ün aşırı ekspresyonu, ER stresinde apoptozun önemli bir mediatörü olan CHOP (412) ve ATF3 ile PERK yolağı apoptozu uyarabilmektedir (413-415). Balakumar ve ark çalışmalarında (416) diyetle uyarılmış insülin direncine sahip sıçanların karaciğer ve pankreaslarında mRNA ve protein düzeyinde ER stres belirteçlerinde artış meydana geldiğini ve bununla ilişkili olarak pankreas ve karaciğerlerinde CHOP mRNA seviyesindeki artışa bağlı JNK ve kaspaz-3 aktivitesinde de artış olduğunu rapor etmiştir. STZ-diyabetik sıçanların karaciğerinde hiperglisemi nedeniyle kaspaz-3 aktivasyonu arttığı bildirilmiştir (417). Haligur ve ark (2012) STZ ile uyarılmış diyabetik sıçan hepatositlerinde apoptotik aktivitenin arttığını ve diyabette karaciğer komplikasyonları ile birlikte artan apoptotik aktive arasında bir bağlantı olabileceğini ileri sürmüştür (418). Omega-6'dan zengin yağlı bir diyetle beslenen sıçanların karaciğerlerinde aktif kaspaz-3 ekspresyonunun ve buna bağlı apoptik hücre sayının arttığı bildirilmiştir (419). Bu çalışmada tedavi uygulanmayan diyabetik grupta kaspaz-3 aktivasyonunun diğer gruplarla kıyaslandığında artmış olduğu saptandı. Fruktoz ve STZ uygulamasına bağlı olarak hipergliseminin ve beraberinde artan inflamuar sürecin ER stersine bağlı olarak apoptotik yolağı uyarılmış olabileceği düşünüldü.

Prolifere eden hücre nükleer antijen (PCNA) 36 kDa ağırlığında histon olmayan bir proteindir ve nükleusta bulunur. DNA polimeraz aktivitesini düzenler. PCNA ekspresyonu ile mitotik aktivite arasında bir korelasyon bulunmaktadır ve hücre proliferasyonu için bir belirteç olarak düşünülebilir (420, 421).

Resveratrol kemokin sinyal transdüksiyonunun kontrolünün yanı sıra ayrıca proliferasyon, farklılaşma, apoptoz ve stres cevabı gibi hücresel süreçlerde genlerin organize edilmesinden sorumludur. Resveratrolün hücre proliferasyonu ve apoptoz üzerine etkisi, hücre tipine, uygulama dozuna ve süresine göre farklılık göstermektedir. CCl₄ ile karaciğer hasarı oluşturulan sıçanlarda resveratrol tedavisinin oksidatif stres ve apoptozu azalttığı, buna karşılık PCNA ekspresyonunu artırarak karaciğerde hücre proliferasyonunu uyardığı bildirilmiştir (269). Araştırmacılar resveratrolün, bir gama sekretaz inhibitörü olan DAPT gibi davranarak Notch-3 ve TGF- β proteinlerinin ekspresyonunu baskıladığını, hepatositlerin proliferasyonunu uyararak hepatosit apoptozunu engellediğini ileri sürmüştür (269, 422).

Wang ve ark resveratrolün insan göbek kordonu mezenkimal kök hücrelerinde, hücre yenilenmesi (423), yaşlanma (424), apoptoz (425) ve nöral farklılaşma (426) ile ilişkili olan SIRT1 sinyalini düzenleyebildiğini bildirmiştir (427). DNA duplikasyonunu ve hücre proliferasyonunu tespit etmede S fazı belirteci olan PCNA ekspresyonunun SIRT1 ile ilişkili olduğu bulunmuştur (428). 0,1, 1 ve 2,5 μ M resveratrol uygulamasından sonra SIRT1 ve PCNA ekspresyonundaki artışın hücre proliferasyon mekanizması ile yakın ilişkili olduğu bulunmuştur (427). Azalan SIRT1 ekspresyonu ile p16 seviyesinde artış meydana geldiği (424, 429), hücre yaşlanmasına ve hücre siklus tutulumuna neden olduğu (430, 431) bildirilmiştir. Bu çalışmada 4 hafta süre ile Tanrıverdi ve ark. (269) ile benzer olarak düşük doz resveratrol uygulaması yapılmıştır. İmmünohistokimya yöntemi ile PCNA ve kaspaz-3 ekspresyonu araştırıldığında diyabetik sıçanlarda düşük doz resveratrol tedavisinin karaciğer hücrelerinde koruyucu etkisi olduğu, hepatosit proliferasyonunu uyarırken apoptozu engellediği saptandı. Sonuçlarımız Tanrıverdi ve ark. (269) sonuçlarını desteklemektedir. Düşük doz resveratrol uygulaması notch proteinlerinin ekspresyonunu baskılayarak hepatosit proliferasyonunun uyarılmasına neden olmuş olabilir.

Vitamin D'nin hücre proliferasyonu ve apoptozu üzerine etkisi tartışmalıdır. Dinlenme fazındaki hücrelerde PCNA seviyesi oldukça düşükken dönüşüm geçiren hücrelerde onarımı sağlamak için PCNA seviyesinde artış görülmektedir (432). 1,25(OH)₂D₃ 'nin immün-düzenleyici etkisiyle PCNA ekspresyonunu düzenleyebildiği ve onarımı artırabildiği görülmektedir. Ancak malignan büyüme, hipertrofi ve anormal büyüme gibi durumlarda 1,25(OH)₂D₃'nin PCNA ekspresyonu üzerinde baskılayıcı etkisi bulunmaktadır (433). Pek çok çalışma 1,25(OH)₂D₃'nin PCNA ekspresyonunu inhibe ederek, malignan büyümeyi (434) ve kardiyovasküler hipertrofiyi (435) baskılayarak antiproliferatif etki gösterdiğini bildirmiştir.

Elattar ve ark (2017) çalışmalarında diyabetik sıçanlara uygulanan 1 α 25(OH)₂D₃ ya da anti-diyabetik ajan olan metforminin tedavi uygulanmayan diyabetik sıçanlarla kıyaslandığında karaciğer enzimlerinde ciddi oranda azalma meydana geldiğini, glukoz metabolizmasını düzenlediğini, kaspaz-3 ve PCNA ekspresyonlarındaki değişimler göz önüne alındığında apoptozda azalma ve hücresel proliferasyonda artış olduğunu göstermiştir (374). Pek çok çalışma ile 1,25(OH)₂D₃'ün PCNA ekspresyonu üzerindeki düzenleyici etkisini gösterilmiştir. Kim ve ark. (2005) vitamin D uygulamasıyla sıçanlarda artan PCNA ekspresyonu ile böbrekte tubular hücre proliferasyonunda artış olduğunu bildirmiştir (436). Ayrıca Domingues-Faria ve ark (2014) ise vitamin D eksikliğinin yaşlı sıçanların iskelet kaslarında atrofi ile sonuçlanan PCNA protein ekspresyonunda azalma gerçekleştiğini göstermiştir (437). Köse ve ark (2017) çalışmalarında hipoksinin neonatal sıçan akciğerlerinde PCNA seviyesini azalttığını ancak yüksek doz vitamin D tedavisinin hücre proliferasyonunu artırdığını bildirmiştir (438).

Bu çalışmada vitamin D tedavisi uygulanan diyabet grubunda PCNA ekspresyonu tedavi uygulanmayan diyabet kontrol grubuna kıyasla artmıştır. Kaspaz-3 ekspresyonu vitamin D uygulanan diyabet grubunda azalmış olmasına rağmen resveratrol ve resveratrol/vitamin D kombin tedavisi uygulanan diyabet grubuna kıyasla PCNA ekspresyonundaki artışın daha az olduğu, kaspaz-3 ekspresyonunun ise anlamlı olarak bu gruplardan daha yüksek olduğu saptandı. Uygulanan vitamin D dozunun bu sonuçta etkili olmuş olabileceği Köse ve ark. yapmış olduğu çalışmada (438) olduğu gibi yüksek doz vitamin D'nin proliferasyon ve apoptozun engellenmesinde daha yararlı

olabileceği düşünöldü. Resveratrol/vitamin D kombin tedavisi uygulanan diyabet grubunda PCNA ekspresyonunda görölen artışın ve kaspaz-3 ekspresyonunda görölen azalmanın resveratrolün vitamin D'nin etkinliğini artırmasına bağlı olarak ortaya çıkmış olabileceği sonucuna varıldı.

Bu çalışmada Wilson ve Islam (2012) tarafından geliştirilen yüksek fruktoz diyeti ve düşük doz STZ enjeksiyonu ile oluşturulan T2DM modelini modifiye ederek diyabet tedavisinin araştırılmasında kullanılmak üzere yeni bir model geliştirilmiş oldu. 9 haftanın sonunda deney tamamlandığında diyabet modeli oluşturulan grubun açlık kan şekerinin yüksek seyretmeye devam etmesi modelin T2DM modeli ile uyumlu olduğu yönündeydi. Yeni T2DM modeli üzerinde ilk kez karaciğer dokusunda olası ER stresi, inflamasyon ve apoptoz ilişkisi çalışıldı. Yüksek fruktoz diyeti ve düşük doz STZ uygulamasının NF-κB'nin aktifleşerek nukleusa yerleşmesinin IL-6, TNF-α ve IL-1β'nin ekspresyonlarını artırdığı böylece inflamasyonun uyarıldığı düşünöldü. Ayrıca GRP78 ekspresyonu ile ER stres yolağının aktifleştiği, kaspaz-3 ekspresyonu ile bazı hücrelerin apoptotik hücre ölümünü seçtiği saptandı. Resveratrol ve vitamin D tedavisinin etkileri ayrı ayrı değerlendirildiğinde resveratrolün hücre proliferasyonu uyararak ve kaspaz-3 ekspresyonunu azaltarak diyabetin neden olduğu karaciğer hasarını iyileştirmede vitamin D tedavisinden daha etkili olduğu göröldü. Resveratrol ve vitamin D'nin, inflamasyon belirteçleri olan NF-κB, IL-6, TNF-α, IL-1β'nin ve ER stres belirteci GRP78'in ekspresyonlarını benzer şekilde azalttığı saptandı. Sunulan modelde ilk kez bu çalışma ile resveratrol/vitamin D kombin tedavisinin etkileri incelendi. Kombin tedavinin açlık kan şekerini neredeyse sağlıklı kontrol grubuna yakın değerlere düşürdüğü, inflamasyon, ER stresi ve apoptozu önlediği ve karaciğer morfolojisini de en iyi şekilde koruduğu tespit edildi.

Sonuç olarak bu çalışma ile resveratrolün vitamin D'nin etkinliğini birçok yolda artırdığı, diyabet tedavisi için yeni bir terapötik yaklaşım olabileceği sonucuna varıldı. Bu çalışmanın bir sonraki aşamasında; ER stresi ve apoptozla ilgili işlem yollarında ortak proteinlere bakılması, elektron mikroskobu ile ultrastrüktürel olarak karaciğer dokusunun incelenmesi, ayrıca serumda inflamasyonla ilgili parametrelerin ölçümlerinin yapılması planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Cali AM, Man CD, Cobelli C, Dziura J, Seyal A, Shaw M, et al. Primary defects in beta-cell function further exacerbated by worsening of insulin resistance mark the development of impaired glucose tolerance in obese adolescents. *Diabetes Care*. 2009;32(3):456-61.
2. Chinmay D, Anurekha J. Diabetes Mellitus: A Review. *International Journal of Pure and Applied Bioscience*. 2015;3(3):224-30.
3. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med*. 2006;3(11):e442.
4. Radenkovic M, Stojanovic M, Prostran M. Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2016;78:13-31.
5. Wilson RD, Islam MS. Fructose-fed streptozotocin-injected rat: an alternative model for type 2 diabetes. *Pharmacol Rep*. 2012;64(1):129-39.
6. Marriott BP, Cole N, Lee E. National estimates of dietary fructose intake increased from 1977 to 2004 in the United States. *J Nutr*. 2009;139(6):1228S-35S.
7. Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr*. 2004;79(4):537-43.
8. Feinman RD, Fine EJ. Fructose in perspective. *Nutr Metab (Lond)*. 2013;10(1):45.
9. Hu FB, Malik VS. Sugar-sweetened beverages and risk of obesity and type 2 diabetes: epidemiologic evidence. *Physiol Behav*. 2010;100(1):47-54.
10. Malik VS, Popkin BM, Bray GA, Despres JP, Hu FB. Sugar-sweetened beverages, obesity, type 2 diabetes mellitus, and cardiovascular disease risk. *Circulation*. 2010;121(11):1356-64.
11. Le KA, Ith M, Kreis R, Faeh D, Bortolotti M, Tran C, et al. Fructose overconsumption causes dyslipidemia and ectopic lipid deposition in healthy subjects with and without a family history of type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr*. 2009;89(6):1760-5.
12. Bagul PK, Middela H, Matapally S, Padiya R, Bastia T, Madhusudana K, et al. Attenuation of insulin resistance, metabolic syndrome and hepatic oxidative stress by resveratrol in fructose-fed rats. *Pharmacol Res*. 2012;66(3):260-8.
13. Odegaard JI, Chawla A. Pleiotropic actions of insulin resistance and inflammation in metabolic homeostasis. *Science*. 2013;339(6116):172-7.
14. Rutledge AC, Adeli K. Fructose and the metabolic syndrome: pathophysiology and molecular mechanisms. *Nutr Rev*. 2007;65(6 Pt 2):S13-23.
15. Passos E, Ascensao A, Martins MJ, Magalhaes J. Endoplasmic Reticulum Stress Response in Non-alcoholic Steatohepatitis: The Possible Role of Physical Exercise. *Metabolism*. 2015;64(7):780-92.
16. Tanti JF, Jager J. Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation. *Curr Opin Pharmacol*. 2009;9(6):753-62.
17. Wei Y, Pagliassotti MJ. Hepatospecific effects of fructose on c-jun NH2-terminal kinase: implications for hepatic insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004;287(5):E926-33.
18. Wei Y, Wang D, Topczewski F, Pagliassotti MJ. Fructose-mediated stress signaling in the liver: implications for hepatic insulin resistance. *J Nutr Biochem*. 2007;18(1):1-9.
19. Kelley GL, Allan G, Azhar S. High dietary fructose induces a hepatic stress response resulting in cholesterol and lipid dysregulation. *Endocrinology*. 2004;145(2):548-55.

20. Rutkowski DT, Wu J, Back SH, Callaghan MU, Ferris SP, Iqbal J, et al. UPR pathways combine to prevent hepatic steatosis caused by ER stress-mediated suppression of transcriptional master regulators. *Dev Cell*. 2008;15(6):829-40.
21. Rutkowski DT, Kaufman RJ. A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol*. 2004;14(1):20-8.
22. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*. 2004;306(5695):457-61.
23. Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5(6):493-506.
24. Borriello A, Cucciolla V, Della Ragione F, Galletti P. Dietary polyphenols: focus on resveratrol, a promising agent in the prevention of cardiovascular diseases and control of glucose homeostasis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2010;20(8):618-25.
25. Frendo-Cumbo S, MacPherson RE, Wright DC. Beneficial effects of combined resveratrol and metformin therapy in treating diet-induced insulin resistance. *Physiol Rep*. 2016;4(15).
26. Pan QR, Ren YL, Liu WX, Hu YJ, Zheng JS, Xu Y, et al. Resveratrol prevents hepatic steatosis and endoplasmic reticulum stress and regulates the expression of genes involved in lipid metabolism, insulin resistance, and inflammation in rats. *Nutr Res*. 2015;35(7):576-84.
27. Zheng X, Zhu S, Chang S, Cao Y, Dong J, Li J, et al. Protective effects of chronic resveratrol treatment on vascular inflammatory injury in streptozotocin-induced type 2 diabetic rats: Role of NF-kappa B signaling. *Eur J Pharmacol*. 2013.
28. Takiishi T, Gysemans C, Bouillon R, Mathieu C. Vitamin D and diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2010;39(2):419-46, table of contents.
29. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 2007;357(3):266-81.
30. De Vita F, Lauretani F, Bauer J, Bautmans I, Shardell M, Cherubini A, et al. Relationship between vitamin D and inflammatory markers in older individuals. *Age (Dordr)*. 2014;36(4):9694.
31. Cheng J, Xia X, Rui Y, Zhang Z, Qin L, Han S, et al. The combination of 1alpha,25dihydroxyvitaminD3 with resveratrol improves neuronal degeneration by regulating endoplasmic reticulum stress, insulin signaling and inhibiting tau hyperphosphorylation in SH-SY5Y cells. *Food Chem Toxicol*. 2016;93:32-40.
32. Riek AE, Oh J, Sprague JE, Timpson A, de las Fuentes L, Bernal-Mizrachi L, et al. Vitamin D suppression of endoplasmic reticulum stress promotes an antiatherogenic monocyte/macrophage phenotype in type 2 diabetic patients. *J Biol Chem*. 2012;287(46):38482-94.
33. Teegarden D, Donkin SS. Vitamin D: emerging new roles in insulin sensitivity. *Nutr Res Rev*. 2009;22(1):82-92.
34. Pittas AG, Lau J, Hu FB, Dawson-Hughes B. The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(6):2017-29.
35. Elseweidy MM, Amin RS, Atteia HH, Ali MA. Vitamin D3 intake as regulator of insulin degrading enzyme and insulin receptor phosphorylation in diabetic rats. *Biomed Pharmacother*. 2017;85:155-9.
36. Erbas O, Solmaz V, Aksoy D, Yavasoglu A, Sagcan M, Taskiran D. Cholecalciferol (vitamin D 3) improves cognitive dysfunction and reduces inflammation in a rat fatty liver model of metabolic syndrome. *Life Sci*. 2014;103(2):68-72.
37. Moore ME, Piazza A, McCartney Y, Lynch MA. Evidence that vitamin D3 reverses age-related inflammatory changes in the rat hippocampus. *Biochem Soc Trans*. 2005;33(Pt 4):573-7.
38. Dampf Stone A, Batie SF, Sabir MS, Jacobs ET, Lee JH, Whitfield GK, et al. Resveratrol potentiates vitamin D and nuclear receptor signaling. *J Cell Biochem*. 2015;116(6):1130-43.

39. Ross MH, Pawlina W. *Histology: A Text and Atlas 7/E*. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2016.
40. Kierszenbaum AL, Tres LL. *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology*. Philadelphia, PA2016.
41. Tao Y, Wang M, Chen E, Tang H. Liver Regeneration: Analysis of the Main Relevant Signaling Molecules. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:4256352.
42. Sun R, Gao B. Negative regulation of liver regeneration by innate immunity (natural killer cells/interferon-gamma). *Gastroenterology*. 2004;127(5):1525-39.
43. Can A. *Kök Hücre Biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanımları*. Ankara2014.
44. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*. 2003;425(6958):577-84.
45. Forbes SJ, Newsome PN. Liver regeneration - mechanisms and models to clinical application. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016;13(8):473-85.
46. Alison MR. Liver stem cells: implications for hepatocarcinogenesis. *Stem Cell Rev*. 2005;1(3):253-60.
47. Shinozuka H, Lombardi B, Sell S, Iammarino RM. Early histological and functional alterations of ethionine liver carcinogenesis in rats fed a choline-deficient diet. *Cancer Res*. 1978;38(4):1092-8.
48. Factor VM, Radaeva SA, Thorgeirsson SS. Origin and fate of oval cells in dipin-induced hepatocarcinogenesis in the mouse. *Am J Pathol*. 1994;145(2):409-22.
49. Gerber MA, Thung SN, Shen S, Stromeyer FW, Ishak KG. Phenotypic characterization of hepatic proliferation. Antigenic expression by proliferating epithelial cells in fetal liver, massive hepatic necrosis, and nodular transformation of the liver. *Am J Pathol*. 1983;110(1):70-4.
50. Lee JS, Heo J, Libbrecht L, Chu IS, Kaposi-Novak P, Calvisi DF, et al. A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells. *Nat Med*. 2006;12(4):410-6.
51. Roskams TA, Libbrecht L, Desmet VJ. Progenitor cells in diseased human liver. *Semin Liver Dis*. 2003;23(4):385-96.
52. Sadri AR, Jeschke MG, Amini-Nik S. Advances in Liver Regeneration: Revisiting Hepatic Stem/Progenitor Cells and Their Origin. *Stem Cells Int*. 2016;2016:7920897.
53. Theise ND, Saxena R, Portmann BC, Thung SN, Yee H, Chiriboga L, et al. The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology*. 1999;30(6):1425-33.
54. Ahmed AM. History of diabetes mellitus. *Saudi Med J*. 2002;23(4):373-8.
55. Maitra A, Abbas A. Endocrine system. *Robbins and Cotran Pathologic basis of disease*. 7 ed. Saunders, Philadelphia2005. p. 1156-226.
56. Kumar P, Clark M. *Textbook of Clinical Medicine*. Saunders, London, UK2002.
57. Hove MN, Kristensen JK, Lauritzen T, Bek T. The prevalence of retinopathy in an unselected population of type 2 diabetes patients from Arhus County, Denmark. *Acta Ophthalmol Scand*. 2004;82(4):443-8.
58. Saely CH, Aczel S, Marte T, Langer P, Drexel H. Cardiovascular complications in Type 2 diabetes mellitus depend on the coronary angiographic state rather than on the diabetic state. *Diabetologia*. 2004;47(1):145-6.
59. Cheng D. Prevalence, predisposition and prevention of type II diabetes. *Nutr Metab (Lond)*. 2005;2:29.
60. Ramarao P, Kaul CL. Insulin resistance: current therapeutic approaches. *Drugs Today (Barc)*. 1999;35(12):895-911.
61. Krentz A, Bailey C. Oral Antidiabetic Agents. *Drugs*. 2005;65(3):385-411.
62. Crowther CA, Hiller JE, Moss JR, McPhee AJ, Jeffries WS, Robinson JS, et al. Effect of treatment of gestational diabetes mellitus on pregnancy outcomes. *N Engl J Med*. 2005;352(24):2477-86.

63. Carroll RW, Murphy R. Monogenic diabetes: a diagnostic algorithm for clinicians. *Genes (Basel)*. 2013;4(4):522-35.
64. Sasaki S, Nio Y, Hirahara N, Sato Y, Inoue Y, Iguchi C, et al. Intraperitoneally implanted artificial pancreas with transkaryotic beta-cells on microcarrier beads in a diffusion chamber improves hyperglycemia after 90% pancreatectomy in rats. *In Vivo*. 2000;14(4):535-41.
65. Ibanez-Camacho R, Meckes-Lozoya M, Mellado-Campos V. The hypoglycemic effect of *Opuntia streptacantha* studied in different animal experimental models. *J Ethnopharmacol*. 1983;7(2):175-81.
66. Akash MS, Rehman K, Chen S. Goto-Kakizaki rats: its suitability as non-obese diabetic animal model for spontaneous type 2 diabetes mellitus. *Curr Diabetes Rev*. 2013;9(5):387-96.
67. Shafir E. Contribution of animal models to the research of the causes of diabetes. *World J Diabetes*. 2010;1(5):137-40.
68. Jorgens V. Oskar Minkowski (1858-1931). An outstanding master of diabetes research. *Hormones (Athens)*. 2006;5(4):310-1.
69. McNeill JH. *Experimental Models of Diabetes*. Florida, USA 1999.
70. Portha B, Giroix M, Serradas P, Morin L, Tormo M, Bailbe D. Cellular basis for glucose refractoriness of pancreatic B-cells in non insulin dependent diabetes. In: Flatt P, Lenzen S, editors. *Insulin secretion and pancreatic B cell research*. UK: Smith-Gordon 1994. p. 461-72.
71. Livingston JN. Genetically engineered mice in drug development. *J Intern Med*. 1999;245(6):627-35.
72. Gray SL, Dalla Nora E, Vidal-Puig AJ. Mouse models of PPAR-gamma deficiency: dissecting PPAR-gamma's role in metabolic homeostasis. *Biochem Soc Trans*. 2005;33(Pt 5):1053-8.
73. Butler AE, Jang J, Gurlo T, Carty MD, Soeller WC, Butler PC. Diabetes due to a progressive defect in beta-cell mass in rats transgenic for human islet amyloid polypeptide (HIP Rat): a new model for type 2 diabetes. *Diabetes*. 2004;53(6):1509-16.
74. Nandi A, Kitamura Y, Kahn CR, Accili D. Mouse models of insulin resistance. *Physiol Rev*. 2004;84(2):623-47.
75. Plum L, Wunderlich FT, Baudler S, Krone W, Bruning JC. Transgenic and knockout mice in diabetes research: novel insights into pathophysiology, limitations, and perspectives. *Physiology (Bethesda)*. 2005;20:152-61.
76. Debons AF, Krinsky I, Maayan ML, Fani K, Jemenez FA. Gold thioglucose obesity syndrome. *Fed Proc*. 1977;36(2):143-7.
77. Singaram S, Lawrence RS, Hornemann U. Studies on the biosynthesis of the antibiotic streptozotocin (streptozocin) by *Streptomyces achromogenes* var. *streptozoticus*. Feeding experiments with carbon-14 and tritium labelled precursors. *J Antibiot (Tokyo)*. 1979;32(4):379-85.
78. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 2008;51(2):216-26.
79. PubChem. Streptozotocin chemical structure [Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5300#section=Top>].
80. Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB. STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes*. 1994;43(11):1326-33.
81. Thulesen J, Orskov C, Holst JJ, Poulsen SS. Short-term insulin treatment prevents the diabetogenic action of streptozotocin in rats. *Endocrinology*. 1997;138(1):62-8.
82. Rerup CC. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol Rev*. 1970;22(4):485-518.
83. Elsner M, Guldbakke B, Tiedge M, Munday R, Lenzen S. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia*. 2000;43(12):1528-33.

84. Delaney CA, Dunger A, Di Matteo M, Cunningham JM, Green MH, Green IC. Comparison of inhibition of glucose-stimulated insulin secretion in rat islets of Langerhans by streptozotocin and methyl and ethyl nitrosoureas and methanesulphonates. Lack of correlation with nitric oxide-releasing or O₆-alkylating ability. *Biochem Pharmacol.* 1995;50(12):2015-20.
85. Szkudelski T, Kandulska K, Okulicz M. Alloxan in vivo does not only exert deleterious effects on pancreatic B cells. *Physiol Res.* 1998;47(5):343-6.
86. Reed MJ, Meszaros K, Entes LJ, Claypool MD, Pinkett JG, Gadbois TM, et al. A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat. *Metabolism.* 2000;49(11):1390-4.
87. Mali VR, Ning R, Chen J, Yang XP, Xu J, Palaniyandi SS. Impairment of aldehyde dehydrogenase-2 by 4-hydroxy-2-nonenal adduct formation and cardiomyocyte hypertrophy in mice fed a high-fat diet and injected with low-dose streptozotocin. *Exp Biol Med (Maywood).* 2014;239(5):610-8.
88. Wang ZH, Hsu CC, Lin HH, Chen JH. Antidiabetic Effects of *Carassius auratus* Complex Formula in High Fat Diet Combined Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2014;2014:628473.
89. Podell BK, Ackart DF, Obregon-Henao A, Eck SP, Henao-Tamayo M, Richardson M, et al. Increased severity of tuberculosis in Guinea pigs with type 2 diabetes: a model of diabetes-tuberculosis comorbidity. *Am J Pathol.* 2014;184(4):1104-18.
90. Masiello P, Broca C, Gross R, Roye M, Manteghetti M, Hillaire-Buys D, et al. Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes.* 1998;47(2):224-9.
91. Kaya Dagistanli F, Susleyici Duman B, Ozturk M. Protective effects of a calcium channel blocker on apoptosis in thymus of neonatal STZ-diabetic rats. *Acta Histochem.* 2005;107(3):207-14.
92. Ozturk M, Bolkent S, Kaya-Dagistanli F, Tuncdemir M, Yilmazer S, Akkan AG. The effects of 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside on the pancreas in neonatal streptozotocin-diabetic rats. *Acta Diabetol.* 2006;43(3):61-5.
93. Portha B, Levacher C, Picon L, Rosselin G. Diabetogenic effect of streptozotocin in the rat during the perinatal period. *Diabetes.* 1974;23(11):889-95.
94. Hininger-Favier I, Benaraba R, Coves S, Anderson RA, Roussel AM. Green tea extract decreases oxidative stress and improves insulin sensitivity in an animal model of insulin resistance, the fructose-fed rat. *J Am Coll Nutr.* 2009;28(4):355-61.
95. Naples M, Federico LM, Xu E, Nelken J, Adeli K. Effect of rosuvastatin on insulin sensitivity in an animal model of insulin resistance: evidence for statin-induced hepatic insulin sensitization. *Atherosclerosis.* 2008;198(1):94-103.
96. Barclay AW, Brand-Miller J. The Australian paradox: a substantial decline in sugars intake over the same timeframe that overweight and obesity have increased. *Nutrients.* 2011;3(4):491-504.
97. Tappy L, Le KA. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol Rev.* 2010;90(1):23-46.
98. Tran LT, Yuen VG, McNeill JH. The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. *Mol Cell Biochem.* 2009;332(1-2):145-59.
99. Wordpress. Simple sugars: fructose, glucose, sucrose 2009 [Available from: <https://cdavies.wordpress.com/2009/01/27/simple-sugars-fructose-glucose-and-sucrose/>].
100. Angelopoulos TJ, Lowndes J, Zukley L, Melanson KJ, Nguyen V, Huffman A, et al. The effect of high-fructose corn syrup consumption on triglycerides and uric acid. *J Nutr.* 2009;139(6):1242S-5S.
101. Gaby AR. Adverse effects of dietary fructose. *Altern Med Rev.* 2005;10(4):294-306.

102. Basciano H, Federico L, Adeli K. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutr Metab (Lond)*. 2005;2(1):5.
103. Collino M. High dietary fructose intake: Sweet or bitter life? *World J Diabetes*. 2011;2(6):77-81.
104. Holdsworth CD, Dawson AM. Absorption of Fructose in Man. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1965;118:142-5.
105. Riby JE, Fujisawa T, Kretchmer N. Fructose absorption. *Am J Clin Nutr*. 1993;58(5 Suppl):748S-53S.
106. Johnson RJ, Perez-Pozo SE, Sautin YY, Manitius J, Sanchez-Lozada LG, Feig DI, et al. Hypothesis: could excessive fructose intake and uric acid cause type 2 diabetes? *Endocr Rev*. 2009;30(1):96-116.
107. Akram M, Hamid A. Mini review on fructose metabolism. *Obes Res Clin Pract*. 2013;7(2):e89-e94.
108. Alegret M, Laguna JC. Opposite fates of fructose in the development of metabolic syndrome. *World J Gastroenterol*. 2012;18(33):4478-80.
109. Nseir W, Nassar F, Assy N. Soft drinks consumption and nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2010;16(21):2579-88.
110. Elliott SS, Keim NL, Stern JS, Teff K, Havel PJ. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *Am J Clin Nutr*. 2002;76(5):911-22.
111. Havel PJ. Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. *Nutr Rev*. 2005;63(5):133-57.
112. Miller A, Adeli K. Dietary fructose and the metabolic syndrome. *Curr Opin Gastroenterol*. 2008;24(2):204-9.
113. Bernadine RGA, Gracia FY. The Role of Fructose in Type 2 Diabetes and Other Metabolic Diseases. *Journal of Nutrition and Food Sciences*. 2018;8(1).
114. Stanhope KL, Schwarz JM, Keim NL, Griffen SC, Bremer AA, Graham JL, et al. Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J Clin Invest*. 2009;119(5):1322-34.
115. Basu S, Yoffe P, Hills N, Lustig RH. The relationship of sugar to population-level diabetes prevalence: an econometric analysis of repeated cross-sectional data. *PLoS One*. 2013;8(2):e57873.
116. Buchanan TA, Xiang AH, Peters RK, Kjos SL, Marroquin A, Goico J, et al. Preservation of pancreatic beta-cell function and prevention of type 2 diabetes by pharmacological treatment of insulin resistance in high-risk hispanic women. *Diabetes*. 2002;51(9):2796-803.
117. Lustig RH. Fructose: metabolic, hedonic, and societal parallels with ethanol. *J Am Diet Assoc*. 2010;110(9):1307-21.
118. Schalkwijk CG, Stehouwer CD, van Hinsbergh VW. Fructose-mediated non-enzymatic glycation: sweet coupling or bad modification. *Diabetes Metab Res Rev*. 2004;20(5):369-82.
119. Dills WL, Jr. Protein fructosylation: fructose and the Maillard reaction. *Am J Clin Nutr*. 1993;58(5 Suppl):779S-87S.
120. Santos CX, Tanaka LY, Wosniak J, Laurindo FR. Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(10):2409-27.
121. Hummasti S, Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and inflammation in obesity and diabetes. *Circ Res*. 2010;107(5):579-91.
122. Borgman M, McErlean E. What is the metabolic syndrome? Prediabetes and cardiovascular risk. *J Cardiovasc Nurs*. 2006;21(4):285-90.

123. Catena C, Giacchetti G, Novello M, Colussi G, Cavarape A, Sechi LA. Cellular mechanisms of insulin resistance in rats with fructose-induced hypertension. *Am J Hypertens.* 2003;16(11 Pt 1):973-8.
124. Fu S, Watkins SM, Hotamisligil GS. The role of endoplasmic reticulum in hepatic lipid homeostasis and stress signaling. *Cell Metab.* 2012;15(5):623-34.
125. Foufelle F, Ferre P. [Unfolded protein response: its role in physiology and physiopathology]. *Med Sci (Paris).* 2007;23(3):291-6.
126. Zhang XQ, Xu CF, Yu CH, Chen WX, Li YM. Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2014;20(7):1768-76.
127. Malhi H, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *J Hepatol.* 2011;54(4):795-809.
128. Dekker MJ, Su Q, Baker C, Rutledge AC, Adeli K. Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010;299(5):E685-94.
129. Ishimoto T, Lanaspas MA, Rivard CJ, Roncal-Jimenez CA, Orlicky DJ, Cicerchi C, et al. High-fat and high-sucrose (western) diet induces steatohepatitis that is dependent on fructokinase. *Hepatology.* 2013;58(5):1632-43.
130. Zambo V, Simon-Szabo L, Szelenyi P, Kereszturi E, Banhegyi G, Csala M. Lipotoxicity in the liver. *World J Hepatol.* 2013;5(10):550-7.
131. Baffy G. Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: the emerging view. *J Hepatol.* 2009;51(1):212-23.
132. Galvan-Pena S, O'Neill LA. Metabolic reprogramming in macrophage polarization. *Front Immunol.* 2014;5:420.
133. Mohamed Salih S, Nallasamy P, Muniyandi P, Periyasami V, Carani Venkatraman A. Genistein improves liver function and attenuates non-alcoholic fatty liver disease in a rat model of insulin resistance. *J Diabetes.* 2009;1(4):278-87.
134. Ruggiano A, Foresti O, Carvalho P. Quality control: ER-associated degradation: protein quality control and beyond. *J Cell Biol.* 2014;204(6):869-79.
135. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(7):519-29.
136. Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science.* 2011;334(6059):1081-6.
137. Kozutsumi Y, Segal M, Normington K, Gething MJ, Sambrook J. The presence of malformed proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature.* 1988;332(6163):462-4.
138. Sitia R, Braakman I. Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature.* 2003;426(6968):891-4.
139. Trombetta ES, Parodi AJ. Quality control and protein folding in the secretory pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2003;19:649-76.
140. Ellgaard L, Helenius A. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(3):181-91.
141. Wang S, Kaufman RJ. The impact of the unfolded protein response on human disease. *J Cell Biol.* 2012;197(7):857-67.
142. Choi JA, Lim YJ, Cho SN, Lee JH, Jeong JA, Kim EJ, et al. Mycobacterial HBHA induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis through the generation of reactive oxygen species and cytosolic Ca²⁺ in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Cell Death Dis.* 2013;4:e957.
143. Lim YJ, Choi JA, Choi HH, Cho SN, Kim HJ, Jo EK, et al. Endoplasmic reticulum stress pathway-mediated apoptosis in macrophages contributes to the survival of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One.* 2011;6(12):e28531.

144. Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol.* 2000;2(6):326-32.
145. Ng DT, Watowich SS, Lamb RA. Analysis in vivo of GRP78-BiP/substrate interactions and their role in induction of the GRP78-BiP gene. *Mol Biol Cell.* 1992;3(2):143-55.
146. Christis C, Lubsen NH, Braakman I. Protein folding includes oligomerization - examples from the endoplasmic reticulum and cytosol. *FEBS J.* 2008;275(19):4700-27.
147. Haze K, Okada T, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Negishi M, et al. Identification of the G13 (cAMP-response-element-binding protein-related protein) gene product related to activating transcription factor 6 as a transcriptional activator of the mammalian unfolded protein response. *Biochem J.* 2001;355(Pt 1):19-28.
148. Zhang SX, Sanders E, Fliesler SJ, Wang JJ. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein responses in retinal degeneration. *Exp Eye Res.* 2014;125:30-40.
149. Cnop M, Foufelle F, Velloso LA. Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends Mol Med.* 2012;18(1):59-68.
150. Ron D. Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J Clin Invest.* 2002;110(10):1383-8.
151. Iwawaki T, Akai R, Yamanaka S, Kohno K. Function of IRE1 alpha in the placenta is essential for placental development and embryonic viability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(39):16657-62.
152. Bertolotti A, Wang X, Novoa I, Jungreis R, Schlessinger K, Cho JH, et al. Increased sensitivity to dextran sodium sulfate colitis in IRE1beta-deficient mice. *J Clin Invest.* 2001;107(5):585-93.
153. Patil C, Walter P. Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr Opin Cell Biol.* 2001;13(3):349-55.
154. Glimcher LH. XBP1: the last two decades. *Ann Rheum Dis.* 2010;69 Suppl 1:i67-71.
155. Reimold AM, Etkin A, Clauss I, Perkins A, Friend DS, Zhang J, et al. An essential role in liver development for transcription factor XBP-1. *Genes Dev.* 2000;14(2):152-7.
156. Zhong Y, Li J, Wang JJ, Chen C, Tran JT, Saadi A, et al. X-box binding protein 1 is essential for the anti-oxidant defense and cell survival in the retinal pigment epithelium. *PLoS One.* 2012;7(6):e38616.
157. Lee K, Tirasophon W, Shen X, Michalak M, Prywes R, Okada T, et al. IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev.* 2002;16(4):452-66.
158. Hinnebusch AG, Lorsch JR. The mechanism of eukaryotic translation initiation: new insights and challenges. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(10).
159. Verfaillie T, Rubio N, Garg AD, Bultynck G, Rizzuto R, Decuypere JP, et al. PERK is required at the ER-mitochondrial contact sites to convey apoptosis after ROS-based ER stress. *Cell Death Differ.* 2012;19(11):1880-91.
160. Yamamoto K, Sato T, Matsui T, Sato M, Okada T, Yoshida H, et al. Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. *Dev Cell.* 2007;13(3):365-76.
161. Scheuner D, Kaufman RJ. The unfolded protein response: a pathway that links insulin demand with beta-cell failure and diabetes. *Endocr Rev.* 2008;29(3):317-33.
162. Oakes S. Endoplasmic reticulum: ER stress. In: McManus L, Mitchell R, editors. *In Pathobiology of Human Disease.* San Diego 2014. p. 114-23.
163. Steiner D. New aspects of proinsulin physiology and pathophysiology. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism.* 2000;13(3):229-39.
164. Ron D. Proteotoxicity in the endoplasmic reticulum: lessons from the Akita diabetic mouse. *J Clin Invest.* 2002;109(4):443-5.

165. Izumi T, Yokota-Hashimoto H, Zhao S, Wang J, Halban PA, Takeuchi T. Dominant negative pathogenesis by mutant proinsulin in the Akita diabetic mouse. *Diabetes*. 2003;52(2):409-16.
166. Wang J, Takeuchi T, Tanaka S, Kubo SK, Kayo T, Lu D, et al. A mutation in the insulin 2 gene induces diabetes with severe pancreatic beta-cell dysfunction in the Mody mouse. *J Clin Invest*. 1999;103(1):27-37.
167. Liu M, Li Y, Cavener D, Arvan P. Proinsulin disulfide maturation and misfolding in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 2005;280(14):13209-12.
168. Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell*. 2000;5(5):897-904.
169. Lee AH, Heidtman K, Hotamisligil GS, Glimcher LH. Dual and opposing roles of the unfolded protein response regulated by IRE1alpha and XBP1 in proinsulin processing and insulin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(21):8885-90.
170. Usui M, Yamaguchi S, Tanji Y, Tominaga R, Ishigaki Y, Fukumoto M, et al. Atf6alpha-null mice are glucose intolerant due to pancreatic beta-cell failure on a high-fat diet but partially resistant to diet-induced insulin resistance. *Metabolism*. 2012;61(8):1118-28.
171. Trusina A, Papa FR, Tang C. Rationalizing translation attenuation in the network architecture of the unfolded protein response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(51):20280-5.
172. Riggs AC, Bernal-Mizrachi E, Ohsugi M, Wasson J, Fatrai S, Welling C, et al. Mice conditionally lacking the Wolfram gene in pancreatic islet beta cells exhibit diabetes as a result of enhanced endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Diabetologia*. 2005;48(11):2313-21.
173. Fonseca SG, Fukuma M, Lipson KL, Nguyen LX, Allen JR, Oka Y, et al. WFS1 is a novel component of the unfolded protein response and maintains homeostasis of the endoplasmic reticulum in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem*. 2005;280(47):39609-15.
174. Fonseca SG, Ishigaki S, Osowski CM, Lu S, Lipson KL, Ghosh R, et al. Wolfram syndrome 1 gene negatively regulates ER stress signaling in rodent and human cells. *J Clin Invest*. 2010;120(3):744-55.
175. Cretenet G, Le Clech M, Gachon F. Circadian clock-coordinated 12 Hr period rhythmic activation of the IRE1alpha pathway controls lipid metabolism in mouse liver. *Cell Metab*. 2010;11(1):47-57.
176. Oyadomari S, Harding HP, Zhang Y, Oyadomari M, Ron D. Dephosphorylation of translation initiation factor 2alpha enhances glucose tolerance and attenuates hepatosteatosis in mice. *Cell Metab*. 2008;7(6):520-32.
177. Puri P, Mirshahi F, Cheung O, Natarajan R, Maher JW, Kellum JM, et al. Activation and dysregulation of the unfolded protein response in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2008;134(2):568-76.
178. Kammoun HL, Chabanon H, Hainault I, Luquet S, Magnan C, Koike T, et al. GRP78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice. *J Clin Invest*. 2009;119(5):1201-15.
179. Lee AH, Scapa EF, Cohen DE, Glimcher LH. Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. *Science*. 2008;320(5882):1492-6.
180. Ning J, Hong T, Ward A, Pi J, Liu Z, Liu HY, et al. Constitutive role for IRE1alpha-XBP1 signaling pathway in the insulin-mediated hepatic lipogenic program. *Endocrinology*. 2011;152(6):2247-55.
181. Hitomi J, Katayama T, Eguchi Y, Kudo T, Taniguchi M, Koyama Y, et al. Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J Cell Biol*. 2004;165(3):347-56.
182. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*. 2000;403(6765):98-103.

183. Obeng EA, Boise LH. Caspase-12 and caspase-4 are not required for caspase-dependent endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 2005;280(33):29578-87.
184. Lu H, Yang Y, Allister EM, Wijesekara N, Wheeler MB. The identification of potential factors associated with the development of type 2 diabetes: a quantitative proteomics approach. *Mol Cell Proteomics*. 2008;7(8):1434-51.
185. Upton JP, Wang L, Han D, Wang ES, Huskey NE, Lim L, et al. IRE1 α cleaves select microRNAs during ER stress to derepress translation of proapoptotic Caspase-2. *Science*. 2012;338(6108):818-22.
186. Muoio DM, Newgard CB. Mechanisms of disease: Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(3):193-205.
187. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. 2006;444(7121):840-6.
188. Velloso LA, Folli F, Saad MJ. TLR4 at the Crossroads of Nutrients, Gut Microbiota, and Metabolic Inflammation. *Endocr Rev*. 2015;36(3):245-71.
189. Eizirik DL, Cardozo AK, Cnop M. The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocr Rev*. 2008;29(1):42-61.
190. Alonso-Magdalena P, Quesada I, Nadal A. Endocrine disruptors in the etiology of type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2011;7(6):346-53.
191. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006;444(7121):860-7.
192. Velloso LA, Eizirik DL, Cnop M. Type 2 diabetes mellitus--an autoimmune disease? *Nat Rev Endocrinol*. 2013;9(12):750-5.
193. Mills ES. A Fatal Case of Diabetes Mellitus Complicated by Infection. *Can Med Assoc J*. 1924;14(8):732-4.
194. Brandaleone H, Standard S, Ralli EP. Prophylactic Foot Treatment in Patients with Diabetes Mellitus: Analyses of Its Effect on the Prevention of Infection of the Lower Extremities and the Operative Prognosis in a Series of Five Hundred Seventy-Six Cases. *Ann Surg*. 1937;105(1):120-4.
195. Marble A, White HJ, Fernald AT. The Nature of the Lowered Resistance to Infection in Diabetes Mellitus. *J Clin Invest*. 1938;17(4):423-30.
196. Richardson R. Immunity in Diabetes. Iii. Relation of Tissue Glycogen and Blood Chemistry to Bacterial Dissemination, Antibody Formation and Survival after Infection in Diabetes. *J Clin Invest*. 1940;19(1):239-50.
197. McKittrick LS, McKittrick JB, Risley TS. Transmetatarsal Amputation for Infection or Gangrene in Patients with Diabetes Mellitus. *Ann Surg*. 1949;130(4):826-40.
198. Richardson SJ, Willcox A, Bone AJ, Foulis AK, Morgan NG. Islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2009;52(8):1686-8.
199. Donath MY, Boni-Schnetzler M, Ellingsgaard H, Ehses JA. Islet inflammation impairs the pancreatic beta-cell in type 2 diabetes. *Physiology (Bethesda)*. 2009;24:325-31.
200. Igoillo-Esteve M, Marselli L, Cunha DA, Ladriere L, Ortis F, Grieco FA, et al. Palmitate induces a pro-inflammatory response in human pancreatic islets that mimics CCL2 expression by beta cells in type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2010;53(7):1395-405.
201. Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell*. 1986;47(6):921-8.
202. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009;1(4):a000034.
203. Wong D, Teixeira A, Oikonomopoulos S, Humburg P, Lone IN, Saliba D, et al. Extensive characterization of NF-kappaB binding uncovers non-canonical motifs and advances the interpretation of genetic functional traits. *Genome Biol*. 2011;12(7):R70.

204. Tsaousidou E, Paeger L, Belgardt BF, Pal M, Wunderlich CM, Bronneke H, et al. Distinct Roles for JNK and IKK Activation in Agouti-Related Peptide Neurons in the Development of Obesity and Insulin Resistance. *Cell Rep*. 2014;9(4):1495-506.
205. Baker RG, Hayden MS, Ghosh S. NF-kappaB, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metab*. 2011;13(1):11-22.
206. Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer*. 2013;12:86.
207. Tan P, Fuchs SY, Chen A, Wu K, Gomez C, Ronai Z, et al. Recruitment of a ROC1-CUL1 ubiquitin ligase by Skp1 and HOS to catalyze the ubiquitination of I kappa B alpha. *Mol Cell*. 1999;3(4):527-33.
208. Wu Z, Peng X, Li J, Zhang Y, Hu L. Constitutive activation of nuclear factor kappaB contributes to cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression and promotes human cervical cancer progression and poor prognosis. *Int J Gynecol Cancer*. 2013;23(5):906-15.
209. Tornatore L, Thotakura AK, Bennett J, Moretti M, Franzoso G. The nuclear factor kappa B signaling pathway: integrating metabolism with inflammation. *Trends Cell Biol*. 2012;22(11):557-66.
210. Perkins ND, Gilmore TD. Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB. *Cell Death Differ*. 2006;13(5):759-72.
211. Coward WR, Sagara H, Wilson SJ, Holgate ST, Church MK. Allergen activates peripheral blood eosinophil nuclear factor-kappaB to generate granulocyte macrophage-colony stimulating factor, tumour necrosis factor-alpha and interleukin-8. *Clin Exp Allergy*. 2004;34(7):1071-8.
212. Bentires M. [Kappa-B nuclear factor and apoptosis of cancerous cells]. *Bull Mem Acad R Med Belg*. 2001;156(6 Pt 2):329-37.
213. Baldwin AS, Jr. Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *J Clin Invest*. 2001;107(1):3-6.
214. Perkins ND. NF-kappaB: tumor promoter or suppressor? *Trends Cell Biol*. 2004;14(2):64-9.
215. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009;1(6):a001651.
216. Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D. Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell*. 2008;135(1):61-73.
217. Paneni F, Costantino S, Volpe M, Luscher TF, Cosentino F. Epigenetic signatures and vascular risk in type 2 diabetes: a clinical perspective. *Atherosclerosis*. 2013;230(2):191-7.
218. Kim JK, Kim YJ, Fillmore JJ, Chen Y, Moore I, Lee J, et al. Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. *J Clin Invest*. 2001;108(3):437-46.
219. Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med*. 2005;11(2):183-90.
220. Le KA, Mahurkar S, Alderete TL, Hasson RE, Adam TC, Kim JS, et al. Subcutaneous adipose tissue macrophage infiltration is associated with hepatic and visceral fat deposition, hyperinsulinemia, and stimulation of NF-kappaB stress pathway. *Diabetes*. 2011;60(11):2802-9.
221. Kim SH, Liu A, Ariel D, Abbasi F, Lamendola C, Grove K, et al. Effect of salsalate on insulin action, secretion, and clearance in nondiabetic, insulin-resistant individuals: a randomized, placebo-controlled study. *Diabetes Care*. 2014;37(7):1944-50.
222. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*. 2011;117(14):3720-32.
223. Davis BK, Wen H, Ting JP. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:707-35.

224. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:519-50.
225. Lamkanfi M, Dixit VM. The inflammasomes. *PLoS Pathog.* 2009;5(12):e1000510.
226. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell.* 2010;140(6):821-32.
227. Kersse K, Bertrand MJ, Lamkanfi M, Vandenabeele P. NOD-like receptors and the innate immune system: coping with danger, damage and death. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011;22(5-6):257-76.
228. Netea MG, Simon A, van de Veerdonk F, Kullberg BJ, Van der Meer JW, Joosten LA. IL-1beta processing in host defense: beyond the inflammasomes. *PLoS Pathog.* 2010;6(2):e1000661.
229. Dinarello CA. IL-1: discoveries, controversies and future directions. *Eur J Immunol.* 2010;40(3):599-606.
230. Bendtzen K, Mandrup-Poulsen T, Nerup J, Nielsen JH, Dinarello CA, Svenson M. Cytotoxicity of human pl 7 interleukin-1 for pancreatic islets of Langerhans. *Science.* 1986;232(4757):1545-7.
231. Maedler K, Sergeev P, Ris F, Oberholzer J, Joller-Jemelka HI, Spinas GA, et al. Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J Clin Invest.* 2002;110(6):851-60.
232. Meier CA, Bobbioni E, Gabay C, Assimakopoulos-Jeannot F, Golay A, Dayer JM. IL-1 receptor antagonist serum levels are increased in human obesity: a possible link to the resistance to leptin? *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(3):1184-8.
233. McGillicuddy FC, Harford KA, Reynolds CM, Oliver E, Claessens M, Mills KH, et al. Lack of interleukin-1 receptor I (IL-1RI) protects mice from high-fat diet-induced adipose tissue inflammation coincident with improved glucose homeostasis. *Diabetes.* 2011;60(6):1688-98.
234. Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med.* 2011;17(2):179-88.
235. Costes S, Langen R, Gurlo T, Matveyenko AV, Butler PC. beta-Cell failure in type 2 diabetes: a case of asking too much of too few? *Diabetes.* 2013;62(2):327-35.
236. Masters SL, Dunne A, Subramanian SL, Hull RL, Tannahill GM, Sharp FA, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1beta in type 2 diabetes. *Nat Immunol.* 2010;11(10):897-904.
237. Malozowski S, Sahlroot JT. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 2007;357(3):302-3; author reply 3.
238. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 1993;259(5091):87-91.
239. Cawthorn WP, Sethi JK. TNF-alpha and adipocyte biology. *FEBS Lett.* 2008;582(1):117-31.
240. Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, Tsukamoto H, Shimoda T. Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford).* 2010;49(7):1215-28.
241. Hotamisligil GS, Budavari A, Murray D, Spiegelman BM. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor-alpha. *J Clin Invest.* 1994;94(4):1543-9.
242. Hotamisligil GS, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes.* 1994;43(11):1271-8.
243. Feinstein R, Kanety H, Papa MZ, Lunenfeld B, Karasik A. Tumor necrosis factor-alpha suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. *J Biol Chem.* 1993;268(35):26055-8.
244. Van Lint J, Agostinis P, Vandevoorde V, Haegeman G, Fiers W, Merlevede W, et al. Tumor necrosis factor stimulates multiple serine/threonine protein kinases in Swiss 3T3 and

- L929 cells. Implication of casein kinase-2 and extracellular signal-regulated kinases in the tumor necrosis factor signal transduction pathway. *J Biol Chem.* 1992;267(36):25916-21.
245. Yazdani-Biuki B, Stelzl H, Brezinschek HP, Hermann J, Mueller T, Krippel P, et al. Improvement of insulin sensitivity in insulin resistant subjects during prolonged treatment with the anti-TNF-alpha antibody infliximab. *Eur J Clin Invest.* 2004;34(9):641-2.
246. Stanley TL, Zanni MV, Johnsen S, Rasheed S, Makimura H, Lee H, et al. TNF-alpha antagonism with etanercept decreases glucose and increases the proportion of high molecular weight adiponectin in obese subjects with features of the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(1):E146-50.
247. Calabrese LH, Rose-John S. IL-6 biology: implications for clinical targeting in rheumatic disease. *Nat Rev Rheumatol.* 2014;10(12):720-7.
248. Tanaka T, Kishimoto T. The biology and medical implications of interleukin-6. *Cancer Immunol Res.* 2014;2(4):288-94.
249. Barnes TC, Anderson ME, Moots RJ. The many faces of interleukin-6: the role of IL-6 in inflammation, vasculopathy, and fibrosis in systemic sclerosis. *Int J Rheumatol.* 2011;2011:721608.
250. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1813(5):878-88.
251. Klover PJ, Clementi AH, Mooney RA. Interleukin-6 depletion selectively improves hepatic insulin action in obesity. *Endocrinology.* 2005;146(8):3417-27.
252. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA.* 2001;286(3):327-34.
253. Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(3):847-50.
254. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(2):85-97.
255. Rotter V, Nagaev I, Smith U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem.* 2003;278(46):45777-84.
256. Piya MK, McTernan PG, Kumar S. Adipokine inflammation and insulin resistance: the role of glucose, lipids and endotoxin. *J Endocrinol.* 2013;216(1):T1-T15.
257. Gauldie J, Richards C, Harnish D, Lansdorp P, Baumann H. Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(20):7251-5.
258. Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunol Today.* 1994;15(2):74-80.
259. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med.* 1999;340(6):448-54.
260. Hung LM, Chen JK, Huang SS, Lee RS, Su MJ. Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovasc Res.* 2000;47(3):549-55.
261. Fremont L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci.* 2000;66(8):663-73.
262. P L, Pryce R. The Production of Resveratrol by *Vitis vinifera* and Other Members of the Vitaceae as a Response to Infection or Injury. *Physiological Plant Pathology.* 1976;9(1):77-86.
263. Gambini J, Ingles M, Olaso G, Lopez-Grueso R, Bonet-Costa V, Gimeno-Mallench L, et al. Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:837042.
264. Murcia MA, Martinez-Tome M. Antioxidant activity of resveratrol compared with common food additives. *J Food Prot.* 2001;64(3):379-84.
265. Catalgol B, Batirel S, Taga Y, Ozer NK. Resveratrol: French paradox revisited. *Front Pharmacol.* 2012;3:141.

266. Kraft TE, Parisotto D, Schempp C, Efferth T. Fighting cancer with red wine? Molecular mechanisms of resveratrol. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2009;49(9):782-99.
267. Jeandet P, Delaunois B, Conreux A, Donnez D, Nuzzo V, Cordelier S, et al. Biosynthesis, metabolism, molecular engineering, and biological functions of stilbene phytoalexins in plants. *Biofactors*. 2010;36(5):331-41.
268. Brown L, Kroon PA, Das DK, Das S, Tosaki A, Chan V, et al. The biological responses to resveratrol and other polyphenols from alcoholic beverages. *Alcohol Clin Exp Res*. 2009;33(9):1513-23.
269. Tanriverdi G, Kaya-Dagistanli F, Ayla S, Demirci S, Eser M, Unal ZS, et al. Resveratrol can prevent CCl(4)-induced liver injury by inhibiting Notch signaling pathway. *Histol Histopathol*. 2016;31(7):769-84.
270. Kasdallah-Grissa A, Mornagui B, Aouani E, Hammami M, El May M, Gharbi N, et al. Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates ethanol-induced oxidative stress in rat liver. *Life Sci*. 2007;80(11):1033-9.
271. El-Agamy DS. Comparative effects of curcumin and resveratrol on aflatoxin B(1)-induced liver injury in rats. *Arch Toxicol*. 2010;84(5):389-96.
272. Velioğlu-Ogunc A, Sehirli O, Toklu HZ, Ozyurt H, Mayadagli A, Eksioğlu-Demiralp E, et al. Resveratrol protects against irradiation-induced hepatic and ileal damage via its anti-oxidative activity. *Free Radic Res*. 2009;43(11):1060-71.
273. Eybl V, Kotyzova D, Koutensky J. Comparative study of natural antioxidants - curcumin, resveratrol and melatonin - in cadmium-induced oxidative damage in mice. *Toxicology*. 2006;225(2-3):150-6.
274. Arichi H, Kimura Y, Okuda H, Baba K, Kozawa M, Arichi S. Effects of stilbene components of the roots of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. on lipid metabolism. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1982;30(5):1766-70.
275. Bujanda L, Garcia-Barcina M, Gutierrez-de Juan V, Bidaurrezaga J, de Luco MF, Gutierrez-Stampa M, et al. Effect of resveratrol on alcohol-induced mortality and liver lesions in mice. *BMC Gastroenterol*. 2006;6:35.
276. Lancon A, Delmas D, Osman H, Thenot JP, Jannin B, Latruffe N. Human hepatic cell uptake of resveratrol: involvement of both passive diffusion and carrier-mediated process. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;316(4):1132-7.
277. Udenigwe CC, Ramprasath VR, Aluko RE, Jones PJ. Potential of resveratrol in anticancer and anti-inflammatory therapy. *Nutr Rev*. 2008;66(8):445-54.
278. Delmas D, Lin HY. Role of membrane dynamics processes and exogenous molecules in cellular resveratrol uptake: consequences in bioavailability and activities. *Mol Nutr Food Res*. 2011;55(8):1142-53.
279. Jannin B, Menzel M, Berlot JP, Delmas D, Lancon A, Latruffe N. Transport of resveratrol, a cancer chemopreventive agent, to cellular targets: plasmatic protein binding and cell uptake. *Biochem Pharmacol*. 2004;68(6):1113-8.
280. Yang HL, Chen WQ, Cao X, Worschech A, Du LF, Fang WY, et al. Caveolin-1 enhances resveratrol-mediated cytotoxicity and transport in a hepatocellular carcinoma model. *J Transl Med*. 2009;7:22.
281. Penumathsa SV, Maulik N. Resveratrol: a promising agent in promoting cardioprotection against coronary heart disease. *Can J Physiol Pharmacol*. 2009;87(4):275-86.
282. Vitrac X, Desmouliere A, Brouillaud B, Krisa S, Deffieux G, Barthe N, et al. Distribution of [14C]-trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration. *Life Sci*. 2003;72(20):2219-33.
283. Szkudelski T, Szkudelska K. Anti-diabetic effects of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1215:34-9.
284. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*. 2006;444(7117):337-42.

285. Rivera L, Moron R, Zarzuelo A, Galisteo M. Long-term resveratrol administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in obese Zucker rats. *Biochem Pharmacol.* 2009;77(6):1053-63.
286. Bhatt JK, Thomas S, Nanjan MJ. Resveratrol supplementation improves glycemic control in type 2 diabetes mellitus. *Nutr Res.* 2012;32(7):537-41.
287. Xu F, Wang Y, Cui W, Yuan H, Sun J, Wu M, et al. Resveratrol Prevention of Diabetic Nephropathy Is Associated with the Suppression of Renal Inflammation and Mesangial Cell Proliferation: Possible Roles of Akt/NF-kappaB Pathway. *Int J Endocrinol.* 2014;2014:289327.
288. Wu L, Zhang Y, Ma X, Zhang N, Qin G. The effect of resveratrol on FoxO1 expression in kidneys of diabetic nephropathy rats. *Mol Biol Rep.* 2012;39(9):9085-93.
289. Elbe H, Vardi N, Esrefoglu M, Ates B, Yologlu S, Taskapan C. Amelioration of streptozotocin-induced diabetic nephropathy by melatonin, quercetin, and resveratrol in rats. *Hum Exp Toxicol.* 2015;34(1):100-13.
290. Bastianetto S, Menard C, Quirion R. Neuroprotective action of resveratrol. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1852(6):1195-201.
291. Kumar A, Kaundal RK, Iyer S, Sharma SS. Effects of resveratrol on nerve functions, oxidative stress and DNA fragmentation in experimental diabetic neuropathy. *Life Sci.* 2007;80(13):1236-44.
292. Kumar A, Negi G, Sharma SS. Neuroprotection by resveratrol in diabetic neuropathy: concepts & mechanisms. *Curr Med Chem.* 2013;20(36):4640-5.
293. Kubota S, Ozawa Y, Kurihara T, Sasaki M, Yuki K, Miyake S, et al. Roles of AMP-activated protein kinase in diabetes-induced retinal inflammation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(12):9142-8.
294. Hua J, Guerin KI, Chen J, Michan S, Stahl A, Krahn NM, et al. Resveratrol inhibits pathologic retinal neovascularization in Vldlr(-/-) mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(5):2809-16.
295. Kim YH, Kim YS, Roh GS, Choi WS, Cho GJ. Resveratrol blocks diabetes-induced early vascular lesions and vascular endothelial growth factor induction in mouse retinas. *Acta Ophthalmol.* 2012;90(1):e31-7.
296. Soufi FG, Mohammad-Nejad D, Ahmadi H. Resveratrol improves diabetic retinopathy possibly through oxidative stress - nuclear factor kappaB - apoptosis pathway. *Pharmacol Rep.* 2012;64(6):1505-14.
297. Vella RK, Pullen C, Coulson FR, Fenning AS. Resveratrol prevents cardiovascular complications in the SHR/STZ rat by reductions in oxidative stress and inflammation. *Biomed Res Int.* 2015;2015:918123.
298. Guo R, Liu B, Wang K, Zhou S, Li W, Xu Y. Resveratrol ameliorates diabetic vascular inflammation and macrophage infiltration in db/db mice by inhibiting the NF-kappaB pathway. *Diab Vasc Dis Res.* 2014;11(2):92-102.
299. Turan B, Tuncay E, Vassort G. Resveratrol and diabetic cardiac function: focus on recent in vitro and in vivo studies. *J Bioenerg Biomembr.* 2012;44(2):281-96.
300. Mohammadshahi M, Haidari F, Soufi FG. Chronic resveratrol administration improves diabetic cardiomyopathy in part by reducing oxidative stress. *Cardiol J.* 2014;21(1):39-46.
301. Hamadi N, Mansour A, Hassan MH, Khalifi-Touhami F, Badary O. Ameliorative effects of resveratrol on liver injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biochem Mol Toxicol.* 2012;26(10):384-92.
302. Beaudeau JL, Nivet-Antoine V, Giral P. Resveratrol: a relevant pharmacological approach for the treatment of metabolic syndrome? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2010;13(6):729-36.
303. Meydani M, Hasan ST. Dietary polyphenols and obesity. *Nutrients.* 2010;2(7):737-51.
304. Cho SJ, Jung UJ, Choi MS. Differential effects of low-dose resveratrol on adiposity and hepatic steatosis in diet-induced obese mice. *Br J Nutr.* 2012;108(12):2166-75.

305. Poulsen MM, Larsen JO, Hamilton-Dutoit S, Clasen BF, Jessen N, Paulsen SK, et al. Resveratrol up-regulates hepatic uncoupling protein 2 and prevents development of nonalcoholic fatty liver disease in rats fed a high-fat diet. *Nutr Res.* 2012;32(9):701-8.
306. Gomez-Zorita S, Fernandez-Quintela A, Macarulla MT, Aguirre L, Hijona E, Bujanda L, et al. Resveratrol attenuates steatosis in obese Zucker rats by decreasing fatty acid availability and reducing oxidative stress. *Br J Nutr.* 2012;107(2):202-10.
307. Akar F, Uludag O, Aydin A, Aytakin YA, Elbeg S, Tuzcu M, et al. High-fructose corn syrup causes vascular dysfunction associated with metabolic disturbance in rats: protective effect of resveratrol. *Food Chem Toxicol.* 2012;50(6):2135-41.
308. Kalantari H, Das DK. Physiological effects of resveratrol. *Biofactors.* 2010;36(5):401-6.
309. Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell.* 2010;140(6):900-17.
310. Ueki K, Kondo T, Tseng YH, Kahn CR. Central role of suppressors of cytokine signaling proteins in hepatic steatosis, insulin resistance, and the metabolic syndrome in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(28):10422-7.
311. Li L, Hai J, Li Z, Zhang Y, Peng H, Li K, et al. Resveratrol modulates autophagy and NF-kappaB activity in a murine model for treating non-alcoholic fatty liver disease. *Food Chem Toxicol.* 2014;63:166-73.
312. Kumar A, Sharma SS. NF-kappaB inhibitory action of resveratrol: a probable mechanism of neuroprotection in experimental diabetic neuropathy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;394(2):360-5.
313. DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr.* 2004;80(6 Suppl):1689S-96S.
314. Goldblatt H, Soames KM. Studies on the Fat-Soluble Growth-Promoting Factor: (I) Storage. (II) Synthesis. *Biochem J.* 1923;17(4-5):446-53.
315. Boullion R, De Groot L, Jameson J. Vitamin D: From Photosynthesis, Metabolism and Action to Clinical Applications. Australia2001.
316. Palomer X, Gonzalez-Clemente JM, Blanco-Vaca F, Mauricio D. Role of vitamin D in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab.* 2008;10(3):185-97.
317. Zittermann A. Vitamin D in preventive medicine: are we ignoring the evidence? *Br J Nutr.* 2003;89(5):552-72.
318. Holick MF. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *Am J Clin Nutr.* 2004;79(3):362-71.
319. Holick MF. Sunlight, UV-radiation, vitamin D and skin cancer: how much sunlight do we need? *Adv Exp Med Biol.* 2008;624:1-15.
320. Peechakara SV, Pittas AG. Vitamin D as a potential modifier of diabetes risk. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2008;4(4):182-3.
321. Keane JT, Elangovan H, Stokes RA, Gunton JE. Vitamin D and the Liver-Correlation or Cause? *Nutrients.* 2018;10(4).
322. Brumbaugh PF, Haussler MR. 1 Alpha,25-dihydroxycholecalciferol receptors in intestine. I. Association of 1 alpha,25-dihydroxycholecalciferol with intestinal mucosa chromatin. *J Biol Chem.* 1974;249(4):1251-7.
323. Taymans SE, Pack S, Pak E, Orban Z, Barsony J, Zhuang Z, et al. The human vitamin D receptor gene (VDR) is localized to region 12cen-q12 by fluorescent in situ hybridization and radiation hybrid mapping: genetic and physical VDR map. *J Bone Miner Res.* 1999;14(7):1163-6.
324. Bouillon R, Eelen G, Verlinden L, Mathieu C, Carmeliet G, Verstuyf A. Vitamin D and cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2006;102(1-5):156-62.
325. Sutton AL, MacDonald PN. Vitamin D: more than a "bone-a-fide" hormone. *Mol Endocrinol.* 2003;17(5):777-91.

326. Ellison TI, Eckert RL, MacDonald PN. Evidence for 1,25-dihydroxyvitamin D₃-independent transactivation by the vitamin D receptor: uncoupling the receptor and ligand in keratinocytes. *J Biol Chem*. 2007;282(15):10953-62.
327. Makishima M, Lu TT, Xie W, Whitfield GK, Domoto H, Evans RM, et al. Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor. *Science*. 2002;296(5571):1313-6.
328. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene*. 2004;338(2):143-56.
329. Uitterlinden AG, Fang Y, van Meurs JB, van Leeuwen H, Pols HA. Vitamin D receptor gene polymorphisms in relation to Vitamin D related disease states. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004;89-90(1-5):187-93.
330. Yu F, Cui LL, Li X, Wang CJ, Ba Y, Wang L, et al. The genetic polymorphisms in vitamin D receptor and the risk of type 2 diabetes mellitus: an updated meta-analysis. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2016;25(3):614-24.
331. Mathieu C, Gysemans C, Giuliatti A, Bouillon R. Vitamin D and diabetes. *Diabetologia*. 2005;48(7):1247-57.
332. Daiger SP, Schanfield MS, Cavalli-Sforza LL. Group-specific component (Gc) proteins bind vitamin D and 25-hydroxyvitamin D. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975;72(6):2076-80.
333. Iyengar S, Hamman RF, Marshall JA, Majumder PP, Ferrell RE. On the role of vitamin D binding globulin in glucose homeostasis: results from the San Luis Valley Diabetes Study. *Genet Epidemiol*. 1989;6(6):691-8.
334. Nykjaer A, Dragun D, Walther D, Vorum H, Jacobsen C, Herz J, et al. An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D₃. *Cell*. 1999;96(4):507-15.
335. Norman PE, Powell JT. Vitamin D, shedding light on the development of disease in peripheral arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(1):39-46.
336. Baier LJ, Dobberfuhl AM, Pratley RE, Hanson RL, Bogardus C. Variations in the vitamin D-binding protein (Gc locus) are associated with oral glucose tolerance in nondiabetic Pima Indians. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(8):2993-6.
337. Szathmary EJ. The effect of Gc genotype on fasting insulin level in Dogrib Indians. *Hum Genet*. 1987;75(4):368-72.
338. Boucher BJ. Inadequate vitamin D status: does it contribute to the disorders comprising syndrome 'X'? *Br J Nutr*. 1998;79(4):315-27.
339. Husemoen LL, Thuesen BH, Fenger M, Jorgensen T, Glumer C, Svensson J, et al. Serum 25(OH)D and type 2 diabetes association in a general population: a prospective study. *Diabetes Care*. 2012;35(8):1695-700.
340. Leung PS. Current research of the RAS in diabetes mellitus. *Adv Exp Med Biol*. 2010;690:131-53.
341. Mathieu C. Vitamin D and diabetes: Where do we stand? *Diabetes Res Clin Pract*. 2015;108(2):201-9.
342. Mezza T, Muscogiuri G, Sorice GP, Prioletta A, Salomone E, Pontecorvi A, et al. Vitamin D deficiency: a new risk factor for type 2 diabetes? *Ann Nutr Metab*. 2012;61(4):337-48.
343. Boucher BJ, Mannan N, Noonan K, Hales CN, Evans SJ. Glucose intolerance and impairment of insulin secretion in relation to vitamin D deficiency in east London Asians. *Diabetologia*. 1995;38(10):1239-45.
344. Norman AW. Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology*. 2006;147(12):5542-8.
345. Dunlop TW, Vaisanen S, Frank C, Molnar F, Sinkkonen L, Carlberg C. The human peroxisome proliferator-activated receptor delta gene is a primary target of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ and its nuclear receptor. *J Mol Biol*. 2005;349(2):248-60.

346. Bookout AL, Jeong Y, Downes M, Yu RT, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell*. 2006;126(4):789-99.
347. Han S, Li T, Ellis E, Strom S, Chiang JY. A novel bile acid-activated vitamin D receptor signaling in human hepatocytes. *Mol Endocrinol*. 2010;24(6):1151-64.
348. Gascon-Barre M, Demers C, Mirshahi A, Neron S, Zalzal S, Nanci A. The normal liver harbors the vitamin D nuclear receptor in nonparenchymal and biliary epithelial cells. *Hepatology*. 2003;37(5):1034-42.
349. Chiu KC, Chu A, Go VL, Saad MF. Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction. *Am J Clin Nutr*. 2004;79(5):820-5.
350. Hewison M, Gacad MA, Lemire J, Adams JS. Vitamin D as a cytokine and hematopoietic factor. *Rev Endocr Metab Disord*. 2001;2(2):217-27.
351. Giulietti A, Gysemans C, Stoffels K, van Etten E, Decallonne B, Overbergh L, et al. Vitamin D deficiency in early life accelerates Type 1 diabetes in non-obese diabetic mice. *Diabetologia*. 2004;47(3):451-62.
352. Luong K, Nguyen LT, Nguyen DN. The role of vitamin D in protecting type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev*. 2005;21(4):338-46.
353. Mauricio D, Mandrup-Poulsen T, Nerup J. Vitamin D analogues in insulin-dependent diabetes mellitus and other autoimmune diseases: a therapeutic perspective. *Diabetes Metab Res Rev*. 1996;12(1):57-68.
354. Seshadri K, Tamilselvan B, Amarabalan R. Role of Vitamin D in Diabetes. *J Endocrinol Metab*. 2011;1(2):47-56.
355. Zhang Y, Leung DY, Richers BN, Liu Y, Remigio LK, Riches DW, et al. Vitamin D inhibits monocyte/macrophage proinflammatory cytokine production by targeting MAPK phosphatase-1. *J Immunol*. 2012;188(5):2127-35.
356. Polla BS, Healy AM, Amento EP, Krane SM. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ maintains adherence of human monocytes and protects them from thermal injury. *J Clin Invest*. 1986;77(4):1332-9.
357. Hewison M, Dabrowski M, Faulkner L, Hughson E, Vadher S, Rut A, et al. Transfection of vitamin D receptor cDNA into the monoblastoid cell line U937. The role of vitamin D₃ in homotypic macrophage adhesion. *J Immunol*. 1994;153(12):5709-19.
358. Du T, Zhou ZG, You S, Huang G, Lin J, Yang L, et al. Modulation of monocyte hyperresponsiveness to TLR ligands by 1,25-dihydroxy-vitamin D₃ from LADA and T2DM. *Diabetes Res Clin Pract*. 2009;83(2):208-14.
359. Haas MJ, Jafri M, Wehmeier KR, Onstead-Haas LM, Mooradian AD. Inhibition of endoplasmic reticulum stress and oxidative stress by vitamin D in endothelial cells. *Free Radic Biol Med*. 2016;99:1-10.
360. Ozturk M. Işık Mikroskopide İmmünohistokimyasal İşaretleme Yöntemleri. In: Demir R, editor. *Histolojik Boyama Teknikleri*. Ankara: Palme; 2001. p. 263-83.
361. Duan WR, Garner DS, Williams SD, Funckes-Shippy CL, Spath IS, Blomme EA. Comparison of immunohistochemistry for activated caspase-3 and cleaved cytokeratin 18 with the TUNEL method for quantification of apoptosis in histological sections of PC-3 subcutaneous xenografts. *J Pathol*. 2003;199(2):221-8.
362. Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul CL, Ramarao P. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res*. 2005;52(4):313-20.
363. Pinhas-Hamiel O, Zeitler P. The global spread of type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. *J Pediatr*. 2005;146(5):693-700.
364. Wall RJ, Shani M. Are animal models as good as we think? *Theriogenology*. 2008;69(1):2-9.

365. Obafemi TO, Akinmoladun AC, Olaleye MT, Agboade SO, Onasanya AA. Antidiabetic potential of methanolic and flavonoid-rich leaf extracts of *Synsepalum dulcificum* in type 2 diabetic rats. *J Ayurveda Integr Med.* 2017;8(4):238-46.
366. Okoduwa SIR, Umar IA, James DB, Inuwa HM. Anti-Diabetic Potential of *Ocimum gratissimum* Leaf Fractions in Fortified Diet-Fed Streptozotocin Treated Rat Model of Type-2 Diabetes. *Medicines (Basel).* 2017;4(4).
367. Ibrahim MA, Habila JD, Koorbanally NA, Islam MS. Butanol fraction of *Parkia biglobosa* (Jacq.) G. Don leaves enhance pancreatic beta-cell functions, stimulates insulin secretion and ameliorates other type 2 diabetes-associated complications in rats. *J Ethnopharmacol.* 2016;183:103-11.
368. Oyenihi AB, Chegou NN, Oguntibeju OO, Masola B. *Centella asiatica* enhances hepatic antioxidant status and regulates hepatic inflammatory cytokines in type 2 diabetic rats. *Pharm Biol.* 2017;55(1):1671-8.
369. Frombaum M, Le Clanche S, Bonnefont-Rousselot D, Borderie D. Antioxidant effects of resveratrol and other stilbene derivatives on oxidative stress and *NO bioavailability: Potential benefits to cardiovascular diseases. *Biochimie.* 2012;94(2):269-76.
370. Singh CK, Ndiaye MA, Ahmad N. Resveratrol and cancer: Challenges for clinical translation. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1852(6):1178-85.
371. Zordoky BN, Robertson IM, Dyck JR. Preclinical and clinical evidence for the role of resveratrol in the treatment of cardiovascular diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1852(6):1155-77.
372. Bensellam M, Laybutt DR, Jonas JC. The molecular mechanisms of pancreatic beta-cell glucotoxicity: recent findings and future research directions. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;364(1-2):1-27.
373. Hambrock A, de Oliveira Franz CB, Hiller S, Grenz A, Ackermann S, Schulze DU, et al. Resveratrol binds to the sulfonylurea receptor (SUR) and induces apoptosis in a SUR subtype-specific manner. *J Biol Chem.* 2007;282(5):3347-56.
374. Elattar S, Estaphan S, Mohamed EA, Elzainy A, Naguib M. The protective effect of 1 α , 25-dihydroxyvitamin d3 and metformin on liver in type 2 diabetic rats. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2017;173:235-44.
375. Silan C. The effects of chronic resveratrol treatment on vascular responsiveness of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biol Pharm Bull.* 2008;31(5):897-902.
376. George N, Kumar TP, Antony S, Jayanarayanan S, Paulose CS. Effect of vitamin D3 in reducing metabolic and oxidative stress in the liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Nutr.* 2012;108(8):1410-8.
377. Yang DK, Kang HS. Anti-Diabetic Effect of Cotreatment with Quercetin and Resveratrol in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Biomol Ther (Seoul).* 2018;26(2):130-8.
378. Pektas MB, Yucel G, Koca HB, Sadi G, Yildirim OG, Ozturk G, et al. Dietary Fructose-Induced Hepatic Injury in Male and Female Rats: Influence of Resveratrol. *Drug Res (Stuttg).* 2017;67(2):103-10.
379. DeFronzo RA, Simonson D, Ferrannini E. Hepatic and peripheral insulin resistance: a common feature of type 2 (non-insulin-dependent) and type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia.* 1982;23(4):313-9.
380. Liu L, Lv G, Ning C, Yang YE, Zhu J. Therapeutic effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on diabetes-induced liver complications in a rat model. *Exp Ther Med.* 2016;11(6):2284-92.
381. Kanuri G, Spruss A, Wagnerberger S, Bischoff SC, Bergheim I. Role of tumor necrosis factor alpha (TNF α) in the onset of fructose-induced nonalcoholic fatty liver disease in mice. *J Nutr Biochem.* 2011;22(6):527-34.
382. Spruss A, Kanuri G, Uebel K, Bischoff SC, Bergheim I. Role of the inducible nitric oxide synthase in the onset of fructose-induced steatosis in mice. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14(11):2121-35.

383. Laskin DL, Weinberger B, Laskin JD. Functional heterogeneity in liver and lung macrophages. *J Leukoc Biol.* 2001;70(2):163-70.
384. Wullaert A, van Loo G, Heynincx K, Beyaert R. Hepatic tumor necrosis factor signaling and nuclear factor-kappaB: effects on liver homeostasis and beyond. *Endocr Rev.* 2007;28(4):365-86.
385. Iskender H, Dokumacioglu E, Saral S, Yenice G, Sevim C. NF- κ B, TNF- α and IL-6 Levels in Liver and Kidney of High-Fructose-Fed Rats. *Journal of Advances in Medical and Pharmaceutical Sciences* 2018;18(3):1-7.
386. Wang X, Zhang DM, Gu TT, Ding XQ, Fan CY, Zhu Q, et al. Morin reduces hepatic inflammation-associated lipid accumulation in high fructose-fed rats via inhibiting sphingosine kinase 1/sphingosine 1-phosphate signaling pathway. *Biochem Pharmacol.* 2013;86(12):1791-804.
387. Vasiljevic A, Bursac B, Djordjevic A, Milutinovic DV, Nikolic M, Matic G, et al. Hepatic inflammation induced by high-fructose diet is associated with altered 11betaHSD1 expression in the liver of Wistar rats. *Eur J Nutr.* 2014;53(6):1393-402.
388. Zhu W, Chen S, Li Z, Zhao X, Li W, Sun Y, et al. Effects and mechanisms of resveratrol on the amelioration of oxidative stress and hepatic steatosis in KKAY mice. *Nutr Metab (Lond).* 2014;11:35.
389. Yang SJ, Lim Y. Resveratrol ameliorates hepatic metaflammation and inhibits NLRP3 inflammasome activation. *Metabolism.* 2014;63(5):693-701.
390. Jeon BT, Jeong EA, Shin HJ, Lee Y, Lee DH, Kim HJ, et al. Resveratrol attenuates obesity-associated peripheral and central inflammation and improves memory deficit in mice fed a high-fat diet. *Diabetes.* 2012;61(6):1444-54.
391. Zhang C, Lu X, Tan Y, Li B, Miao X, Jin L, et al. Diabetes-induced hepatic pathogenic damage, inflammation, oxidative stress, and insulin resistance was exacerbated in zinc deficient mouse model. *PLoS One.* 2012;7(12):e49257.
392. Boden G, She P, Mozzoli M, Cheung P, Gumireddy K, Reddy P, et al. Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor-kappaB pathway in rat liver. *Diabetes.* 2005;54(12):3458-65.
393. Cohen-Lahav M, Shany S, Tobvin D, Chaimovitz C, Douvdevani A. Vitamin D decreases NFkappaB activity by increasing IkappaBalpha levels. *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21(4):889-97.
394. Ning C, Liu L, Lv G, Yang Y, Zhang Y, Yu R, et al. Lipid metabolism and inflammation modulated by Vitamin D in liver of diabetic rats. *Lipids Health Dis.* 2015;14:31.
395. Harris SS. Does vitamin D deficiency contribute to increased rates of cardiovascular disease and type 2 diabetes in African Americans? *Am J Clin Nutr.* 2011;93(5):1175S-8S.
396. Ganji V, Zhang X, Shaikh N, Tangpricha V. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations are associated with prevalence of metabolic syndrome and various cardiometabolic risk factors in US children and adolescents based on assay-adjusted serum 25-hydroxyvitamin D data from NHANES 2001-2006. *Am J Clin Nutr.* 2011;94(1):225-33.
397. Melamed ML, Michos ED, Post W, Astor B. 25-hydroxyvitamin D levels and the risk of mortality in the general population. *Arch Intern Med.* 2008;168(15):1629-37.
398. van Etten E, Mathieu C. Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3: basic concepts. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005;97(1-2):93-101.
399. Sigmundsdottir H, Pan J, Debes GF, Alt C, Habtezion A, Soler D, et al. DCs metabolize sunlight-induced vitamin D3 to 'program' T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27. *Nat Immunol.* 2007;8(3):285-93.
400. Holick MF. Vitamin D: evolutionary, physiological and health perspectives. *Curr Drug Targets.* 2011;12(1):4-18.
401. Kim OK, Jun W, Lee J. Mechanism of ER Stress and Inflammation for Hepatic Insulin Resistance in Obesity. *Ann Nutr Metab.* 2015;67(4):218-27.

402. Schroder M. Endoplasmic reticulum stress responses. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(6):862-94.
403. Shen X, Zhang K, Kaufman RJ. The unfolded protein response--a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. *J Chem Neuroanat.* 2004;28(1-2):79-92.
404. Ozawa K, Miyazaki M, Matsuhisa M, Takano K, Nakatani Y, Hatazaki M, et al. The endoplasmic reticulum chaperone improves insulin resistance in type 2 diabetes. *Diabetes.* 2005;54(3):657-63.
405. Gaballah HH, Zakaria SS, Elbatsh MM, Tahoon NM. Modulatory effects of resveratrol on endoplasmic reticulum stress-associated apoptosis and oxido-inflammatory markers in a rat model of rotenone-induced Parkinson's disease. *Chem Biol Interact.* 2016;251:10-6.
406. Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, et al. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science.* 2000;287(5453):664-6.
407. Nishitoh H, Matsuzawa A, Tobiume K, Saegusa K, Takeda K, Inoue K, et al. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev.* 2002;16(11):1345-55.
408. Ortis F, Cardozo AK, Crispim D, Storling J, Mandrup-Poulsen T, Eizirik DL. Cytokine-induced proapoptotic gene expression in insulin-producing cells is related to rapid, sustained, and nonoscillatory nuclear factor-kappaB activation. *Mol Endocrinol.* 2006;20(8):1867-79.
409. Kaneko M, Niinuma Y, Nomura Y. Activation signal of nuclear factor-kappa B in response to endoplasmic reticulum stress is transduced via IRE1 and tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. *Biol Pharm Bull.* 2003;26(7):931-5.
410. Hu P, Han Z, Couvillon AD, Kaufman RJ, Exton JH. Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1alpha-mediated NF-kappaB activation and down-regulation of TRAF2 expression. *Mol Cell Biol.* 2006;26(8):3071-84.
411. Cnop M, Ladriere L, Hekerman P, Ortis F, Cardozo AK, Dogusan Z, et al. Selective inhibition of eukaryotic translation initiation factor 2 alpha dephosphorylation potentiates fatty acid-induced endoplasmic reticulum stress and causes pancreatic beta-cell dysfunction and apoptosis. *J Biol Chem.* 2007;282(6):3989-97.
412. Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ.* 2004;11(4):381-9.
413. Ma Y, Brewer JW, Diehl JA, Hendershot LM. Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. *J Mol Biol.* 2002;318(5):1351-65.
414. Jiang HY, Wek SA, McGrath BC, Lu D, Hai T, Harding HP, et al. Activating transcription factor 3 is integral to the eukaryotic initiation factor 2 kinase stress response. *Mol Cell Biol.* 2004;24(3):1365-77.
415. Nakanishi K, Sudo T, Morishima N. Endoplasmic reticulum stress signaling transmitted by ATF6 mediates apoptosis during muscle development. *J Cell Biol.* 2005;169(4):555-60.
416. Balakumar M, Raji L, Prabhu D, Sathishkumar C, Prabu P, Mohan V, et al. High-fructose diet is as detrimental as high-fat diet in the induction of insulin resistance and diabetes mediated by hepatic/pancreatic endoplasmic reticulum (ER) stress. *Mol Cell Biochem.* 2016;423(1-2):93-104.
417. Afrin R, Arumugam S, Soetikno V, Thandavarayan RA, Pitchaimani V, Karuppagounder V, et al. Curcumin ameliorates streptozotocin-induced liver damage through modulation of endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in diabetic rats. *Free Radic Res.* 2015;49(3):279-89.
418. Haligur M, Topsakal S, Ozmen O. Early degenerative effects of diabetes mellitus on pancreas, liver, and kidney in rats: an immunohistochemical study. *Exp Diabetes Res.* 2012;2012:120645.

419. Kaya-Dagistanli F, Tanriverdi G, Altinok A, Ozyazgan S, Ozturk M. The effects of alpha lipoic acid on liver cells damages and apoptosis induced by polyunsaturated fatty acids. *Food Chem Toxicol.* 2013;53:84-93.
420. Dervan PA, Magee HM, Buckley C, Carney DN. Proliferating cell nuclear antigen counts in formalin-fixed paraffin-embedded tissue correlate with Ki-67 in fresh tissue. *Am J Clin Pathol.* 1992;97(5 Suppl 1):S21-8.
421. Linden MD, Torres FX, Kubus J, Zarbo RJ. Clinical application of morphologic and immunocytochemical assessments of cell proliferation. *Am J Clin Pathol.* 1992;97(5 Suppl 1):S4-13.
422. Chen Y, Zheng S, Qi D, Zheng S, Guo J, Zhang S, et al. Inhibition of Notch signaling by a gamma-secretase inhibitor attenuates hepatic fibrosis in rats. *PLoS One.* 2012;7(10):e46512.
423. Liu B, Ghosh S, Yang X, Zheng H, Liu X, Wang Z, et al. Resveratrol rescues SIRT1-dependent adult stem cell decline and alleviates progeroid features in laminopathy-based progeria. *Cell Metab.* 2012;16(6):738-50.
424. Chen H, Liu X, Zhu W, Chen H, Hu X, Jiang Z, et al. SIRT1 ameliorates age-related senescence of mesenchymal stem cells via modulating telomere shelterin. *Front Aging Neurosci.* 2014;6:103.
425. Godoy JA, Zolezzi JM, Braidy N, Inestrosa NC. Role of Sirt1 during the ageing process: relevance to protection of synapses in the brain. *Mol Neurobiol.* 2014;50(3):744-56.
426. Hisahara S, Chiba S, Matsumoto H, Tanno M, Yagi H, Shimohama S, et al. Histone deacetylase SIRT1 modulates neuronal differentiation by its nuclear translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(40):15599-604.
427. Wang X, Ma S, Meng N, Yao N, Zhang K, Li Q, et al. Resveratrol Exerts Dosage-Dependent Effects on the Self-Renewal and Neural Differentiation of hUC-MSCs. *Mol Cells.* 2016;39(5):418-25.
428. Rathbone CR, Booth FW, Lees SJ. Sirt1 increases skeletal muscle precursor cell proliferation. *Eur J Cell Biol.* 2009;88(1):35-44.
429. Chen H, Liu X, Chen H, Cao J, Zhang L, Hu X, et al. Role of SIRT1 and AMPK in mesenchymal stem cells differentiation. *Ageing Res Rev.* 2014;13:55-64.
430. da Luz PL, Tanaka L, Brum PC, Dourado PM, Favarato D, Krieger JE, et al. Red wine and equivalent oral pharmacological doses of resveratrol delay vascular aging but do not extend life span in rats. *Atherosclerosis.* 2012;224(1):136-42.
431. Vassallo PF, Simoncini S, Ligi I, Chateau AL, Bachelier R, Robert S, et al. Accelerated senescence of cord blood endothelial progenitor cells in premature neonates is driven by SIRT1 decreased expression. *Blood.* 2014;123(13):2116-26.
432. Qiao PF, Yao L, Zhang XC, Li GD, Wu DQ. Heat shock pretreatment improves stem cell repair following ischemia-reperfusion injury via autophagy. *World J Gastroenterol.* 2015;21(45):12822-34.
433. Moukayed M, Grant WB. Molecular link between vitamin D and cancer prevention. *Nutrients.* 2013;5(10):3993-4021.
434. Guo J, Ma Z, Ma Q, Wu Z, Fan P, Zhou X, et al. 1, 25(OH)(2)D(3) inhibits hepatocellular carcinoma development through reducing secretion of inflammatory cytokines from immunocytes. *Curr Med Chem.* 2013;20(33):4131-41.
435. O'Connell TD, Berry JE, Jarvis AK, Somerman MJ, Simpson RU. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 regulation of cardiac myocyte proliferation and hypertrophy. *Am J Physiol.* 1997;272(4 Pt 2):H1751-8.
436. Kim YO, Li C, Sun BK, Kim JS, Lim SW, Choi BS, et al. Preconditioning with 1,25-dihydroxyvitamin D3 protects against subsequent ischemia-reperfusion injury in the rat kidney. *Nephron Exp Nephrol.* 2005;100(2):e85-94.

437. Domingues-Faria C, Chanet A, Salles J, Berry A, Giraudet C, Patrac V, et al. Vitamin D deficiency down-regulates Notch pathway contributing to skeletal muscle atrophy in old wistar rats. *Nutr Metab (Lond)*. 2014;11(1):47.
438. Kose M, Bastug O, Sonmez MF, Per S, Ozdemir A, Kaymak E, et al. Protective effect of vitamin D against hyperoxia-induced lung injury in newborn rats. *Pediatr Pulmonol*. 2017;52(1):69-76.



HAM VERİLER

FORMLAR



ETİK KURUL KARARI

Tarih ve Sayı: 01/06/2017-205280



* B E S A N I H P E *



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı



Sayı :35980450-050.01.04-
Konu :Prof.Dr. Turgut ULUTİN'e ait Etik
Kurul Onayı

Sayın Prof. Dr. Ali Nur Turgut ULUTİN

İlgi :21.04.2017 tarihli proje başvurunuz.

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, **Yüksek Lisans Öğrencisi Merve ANAPALI**'ya ait "Fruktoz Ve Streptozotocin İle Oluşturulan Diyabet Modelinde Resveratrol Ve Vitamin D Tedavisinin Karaciğer Ve Endoplazmik Retikulum Stresine Etkileri" isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul ilkelerine uygun bulunmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

e-İmzalı
Prof. Dr. Fatma Alev KAYMAZ
Başkan

30/05/2017 B.İşl. : C.SÖNMEZTÜRK

Doğrulamak için: <http://194.27.128.66/envision.Sorgula/belgedogrulama.aspx?V=BERANIHPE>

Ayrıntılı bilgi için: arnar Cazan SÖNMEZTÜRK

İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı I.Ü. Veteriner Fakültesi Dekanlık katı A 221
nolu oda Avcılar/İSTANBUL

Tel : (212) 473 7070 Faks : 2124400377

e-posta : hadyek@istanbul.edu.tr Elektronik Ağ : www.istanbul.edu.tr

PATENT HAKKI İZİNİ



İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

FRUKTOZ VE STREPTOZOTOCİN İLE OLUŞTURULAN DİYABET MODELİNDE RESVERATROL VE VİTAMİN D TEDAVİSİNİN KARACİĞER VE ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİNE ETKİLERİ

ORJİNALLİK RAPORU

%**4**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**3**

İNTERNET
KAYNAKLARI

%**2**

YAYINLAR

%**1**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Özge KÖSE, Pınar ERKEKOĞLU, Büşra ÖZYURT, Belma KOÇER GÜMÜŞEL. "An Overview of the Endoplasmic Reticulum Stress and Interrelation with Obesity: Review", Türkiye Klinikleri Journal of Pharmacy Sciences, 2017 Yayın	% 1
2	slideplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<% 1
3	www.ctf.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
4	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<% 1
5	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
6	tbgder.org İnternet Kaynağı	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	MERVE	Soyadı	ANAPALI
Doğ.Yeri	ERZURUM	Doğ.Tar.	03.07.1992
Uyruğu	TC	TC Kim No	38629285744
Email	merveanapali@gmail.com	Tel	0536 935 15 69

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK	2015
Lise	MECİDİYE ANADOLU LİSESİ ERZURUM	2010

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ	ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TIBBİ BİYOLOJİ ABD	2017-devam ediyor
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İNGİLİZCE	ÇOK İYİ	İYİ	İYİ		76,25

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS WORD	İYİ
MS EXCEL	İYİ
ENDNOTE X8	İYİ

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri):