

T.C.
ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL DİABET OLUŞTURULAN SIÇANLARDA
KALP VE İSKELET KASI NRF-2 YAPIMI VE
OKSİDATİF STRES ÜZERİNE MELATONİNİN
ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Salim ÖZENOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi İnci TURAN

ZONGULDAK
2019

T.C.
ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL DİABET OLUŞTURULAN SIÇANLARDA
KALP VE İSKELET KASI NRF-2 YAPIMI VE
OKSİDATİF STRES ÜZERİNE MELATONİNİN
ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Salim ÖZENOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi İnci TURAN

ZONGULDAK
2019

KABUL ve ONAY :

“DENEYSEL DİABET OLUŞTURULAN SIÇANLARDA KALP VE İSKELET KASI NRF-2 YAPIMI VE OKSİDATİF STRES ÜZERİNE MELATONİNİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından değerlendirilerek, Fizyoloji Anabilim Dalı Fizyoloji Yüksek Lisans Programı yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

26.06.2019

Başkan : Prof. Dr. Hale SAYAN ÖZAÇMAK

Üye : Prof. Dr. Şerif DEMİR

Üye : Dr. Öğretim Üyesi İnci TURAN (Danışman)

ONAY :

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

TARİH: 26.06.2019

Prof. Dr. Veysel Haktan ÖZAÇMAK

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresinde akademik bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, yol gösteren ve destek olan değerli hocalarım Bülent Ecevit Üniversitesi Fizyoloji Anabilim dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Hale SAYAN ÖZAÇMAK ve Prof. Dr. Veysel Haktan ÖZAÇMAK' a,

Her alanda büyük destek gördüğüm, akademik bilgi ve deneyimiyle yol gösteren ve bana çok şey katan, ilgili ve şefkatli yaklaşımıyla beni sürekli motive eden değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi İnci TURAN'a,

Yüksek lisans eğitimi ve deney sürecinde yardımlarını esirgemeyen, birlikte eğitim aldığımız arkadaşlarım Meryem ERGENÇ'e, Osman CENGİL'e ve Birgül ALTUĞ'a,

Zonguldak Atatürk Devlet Hastanesi fizik tedavi ünitesindeki çalışma arkadaşlarıma,

Her alanda gösterdikleri desteği yüksek lisans eğitimim süresinde de gösteren, haklarını asla ödeyemeyeceğim sevgili annem, babam ve kardeşime,

Hayattaki en büyük şansım, varlığında huzuru bulduğum, en kıymetlim sevgili eşim Ayşegül ÖZENOĞLU'na ve onun bana hediyesi, mutluluk kaynağım canım kızım Defne'ye çok teşekkür ederim. İyi ki varsınız.

Bu çalışma Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. (BAP No: 2016-26259946-02)

Salim ÖZENOĞLU
ZONGULDAK,2019

ÖZET

Salim Özenoğlu, Deneysel Diabet Oluşturulan Sıçanlarda Kalp ve İskelet Kası NRF2 Yapımı ve Oksidatif Stres Üzerine Melatoninin Etkisinin İncelenmesi, Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Zonguldak 2019.

Diyabetes mellitus (DM) kronik hiperglisemi ile giden epidemik bir hastalıktır. Kronik hiperglisemi serbest oksijen radikallerinin (ROS) yapımı ile birlikte. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) redoks duyarlı transkripsiyon faktörüdür ve pek çok antioksidan enzimin gen yapımını kontrol eder. Melatoninin deneysel modellerde diyabetik nöropatide koruyucu olduğu gösterilmiştir. Amacımız deneysel diyabet oluşturulan sıçanlarda iskelet ve kalp kasında melatoninin NRF2 düzeyleri ile oksidatif stres düzeylerine etkisini incelemektir. Çalışmamızda 36 adet Wistar-albino sıçan dört gruba ayrıldı. 1) Kontrol+serum fizyolojik (SF) grubu (n=8), 2) Kontrol+melatonin grubu (n=8), 3) Diyabet+SF grubu (n=10), 4) Diyabet+melatonin grubu (n=10). Diyabet oluşturmak için tek doz intraperitoneal (İP) streptozotosin (STZ) 60mg/kg dozunda uygulandı. Melatonin uygulaması (10 mg/kg, İP) 28 gün boyunca uygulandı. Bu sürenin sonunda sıçanların kalp ve iskelet dokuları alınarak lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak malondialdehid (MDA), antioksidan gösterge olarak indirgenmiş glutatyon (GSH) düzeyleri spektrofotometrik olarak incelendi. Dokularda NRF2 ve tioredoksin (TRX) düzeyleri ELISA yöntemi ile ölçüldü. Diyabetik grubun iskelet ve kalp kası MDA düzeyleri kontrol gruplarına göre yüksek bulunurken, melatonin tedavisi sonrası bu değerin anlamlı düzeyde azaldığı gözlenmiştir ($p<0.05$). İskelet kası GSH seviyesi melatonin uygulanan diyabetik grupta sadece diyabet grubuna göre yüksek bulunmuştur. Diyabetik grupta iskelet kası NRF2 düzeyleri kontrol gruplarına göre düşük bulunmuştur. Bu azalma melatonin tedavisi ile kontrol değerlerine yükselmiştir. Kalp kası NRF2 düzeylerinde diyabet grubunda düşüklük görülmesine rağmen bu farklılığın anlamlı olmadığı saptanmıştır. TRX seviyelerinde iskelet kasında gruplar arasında farklılık gözlenmemiştir. Kalp kası TRX seviyeleri diyabet grubunda düşük bulunurken melatonin uygulaması ile yükselmiştir ($p<0.05$). Çalışmamızın sonuçları melatonin tedavisinin diyabetle ortaya çıkan oksidatif stresi iskelet kasında NRF2 yolağı ile kalp kasında ise TRX yolağı ile azaltabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler; Melatonin, Diabetes Mellitus, NRF2, TRX, Rat, Oksidatif Stres

ABSTRACT

Salim Özenoğlu, The Effects of Melatonin on Nrf2 Expression and Oxidative Stress in Heart Muscle and Skeletal Muscle in Rats With Experimental Diabetes, Zonguldak Bülent Ecevit University, Institute of Health Sciences, Department of Physiology, Master of Science Thesis, Zonguldak, 2019.

Diabetes mellitus (DM) is an epidemic disease associated with chronic hyperglycemia. Chronic hyperglycemia is associated with the production of free oxygen radicals (ROS). Nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (NRF2) is a redox sensitive transcription factor and controls gene production of many antioxidant enzymes. Melatonin has been shown to be protective in diabetic neuropathy in experimental models. The aim of this study was to investigate the effect of melatonin on NRF2 levels and oxidative stress levels in skeletal muscle and heart muscle in experimental diabetes-induced rats. 36 Wistar albino rats were divided into four groups. 1) Control+isotonic solution (SF) group (n=8), 2) control+melatonin group (n=8), 3) Diabetes+SF group (n=10), 4) Diabetes+melatonin group (n=10). A single dose of intraperitoneal streptozotocin (STZ) was administered at a dose of 60 mg/kg. Melatonin treatment (10 mg/kg, IP) was administered for 28 days. At the end of this period, malondialdehyde (MDA) level as an indicator of lipid peroxidation and reduced glutathione levels (GSH) were determined by spectrophotometry. NRF2 and thioredoxin (TRX) levels were measured by ELISA. MDA levels of the diabetic group were higher than the control groups and this value was significantly decreased after melatonin treatment ($p<0.05$). Skeletal muscle GSH levels in the melatonin treated diabetic group was significantly higher than the diabetic group. In the diabetic group, skeletal muscle NRF2 levels were found lower than normoglycemic control groups. Melatonin treatment increased this value to control levels. Although NRF2 levels of heart muscle in the diabetes group was found to be decreased, the differences was not statistically significant. No difference was observed between the groups in skeletal muscle in TRX levels. In the diabetes group, heart muscle TRX levels were lower than control groups and melatonin administration increased this level ($p<0.05$). The results of our study indicate that melatonin treatment can reduce the oxidative stress induced with diabetes by NRF2 pathway in skeletal muscle and by TRX pathway in cardiac muscle.

Keywords; Melatonin, Diabetes Mellitus, NRF2, TRX, Rat, Oxidative Stress

İÇİNDEKİLER

Sayfa

KABUL VE ONAY	iii
ÖNSÖZ	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİL DİZİNİ	xi
TABLO DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Diyabetin Tanımı.....	3
2.2. Diyabetin Tarihçesi	3
2.3. Epidemiyoloji	4
2.4. Diyabetin Sınıflandırılması	4
2.4.1. Tip 1 diyabet	5
2.4.2. Tip 2 diyabet	6
2.5. Diyabetin Komplikasyonları	6
2.6. Diyabet ve Kalp Kası.....	7
2.7. Diyabet ve İskelet Kası.....	8
2.8. Oksidatif Stres	10
2.8.1. Diyabet ve oksidatif stres.....	10
2.8.2. Polyol yolağı.....	11
2.8.3. Artmış ileri glikasyon son ürünleri (AGE)	12
2.8.4. Protein kinaz C (PKC) aktivasyonunun artması.....	12
2.8.5. Glukozun otooksidasyonu	13
2.8.6. Lipid peroksidasyonu ve MDA üretimi	14
2.9. Antioksidan Mekanizmalar	14
2.9.1. Glutatyon (GSH).....	15
2.9.2. Nükleer faktör eritroit 2- related faktör 2 (NRF2).....	15
2.9.3. Tioredoksin (TRX)	17
2.10. Melatonin.....	17

3. GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1. Deney Hayvanları	20
3.2. Grupların Oluşturulması	20
3.3. Doku Örneklerinin Alınması	22
3.4. MDA ve GSH Ölçümü	23
3.5. NRF2 ve TRX Düzeylerinin Belirlenmesi	23
3.6. İstatiksel Analiz	23
4. BULGULAR	25
4.1. Kan Glukoz Ölçümleri	25
4.2. Ağırlık Takipleri	25
4.3. İskelet Kası GSH Düzeyleri	26
4.4. Kalp Kası GSH Düzeyleri	27
4.5. İskelet kası MDA düzeyleri	27
4.6. Kalp Kası MDA Değerleri	28
4.7. İskelet Kası NRF2 Sonuçları	29
4.8. Kalp Kası NRF2 Sonuçları	30
4.9. İskelet Kası TRX Sonuçları	31
4.10. Kalp Kası TRX Sonuçları	32
4.11. Tüm Doku Örneklerinden Elde Edilen Veriler	32
5. TARTIŞMA	34
6. SONUÇLAR	38
7. KAYNAKLAR	39
8. EKLER	49
Ek-1 Etik Kurul Onayı	49
9. ÖZGEÇMİŞ	50

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADA	Amerikan Diyabet Birliği
ADP	Adenozin difosfat
AGE	İleri glikasyon son ürünleri
ARE	Antioksidan responsive element
ATP	Adenozin trifosfat
CAT	Katalaz
DAG	Diaçilgliserol
DM	Diyabetes mellitus
ELISA	Enzyme-linked immün sorbent assay
eNOS	Endotel nitrik oksit sentaz
ETZ	Elektron transfer sistemi
FADH	Flavin adenin dinükleotid
GPx	Glutasyon peroksidaz
GSH	İndirgenmiş glutasyon
HO-1	Hem oksijenaz-1
IDDM	İnsüline bağımlı diyabetes mellitus
İP	İntraperitoneal
KEAP-1	Kelch-like ECH-associated protein-1
MDA	Malondialdehit
NAD+	Nikotinamid adenin dinükleotidin yükseltgenmiş hali
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NF-κB	Nükleer faktör kappa B
NIDDM	İnsüline bağımlı olmayan diyabetes mellitus
NO	Nitrik oksit
NQO1	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat kinon oksidoredüktaz
NRF2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
PBS	Fosfat tampon solüsyonu
PKC	Protein kinaz C
ROS	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
STZ	Streptozotosin
TGF-β1	Transforming growth faktör beta-1

TRX	Tioredoksin
TURDEP	Türk diyabet epidemiyoloji çalışma grubu
VEGF	Vasküler endotel growth faktör



ŞEKİL DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1. Diyabetik kardiyomyopatinin oluşum mekanizmaları.....	8
2. Diyabetin kas dokusu üzerine etkisi.....	9
3. Polyol yolağı.	11
4. NRF2, KEAP-1 kompleksi.	16
5. Melatonin sentezi ve ışığın etkisi.....	18
6. Deney gruplarının oluşturulması.....	21
7. İskelet kasından alınan doku örneklerindeki GSH düzeyleri.....	26
8. Kalp kas dokusu örneklerinde bulunan GSH düzeyleri.	27
9. İskelet kasından alınan doku örneklerinin MDA düzeyleri.	28
10. Kalp kasından alınan doku örneklerindeki MDA değerleri.	29
11. İskelet kasından alınan doku örneklerindeki NRF2 değerleri.....	30
12. Kalp kasından alınan doku örneklerindeki NRF2 değerleri.....	31
13. İskelet kasından alınan doku örneklerindeki TRX değerleri.....	31
14. Kalp kasından alınan doku örneklerindeki TRX değerleri.	32

TABLO DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
1. STZ Enjeksiyonu Öncesi Ortalama Glukoz Değerleri.....	25
2. STZ Enjeksiyonu Öncesi Sıçanların Ağırlık Ortalama Değerleri.....	26
3. Doku Örneklerinden Elde Edilen Verilerin Gruplara Göre Dağılımı	33



1. GİRİŞ

Diabetes mellitüs (DM) kronik hiperglisemi ile giden epidemik bir hastalıktır. Kronik hiperglisemi serbest oksijen radikallerinin yapımı ile birlikte ve böbrek, beyin, göz, sinir sistemi, kan damarları, kalp gibi organlarda oksidatif stres artışı ile uzun dönemde patolojik değişiklikler, organ disfonksiyonu ve organ yetmezliklerine neden olmaktadır (1). Yükselmiş kan glukoz seviyesi proinflamatuvar sitokinlerin yapımını uyarır, lipit peroksidasyonu ve apoptotik süreci aktive ederek çeşitli diyabet komplikasyonlarına neden olur. Diyabetik koşullarda beyin dokusunda inflamatuvar sitokinlerin salınımı ve oksidatif stres artmaktadır. İnsan ve deney hayvanlarında oksidatif stresin lipit peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve DNA hasarı ile nöronal ölümden santral rol oynadığı saptanmıştır (2). Artan hücrel stres ve kardiyomyosit apoptozisi, DM ile ortaya çıkan kardiyovasküler komplikasyonlardan sorumlu tutulmaktadır (3).

NRF2 redoks duyarlı transkripsiyon faktörüdür ve pek çok antioksidan enzimin ve faz II detoksifikasyon enzimlerinin gen yapımını kontrol eder. Bu enzimler arasında NADPH quinone oksidoreduktaz 1, hem oksijenaz 1 (HO-1), gama glutamil sentetaz, süperoksit dismutaz (SOD) ve thioredoksin (TRX) yer alır. Fizyolojik koşullarda Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) sitozolik bir protein olan Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP-1) ile kontrol edilir. Oksidatif stres artışı ile NRF2'nin aktivasyonu sonrasında NRF2, KEAP-1'den ayrılarak nükleusda bulunan antioksidan responsive element (ARE)'e bağlanır. NRF2 sinyalinin aktivasyonu diyabetin periferik komplikasyonlarının engellenmesinde önemli yere sahiptir (4, 5). NRF2 hücrede indirgenmiş glutatyon (GSH) miktarının kontrolünde ve redoks homeostazisinin korunmasında önemlidir. TRX ve GSH oksidatif stresle oluşan sitotoksiteden hücreleri koruyan majör tiyol antioksidanlardır. TRX majör olarak endotel hücreleri tarafından yapılır ve hücreleri oksidatif strese karşı korur. Aynı zamanda TRX hücrelerde HO-1 yapımını da kontrol eder (5).

DM ile ortaya çıkan mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonların oluşumunda oksidatif stresin önemli rol oynadığı bildirilmektedir. DM; beyin, böbrek, kalp, pankreas gibi pek çok dokuda oksidatif stres artışı ile fonksiyon bozukluklarına neden olmaktadır. Kronik hiperglisemi ile artan serbest oksijen

radikalleri diyabetik kardiomiyopati gelişimine neden olur (6). Melatonin uygulamasının diyabetik sıçan retinasında NRF2 miktarının azalmasını engelleyerek oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir. Diyabette NRF2 aktivasyonu ile oksidatif stresin engellenmesi son zamanlarda diyabet komplikasyonlarının azaltılmasında yer almaktadır (7).

DM kas yapısında etkilemektedir. Diyabetik miyopati fiziksel aktivite ve kas kitle ve gücünü azaltarak diyabetik komplikasyonların artışına neden olmaktadır. Diyabetik miyopatide kas liflerinin sayısında azalma, atrofi ve kapiller yoğunlukta azalma gözlenmektedir (8). Ayrıca artan oksidatif stres ve inflamatuvar cevap insülin direncinin oluşumunda rol alır (9). İskelet kasında hiperinsülinemi, hiperlipidemi, glukokortikoid ve inflamatuvar sitokinler gibi çeşitli nedenlerle glukoz dağılımının bozulması serbest oksijen radikalleri (ROS) yapımının artışı ile sonuçlanmaktadır (10). Ding ve arkadaşları (11) diyabetik sıçanlarda bir antioksidan olan proantosiyanidin kullanımının diyabete ortaya çıkan iskelet kası hasarını azaltmada etkili olduğunu göstermişlerdir. Benzer şekilde SOD yapımının arttığı farelerde iskelet kasında oksidatif stres ve insülin direncinin azaldığı da saptanmıştır (10).

Melatonin glukoz metabolizmasını kontrol edici etkilere sahiptir ve pinealektomili hayvanlarda insülin direnci gelişmektedir. Melatoninin diyabetik hayvanlarda insülin direncini azaltmada etkili olduğu gösterilmiştir. Melatonin tedavisinin obezite ve diyabet ile oluşan komplikasyonların engellenmesinde yararlı etkiler gösterdiği saptanmıştır (12, 13).

DM, oksidatif stresin arttığı ve antioksidan savunma mekanizmaların azalması ile karakterize yaygın bir hastalıktır. Artmış oksidatif stres ve azalmış antioksidan enzim aktivitesi diyabetli hastalarda çeşitli organların etkilenmesine neden olmaktadır (1). Çeşitli deneysel çalışmalarda melatonin hormonunun antioksidan enzim düzeylerini artırdığı ve antiinflamatuvar etkileri gösterilmiştir. Ayrıca diyabetle ortaya çıkan komplikasyonları azaltmada etkili olduğu da bildirilmektedir (12). NRF2 sinyalinin aktivasyonu diyabetin çeşitli komplikasyonlarını önlemede etkili olduğu bildirilmiştir (7). Bu çalışmanın amacı diyabetik sıçanlarda antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri olduğu bilinen melatonin uygulamasının iskelet ve kalp kası NRF2 düzeyleri ve oksidatif stres üzerine etkilerini incelemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diyabetin Tanımı

DM insülin sekresyonunun veya aktivitesinin bozulması ya da her ikisinin birlikte görülmesi durumu sonucu, kronik hiperglisemi ile karakterize metabolik bir hastalıktır. Kronik hiperglisemi özellikle sinirler, göz, böbrek, kalp ve kan damarlarında diyabetle birlikte oluşan hasar ve disfonksiyonlarla ilişkilendirilir (14).

Poliüri, polidipsi ve kilo kaybı diyabetin karakteristik semptomlarıdır. Daha ciddi formlarında ketoasidoz veya non-ketotik hiperosmolar durumlar ortaya çıkabilir, baygınlık veya komayla sonuçlanabilir. Tedavi edilmez ise ölüme kadar gidebilir (15).

DM oluşumunda pankreas beta hücrelerinin otoimmün yıkımı sonucu insülin eksikliği ve çeşitli anormallikler sonucu insüline karşı direnç oluşması gibi patolojik süreçler rol oynar. İnsülinin hedef dokuda etkinliğinin azalmasına bağlı olarak karbonhidrat, yağ ve protein metabolizması bozulur (14).

2.2. Diyabetin Tarihçesi

DM, ilk olarak milattan önce 1500 yıllarında eski mısır papirüslerinde idrarın şekerli olması ve fazla idrara çıkılması durumlarıyla tanımlanmıştır (16).

Eski yunan hekimleri bu durumun esas semptomlarından fazla miktarda idrara çıkma durumuna atıfta bulunarak, sifon anlamına gelen diyabet sözcüğünü kullandılar ve iki farklı tipini tanımladılar. İdrarın şekerli tada sahip olduğu durumda bal anlamındaki 'mel' sözcüğünü kullanarak DM, idrarın tatsız olduğu durumu tanımlamak amacı ile diabetes insipidus kullanıldı. Diabetes insipidus vazopressin hormonu kaynaklı bozukluklar için kullanılırken, diyabet sözcüğü DM ile birbirinin yerine eş anlamlı olarak kullanılmaktadır (16, 17).

Paul Langerhans pankreas adacıklarını bulmuş (1960), Claud-Bernard ise diyabetin nöro-hormonal mekanizmasını tanımlamıştır (1875). 1889'da V. Mering ve Minkowski pankreatomi yapılan köpekte diyabet geliştiğini belirlemiş ve diyabetin pankreasla ilişkisine önemli bir kanıt sunmuşlardır. 1922'de Banting ve Best pankreastan insülin izolasyonu ve insülinin klinik kullanımı ile hastalığın tedavisine

yeni katkılar sundular. Sonraki yıllarda oral uygulanan hipoglisemik ajan denemeleri, 1955’de tolbutamide ve carbutamide ile başarıya ulaşmıştır (16, 18, 19).

2.3. Epidemiyoloji

Yetişkinlerde 2010 yılı için diyabet prevalansı 285 milyon kişiye tekabül eden %6,4’tür ve bu oran ve sayıların 2030 yılında %7,7 ile 439 milyon kişiye ulaşması öngörülmüştür. Diyabetin 2010 ile 2030 yılları arasındaki artış oranı gelişmiş ülkelerde %20 iken gelişmekte olan ülkelerde %69 olarak tahmin edilmektedir (20). Diyabet tüm coğrafyada yaygın olarak görülmesine rağmen sıklığı bazı bölgelerde değişiklik gösterir. Alaska ve Grönland’da çok seyrek görülmesine karşın Pima yerlilerinde, Arizona ve Malta’da çok sık görülür (16).

Türk diyabet epidemiyoloji çalışma grubu (TURDEP) tarafından 2002 yılında yayımlanan verilere göre Türkiye’de diyabet prevalansı %7.2, bozulmuş glukoz toleransı için ise %6.7 olarak belirlenmiştir (21). On iki yıl sonra benzer yöntemle yapılan çalışmada (TURDEP) diyabet prevalansının %90 artarak %13.7 oranına ulaştığı görülmüştür (22).

Dengesiz beslenme, obezite, sık hamilelik, enfeksiyonlar, ameliyat ve anestezi stresi, genetik ve bilinçsiz ilaç kullanımı diyabetin sıklığını arttıran faktörlerdir (16).

2.4. Diyabetin Sınıflandırılması

Diyabetik hastalar sınıflandırılırken o anki mevcut koşullara bağlı olarak değerlendirilir ve hasta sadece bir sınıfa ait olmayabilir (1). Geçen yıllar içinde tanı sınıflandırma konusunda bazı değişiklikler olmuştur. Amerikan Diyabet Birliği (ADA) 1997 yılında kriterler yayınlamış sonrasında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 1999 yılında bu kriterleri küçük değişikliklerle benimsemiştir (15, 23, 24).

Diyabetin etyolojik sınıflamasında dört klinik tip bulunmaktadır. Tip 1 diyabet, tip 2 diyabet ve gestasyonel diyabet primer, diğer spesifik diyabet tipleri ise sekonder olarak bilinir (24).

2.4.1. Tip 1 diyabet

Pankreas beta hücrelerinin hasarı sonucu mutlak insülin eksikliği şeklinde ortaya çıkan diyabet tip 1 diyabet veya insülin gerekliliğine işaret eden insüline bağımlı diyabetes mellitus (IDDM) olarak isimlendirilir. Tip 1 diyabet genelde 30 yaş altında ortaya çıkar ve bu yüzden juvenil diyabetes mellitus da denilmektedir. Okul çağı (6 yaş), puberte dönemi (13 yaş) ve geç adölesan dönemde (20 yaş) görülme sıklığı artar. Diyabete ilişkin semptomlar (polidipsi, poliüri, kilo kaybı, ağız kuruluğu) aniden ortaya çıkar. Hastalar obez değildir, genellikle zayıf ya da normal kilodadır. Ketozis ve asidoza yatkınlıkları yüksektir. DM tanısı almış hastaların %5-10'luk kısmını oluştururlar (17, 24, 25).

İnsülin eksikliği hastaların %90'ında immün kaynaklı, geriye kalanında ise idiyopatik olarak gelişir (24).

Genetik yatkınlığı olan kişilerde stres, virüsler ve toksinler gibi çevresel faktörlerin otoimmüneyi tetiklemesi sonucu pankreas beta hücre hasarı başlar ve tip 1A immün kaynaklı diyabet oluşur (24). Kanda beta hücrelerinin yıkımına neden olan adacık hücresi antikorları (Islet Cell Antibodies, ICA), glutamik asit dekarboksilaza karşı gelişen antikorlar (GAD65) ve tirozinfosfataz antikorları (IA-2 ve IA-2b) gibi otoimmün belirteçlerden bir veya genellikle birden fazlası bulunur (14).

Tip 1 diyabet üzerinde genetik faktörlerin etkisi büyüktür. Tek yumurta ikizlerinde eğer ikizlerden biri hastaysa diğersinin de hasta olma olasılığı %33'tür (17). 6. Kromozomda bulunan insan lökosit antijeninin (HLA) haplotipleri diyabetle ilişkilidir. DQA, DRB ve DRB genleri tip 1 diyabet gelişiminde etkiliyken, HLA-DR/DQ allellerinin diyabete karşı koruyucu rolü vardır (14).

Beta hücreleri hasar görmeden erken dönemde hastalık teşhis edilirse, siklosporin gibi bazı ilaçlarla bağışıklık sisteminin baskılanması sağlanıp, tip 1A diyabet tedavi edilebilmektedir (17). Tip 1A diyabetliler myastenia graves, hashimato tiroiditi, addison, vitiligo, çölyak gibi diğers otoimmün hastalıklara eğilimlidirler (14).

Tip 1 diyabetli bireylerin çok küçük bir kısmında hiçbir otoimmün belirti görülmemesine rağmen insülinopeni ve ketoasidoza yatkınlık görülür. Diyabetin bu

formu idiopatik diyabet veya tip 1B diyabet olarak adlandırılır. Bu tür hastaların çoğu afrika ve asya kökenlidir (14, 15).

2.4.2. Tip 2 diyabet

Tip 2 diyabetli bireylerde insülin direnci ve mutlak bir insülin yokluğundan ziyade göreceli olarak eksiklik görülür. Tüm diyabetli bireylerin yaklaşık %90-95'ini oluşturur (14). Daha önce, genellikle 30 yaş üstü bireylerde görüldüğü için erişkin başlangıçlı diyabet ve genellikle hayatta kalmak için insülin tedavisine ihtiyaçları olmadığı için insülin bağımlı olmayan diyabet (NIDDM) olarak isimlendirilmiştir (14, 24).

Susuzluk hissi ve ağız kuruluğu, sık idrara çıkma, bulanık görme, yavaş iyileşen yaralar, tekrarlayan enfeksiyonlar gibi semptomlar ile tip 1 diyabete benzeyen semptomları olmasına karşın, tip 2 diyabetin başlangıç aşamasındaki yavaş seyri akut metabolik bir hastalık tablosu oluşturmaz. Bu durum hastalığın geç teşhis edilmesine sebebiyet verir (26).

Tip 2 diyabet oluşumunda metabolik ve genetik faktörler ortak rol oynar. Aile de diyabet öyküsü, etnik köken, artan yaşla birlikte gestasyonel diyabet öyküsü, sigara kullanımı, sedanter yaşam, sağlıksız beslenme ve fazla kilo ve obezite tip 2 diyabet riskini artırır (15). Obezite insülin direncini artırır bu tip diyabetli hastaların çoğu obezdir. Obez olmayan hastalarda ise karın bölgesinde artmış yağ dokusu dikkat çekmektedir (14).

Pankreas, beyin, kas dokusu, böbrek ve yağ dokusu gibi birden çok organı etkiler. Karaciğerde artmış glukoz üretimi, iskelet kasında glukozun geri alım mekanizmasında azalma, pankreas alfa hücrelerinde artmış glukagon salgısı, böbreklerde artan glukoz tutulması, yağ hücrelerinde artan lipoliz ve hipotalamik insülin direncindeki artış gibi patofizyolojik mekanizmalar ile organ ve dokuları etkiler (27).

2.5. Diyabetin Komplikasyonları

Diyabet birçok komplikasyonu da beraberinde getirir. Hiperglisemiden kaynaklanan ve sonucu ölüme varabilen diyabetik ketoasidoz ile koma tablosu oluşturan hipoglisemi gibi akut metabolik komplikasyonlar oluşabilir. Uzun

dönemde ise yıkıcı etkileri olan mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar gözlenir (28). Nefropati, nöropati ve retinopati diyabetin özgün mikrovasküler patolojilerini oluşturur.

Makrovasküler komplikasyonlar çoğunlukla ateroskleroz kaynaklı gelişir. Kardiyovasküler patolojiler sonrası miyokard infarktüsü, serebrovasküler patolojiler sonrası inme ve periferik vasküler hastalıklar başlıca makrovasküler komplikasyonları oluşturur. Demans, depresyon, diyabetik ayak ve cinsel problemler diyabetin diğer komplikasyonlarından (28–30).

2.6. Diyabet ve Kalp Kası

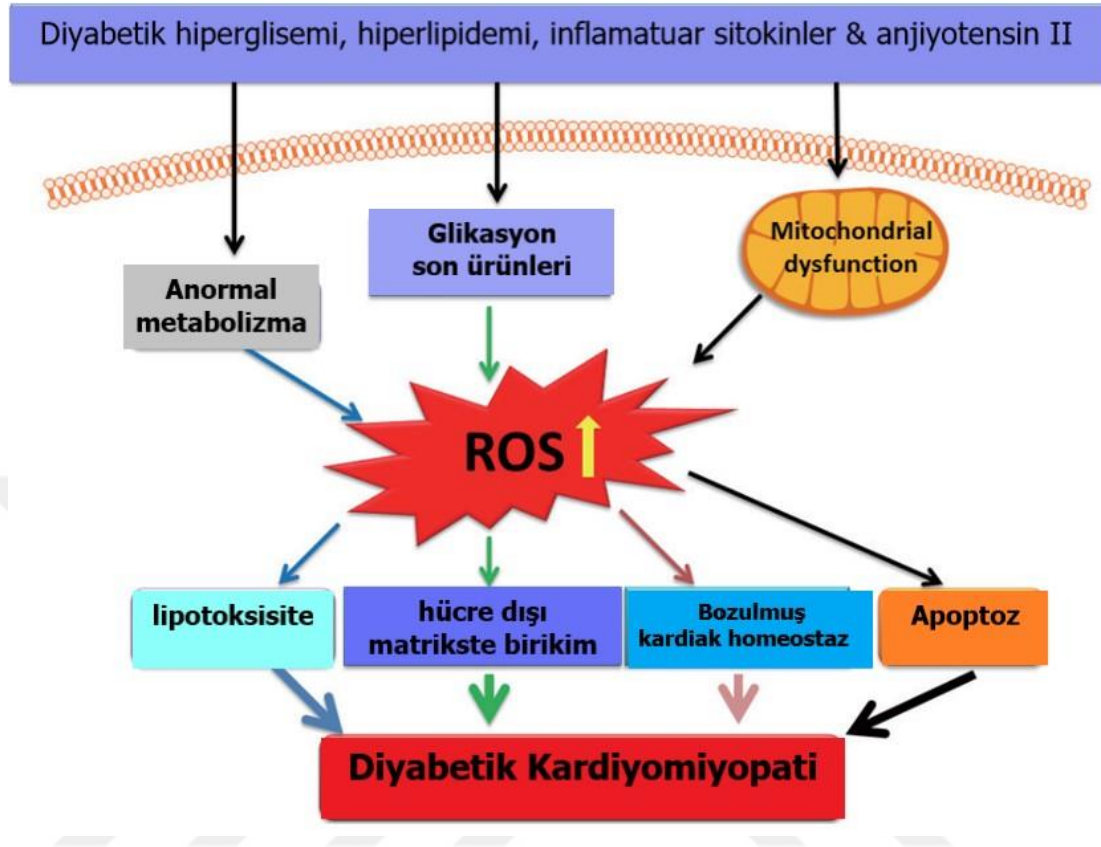
Diyabetik hastalarda diyabetik komplikasyonlar morbitide ve mortaliteye neden olur. Diyabetik kardiyovasküler hastalıklar başlıca ölüm nedenidir (31). Artmış ateroskleroz nedeniyle oluşan koroner arter hastalığı, kardiyak otonom nöropati ve diyabetik kardiyomyopati diyabetin kalp üzerine etkileridir (32).

DM, kalp yetmezliği için önemli bir risk faktörüdür. Yapılan istatistiksel bir çalışmada; sağlıklı kişilere göre kalp yetmezliği riski diyabetli erkeklerde iki kat, diyabetli kadınlarda ise beş kat daha yüksektir (33).

DM, kalp kası üzerinde hipertansiyon ve koroner kalp hastalığından bağımsız olarak, erken dönemde diyastolik gevşeme anomalileri sonrasında klinik kalp yetmezliği tabloları oluşturur (34). Diyabetle ilişkili kalp kası üzerindeki yapısal ve fonksiyonel bozukluklar diyabetik kardiyomyopati olarak isimlendirilir (35). Diyabetik kardiyomyopati, miyositlerde lipit birikimi ve sol ventrikül hipertrofisi sonucu kontraktıl disfonksiyonla karakterize bir hastalıktır. Diyabetik kardiyomyopati için bulunan birçok tanı aracı ve yönetim seçeneğine karşın gelişimini saptamak ve etkin bir şekilde hastalığı önlemek günümüz koşullarında hala zordur (32).

Bozulan hücreler arası kalsiyum dengesi sonucu kardiyak kontraktilitenin bozulması, artan serbest radikallerin üretimi sonrası oluşan mitokondrial disfonksiyon, hücre dışı matrikste biriken ileri glikasyon son ürünleri (AGE) neticesinde diyastolik disfonksiyon ve kalp yetmezliği, anormal hücre metabolizması sonucu zararlı lipid birikimi ve çinko ve bakır gibi gerekli metallerin hemeostazının

bozulması diyabetik kardiyomyopatinin patofizyolojik mekanizmalarını oluşturur (36).



Şekil 1. Diyabetik kardiyomyopatinin oluşum mekanizmaları (36).

Diyabetik kardiyomyopatinin gelişiminde birçok mekanizma olmasına rağmen, hiperglisemi metabolik ve moleküler olayların temelinde önemli bir rol oynar. Diyabetle birlikte görülen metabolik anomaliler; hiperglisemi, inflamasyon, hiperlipidemi ve bunların tetiklediği ROS üretiminin artışı diyabetik kardiyomyopatinin de içinde bulunduğu diyabetik komplikasyonlara sebep olur (32).

2.7. Diyabet ve İskelet Kası

Diyabet özellikle yaşlı insanlarda mobilitenin bozulması, fonksiyonel kısıtlamaların gelişmesi ve bağımsızlığın azalması gibi durumları beraberinde getirir. Bu durumu diyabetin komplikasyonları olan kardiyovasküler hastalıklar, görme bozuklukları, kilo artışı, periferik nöropatiler ve kognitif fonksiyon bozuklukları tetikler. İskelet kasında oluşan kütle ve kuvvet kaybı fonksiyonel kısıtlamalar oluşturur. İnsülin direnci, hiperglisemi, kas içerisine yağ infiltrasyonu ve periferik

nöropatiler diyabetli bireylerde iskelet kası yapısındaki bozuklukların temelini oluşturur (37).

Diyabet ile iskelet kasında meydana gelen bozukluklar diyabetik miyopati olarak isimlendirilir. Diyabetik miyopati oluşumunda hücresel hasar, atrofi ve miyozit olarak üç tip hasar oluşur. Miyofibrillerdeki çap ve uzunluğun azalması ve sarkoplazmadaki vakuol formasyonların eşlik ettiği atrofik değişiklikler ve hücresel lezyonlar görülür (38).



Şekil 2. Diyabetin kas dokusu üzerine etkisi (39).

İskelet kasının çalışması için gerekli olan enerjinin sağlandığı mitokondrideki bozukluklar, kas fonksiyonuna olumsuz etki edecektir. Mitokondriyal disfonksiyon lipid birikimi ve insülin inhibisyonunun tetiklediği hiperlipidemi kaynaklı serbest radikal üretimi artışının bir komplikasyonu olarak ortaya çıkar. Mitokondri ve diğer kaynaklardan üretilen serbest radikaller mitokondri de bozukluklara sebep olur ve bu durum pozitif bir geri besleme döngüsü oluşturarak zararın artmasına sebep olur (40).

Kas kuvveti kaybında, kas kütlesi kaybı ve miyofibril yapısı ve tipindeki değişimler kadar nörolojik faktörlerde rol oynar. Kortikal ve spinal uyarımın azalması, motor ünite deşarj oranının azalması ve sinir iletiminin yavaşlaması kas kuvvetini etkiler. Diyabetli bireylerde istemli kas gücünün azalmasında kas kitlesi kaybı ve nörolojik faktörler etkileşim gösterir (37).

Normal şartlarda vücuttaki glukozun büyük bir kısmı iskelet kasında metabolize edilir. İskelet kası metabolizmasındaki bozukluklar, vücuttaki glukoz

dengeğini ve insülin duyarlılığını olumsuz yönde etkiler (41). Bu yüzden diyabetik miyopatinin komorbidite gelişme oranını doğrudan arttırdığı düşünülmektedir (39).

2.8. Oksidatif Stres

Oksijenin aerobik yaşamın sona ermesinde önemli rol oynamasına karşın yaşamın devamı için mutlak gereklidir. Yaşam için gerekli olan kimyasallar ve ısı enerjisi hidrojen ve karbon molekülleri içeren besinlerin oksidasyonu ile elde edilir. Normal fizyolojik metabolizma içerisinde oksijen reaktif türlerine indirgenir. Bu reaktif türler antioksidan sistem tarafından baskılanmazsa hücre ölümüne kadar giden sonuçlara yol açar (42, 43).

Oksidatif stres; diyabet, kanser gibi birçok hastalık, yaşlanma, ilaç yan etkileri, toksisite ve inflamasyon gibi nedenlerle pro-oksidanlar ile antioksidanlar arasındaki denge bozulup hücre hasarı ve hatta ölümüne sebep olmasını ifade eder (44).

Serbest radikaller bir veya birden fazla eşlenmemiş elektron bulunduran reaktif kimyasal oluşumlardır. Reaktif oksijen, azot ve klor türleri olarak sınıflandırılırlar (43). Oksijen soluduğumuz hava da oksijen molekülü ya da dioksijen olarak bulunur. Fizyolojik süreç içinde elektron vererek reaktif hale geçer ve hidroperoksil, süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil gibi reaktif oksijen türlerini oluşturur. Bu moleküller biyolojik sistemlerde dokulardaki konsantrasyonuna göre oksidatif stres oluşturarak olumsuz etkiler gösterir (42, 45).

2.8.1. Diyabet ve oksidatif stres

Diyabetin hem mikrovasküler hem de makrovasküler komplikasyonlarında oksidatif stres önemli rol oynar. Diyabetle oluşan metabolik anomaliler kan damarlarında, kalp ve iskelet kasında mitokondrial ROS üretimini artırır (46). Artan oksidan üretimi hücre ve plazmada antioksidan aktivitesinin üzerine çıkarak oksidatif stres oluşturur (47). Oksidan üretimindeki artışın yanı sıra yine diyabet kaynaklı antioksidan mekanizmaların azalması komplikasyonlara zemin hazırlar (48). İnsülin direnci, beta hücre fonksiyonlarında bozukluk, bozulmuş glukoz toleransı, inflamasyon, dislipidemi ve mitokondrial fonksiyon bozuklukları diyabette oluşan oksidan ortamın bazı sonuçlarıdır (45, 49).

Hem tip 1 hem de tip 2 diyabetin ortak noktası olan hiperglisemi ROS üretimini artırarak veya redox dengesini bozarak oksidatif stres oluşturur (49). AGE'nin hücre içi artışı, AGE reseptörlerinin ekspresyonunun artması, protein kinaz C (PKC) izoformlarının aktivasyonunun artması, artan glukoz seviyesinin polyol yolağının aktivitesini artırması ve mitokondrial elektron transfer zincirinde (ETZ) artmış süperoksit üretimi hipergliseminin doku hasar mekanizmalarıdır. Bu mekanizmaların hepsinin temelinde mitokondrial ROS artışı vardır (46, 49).

2.8.2. Polyol yolağı

Polyol yolağında ROS üretiminin artışı ile ilişkili iki enzim vardır. İlki aldoketo redüktaz protein ailesinden olan aldoz redüktaz enzimi glukoz metabolizmasının hız sınırlayıcı olan ilk basamağını katalizler. Aldoz redüktaz glukozu substrat olarak kullanarak nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) kofaktörlüğünde sorbitole dönüştürür. İkinci ilişkili enzim sorbitol dehidrogenaz sorbitolü nikotinamid adenin dinükleotidin yükseltgenmiş hali (NAD⁺) kofaktörlüğünde fruktoza dönüştürür (46, 48) (Şekil 3).



Şekil 3. Polyol yolağı (50).

Aldoz redüktaz insülininden bağımsız GLUT taşıyıcıları bulunduran lens, retina, böbrek glomerülleri ve periferik sinir gibi dokularda bulunur (51). Buna bağlı olarak hiperglisemi hücre içi glukoz konsantrasyonunu da yükseltir (46). Normal koşullarda aldoz redüktaz enziminin glukoz afinitesi düşüktür ve çok küçük oranda glukoz bu yolla sorbitole metabolize edilir. Hiperglisemik ortamda enzimin aktivitesi artarak bu oran %30-35' e kadar çıkar ve sonucunda sorbitol üretimi artarken NADPH azalır. NADPH azalması üretiminde rol oynadığı, hücre içi önemli bir antioksidan olan GSH'ı da azaltır. Sorbitolün fruktoza dönüşümündeki artış nikotinamid adenin dinükleotidin yükselgenmiş haline oranını (NADH / NAD⁺)

arttırarak gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz enzimini inhibe eder ve PKC aktivasyonunu arttırır (49).

Polyol yolağındaki artış redoks dengesini bozarak dolaylı olarak ROS üretiminde artış meydana getirir ve oksidatif stres oluşturur (49).

2.8.3. Artmış ileri glikasyon son ürünleri (AGE)

Hipergliseminin tetiklediğı bir diğer oksidatif stres mekanizması AGE artışı ile gerçekleşir. AGE oluşumu indirgenmiş şekerlerin aldehit veya keton gruplarıyla proteinlerin serbest amino grupları arasındaki nonenzimatik tepkimeyle başlar. Aralarında shiff bazı oluşturan gruplar amadori ürünlerini ve sonunda AGE'yi oluşturur (49, 51).

AGE üretiminin artışı üç temel mekanizma ile hücre hasarını tetikler. İlki hücre içi proteinleri modifiye ederek fonksiyonlarını değıştirir. İkinci mekanizma AGE tarafından modifiye edilen hücre dışı matriks komponentleri ile diğer matriks bileşenlerinin ve hücre yüzeyindeki matriks reseptörlerinin anormal şekilde etkileşimi ile oluşur. Üçüncü mekanizma ise AGE tarafından modifiye edilen plazma proteinlerinin makrofaj, vasküler düz kas ve endotel gibi hücrelerde bulunan AGE reseptörlerine bağlanmasıyla oluşur (46).

AGE reseptörlerinin uyarılması; NADPH oksidasyonu ve sonrasında redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ve inflamatuvar mediatörlerin salınımını ile ROS üretimini arttırarak ateroskleroz dahil diyabet komplikasyonlarında rol oynar (49, 52).

2.8.4. Protein kinaz C (PKC) aktivasyonunun artması

PKC ailesi ikincil lipid habercisi olan diaçilgliserol (DAG) tarafından aktive edilen birçok PKC izoformunu içinde barındırır. Hiperglisemik koşullarda dihidroksiaseton miktarı artarak gliserol-3-fosfatı indirger ve DAG novo sentezi oluşur. DAG yükselmesiyle aktive olan PKC, dolaylı yoldan AGE ve AGE reseptörleri etkileşimi ve artmış polyol yolu tarafından da aktive olur. Endotel hücrelerinin kontraktilesi ve geçirgenliğindeki, hücre dışı matriks protein sentezindeki ve kan akışındaki bozuklukların PKC aktivasyonu ile ilişkisi vardır (42, 53).

PKC aktivasyonu ile birlikte birçok biyokimyasal etki meydana gelir. PKC aktivasyonu, nitrik oksit (NO) sentezini endotel nitrik oksit sentazı (eNOS) baskılayarak inhibe eder, endotelin-1'i ise aktive eder. Vazodilatatör NO inhibisyonu ve vazokonstriktör endotelin-1 aktivasyonu ile damarlardaki kan akışı bozulur. Vasküler endotel growth faktör (VEGF) salınımı artar, kan akımında ve damar geçirgenliğinde bozukluklar meydana gelir. Tip 4 kollajen, transforming growth faktör beta-1 (TGF- β 1) ve fibronektin salınımını artırarak NO inhibisyonu ile ilişkili matriks protein birikimine sebep olur. Nükleer faktör kappa B (NF- κ B) ve NADPH oksidaz aktivasyonu artarak oksidatif stres ortamı yaratır. Meydana gelen bu değişikliklerin tümü diyabetik komplikasyonlara zemin hazırlar (46, 54).

2.8.5. Glukozun otooksidasyonu

Glukozun oksidasyonu hücre içinde glikolizle başlar. Glikoliz sonucunda pirüvat ve NADH üretilir. Pirüvat krebs döngüsü içine girer, ETZ ve adenosin trifosfat (ATP) üretimi için gerekli NADH ve flavin adenin dinükleotit (FADH) oluşur. NADH ve FADH elektron taşıma zincirinde indirgenir. Oluşan enerji mitokondrial proton hareketleri ile membranın içi ile dışı arasında voltaj farkı oluşturur. Bu enerji adenosin difosfata (ADP) fosfat bağlamada kullanılarak ATP elde edilir (49).

Hücre içi glukoz oranının artmasıyla glukoz metabolizması da artarak FADH₂ ve NADH üretimini tetikler. ETZ de yakıt olarak kullanılan NADH ve FADH mitokondrial proton farkını yükseltir. Voltaj belli eşiğe ulaştığında elektronlar oksijene transfer olarak süperoksit radikalleri oluşur. Kompleks 1 deki NADH dehidrogenaz ve kompleks 2 ve 3 ara yüzeyi süperoksit üretimi ana merkezleridir (48).

Mitokondrial süperoksit üretimi oksidatif stres oluşturur. Substrat taşınmasında bozukluklar, glukoz, yağ asitleri ve aminoasitler gibi enerji kaynaklarının kullanım oranlarının değişmesi, ETZ protein fonksiyonlarının değişmesi gibi enerji üretimindeki diğer diyabetik anormalliklerle birlikte oksidatif stres komplikasyonların temel sebeplerindedir (28).

2.8.6. Lipid peroksidasyonu ve MDA üretimi

Diyabet vücudumuzda bulunan lipitleri peroksidasyona daha duyarlı hale getirir. Çoklu doymamış yağ asitleri yapısındaki çoklu bağlar nedeniyle serbest radikallerle çok kolay reaksiyona girer. Bu reaksiyonlarda birincil olarak reaktif hidroperoksiller oluşur. İkincil olarak malondialdehit (MDA), 4-hidroksinonenal, izoprostanlar oluşur (55).

Lipitler hücre zarının bütünlüğünden sorumludur. Lipit peroksidasyonu hücre zarı bütünlüğünde, yapısında ve fonksiyonlarında bozukluklar meydana getirir. Ayrıca yüksek oranda reaktif bileşikler olan hidroperoksiller yeni serbest radikaller üretebilir (56).

Lipit peroksidasyonu sonucu oluşan MDA, tiyobarbitürik asitle reaksiyona girerek lipit peroksitlerinin ölçümünde kullanılır (57).

2.9. Antioksidan Mekanizmalar

Lipit, protein, karbonhidrat ve DNA oksidasyonunu, serbest radikallerle güvenli bir şekilde reaksiyona girerek geciktiren veya engelleyen maddeler antioksidan olarak nitelendirilir (58). Oksidanları enzimler aracılığıyla daha zayıf moleküllere dönüştürerek süpürme etkisi, oksidanlara hidrojen aktararak baskılama etkisi, onarım etkisi ve ağır metalleri bağlayarak fonksiyonlarını engelleyen zincir kırıcı etki antioksidanların savunma mekanizmalarını oluşturur (51).

Antioksidanlar enzimler gibi endojen kaynaklı veya diyetle sağlanan flavonoid, karotenoid, vitaminler ve mineraller gibi ekzojen kaynaklı olabilir. Antioksidanlar; glutatyon redüktaz, katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon S-transferaz ve TRX gibi enzimatik oksidanlar, E vitamini, C vitamini ve GSH gibi enzimatik olmayan oksidanlar olarak iki gruba ayrılabilir (59, 60).

Diyabetle birlikte gelişen komplikasyonların önlenmesinde antioksidanların rolü büyüktür. Serum antioksidan miktarı yüksek olan bireylerde tip 2 diyabet riskinin azaldığı görülmüştür. SOD, GSH ve askorbat gibi antioksidan seviyelerinin düşüklüğü diyabette oldukça sık görülmektedir. Diyabetli bireylerin nötrofil ve monositlerinde indirgenmiş GSH seviyelerinin düşük olduğu tespit edilmiştir.

Antioksidan içeriği yüksek olan bitkilerin oksidatif stres sonucu oluşan bozukluklarda etkili olduğu görülmüştür (58).

2.9.1. Glutatyon (GSH)

GSH büyük bir kısmı indirgenmiş halde olmak üzere, endojen antioksidanlar arasında vücut içerisinde yüksek konsantrasyona sahip (1–10 Mm) bir antioksidandır (61). GSH içinde sistein, glutamat ve glisin bulunduran bir tripeptittir. Glutamat ve glisin hücre içinde göreceli olarak yüksek konsantrasyona sahip olduğu için sistein GSH sentezinde sınırlayıcı bir roldedir (62). GSH'ın indirgenmiş formda olması pentoz fosfat yolunda üretilen NADPH'a ve glutatyon redüktaz enzimine bağlıdır (60).

GSH'ın en çok sentezlendiği yer karaciğerdir. % 40'ı safra ile atılan GSH'ın barsakta lipit peroksidasyonuna engel olduğu ve ksenebiyotiklere karşı vücudu koruduğu düşünülmektedir (63).

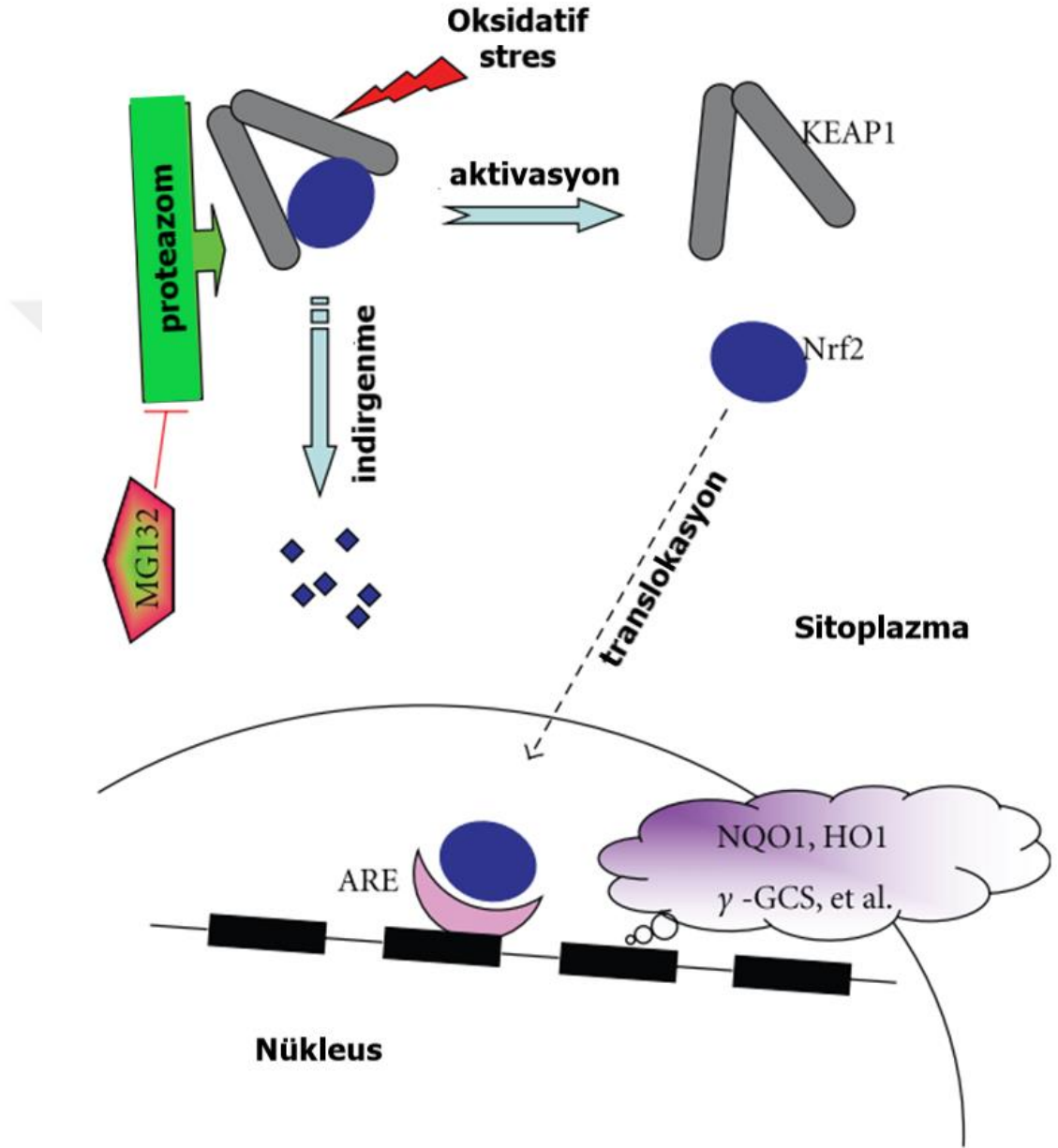
GSH, singlet oksijen ve ROS türleriyle reaksiyona girerek bu zararlı molekülleri temizler ve antioksidan sisteme doğrudan katkı sağlar. Doğrudan serbest radikalleri temizlemesinin yanı sıra, redüktaz ve peroksidaz antioksidan enzimlere substrat olarak etki gösterir (63). GSH tarafından indirgenen dehidroaskorbit asit, α -tokoferolsil radikalini α -tokoferole dönüştürür. Bu α -tokoferol çoklu doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girerek hücre membranını stabilize eder ve oksidatif hasara karşı korur (61). Sağlıklı kişilere göre diyabette GSH seviyelerinin oldukça düşük olduğu görülmüştür (51).

2.9.2. Nuklear faktör eritroit 2- related faktör 2 (NRF2)

NRF2 cap'n'collar ailesinin bir üyesi olup hücrel detoksifikasyon yanıtının ve redoks durumunun düzenlenmesinden sorumlu transkripsiyon faktörüdür. Fizyolojik koşullarda NRF2 inhibitörü olan KEAP-1' e bağlı halde bulunur (64). NRF2, KEAP-1 aracılığıyla ubiquitin proteazom tarafından indirgenmiş haldedir (65).

Oksidatif stres ve elektrofilik bileşiklerin etkileri ile NRF2, KEAP-1 ile etkileşiminden ayrılır. Serbest kalan ve aktifleşen NRF2 nükleusa transloke olur ve sMaf proteinleri yardımıyla antioksidan duyarlı genlere (ARE) bağlanır (66) (Şekil 4). Bu durum faz 2 detoksifikasyon ve antioksidan enzimlerin transkripsiyonunda

artıŖa yol açar. NRF2; HO-1, thioredoksin redüktaz, glutatyon-S-transferaz ve NADPH kinon oksidoredüktaz (NQO1) gibi antioksidan içeriklerin, SOD ve CAT gibi antioksidan enzimlerin ve enzim olmayan süpürücü antioksidan GSH'ın ekspresyonunda önemli rol oynar (36).



Ŗekil 4. NRF2, KEAP-1 kompleksi (64).

2.9.3. Tioredoksin (TRX)

Prokaryotik ve ökaryotik hücreler serbest radikaller tarafından üretilen protein disülfid bağlarının indirgenmesi için TRX sistemi ve GSH sistemi olmak üzere iki farklı antioksidan sisteme sahiptir (67).

TRX, DNA replikasyonu ve onarımı ile ilişkili ribonükleotid redüktazın indirgen bir substratı olarak keşfedildi. Ayrıca TRX, TRX sistemini oluşturan elemanlardan bir tanesidir. TRX sistemi; NADPH, TRX ve TRX redüktazı içeren, birçok enzime elektron sağlayan, DNA sentezi ve oksidatif strese karşı savunma mekanizmalarında kritik rolü bulunan disülfid redüktaz bir sistemdir (68).

TRX sistem serbest radikallerin giderilmesi için tiyol bağımlı peroksidazlara elektron sağlar. Birçok redoks duyarlı transkripsiyon faktörünün aktivitesini düzenleyerek DNA ve protein onarımına dahil olarak antioksidan aktiviteye katkı sağlar (68).

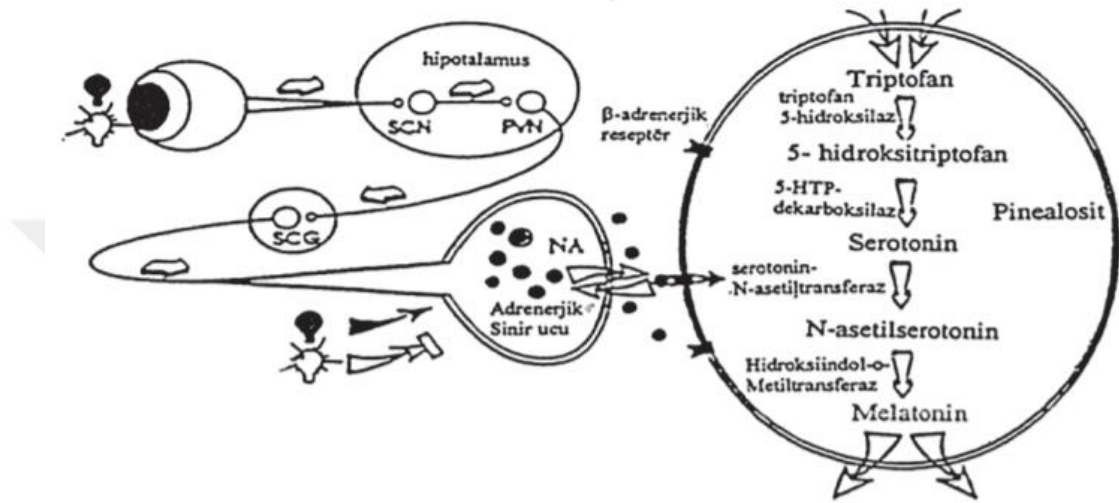
2.10. Melatonin

Melatonin ilk olarak izole edilmiş inek epifiz bezinde tespit edilmiştir. Amfibi cilt hücrelerindeki melanin granüllerinin çekirdeğin etrafında toplanmasını sağlayarak cilt rengini açtığı görülmüş ve serotonin kaynaklı olduğu da göz önüne alınarak melatonin denilmiştir. Memeli melanozomları, amfibilerin aksine kalıcı olarak dağılmıştır ve melatoninin pigment değişimi üzerine etkisi memelilerde sınırlıdır (69).

Melatoninin omurgalılardaki sirkadyen ritmi belirleme rolü onu benzersiz yapmaktadır. Gün içinde aydınlık zamanlarda düşük seviyelerde salgılanırken karanlıkta salgısı en yüksek seviyededir. Bu özelliği iç organları dış çevredeki foto-periyodik değişiklikler hakkında bilgilendirmek için onu uygun bir sinyal molekülü yapmaktadır (69).

Melatonin epifiz bezinde dış çevredeki ışık kontrolünde sentezlenir. Melatonin sentezinin öncüsü esansiyel amino asit triptofan, serotonine dönüştürülür. Arilakilamin N-transferaz tarafından asetillenir ve hız sınırlayıcı bir basamak olan hidroksiindol-O-metil transferaz varlığında melatonine dönüştürülür (70).

Retinadan algılanan ışık sonrası sinirsel iletiler, suprakiazmatik nükleusa ve diğer hipotalamik yapılara ulaşır. Sonrasında superior servikal gangliyona ulaşır. Işıksız ortamda postgangliyonik sempatik liflerden salınan noradrenalin beta 1 reseptörlerine bağlanır. Sonucunda depolardaki serotonin ve arilakilamin N-transferaz enzimi hücre içine salınır ve epifiz bezindeki bu biyokimyasal değişiklikler melatonin sentezini artırır (71).



Şekil 5. Melatonin sentezi ve ışığın etkisi (71).

Melatoninin yapılan çalışmalar sonucu; antiinflamatuvar, antioksidan, antionkostatik ve sirkadyen ritim düzenleme gibi fonksiyonları olduğu belirlenmiştir. Melatonin antioksidan etkilerini doğrudan serbest radikallerin detoksifikasyonu yoluyla ya da antioksidan enzimleri uyarırken prooksidan enzimleri baskılayarak gösterir (72).

Melatonin; hidroksil radikali, süperoksit anyonu ve nitrik oksit gibi hem reaktif oksijen türlerini hem de reaktif nitrojen türlerini süpürebilir. Melatonin oluşturduğu N1-asetil-N2-formil-5-metoksinakinamin (AFMK) ve N1-asetil-5-metoksikinuramin (AMK) gibi ikincil ve üçüncül metabolitlerle etki alanını genişletir. AMK mitokondride prekürsörün kompleks 1'i tetikleme yeteneğini korur, elektron sızıntısını azaltır ve ATP üretimini artırır (73).

Melatonin, fenton ve haber-weiss reaksiyonlarında geçiş metallerini şelatlayarak hidroksil radikalının üretimini ve dolayısıyla oksidatif stresi azaltır (72). Lipofilik yapıda olması sebebiyle kan-beyin bariyerini geçebilir ve hücredeki tüm

organellere ulaşabilir. Bu yapısı melatonine geniş bir etki alanı sağlar. En güçlü lipofilik antioksidan olarak kabul edilen E vitamininden iki kat daha etkili olduğu gösterilmiştir (51, 73).

DeneySEL çalışmalarda; melatonin hormonunun serbest radikalleri nötrleyerek redoks dengesine katkı sağladığı ve diyabet komplikasyonlarını azalttığı gösterilmiştir (70).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

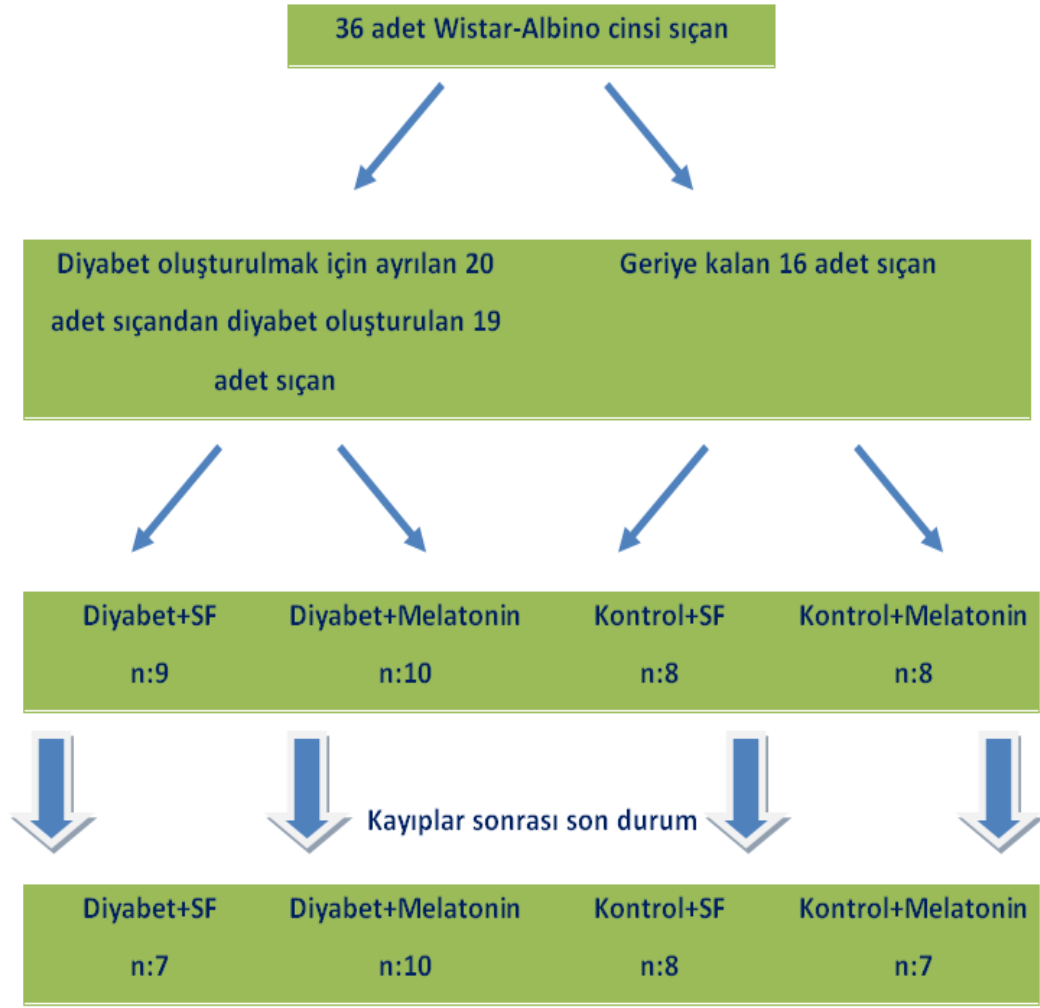
Deneysel diyabet oluşturulan sıçanlarda kalp ve iskelet kası nrf2 yapımı ve oksidatif stres üzerine melatoninin etkisinin incelenmesi adlı çalışmamız, Bülent Ecevit Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim dalı laboratuvarları ve Bülent Ecevit Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezinde 9.10.2017-7.06.2018 tarihleri arasında yapıldı. Çalışmamıza öncesinde Bülent Ecevit Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onay verildi (Ek-1). Çalışmamız 2016-26259946-02 numaralı proje olarak Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.

3.1. Deney Hayvanları

Çalışmamızda Bülent Ecevit Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezinde üretilen 36 adet Wistar-Albino cinsi erkek sıçanlar kullanıldı. Ağırlıkları 275-470 gram olan sıçanlar; 20-22 °C derece sıcaklıkta, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık döngüsünde, sıçanların rahat hareket edebileceği büyüklükte tel kafesler içinde, gruplara ayrılmış ve tüm gruplar aynı koşullarda olacak şekilde barındırıldı. Tüm denekler deney süresi boyunca günlük çeşme suyu ve %21 ham protein içeren pelet yemlerle serbest erişimi olacak şekilde uygun laboratuvar koşulları altında tutuldu.

3.2. Grupların Oluşturulması

Diyabet veya diyabete bağlı komplikasyonlar yüzünden denek kaybedilebileceği ihtimalinden dolayı diyabet gruplarına kontrol gruplarına göre 2 denek fazla olacak şekilde oluşturuldu. Deney hayvanlarından rastgele seçilen 20 tanesi deneysel diyabet oluşturmak için ayrıldı. Geriye kalan 16 tane deney hayvanı; 8 adet kontrol+serum fizyolojik (SF), 8 adet kontrol+melatonin olmak üzere rastgele ikiye ayrılarak isimlendirildi. Deneysel diyabet modeli oluşturulabilen 19 hayvan da 9 adet diyabet+SF, 10 adet diyabet+melatonin olmak üzere iki gruba ayrılarak isimlendirildi (Şekil 6).



Şekil 6. Deney gruplarının oluşturulması

Diyabet modeli oluşturmak için streptozotosin [STZ, (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA)], 0.1 M sitrat tamponu (ph=4.5) içinde hazırlandı. Rastgele seçilen 20 adet sıçana 60 mg/kg her birine tek doz olacak şekilde İP olarak uygulandı. Diğer sıçanlara aynı miktarda sitrat tamponu İP olarak uygulandı (7).

STZ uygulamasından sonra akut dönemde oluşabilecek hipoglisemiye engellemek için ilk 48 saat için kafes suluklarına %5 glukoz çözeltisi konuldu. STZ enjeksiyonundan 72 saat sonra kuyruk venlerinden alınan kan örnekleri ile glukometre (lifecheck, Almanya) üzerinden kan şekeri düzeylerine bakıldı. Kan şekeri düzeyi 250 mg/dl'nin üzerindeki sıçanlar diyabet olarak kabul edildi. STZ enjeksiyonu yapılan 20 adet sıçandan 19 denekte diyabet oluşturulmuş 1 tanesinde oluşturulamamıştır.

Melatonin (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA), İP enjeksiyon için %1 ethanol ve %0.9 NaCl içinde çözdürüldü ve stok solüsyon hazırlandı. Kontrol+melatonin (n=7) ve diyabet+melatonin (n=10) gruplarındaki deneklere 10 mg/kg olmak üzere günlük intraperitoneal (İP) olarak enjekte edildi (7). Diğer deneklere aynı stresi yaşatmak için İP olarak aynı miktarda SF enjeksiyonu yapıldı.

Kontrol+SF uygulanan grup (n=8): diyabet modeli için ayrılan sıçanlardan geriye kalan, İP olarak sitrat tamponu enjeksiyonu yapılan 16 denek arasından rastgele seçildi. İP olarak SF uygulamasına 4 hafta boyunca devam edildi.

Kontrol+melatonin uygulaması yapılan grup (n=7): diyabet oluşturmak için ayrılan deneklerden geriye kalan 16 denek arasından rastgele 8 tanesi seçilerek oluşturuldu. İP olarak melatonin uygulaması 4 hafta boyunca yapıldı. 4 haftalık süreçte bir tane denek öldüğü için gruptaki sıçan sayısı 7'e düştü.

Diyabet+SF uygulanan grup (n=7): deneysel diyabet oluşturulan 19 sıçandan rastgele 9 tanesi seçilerek oluşturuldu. İP olarak melatonin uygulaması 4 hafta boyunca yapıldı. 4 haftalık süreçte 2 sıçan yaşamını yitirerek gruptaki denek sayısını 7'e düşürdü.

Diyabet+melatonin uygulaması yapılan grup (n=10): deneysel diyabet oluşturulan 19 sıçan arasından rastgele 10 tanesi seçilerek oluşturuldu. İP olarak melatonin uygulaması 4 hafta boyunca yapıldı.

Tüm gruplardaki deneklerin kan şekeri düzeyleri kuyruk venlerinden alınan örnekler ile haftalık olarak takip edildi. İP enjeksiyon öncesi denekler tartıya çıkarılarak, vücut ağırlıkları günlük takip edildi.

3.3. Doku Örneklerinin Alınması

Tüm sıçanlar, 4 haftalık enjeksiyon uygulamaları bitiminden sonra yüksek doz anestezi (sodyum tiyopental) enjeksiyonuyla feda edildi. Soleus kası izole edilerek çıkarıldı. Kalp dokusu çıkarıldı ve kan dokusundan ayrıldı. Alınan örnekler, -80 °C'de iki eşit parçaya ayrılmış halde çalışma yapılacak güne kadar saklandı.

3.4. MDA ve GSH Ölçümü

Oksidatif stresin sonucu lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA miktarının ölçüldüğü bu yöntemde, alınan soleus kası ve kalp kası dokuları %10'luk triklorasetik asit eklenerek doku homojenizatöründe homojenize edildi. Homojenize edilen dokular 3000 devirde 15 dk santrifüj edildi. Elde edilen süpernatanın üzerine %0.67'lik tiyobarbitürik asit ve %1' lik butilhidroksitoluen eklenerek tüplerin ağzı kapatıldı ve 15 dk 100°C'de kaynatıldı. Elde edilen sıvı spektrofotometrede 535 nm absorbansta okunarak MDA miktarı nmol/g doku olarak bulundu (74).

Endojen bir antioksidan olan GSH miktarı modifiye Ellman metoduna göre çalışıldı (75). Hazırlanmış olan süpernatalara 1000 µl 0.3 M disodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄) eklendi. Sonrasında 125 µl Ellman reaktifi eklenerek 5-10 dk sonra, spektrofotometrede 412 nm absorbansta okunarak µmol/g doku olarak GSH düzeyi belirlenmiştir.

3.5. NRF2 ve TRX Düzeylerinin Belirlenmesi

Doku örnekleri hazırlanan fosfat tampon solüsyonu (PBS) eklenerek doku homojenizatöründe homojenize edildikten sonra 3000 rpm ve 2-8 °C'de 20 dk santrifüj edildi. Elde edilen süpernatana, enzyme-linked immün sorbent assay (ELISA) yöntemi ile NRF2 ve TRX düzeylerinin belirlenmesi için analiz edildi.

İskelet kası ve kalp kası NRF2 düzeyleri, The nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) ELISA kiti (Sun Red Biotechnology, Çin, katalog no: 201-11-5375) kullanılarak gerçekleştirildi. İskelet ve kalp kası TRX düzeyleri ise thioredoxin (TRX) ELISA kiti (Sun Red Biotechnology, Çin, katalog no: 201-11-0445) kullanılarak gerçekleştirildi.

Çalışma ELISA kit klavuzundaki esaslar temel alınarak yapıldı. Hazırlanan plate Chromate 4300 ELISA cihazında (Awareness Technology, USA) 450 nm dalga boyunda okutuldu.

3.6. İstatiksel Analiz

Elde edilen veriler ortalama değer±standart hata olarak verilmiştir. Verilerin değerlendirilmesi SPSS 22.0 istatistik programı (IBM, USA) kullanılmıştır. Gruplar

arası farklılıkların değerlendirilmesinde Kruskal Wallis testi, grup içindeki farklılıkların değerlendirilmesinde ise Dunn testi kullanılarak karşılaştırma yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık, p değerinin 0.05'ten küçük olduğu değerler için kabul edilmiştir.



4. BULGULAR

4.1. Kan Glukoz Ölçümleri

STZ enjeksiyonu yapılan diyabetli gruplarda, enjeksiyon öncesi ve sonrası yapılan ölçümlerde kan glukoz seviyeleri beklenildiği gibi yüksek bulundu. Diyabetli gruplardaki enjeksiyon sonrası kan glukozundaki artış, kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Kan glukoz ölçümleri Tablo 1’de gösterildi.

Tablo 1. STZ Enjeksiyonu Öncesi, Sonrası 3. ve 28. Günü Kuyruk Venlerinden Alınan Örneklerdeki Ortalama Glukoz Değerleri

Gruplar	Kan glukoz ölçümleri (mg/dl)		
	STZ öncesi	STZ sonrası 3. gün	28. gün
Kontrol+SF grubu	92.62±2.09	89.37±3.12	99.25±9.79
Kontrol+Melatonin grubu	86.62±5.70	95.75±1.91	111.14±7.37
Diyabet+SF grubu	90.87±4.26	482.00±33.28*	461.85±49.64*
Diyabet+Melatonin grubu	90.21±2.08	451.50±28.49*	523.20±50.65*

*Kontrol+SF ve kontrol+melatonin grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir (p<0.05).

4.2. Ağırlık Takipleri

Deney başlangıcındaki ağırlık ölçümlerinde, tüm gruplardaki ortalama ağırlıklar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Buna rağmen STZ enjeksiyonu sonrası diyabetli gruplarda, kontrol gruplarına göre ortalama ağırlıklarda istatistiksel olarak anlamlı seviyede azalma görülmüştür. Deney gruplarının ağırlık ortalamaları Tablo 2’de gösterilmiştir.

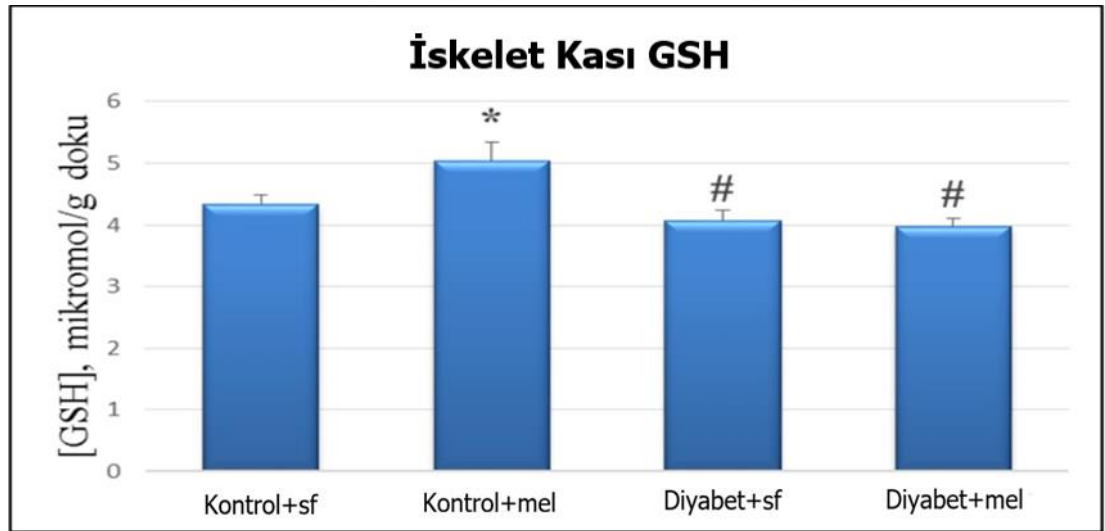
Tablo 2. STZ Enjeksiyonu Öncesi, Deneyin 1. Haftası ve 4. Haftası Sıçanların Ölçülen Ortalama Ağırlık Değerleri

Gruplar	Vücut ağırlığı(g)		
	STZ öncesi	1.hafta	4. hafta
Kontrol+SF grubu	371.00±6.96	399.26±12.18	413.35±13.57
Kontrol+Melatonin grubu	374.20±9.14	404.78±19.58	407.80±25.20
Diyabet+SF grubu	354.90±13.54	329.98±21.23*	325.00±27.61*
Diyabet+Melatonin grubu	350.6±8.49	328.60±16.76*	311.76±24.27*

*Kontrol+SF ve kontrol+melatonin grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir (p<0.05).

4.3. İskelet Kası GSH Düzeyleri

Kontrol+melatonin grubundaki iskelet kas dokularından alınan örneklerdeki GSH düzeyleri, melatonin uygulanmayan kontrol+SF grubundaki değerlere göre anlamlı seviyede yüksek bulunmuştur (p<0.05). DM olan diyabet+melatonin ve diyabet+SF gruplarındaki GSH düzeyleri, kontrol+melatonin grubundaki değerlere göre anlamlı seviyede düşük bulunmuştur (p<0.01). Diyabet+melatonin ve diyabet+SF grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (Şekil 7).

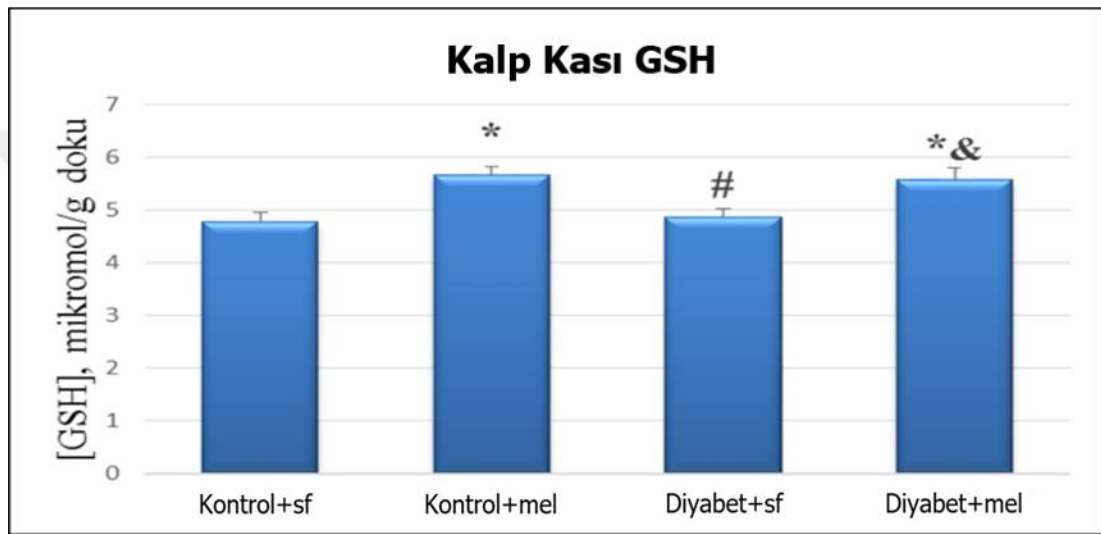


*Kontrol+SF grubuna göre (p<0.05), # Kontrol+melatonin grubuna göre (p<0.01) anlamlı farklılığı göstermektedir.

Şekil 7. İskelet kasından alınan doku örneklerindeki GSH düzeyleri ortalama değer ve standart hata olarak gösterilmiştir.

4.4. Kalp Kası GSH Düzeyleri

Melatonin uygulanan kontrol+melatonin grubundaki kalp kasından alınan doku örneklerindeki ortalama GSH düzeyleri, kontrol+SF grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.01$). Melatonin uygulanan diyabet+melatonin grubu GSH düzeyleri, diyabet+SF grubuna göre anlamlı seviyede yüksek görülmüştür ($p<0.05$). DM olan diyabet+SF grubu GSH düzeyleri, kontrol+melatonin grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0.01$) (Şekil 8).

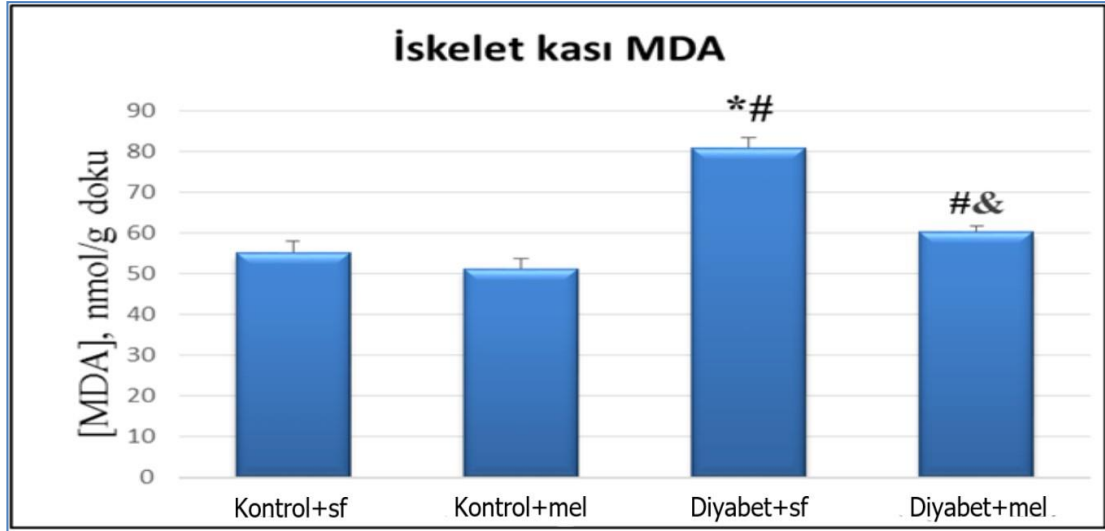


*Kontrol+SF grubuna göre ($p<0.01$), & Diyabet+SF grubuna göre ($p<0.05$), # Kontrol+melatonin grubuna göre ($p<0.01$) anlamlı farklılığı göstermektedir.

Şekil 8. Deney gruplarındaki kalp kas dokusu örneklerinde bulunan GSH düzeyleri ortalama değer ve standart hataları gösterilmiştir.

4.5. İskelet kası MDA düzeyleri

İskelet kası dokusundan alınan örneklerden yapılan analiz sonucu, DM olan diyabet+SF grubundaki ortalama MDA düzeyi, DM olmayan kontrol gruplarına göre anlamlı seviyede yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). Ayrıca melatonin uygulanan diyabet+melatonin grubu ortalama MDA düzeyi, diyabet+SF grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0.001$). Diyabet+melatonin grubu değerleri ise kontrol+melatonin grubuna göre anlamlı derecede yüksektir ($p<0.05$) (Şekil 9).

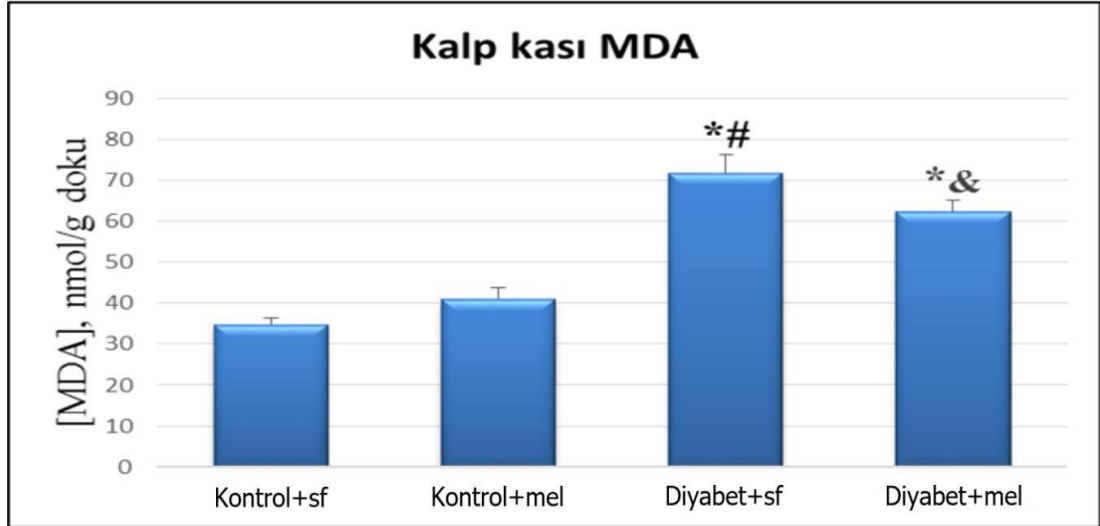


* Kontrol+SF grubuna göre ($p<0.05$), & Diyabet+SF grubuna göre ($p<0.05$), # Kontrol+melatonin grubuna göre ($p<0.05$) anlamlı farklılığı göstermektedir.

Şekil 9. İskelet kasından alınan doku örneklerinin MDA düzeyleri ortalama değer ve standart hata olarak gösterilmiştir.

4.6. Kalp Kası MDA Değerleri

Kalp kası dokusundan alınan örneklerden yapılan analiz sonucu, kontrol+SF grubu ortalama MDA düzeyine göre, DM oluşturulan gruplar diyabet+melatonin ve diyabet+SF grupları ortalama MDA düzeyleri $p<0.001$ anlamlılık düzeyinde yüksek bulunmuştur. DM oluşturulan diyabet+melatonin grubu ortalama MDA değerleri, kontrol+melatonin grubu değerlerine göre anlamlılık düzeyinde yüksek olduğu görülmüştür ($p<0.001$). Diyabet+melatonin grubu MDA düzeyleri ise melatonin uygulanmayan diyabet+SF grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0.05$) (Şekil 10). Yani melatonin uygulaması ile MDA düzeylerinde azalma gözlenmiştir.

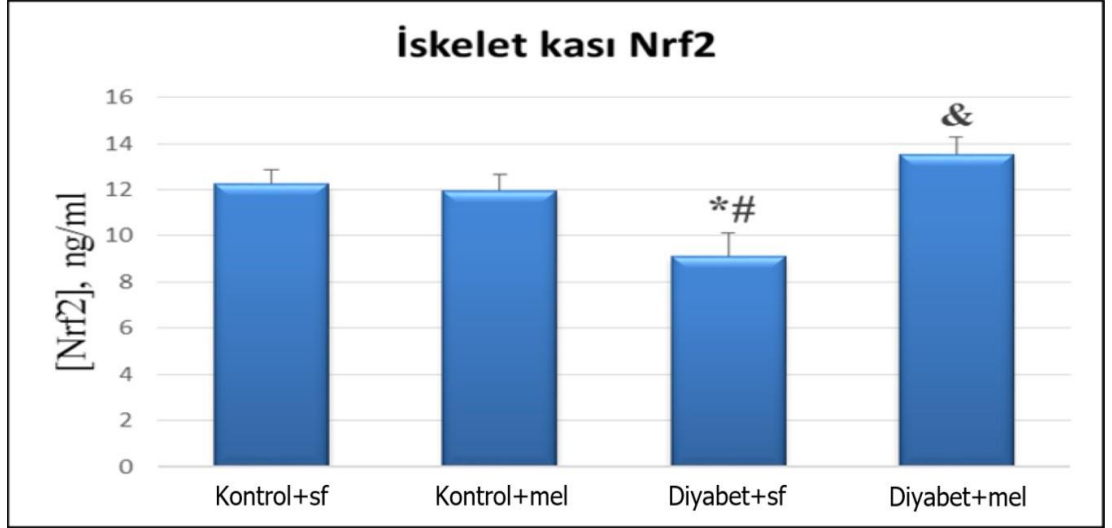


* Kontrol+SF grubuna göre ($p < 0.001$), & Diyabet+SF grubuna göre ($p < 0.05$), # Kontrol+melatonin grubuna göre ($p < 0.001$) anlamlı farklılığı göstermektedir.

Şekil 10. Kalp kasından alınan doku örneklerindeki MDA değerleri ortalama değer ve standart hata olarak gösterilmiştir.

4.7. İskelet Kası NRF2 Sonuçları

İskelet kası dokusundan alınan örneklerden yapılan analiz sonucu; diyabet+SF grubu NRF2 düzeyi, DM olmayan kontrol+SF grubuna ve kontrol+melatonin grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p < 0.05$). DM oluşturulan gruplarda ise; melatonin uygulanan diyabet+melatonin grubu ortalama NRF2 değerleri, melatonin uygulanmayan diyabet+SF grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p < 0.01$) (Şekil 11).

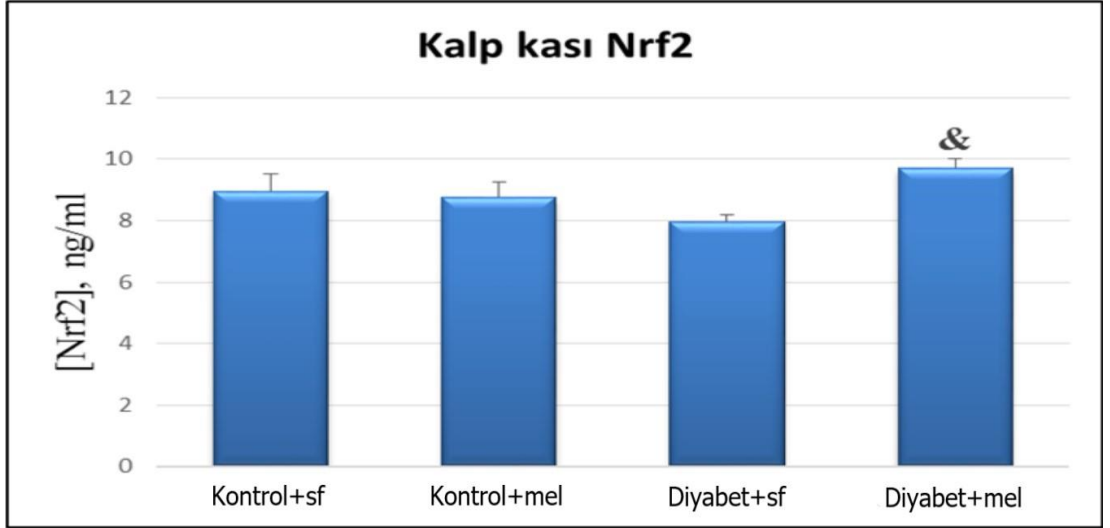


* Kontrol+SF grubuna göre ($p<0.05$), & Diyabet+SF grubuna göre ($p<0.01$), # Kontrol+melatonin grubuna göre ($p<0.05$) anlamlı farklılığı göstermektedir.

Şekil 11. İskelet kasından alınan doku örneklerindeki NRF2 değerleri ortalama değer ve standart hata olarak gösterilmiştir.

4.8. Kalp Kası NRF2 Sonuçları

Kalp kası dokusundan alınan örneklerden yapılan analizde, DM oluşturulan gruplar arasında; melatonin uygulanan diyabet+melatonin grubu NRF2 düzeyi, diyabet+SF grubu NRF2 düzeyine göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.01$). Diğer gruplar arası NRF2 düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

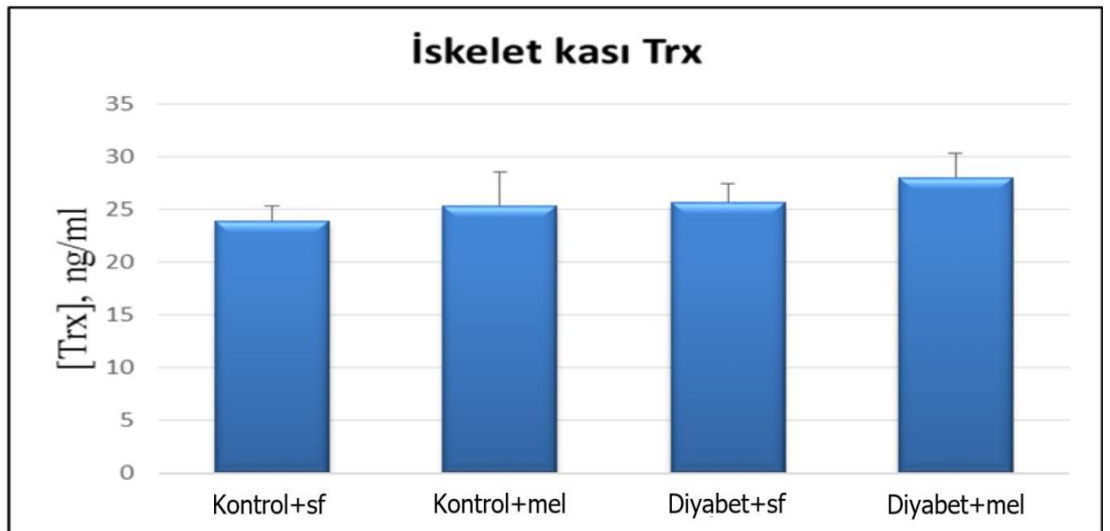


& Diyabet+SF grubuna göre ($p<0.01$) anlamlı farklılığı göstermektedir.

Şekil 12. Kalp kasından alınan doku örneklerindeki NRF2 değerleri ortalama değer ve standart hata olarak gösterilmiştir.

4.9. İskelet Kası TRX Sonuçları

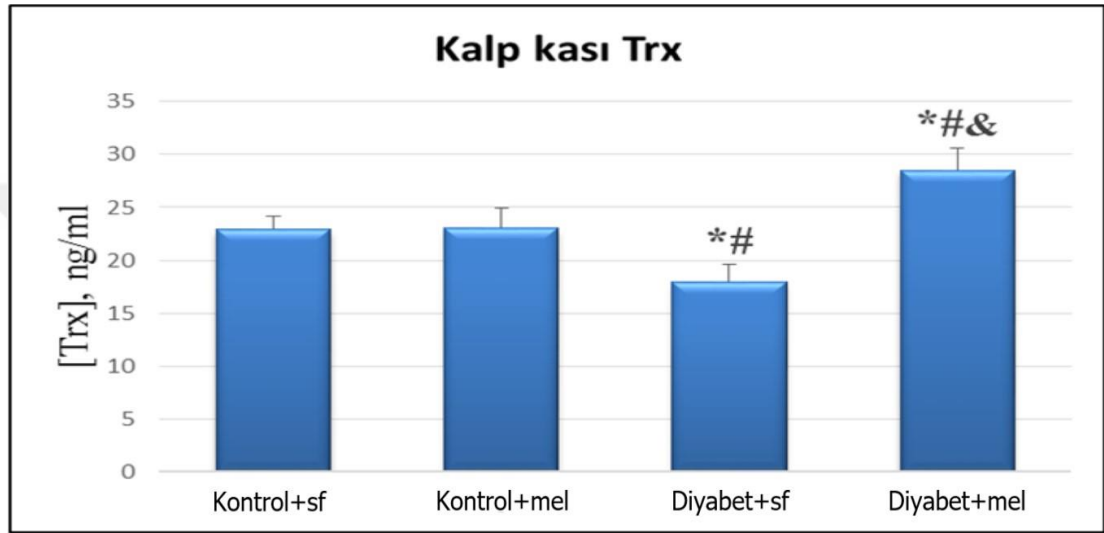
İskelet kasından alınan doku örneklerinden yapılan analiz sonucu, deney grupları arasında melatonin uygulanan gruplarda görülen TRX düzeyleri, uygulanmayan gruplardaki TRX düzeylerine göre rakamca daha yüksek olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 13).



Şekil 13. İskelet kasından alınan doku örneklerindeki TRX değerleri ortalama değer ve standart hata olarak gösterilmiştir.

4.10. Kalp Kası TRX Sonuçları

Kalp kasından alınan doku örneklerinden yapılan analizde, diyabet+melatonin grubundaki ortalama TRX düzeyleri, kontrol gruplarına ve melatonin uygulanmayan diyabet+SF grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.01$). DM oluşturulan diyabet+SF grubu TRX değerleri ise DM olmayan kontrol+SF ve kontrol+melatonin gruplarına göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0.05$) (Şekil 14).



* Kontrol+SF grubuna göre ($p<0.05$), & Diyabet+SF grubuna göre ($p<0.01$), # Kontrol+melatonin grubuna göre ($p<0.05$) anlamlı farklılığı göstermektedir.

Şekil 14. Kalp kasından alınan doku örneklerindeki TRX değerleri ortalama değer ve standart hata olarak gösterilmiştir.

4.11. Tüm Doku Örneklerinden Elde Edilen Veriler

Tüm gruplardaki iskelet ve kalp kası dokularından alınan örneklerde, yapılan analiz sonucu elde edilen MDA, GSH, NRF2 ve TRX gruplarına göre ortalama değerleri Tablo 3’de gösterilmiştir.

Tablo 3. Doku Örneklerinden Elde Edilen Verilerin Gruplara Göre Dağılımı

	Kontrol+SF	Kontrol+Mel	Diyabet+SF	Diyabet+Mel
İskelet Kası	4.33±0.15	5.04±0.31	4.07±0.16	3.98±0.12
GSH		*	#	#
Kalp Kası	4.77±0.18	5.66±0.17	4.87±0.15	5.58±0.21
GSH		*	#	*&
İskelet Kası	55.05±2.97	51±2.6	80.86±2.62	60.11±1.59
MDA			*#	#&
Kalp Kası	34.78±1.65	40.95±2.92	71.64±4.62	62.4±2.72
MDA			*#	*&
İskelet Kası	12.24±0.63	11.95±0.7	9.12±1.01	13.51±0.78
NRF2			*#	&
Kalp Kası	8.97±0.57	8.75±0.5	7.97±0.22	9.71±0.32
NRF2				&
İskelet Kası	23.91±1.44	25.28±3.29	25.66±1.8	28.04±2.26
TRX				
Kalp Kası	22.9±1.29	23.05±1.89	19.95±1.71	28.54±2.02
TRX			*#	*#&

*Kontrol+SF grubuna göre (p<0.05), & Diyabet+SF grubuna göre (p<0.05), #Kontrol+melatonin grubuna göre (p<0.05) anlamlı farklılığı göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Yaptığımız çalışmanın sonuçları; diyabetin iskelet ve kalp kasında oksidan stresi artırırken, melatoninin antioksidan etkisiyle bu durumu tersine çevirdiğini göstermiştir. STZ ile diyabet oluşturulmuş ratların her iki dokusunda oksidan stresin göstergesi olan MDA düzeylerinin arttığı ve melatonin tedavisi ile bu artışın engellendiği gösterilmiştir. GSH seviyesi iskelet kasında diyabetle beraber azalırken melatonin tedavisi anlamlı bir değişiklik yaratmamıştır. Diyabet NRF2 seviyelerinin iskelet kasında azalmasına neden olurken melatonin uygulamasıyla bu azalma engellenebilmiştir. TRX düzeyi diyabette kalp kasında azalırken, melatonin tedavisi ile normal düzeylere gelebilmiştir ancak iskelet kasında herhangi bir farklılık saptanmamıştır. Ayrıca diyabet ile ortaya çıkan hipergliseminin ve kilo kaybının melatonin tedavisi ile değişmediği gözlenmiştir.

Melatoninin kan glukoz düzeyleri üzerine olan etkileri, insülin direnci ve kilo kaybına olan metabolik etkilerinin gösterildiği çalışmalar farklılıklar içermektedir. Bizim çalışmamızda ve bazı çalışmalarda melatonin uygulamasının kan glukoz düzeylerine ve kilo kaybına olumlu bir etkisi gözlenmemiştir (7, 76). Deneysel süreçte kullanılan ratların cinsi, yaşı, kilosu gibi etmenler ile melatoninin uygulanma süresi bu farklılıkları oluşturuyor olabilir.

DM hiperglisemi ile karakterizedir ve diyabetik retinopati, diyabetik nefropati, diyabetik nöropati ve miyopati ile diyabetik kardiyomiyopati gibi komplikasyonlara yol açmaktadır. Bunlar arasında diyabetik kardiyomiyopati yüksek mortalite ve morbiditeye neden olan majör komplikasyondur (77). Diyabette insülin salınımı veya fonksiyonundaki bozukluk sebebiyle ya da her iki durumun birlikte olmasıyla ortaya çıkan hiperglisemik ortam, kalp ve iskelet kası da dahil olmak üzere birçok organı olumsuz etkiler (39, 78). Hiperglisemik ortam sonucu aşırı ROS üretiminin yol açtığı kalp kası dokusundaki nekroz, apoptoz, fibrosiz ve inflamasyon, kalp kasında yapısal ve fonksiyonel bozukluklar meydana getirmektedir (79). Ayrıca diyabetin kollajen oluşumuyla beraber fibrozise, miyokard kontraktıl proteinlerinde ve hücrel kalsiyum metabolizmasında anormalliklere, mitokondriyal disfonksiyona, endoplazmik retikulum stresine, anormal koroner dolaşıma, sempatik sinir sistemi ve renin anjiotensin aldosteron sisteminin aktivasyonuna neden olarak miyokard hücrelerinde çeşitli sinyal yollarını bozduğu gösterilmiştir. Bu

patofizyolojik değişiklikler kardiyomiyositlerde harabiyete neden olmaktadır (80–82). Deneysel diyabet modelleri de insan diyabetik kardiyomiyopati patofizyolojisini yansıtan metabolik, yapısal ve fonksiyonel problemleri sergilemektedir (83). DM, ayrıca kas kitle ve fonksiyonlarının bozulduğu diyabetik miyopatiye neden olmaktadır. Sıklıkla göz ardı edilen bu komplikasyon iskelet kasının glukoz homeostazisindeki rolünden dolayı diğer diyabetik komplikasyonların oluşmasına aracılık etmektedir. Ancak hala diyabetik miyopatiyi tetikleyici mekanizmalar tam olarak açıklanamamıştır (84).

Miyosit hasarındaki en önemli etkenlerden biri diyabetteki artmış ROS üretimidir. Fazla ROS üretimi membran proteinleri, lipidleri ve nükleik asitlerle reaksiyona girmekte ve hücrenin ölümüne kadar giden bir süreci başlatmaktadır. Lipid peroksidasyonunun son ürünü MDA olarak bilinmekte ve oksidatif stres için önemli bir belirteç olarak kabul edilmektedir (52). Çalışmamızda diyabet hem iskelet kasında hem de kalp kasında MDA düzeylerinin yükselmesine neden olmuştur. Yani diyabet ile oksidatif stres artışı her iki dokuyu da etkilemiştir. Literatürde diyabetin MDA artışına neden olduğunu gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır ve bu yönüyle çalışmamız literatürü desteklemektedir. Yapılan *in vivo* bir çalışmada kontrol grubuyla karşılaştırıldığında diyabet grubunda MDA seviyesi yüksek ve GSH seviyesi düşük bulunmuştur (85). Diğer bir çalışmada serum MDA seviyesi DM hastalarında sağlıklı gruba göre daha yüksek bulunmuştur. Aynı çalışmada MDA seviyelerindeki düşüş ile total antioksidan kapasitedeki artış arasında güçlü bir korelasyon görülmüştür (86).

Melatonin ve türevleri, ROS detoksifikasyonu ile birlikte moleküler hasarı azaltıcı antioksidan bir rol oynar (69, 87). Melatonin amfifilik özelliği sayesinde fizyolojik bariyerlerden kolayca geçer ve diğer antioksidanlara göre daha geniş bir etki alanı vardır (88). Diyabette artan MDA düzeylerinin melatonin uygulaması ile beyin, akciğer, kemik, retina gibi birçok dokuda azaldığı gösterilmiştir (89–91). Çalışmamızda 4 hafta süresince melatonin tedavisi iskelet ve kalp kasında MDA düzeylerini azaltmıştır. Bu bulgu melatoninin iyi bilinen antioksidan özelliğini destekler niteliktedir.

Melatoninin bir antioksidan olarak etkilerinin yanı sıra antioksidan enzimlerin aktivitelerini uyarıcı etkisiyle de antioksidan sisteme katkı sağlar (92). Bununla

birlikte oksidatif strese hangi mekanizmayla karşı koyduğu hala tam olarak net değildir. NRF2, hücreleri çeşitli antioksidan genleri ve enzimleri aktive ederek ROS gibi streslere karşı korur (93). İskelet kası bütünlüğü, lif tipi ve mitokondriyal biyogenezde önemli bir değişiklik olmamasına rağmen, NRF2 eksikliğinin mitokondriyal solunumu olumsuz etkilediği görülmüştür (94). Çalışmamızda diyabetin iskelet kas dokusunda NRF2 seviyelerini azaltması diyabetin iskelet kası ile ilgili komplikasyonlarının oluşumunu arttıracaklarını düşündürmektedir. Ayrıca melatonin uygulaması ile azalan NRF2 düzeyleri tekrar normal seviyelere yükselmiştir. Shi ve arkadaşları (95) böbrek iskemisi yapılan diyabetik sıçanlarda azalan NRF2 seviyesinin melatonin tedavisiyle yükseldiğini göstermişlerdir. Diyabetik retinopati yapılan ratlarda 8 ve 12 haftalık melatonin tedavisinin diyabet ile azalan NRF2 düzeylerini kontrol seviyelerine getirdiği başka bir çalışmada gösterilmiştir (7). Negi ve arkadaşları (76) diyabetik nöropati oluşturdukları ratlarda gelişen nöroinflamasyonun, melatonin uygulandığında hemoksijenaz-1 ekspresyonlarını arttırarak NRF2 yolağını düzenlediğini bildirmişlerdir. Çalışmamız farklı dokularda NRF2 üzerine etkisi gösterilen melatoninin iskelet kasında da benzer bir etki ortaya çıkarttığı yönündedir. Bu etki, melatonin tedavisi ile iskelet kasında lipid peroksidasyonunun azalmış olmasının, melatoninin NRF2 üzerindeki düzenleyici etkisinden kaynaklandığını düşündürmektedir.

Diyabetik ve vahşi tip fareler ile yapılan bir çalışmada, normal ve diyabetik kardiyomiyositlerde NRF2'nin ROS üretimi ve apoptoza karşı savunmada önemli bir düzenleyici olduğu belirtilmiştir (96). STZ ile oluşturulmuş diyabet modeli kullanılarak yapılan bir çalışmada sıçanlar, NRF2'nin diyabetik kardiyomiyopati patogenezinde zararlı rolü de olabileceği varsayımı ile 9 ay boyunca izlenmiş ve diyabetik ortam nedeniyle miyokard otofajisi bozulmuşsa kalbe zarar vereceği, miyokard otofajisi bozulmamışsa NRF2'nin kardiyak koruyucu olduğunu öne sürmüşlerdir (97). Melatonin uygulamasının beyin hasarı ve diyabetik nöropatide, NRF2 aktivasyonu ile koruyucu etkisi gösterilmiştir (76, 98). Çalışmamızda diyabet grubunda kalp kası NRF2 düzeyleri kontrol grubuna göre düşük bulunsada bu farklılık anlamlı bulunmamıştır. Diyabette melatonin kullanımı NRF2 düzeylerini arttırmıştır. Zhang ve arkadaşları (99) iskemi reperfüzyon hasarı oluşturdukları kardiyomiyositlerde melatoninin NRF2 yolağını aktive ederek oksidatif stresi ve apoptozisi engellediğini ve miyositleri koruduğunu göstermişlerdir. Yapılan başka

bir çalışmada kalp yetmezliği oluşturulan farelerde melatoninin NRF2 yolağı aracılığıyla koruyucu olduğu bildirilmiştir (100). Çalışmamızda diyabette melatonin tedavisiyle NRF2 düzeylerinin artmış olması melatoninin NRF2 yolağı ile diyabette de koruyucu etkili olduğunu göstermesi açısından önemlidir.

Diyabet durumlarında oksidan/antioksidan denge bozulur ve fazla miktarda ROS üretimi diyabetik komplikasyonların gelişmesini hızlandırır (101). Bu durumu engellemek için antioksidan sistemin aktive olması gerekmektedir. TRX, nörodejeneratif hastalıklarda koruyuculuğı gösterilen, apoptozisi engelleyici özelliğı olan ve lipid peroksidasyonunu önleyici rolü ile bilinen antioksidan ailesinin bir üyesidir (102). GSH'da vücutta endojen olarak bulunan önemli bir antioksidandır. STZ ile diyabet oluşturulmuş rat kalplerinde TRX ve GSH seviyelerinin azaldığı bildirilmiştir (101). Aynı şekilde diyabet oluşturulmuş rat aortasında hipergliseminin TRX seviyelerini azalttığı bilinmektedir (103). Miyokardial iskemi reperfüzyon modeli oluşturulan bir çalışmada melatoninin TRX sistemini aktive ederek TRX etkileşimli proteinin ekspresyonunu baskılayarak oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir (104). Bizde çalışmamızda diyabet oluşturulan ratların kalp kası TRX seviyelerinde azalma saptadık. Melatonin uygulaması ile azalan TRX seviyeleri normal seviyelere yükseldi. Melatonin kalp kasında antioksidan etkisini TRX seviyelerini arttırarak göstermiştir. Çalışmamızda grupların iskelet kas TRX seviyelerinde anlamlılık saptanmadı. Bu bize melatoninin iskelet kasında farklı antioksidan yolları kullanarak oksidatif stresi azalttığını düşündürmektedir. Çalışmamızda ayrıca diyabetli grupların iskelet kasında GSH seviyeleri düşüktür. Melatonin uygulaması diyabetli grubun iskelet kasında GSH seviyelerini değiştirmemiştir.

6. SONUÇLAR

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular, diyabetin hem kalp kasında hem de iskelet kasında oksidatif stresi arttırdığını ve antioksidan moleküllerin seviyelerini azalttığını göstermiştir. Melatonin tedavisinin her iki kas grubunda oksidan dengeyi düzenlediği ve bu etkisini kalp kasında özellikle TRX yapımını arttırarak, iskelet kasında NRF2 ekspresyonunu aktive ederek gösterdiği görülmektedir. Sonuç olarak melatonin, diyabette özellikle kalp ve iskelet kasında ortaya çıkan hasarların önlenmesinde tedavi edici bir ajan olabilir. Ancak bu koruyucu etkinin altında yatan patofizyolojik mekanizmaların açıklanması için daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.



7. KAYNAKLAR

1. Mollazadeh H, Sadeghnia HR, Hoseini A, Farzadnia M, Boroushaki MT. Effects of pomegranate seed oil on oxidative stress markers, serum biochemical parameters and pathological findings in kidney and heart of streptozotocin-induced diabetic rats. *Ren Fail* 38(8):1256–66, 2016.
2. Tian X, Liu Y, Ren G, Yin L, Liang X, Geng T. Resveratrol limits diabetes-associated cognitive decline in rats by preventing oxidative stress and inflammation and modulating hippocampal structural synaptic plasticity. *Brain Res* 1650:1–9, 2016.
3. Chowdhury S, Ghosh S, Rashid K, Sil PC. Deciphering the role of ferulic acid against streptozotocin-induced cellular stress in the cardiac tissue of diabetic rats. *Food Chem Toxicol* 97:187–98, 2016.
4. Liu YW, Cheng YQ, Liu XL, Hao YC, Li Y, Zhu X. Mangiferin upregulates glyoxalase 1 through activation of Nrf2/ARE signaling in central neurons cultured with high glucose. *Mol Neurobiol* 54(6):4060–70, 2017.
5. Sun Q, Shen ZY, Meng QT, Liu HZ, Duan WN, Xia ZY. The role of DJ-1/Nrf2 pathway in the pathogenesis of diabetic nephropathy in rats. *Ren Fail* 38(2):294–304, 2016.
6. Yang H, Mao Y, Tan B, Luo S, Zhu Y. The protective effects of endogenous hydrogen sulfide modulator, S-propargyl-cysteine, on high glucose-induced apoptosis in cardiomyocytes: A novel mechanism mediated by the activation of Nrf2. *Eur J Pharmacol* 761:135–43, 2015.
7. Jiang T, Chang Q, Cai J, Fan J, Zhang X, Xu G. Protective effects of melatonin on retinal inflammation and oxidative stress in experimental diabetic retinopathy. *Oxid Med Cell Longev* 2016:1–13, 2016.
8. Guan Y, Cui ZJ, Sun B, Han LP, Li CJ, Chen LM. Celastrol attenuates oxidative stress in the skeletal muscle of diabetic rats by regulating the AMPK-PGC1 α -SIRT3 signaling pathway. *Int J Mol Med* 37(5):1229–38, 2016.

9. Cappellari GG, Zanetti M, Semolic A, Vinci P, Ruozi G, Falcione A. Unacylated ghrelin reduces skeletal muscle reactive oxygen species generation and inflammation and prevents high-fat diet-induced hyperglycemia and whole-body insulin resistance in rodents. *Diabetes* 65(4):874–86, 2016.
10. Boden MJ, Brandon AE, Tid-Ang JD, Preston E, Wilks D, Stuart E. Overexpression of manganese superoxide dismutase ameliorates high-fat diet-induced insulin resistance in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Metab* 303(6):798–805, 2012.
11. Ding Y, Dai X, Jiang Y, Zhang Z, Bao L, Li Y. Grape seed proanthocyanidin extracts alleviate oxidative stress and ER stress in skeletal muscle of low-dose streptozotocin and high-carbohydrate/high-fat diet-induced diabetic rats. *Mol Nutr Food Res* 57(2):365–9, 2013.
12. Teodoro BG, Baraldi FG, Sampaio IH, Bomfim LHM, Queiroz AL, Passos MA. Melatonin prevents mitochondrial dysfunction and insulin resistance in rat skeletal muscle. *J Pineal Res* 57(2):155–67, 2014.
13. Nduhirabandi F, Du Toit EF, Blackhurst D, Marais D, Lochner A. Chronic melatonin consumption prevents obesity-related metabolic abnormalities and protects the heart against myocardial ischemia and reperfusion injury in a prediabetic model of diet-induced obesity. *J Pineal Res* 50(2):171–82, 2011.
14. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 37(1):81-90, 2014.
15. Chan M. Global report on diabetes. Vol. 58, World Health Organization, 2014.
16. Bağrıaçık N. Diabetes Mellitus: Tanımı, Tarihçesi Ve Sıklığı. *Diabetes Mellitus Sempozyumu*. 18 - 19 Aralık 1997, İstanbul, s. 9–18.
17. Barret KE, Barman SM, Boitano S, Brooks HL. *Ganong's Review Of Medical Physiology*. 24th Edition. McGraw-Hill Medical, New York, USA, 2012.
18. Akkaya H, Çelik S. Ratlarda diyabet öncesi ve sonrası oksidan-antioksidan durum. *FÜ Sağ Bil Vet Derg* 24(1):5–10, 2010.

19. Luft R. Oskar Minkowski: Discovery of the pancreatic origin of diabetes, 1889. *Diabetologia* 32(7): 399-401, 1989.
20. Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 94(3):311–21, 2011.
21. Satman I, Yılmaz T, Sengül A, Salman S, Salman F, Uygur S. Population-based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: Results of the Turkish Diabetes Epidemiology Study (TURDEP). *Diabetes Care* 25(9):1551–6, 2002.
22. Satman I, Omer B, Tutuncu Y, Kalaca S, Gedik S, Dinccag N. Twelve-year trends in the prevalence and risk factors of diabetes and prediabetes in Turkish adults. *Eur J Epidemiol* 28(2):169–80, 2013.
23. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care* 33(1):11–61, 2010.
24. Satman İ, İmamoğlu Ş, Yılmaz C, Akalın S ve Diabetes Mellitus Çalışma ve Eğitim Grubu. TEMD Diabetes Mellitus Ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi Ve İzlem Kılavuzu. 7. Baskı, Pelin Ofset Matbaacılık, Ankara, 2015.
25. Hall JE. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology. 12th edition. Saunders Elsevier, Philadelphia, USA, 2011.
26. International Diabetes Federation. IDF Diyabet Atlası 8th, 2017.
27. Brunton, S. Pathophysiology of type 2 diabetes: The evolution of our understanding. *J Fam Pract* 65(4), 2016.
28. Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev* 93(1):137–88, 2013.
29. Kawanami D, Matoba K, Sango K, Utsunomiya K. Incretin-based therapies for diabetic complications: basic mechanisms and clinical evidence. *Int J Mol Sci* 17(8):1223, 2016.

30. Koulis C, Watson AMD, Gray SP, Jandeleit-Dahm KA. Linking RAGE and Nox in diabetic micro and macrovascular complications. *Diabetes and Metabolism* 41(4): 272-281, 2015.
31. Hölscher ME, Bode C, Bugger H. Diabetic cardiomyopathy: Does the type of diabetes matter? *Int J Mol Sci* 17(12):2136, 2016.
32. Lee WS, Kim J. Diabetic cardiomyopathy: Where we are and where we are going. *Korean Journal of Internal Medicine* 32(3):404, 2017.
33. Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular disease: the framingham study. *JAMA J Am Med Assoc* 241(19):2035–8, 1979.
34. Jia G, Whaley-Connell A, Sowers JR. Diabetic cardiomyopathy: a hyperglycaemia and insulin-resistance-induced heart disease. *Diabetologia* 61(1): 21-28, 2018.
35. Bugger H, Abel ED. Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy. *Diabetologia* 57(4): 660-671, 2014.
36. Chen J, Zhang Z, Cai L. Diabetic cardiomyopathy and its prevention by Nrf2: Current status. *Diabetes Metab J* 38(5):337–45, 2014.
37. Bianchi L, Volpato S. Muscle dysfunction in type 2 diabetes: a major threat to patient's mobility and independence. *Acta Diabetol* 53:879–89, 2016.
38. M. Hashemi, M. Bayat, A.R. Azizi Saraji ME. The effect of swimming exercise on experimental diabetic myopathy in rats. *World J Zool* 4(3):216–22, 2009.
39. D'Souza DM, Al-Sajee D, Hawke TJ. Diabetic myopathy: impact of diabetes mellitus on skeletal muscle progenitor cells. *Frontiers in Physiology* 4:374, 2013.
40. Di Meo S, Iossa S, Venditti P. Skeletal muscle insulin resistance: role of mitochondria and other ROS sources. *J Endocrinol* 233(1): R15–42, 2017.
41. Wu H, Ballantyne CM. Skeletal muscle inflammation and insulin resistance in obesity. *J Clin Invest* 127(1): 43–54, 2017.

42. Tangvarasittichai S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes* 6(3): 456, 2015.
43. Asmat U, Abad K, Ismail K. Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review, *Saudi Pharmaceutical Journal* 24(5):547-553, 2016.
44. Atalay M, Laaksonen DE. Diabetes, oxidative stress and physical exercise. *Journal of Sports Science and Medicine*. 1(1):1–14, 2002.
45. Rochette L, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. *Biochimica et Biophysica Acta* 1840(9):2709-2729, 2014.
46. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation Research* 107(9):1058-1070, 2010.
47. Henriksen EJ, Diamond-Stanic MK, Marchionne EM. Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Free Radical Biology and Medicine* 51(5):993-999, 2011.
48. Jay, Desmond Hitomi, Hirofumi Griendling KK. Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. *Free Radic Biol Med*. 40(2):183–92, 2006.
49. Rains JL, Jain SK. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radical Biology And Medicine* 50(5):567-575, 2011.
50. Kaneko M, Bucciarelli L, Hwang YC, Lee L, Yan SF, Schmidt AM. Aldose reductase and AGE-RAGE pathways: key players in myocardial ischemic injury. *Ann N Y Acad Sci* 1043:702–9, 2005.
51. Memişoğulları R. Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi* 3:30-39, 2005.
52. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. *J Biochem Mol Toxicol* 17(1):24–38, 2003.
53. Robertson AP. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *Journal of Biological Chemistry* 279(41):42351-54, 2004.

54. Das Evcimen N, King GL. The role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes. *Pharmacological Research* 55(6):498-510, 2007.
55. Gürol G, Aslan A. Lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzimler. *Sak Tıp Derg* 3(1):5–7, 2013.
56. Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 482(3):419-425, 2017.
57. Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yönden Z. Oxidative stress and its impacts on intracellular lipids, proteins and DNA. *J Clin Exp Investig* 6(3):331–6, 2015.
58. Sindhi V, Gupta V, Sharma K, Bhatnagar S, Kumari R, Dhaka N. Potential applications of antioxidants – A review. *J Pharm Res* 7(9):828–35, 2013.
59. He L, He T, Farrar S, Ji L, Liu T, Ma X. Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species. *Cellular Physiology and Biochemistry* 44(2):532-553, 2017.
60. Aksoy Yasemin. Antioksidan mekanizmada glutatyonun rolü. *Turkiye Klin J Med Sci* 22(4):442–8, 2002.
61. Espinosa-Diez C, Miguel V, Mennerich D, Kietzmann T, Sánchez-Pérez P, Cadenas S. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biology* 6:183-197, 2015.
62. Maher P, Lewerenz J, Lozano C, Torres JL. A novel approach to enhancing cellular glutathione levels. *J Neurochem* 107(3):690–700, 2008.
63. Çaylak E, Rica C. Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar. *Tıp Araştırmaları Derg* 9(1):73–83, 2011.
64. Li B, Liu S, Miao L, Cai L. Prevention of diabetic complications by activation of Nrf2: diabetic cardiomyopathy and nephropathy. *Exp Diabetes Res* 2012:7, 2012.
65. Tan SM, de Haan JB. Combating oxidative stress in diabetic complications with Nrf2 activators: How much is too much? *Redox Rep* 19(3):107–17, 2014.

66. Cui W, Min X, Xu X, Du B, Luo P. Role of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 in diabetic nephropathy. *Journal of Diabetes Research* 2017, 2017.
67. Louro RO, Díaz-Moreno I. Redox proteins in supercomplexes and signalosomes. CRC Press, Boca Raton, USA, 2016.
68. Lu J, Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radical Biology and Medicine* 66:75–87, 2014.
69. Tan DX, Manchester LC, Esteban-Zubero E, Zhou Z, Reiter RJ. Melatonin as a potent and inducible endogenous antioxidant: Synthesis and metabolism. *Molecules* 20(10):18886–906, 2015.
70. Zephy D, Ahmad J. Type 2 diabetes mellitus: Role of melatonin and oxidative stress. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews* 9(2):127-131, 2015.
71. Şener G. Karanlığın hormonu: Melatonin. *Marmara Pharmaceutical Journal* 14:112–20, 2010.
72. Reiter RJ, Tan D-X, Qin L, Alatorre-Jimenez M, Sainz RM, Mayo JC. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *J Pineal Res* 61(3):253–78, 2016.
73. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem* 97:55–74, 2015.
74. Casini AF, Ferrali M, Pompella A, Maellaro E, Comporti M. Lipid peroxidation and cellular damage in extrahepatic tissues of bromobenzene-intoxicated mice. *Am J Pathol* 123(3):520–31, 1986.
75. Aykaç G, Uysal M, Süha Yalçın A, Koçak-Toker N, Sivas A, Öz H. The effect of chronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats. *Toxicology* 36(1):71–6, 1986.
76. Negi G, Kumar A, Sharma SS. Melatonin modulates neuroinflammation and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy: Effects on NF- κ B and Nrf2 cascades. *J Pineal Res* 50(2):124–31, 2011.



77. Meng S, Yang F, Wang Y, Qin Y, Xian H, Che H. Silymarin ameliorates diabetic cardiomyopathy via inhibiting TGF- β 1/Smad signaling. *Cell Biol Int* 43(1):65–72, 2019.
78. Marwick TH, Ritchie R, Shaw JE, Kaye D. Implications of underlying mechanisms for the recognition and management of diabetic cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 71(3):339-351, 2018.
79. Ge Z-D, Lian Q, Mao X, Xia Z. Current Status and Challenges of NRF2 as a Potential Therapeutic Target for Diabetic Cardiomyopathy. *Int Heart J* 60(3):512-520, 2019.
80. Trachanas K, Sideris Sk, Aggeli C, Poulidakis E, Gatzoulis K, Tousoulis D. Diabetic cardiomyopathy: From pathophysiology to treatment. *Hellenic Journal of Cardiology* 55(5):411-421, 2014.
81. Kandemir Y, Tosun V, Güntekin Ü. Melatonin protects against streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy through the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway. *Adv Clin Exp Med* 28(9):0–0, 2019.
82. Jia G, DeMarco VG, Sowers JR. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy. *Nature Reviews Endocrinology* 12(3):144–153, 2016.
83. Fuentes-Antras J, Picatoste B, Gomez-Hernandez A, Egido J, Tunon J, Lorenzo O. Updating experimental models of diabetic cardiomyopathy. *J Diabetes Res* 2015:656795, 2015.
84. Hernández-Ochoa EO, Llanos P, Lanner JT. The underlying mechanisms of diabetic myopathy. *J Diabetes Res* 2017:1–3, 2017.
85. Soliman GZA. Blood lipid peroxidation superoxide levels in Egyptian type 2 diabetic patients. *Singapore Med J* 49(2):129–36, 2008.
86. Armstrong AM, Chestnutt JE, Gormley MJ, Young IS. The effect of dietary treatment on lipid peroxidation and antioxidant status in newly diagnosed noninsulin dependent diabetes. *Free Radic Biol Med* 21(5):719–26, 1996.

87. Reiter RJ, Paredes SD, Manchester LC, Tan DX. Reducing oxidative/nitrosative stress: A newly-discovered genre for melatonin. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 44(4):175-200, 2009.
88. Bonnefont Rousselot D, Collin F. Melatonin: Action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. *Toxicology* 278(1):55–67, 2010.
89. Onk D, Onk OA, Erol HS, Özkaraca M, Çomaklı S, Ayazoğlu TA. Effect of melatonin on antioxidant capacity, inflammation and apoptotic cell death in lung tissue of diabetic rats. *Acta Cir Bras* 33(4):375–85, 2018.
90. Bicer M, Baltaci SB, Patlar S, Mogulkoc R, Baltaci AK. Melatonin has a protective effect against lipid peroxidation in the bone tissue of diabetic rats subjected to acute swimming exercise. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation* 34(2): 2018.
91. Mehrzadi S, Motevalian M, Rezaei Kanavi M, Fatemi I, Ghaznavi H, Shahriari M. Protective effect of melatonin in the diabetic rat retina. *Fundam Clin Pharmacol* 32(4):414–21, 2018.
92. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 36(1):1–9, 2004.
93. Uruno A, Yagishita Y, Yamamoto M. The Keap1-Nrf2 system and diabetes mellitus. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 566:76-84, 2015.
94. Coleman V, Sa-Nguanmoo P, Koenig J, Schulz TJ, Grune T, Klaus S, et al. Partial involvement of Nrf2 in skeletal muscle mitohormesis as an adaptive response to mitochondrial uncoupling. *Sci Rep* 8(1):2446, 2018.
95. Shi S, Lei S, Tang C, Wang K, Xia Z. Melatonin attenuates acute kidney ischemia/reperfusion injury in diabetic rats by activation of the SIRT1/Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Biosci Rep* 39(1):BSR20181614, 2019.

96. He X, Kan H, Cai L, Ma Q. Nrf2 is critical in defense against high glucose-induced oxidative damage in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 46(1):47–58, 2009.
97. Zang Hm, Wu W, Qi L, Bowen C, Cui T, Nagarkatti P, et al. Nrf2 exaggerates cardiomyopathy associated with type 1 diabetes in mice. *Diabetes* 67(1):475-P, 2018.
98. Ding K, Wang H, Xu J, Li T, Zhang L, Ding Y, et al. Melatonin stimulates antioxidant enzymes and reduces oxidative stress in experimental traumatic brain injury: The Nrf2-ARE signaling pathway as a potential mechanism. *Free Radic Biol Med* 73:1–11, 2014.
99. Zhang Y, Qiao B, Gao F, Wang H, Miao S, Zhao H. Melatonin protects H9c2 cells against ischemia/reperfusion-induced apoptosis and oxidative stress via activation of the Nrf2 signaling pathway. *Mol Med Rep* 18(3):3497–505, 2018.
100. Liu Y, Li LN, Guo S, Zhao XY, Liu YZ, Liang C. Melatonin improves cardiac function in a mouse model of heart failure with preserved ejection fraction. *Redox Biol* 18:211–21, 2018.
101. Okatan EN, Tuncay E, Turan B. Cardioprotective effect of selenium via modulation of cardiac ryanodine receptor calcium release channels in diabetic rat cardiomyocytes through thioredoxin system. *J Nutr Biochem* 24(12):2110–2118, 2013.
102. Li H, Xu C, Li Q, Gao X, Sugano E, Tomita H. Thioredoxin 2 offers protection against mitochondrial oxidative stress in H9c2 cells and against myocardial hypertrophy induced by hyperglycemia. *Int J Mol Sci* 18(9):1958, 2017.
103. Schulze PC, Yoshioka J, Takahashi T, He Z, King GL, Lee RT. Hyperglycemia promotes oxidative stress through inhibition of thioredoxin function by thioredoxin-interacting protein. *J Biol Chem*. 279(29):30369–74, 2004.
104. Yu L, Fan C, Li Z, Zhang J, Xue X, Xu Y. Melatonin rescues cardiac thioredoxin system during ischemia-reperfusion injury in acute hyperglycemic state by restoring Notch1/Hes1/Akt signaling in a membrane receptor-dependent manner. *J Pineal Res* 62(1):e12375, 2017.

8. EKLER

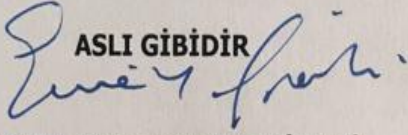
Ek-1 Etik Kurul Onayı

 **T.C.**
BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 

TOPLANTI TARİHİ : 10.11.2016
TOPLANTI NO : 2016/10

2- 06/10/2016 tarih ve 2016/09 sayılı toplantıda onay verilen Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'nın 2016-47-06/10 Protokol no'lu "Tip I Diabet Oluşturulan Sıçanlarda Beyin, Kalp ve İskelet Kası Nrf2 Yapımı ve Oksidatif Stres Üzerine Melatoninin Etkisinin İncelenmesi" konulu çalışma başlığının "Deneysel Diabet Oluşturulan Sıçanlarda Kalp ve İskelet Kası Nrf2 Yapımı ve Oksidatif Stres Üzerine Melatoninin Etkisinin İncelenmesi" olarak değiştirilmesinin uygunluğuna,

Oy birliği ile karar verildi.


ASLI GİBİDİR
Prof. Dr. Emine YILMAZ SİPAHİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkan Vekili

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Salim ÖZENOĞLU
Mail : salimozenoglu@gmail.com
Doğum Tarihi : 18.01.1988

Eğitim Bilgileri

Derece	Alan	Üniveriste	Yıl
Lisans	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	Pamukkale Üniversitesi	2011
Yüksek Lisans	Fizyoloji	Bülent Ecevit Üniversitesi	2019

İş Tecrübeleri

2011 -2012	Yeni Yaşam Özel Eğitim ve Rehabilitasyon Merkezi Seydişehir/Konya
2012-2013	Rehberim Özel Eğitim ve Rehabilitasyon Merkezi Niğde/Merkez
2015-2017	Uzunmehmet Göğüs ve Meslek Hastalıkları Hastanesi Zonguldak/ Merkez
2017-	Zonguldak Atatürk Devlet Hastanesi

Akademik Yayınlar

Meryem Ergenç, Salim Özenoğlu, İnci Turan, Veysel Haktan Özaçmak, Hale Sayan Özaçmak. “Diabetik Sıçanlarda Melatonin Uygulamasının Karaciğer, Böbrek, Mide, Pankreas ve Göz Dokularında Oksidatif Stres Üzerine Etkisi” Türkiye Diyabet ve Obezite Dergisi 3(3):117-123, 2017.

Sertifikalar

Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası