



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ZEBRA BALIKLARINDA OLUŞTURULAN TİP 2 DİYABET
MODELİNDE *STEVIA REBAUDIANA*'NIN OLASI
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

ESRA DANDİN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. EBRU IŞIK ALTURFAN

2019-İSTANBUL



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ZEBRA BALIKLARINDA OLUŞTURULAN TİP 2 DİYABET
MODELİNDE *STEVIA REBAUDIANA*'NIN OLASI
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

ESRA DANDİN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI


DANIŞMAN
Prof. Dr. EBRU IŞIK ALTURFAN

2019-İSTANBUL

TEZ ONAY FORMU

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program türü : Yüksek Lisans
Anabilim Dalı : Eczacılık Fakültesi Biyokimya
Tez Sahibi : Esra Dandin
Sınav Tarihi ve Saati : 21/10/2019, 13:00
Tez Başlığı : Zebra Balıklarında Oluşturulan Tip 2 Diyabet Modelinde *Stevia rebaudiana*'nın Olası Etkilerinin İncelenmesi

Bu çalışma, içerik ve kalite bakımından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvan, Adı-Soyadı (Kurum Adı)	İmza
Danışman	Prof.Dr.Ebru Işık Alturfan	
Üye	Prof.Dr.Azize Şener	
Üye	Prof.Dr.İlhan Onaran	

ONAY

Bu tez, yukarıda isimleri bulunan jüri üyeleri tarafından "Marmara Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliği" nin ilgili maddeleri uyarınca kabul edilmiş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun13.11.2019.....tarih ve53.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü ✓

Prof. Dr.
Aysen GARGILLKEÇES


BEYAN

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

Esra Dandin



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca gerek ders gerek tez dönemlerimde bana her zaman özverili şekilde yol gösteren, manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam ve tez danışmanım Sayın **Prof. Dr. Ebru Işık Alturfan'a** teşekkür ederim.

Bana tecrübeleri ile ışık tutan ve çalışmamızın sonuçlarına ulaşmamızda emekleri olan arkadaşlarım Ünsal Veli Üstündağ, Perihan Seda Ateş ve İsmail Ünal'a teşekkür ederim.

Aileme ve arkadaşlarıma daimi destekleri için teşekkür ederim.

Bu tez, marmara üniversitesi bilimsel araştırma projeleri komisyonu başkanlığı tarafından **SAG-C-YLP-100719-0263** numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

BEYAN	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR VE SİMGELER	vi
TABLO LİSTESİ	x
RESİM LİSTESİ	xi
ŞEKİL LİSTESİ	xii
1- ÖZET	1
2- ABSTRACT	2
3- GİRİŞ VE AMAÇ	3
4- GENEL BİLGİLER	5
4.1. Diyabet Hastalığı.....	5
4.1.1. Diyabet hastalığının sınıflandırılması.....	7
4.1.1.1. Tip 1 diyabet.....	7
4.1.1.2. Tip 2 diyabet.....	8
4.1.1.3. Gestasyonel diyabet.....	10
4.1.1.4. Monogenik diyabet-gençlerde görülen T2DM (MODY, maturity diabetes onset of the young)	12
4.2. Diyabet Hastalığının Klinik Belirtileri.....	12
4.2.1. Diyabetin primer etkileri.....	12
4.2.1.1. Hipoglisemi.....	12
4.2.1.2. Diyabetik ketoasidoz.....	13
4.2.1.3. Açlık hiperglisemisi.....	13
4.2.1.4. Hiperglisemik hiperosmolar durum.....	14

4.2.1.5. Laktik asidoz.....	14
4.2.2. Diyabetin sekonder etkileri.....	14
4.2.2.1.Kardiyovasküler hastalıklar.....	14
4.2.2.2. Nefropati.....	15
4.2.2.3. Retinopati.....	17
4.2.2.4. Nöropati.....	18
4.2.2.5. Diyabetik ayak.....	18
4.2.2.6. Oral sağlık.....	20
4.2.2.7. Hamilelikle ilişkili diyabetik komplikasyonlar.....	20
4.3. Tip 2 Diyabet Gelişiminde Etkili Moleküler Mekanizmalar.....	21
4.4. Tip 2 Diyabet ve Obezite İlişkisi.....	23
4.4.1. Leptin.....	25
4.5. Fibroblast Büyüme Faktörü 21 (FGF21).....	26
4.6. Diyabet Gelişimindeki Epigenetik Faktörler.....	27
4.6.1. DNMT3A	28
4.7. Tip 2 Diyabet Gelişimde İnflamasyonun Rolü.....	31
4.7.1. İnterlökin-21.....	32
4.7.2. Tümör nekroz faktörü alfa (Tnf-alfa, Tnf- α).....	32
4.8. Tip 2 Diyabette Oksidan-Antioksidan Durum	35
4.9. Tatlandırıcılar	38
4.9.1. Stevia rebaudiana.....	41
4.10. Zebra Balıklarında Oluşturulan Diyabet Modelleri.....	43
4.10.1. Fazla beslenme ile oluşturulan tip 2 diyabet modeli.....	45
5. GEREÇ ve YÖNTEM	
5.1. Zebra Balıkları Bakım ve Beslenme Prosedürü.....	48
5.2. Kullanılan Cihazlar.....	49
5.3. Kullanılan Kimyasallar.....	49
5.4. Maruziyet Grupları.....	51
5.5. Maruziyet Uygulaması.....	51
5.6. Oral Glukoz Tolerans Testi (OGTT).....	52
5.7. Oksidan ve Antioksidan Parametrelerinin İncelenmesi.....	54
5.7.1. Parametreler için tayin yöntemleri.....	54

5.7.1.1. Total protein tayini	54
5.7.1.2. Lipit peroksidasyon (LPO) tayini	56
5.7.1.3. Total nitrik oksid tayini.....	57
5.7.1.4. SOD aktivitesi tayini	59
5.7.1.5. GST aktivitesi tayini.....	60
5.8. Gen İfadesi Analizi (RT-PCR).....	62
5.8.1. Delta delta C _t metodu ile veri analizi	62
5.9. İstatistiksel Analizi.....	63
6. BULGULAR	
6.1. Grupların 15.gün Vücut Ağırlıkları Karşılaştırması.....	64
6.2. Kan Glukoz Değerleri.....	65
6.2.1. Başlangıç (0.gün) açlık kan glukoz değerleri.....	65
6.2.2. 15. gün açlık kan glukoz değerleri.....	66
6.2.3. Grupların 0-15. gün açlık kan glukoz değerleri karşılaştırması.....	67
6.2.4. Grupların oral glukoz test sonuçlarının karşılaştırılması.....	68
6.3. Oksidan-Antioksidan Sistem Parametreleri	69
6.3.1. Grupların lipit peroksidasyon (LPO) analizi sonuçları.....	69
6.3.2. Grupların süperoksit dismutaz (SOD) analizi sonuçları.....	70
6.3.3. Grupların glutatyon S-transferaz (GST) analizi sonuçları.....	71
6.3.4. Grupların nitrit oksit (NO) analizi sonuçları.....	72
6.4. RT-PCR Analizi Sonuçları.....	73
6.4.1. <i>fgf21</i> mRNA ekspresyon analizi sonuçları.....	73
6.4.2. <i>dnmt3a</i> mRNA ekspresyon analizi sonuçları.....	74
6.4.3. <i>lepam</i> mRNA ifade analizi sonuçları.....	75
6.4.4. <i>IL21</i> mRNA ifade analizi sonuçları.....	76
6.4.5. <i>tnf α</i> mRNA ifade analizi sonuçları.....	77
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	78
8. KAYNAKLAR	87
9.EKLER	
EK-1. Uluslararası Kongre Bildiri Özeti.....	95
EK-2. Etik Kurul Onayı.....	96
10. ÖZGEÇMİŞ	97

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

(H₂O₂): Hidrojen peroksit

(NO): Nitrik oksit

(O₂): Oksijen

(O₂⁻): Superoksit anyone

(OH[•]): Hidroksi radikali

(ONOO⁻): Peroksinitrit

α: Alfa

actb1: Beta aktin

ACR: Albumin/Kreatinin oranı

ADA: Amerikan Diyabet Birliği

ADP: Adenozin difosfat

Ask1: Apoptoz sinyal düzenleyici kinaz 1

ATP: Adenozin trifosfat

ATPaz: Adenozin trifosfatı, adenozin difosfat ve ortofosfata hidrolizleyen enzim

β: Beta

Ca²⁺: Kalsiyum iyonu

CAT: Katalaz

CDC: Hastalık kontrol ve önleme merkezleri

DKA: Diyabetik Ketoasidoz

DM: Diabetes Mellitus

DMSO: Dimetil Sülfoksit

cDNA: Kopya DNA

C_t: Eşik döngü sayısı

Cu-Zn-SOD: Cu/Zn superoksit dismutaz

Cyp2D: Sitokrom P450 2D

D:Diyabet

D+DDS: Diyabet + Düşük Doz Stevia

D+YDS:Diyabet + Yüksek Doz Stevia

DNA:Deoksiribo nükleik asit

ENU: N-Etil-N-Nitrosüre

FADH₂: Flavin adenin dinükleotid

FDA: Besin ve İlaç Yönetimi

FBG: Fazla beslenen grup

FGF-21: Fibroblast büyüme faktörü 21

γ: Gama

GDM: Gestasyonel Diyabet

GLUT: Glukoz Taşıyıcı

GRAS: Genel olarak kullanımı güvenli

GSH:Glutatyon

GSH: L-Glutatyon

GST: Glutatyon S-transferaz

HbA1c: Glikozile Hemoglobin

HCl: Hidroklorik asit

Hd: Periventriküler hipotalamus'un dorsal bölgesi

HEPES: 4-(2-hidroksietil)-1-piperazineethansulfonik asit

HGMD: İnsan Gen Mutasyon Veritabanı

IDF: International Diabetes Federation

IFN- γ : İnterferon- γ

IRS: İnsülin reseptör substratı

K: Kontrol

K⁺: Potasyum iyonu

K₂HPO₄: Dipotasyum hidrojen fosfat

KH₂PO₄: Potasyum dihidrojen fosfat

KoQ10: Koenzim Q10

LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein

LNCS: Düşük ya da sıfır kalorili tatlandırıcı

MDA: Malondialdehit

mRNA: Mesajcı ribo nükleik asit

Na₂HPO₄: Disodyum hidrojen fosfat

Na⁺: Sodyum iyonu

NaCl: Sodyum klorür

NAD(P)H: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat

NADH: Nikotinamid adenin dinükleotid

Na-EDTA: Sodyum etilendiamin tetraasedik asit

NaOH: Sodyum hidoksit

NEDD: N-(1-Naftil)-etilendiamin dihidroklorür

NOS: Nitrik oksit sentaz

NTR: Nitroredüktaz

OECD: Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü

OGTT: Oral glukoz tolerans testi

PBS: Fosfat tampon tuzu tablet

pH: Hidrojenin gücü

ROT: Reaktif oksijen türleri

Ser/Thr: Serin/Threonin

SOD: Superoksit dismutaz

SULF: Sülfaniamid

SVG: Steviol glukuronit

TBA: Triklorasetik asit

TCA: Tiyobarbürük asit

TDD: Türkiye Diyabet Derneği

TNF- α : Tümör nekroz faktör- α

T1DM: Tip 1 diyabet

T2DM: Tip 2 diyabet

VCl₃: Vanadyum (III) Klorür

WHO: Dünya sağlık örgütü

ZnSO₄: Çinko sülfat

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1: Genel diyabet tanı kriterleri

Tablo 2: Deneylerde kullanılan cihazlar

Tablo 3: Kullanılan kimyasallar listesi

Tablo 4: Total protein tayini yöntemi

Tablo 5: Lipit peroksidasyon tayin yöntemi

Tablo 6: Nitrik oksit tayin yöntemi

Tablo 7: Superoksit dismutaz tayin yöntemi

Tablo 8: GST tayin yöntemi

RESİM LİSTESİ

Resim 1: Stevia rebaudiana

Resim 2: ZEBTEC Mini Akvaryum sistemi

Resim3:Çalışmamızda gerçekleştirilen kan alımı uygulamasına ait görüntü

Resim4:Çalışmamızda mikropipet yardımıyla yapılan gavaj uygulamasına ait görüntü



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: DNA metiltransferazların (DNMT) replikasyonda (A) ve De Nova Metilasyonda İşlevleri

Şekil 2: Steviol glikozitlerin iskeleti (A), Stevioside (B), Rebaudioside A (C)

Şekil 3: Kan alımı yapılan dorsal aort damarının konumu

Şekil 4: Grupların 15.gün vücut ağırlıkları karşılaştırması grafiği

Şekil 5: Grupların başlangıç (0.gün) açlık kan glukoz değerlerikarşılaştırılması grafiği

Şekil 6: Grupların başlangıç (0.gün) açlık kan glukoz değerlerikarşılaştırılması grafiği

Şekil 7: Grupların başlangıç (0.gün) ve 15. gün açlık kan glukoz değerlerikarşılaştırılması grafiği

Şekil 8: Grupların başlangıç oral glukoz tolerans test sonuçları grafiği (15.gün)

Şekil 9: Grupların lipit peroksidasyon değerlerinin karşılaştırılması grafiği

Şekil 10: Grupların süperoksit dismutaz aktivitelerinin karşılaştırılması grafiği

Şekil 11: Grupların glutatyon S-transferaz aktivitelerinin karşılaştırılması grafiği

Şekil 12: Grupların nitrik oksit değerlerinin karşılaştırılması grafiği

Şekil 13: Grupların *fgf21* mRNA ekspresyon analizi grafiği

Şekil 14: Grupların *dnmt3a* mRNA ekspresyon analizi grafiği

Şekil 15: Grupların *lepam* mRNA ekspresyon analizi grafiği

Şekil 16: K ve maruziyet gruplarının *IL21* mRNA ifade analizi grafiği

Şekil 17: K ve maruziyet gruplarının *tnfam* mRNA ifade analizi grafiği

Zebra Balıklarında Oluşturulan Tip 2 Diyabet Modelinde *Stevia rebaudiana*'nın Olası Etkilerinin İncelenmesi

Öğrencinin Adı: Esra Dandin

Danışman: Prof.Dr. Ebru Işık Alturfan

Anabilim Dalı: Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

1. ÖZET

Amaç: Çalışmamızdaki amaç, zebra balığında fazla beslenme ile oluşturulan tip 2 diyabet modelinde *Stevia rebaudiana*'nin olası etkisinin incelenmesidir.

Gereç ve Yöntem: Yetişkin zebra balıkları 15 gün boyunca fazla beslenmeye ve *Stevia rebaudiana*'nin düşük ve yüksek olmak üzere iki dozuna maruz bırakılmıştır. Buna göre Kontrol (K), Diyabet (D), Diyabet+Düşük Doz Stevia (D+DDS) ve Diyabet+Yüksek Doz Stevia (D+YDS) şeklinde gruplar oluşturulmuştur. 15 gün sonunda zebra balıklarında oral glukoz tolerans testi uygulanmış ve karaciğer-pankreas dokuları çıkarılarak homojenize edilmiştir. Deney başında ve sonunda hayvanların açlık kan glukoz düzeyleri, deney sonunda oral glukoz tolerans testi yapılmıştır. Biyokimyasal parametreler spektrofotometrik yöntemle, gen ekspresyonları RT-PCR yöntemi ile ölçülmüştür.

Bulgular: D grubunda deney süresi sonunda vücut ağırlıkları ile açlık kan glukoz düzeyleri hem kendi başlangıç değerlerine hem de K grubu 15.gün değerlerine göre artmıştır. D grubunda lipid peroksidasyon (LPO), nitrik oksit (NO) düzeyleri artmıştır, süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon S-transferaz (GST) aktiviteleri ise azalmıştır. D grubunda leptin, fibroblast büyüme faktörü 21 (*fbf21*), interlökin 21 (*IL21*) ile tümör nekroz faktörü alfanın (*tnfa*) gen ekspresyon düzeyleri artarken *dnmt3a* ekspresyon düzeyi azalmıştır.

Sonuçlar: Stevia uygulaması D grubunda bozulan oksidan antioksidan dengesini, gen ekspresyon düzeylerini ve kan glukoz düzeylerini düzeltmiştir.

Anahtar Sözcükler: Tip 2 diyabet, *Stevia rebaudiana*, leptin, fibroblast büyüme faktörü 21, tümör nekroz faktörü alfa

Investigation of the Possible Effects of *Stevia rebaudiana* on Type 2 Diabetes Model in Zebrafish

Name of the Student: Esra Dandin

Adviser: Prof.Dr. Ebru Işık Alturfan

Department:Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy

2. ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to investigate the possible effects of *Stevia rebaudiana* in a model of type 2 diabetes mellitus induced by overnutrition in zebrafish.

Materials and Methods: Adult zebrafish were exposed to overfeeding and low and high doses of *Stevia rebaudiana* for 15 days. Accordingly, Control (K), Diabetes (D), Diabetes + Low Dose Stevia (D + DDS) and Diabetes + High Dose Stevia (D + YDS) groups were formed. At the end of 15 days, oral glucose tolerance test was performed and liver-pancreas tissues were removed and homogenized. Fasting blood glucose levels of the animals at the beginning and end of the experiment and oral glucose tolerance test were performed at the end of the experiment. Biochemical parameters were measured by spectrophotometric method and gene expression was measured by RT-PCR method.

Results: At the end of the experimental period, body weight and fasting blood glucose levels increased in D group when compared with both their initial values and the 15th day of the K group. In group D, lipid peroxidation (LPO), nitric oxide (NO) levels increased, superoxide dismutase (SOD) and glutathione S-transferase (GST) activities decreased. In group D, gene expression levels of leptin, fibroblast growth factor 21 (fbf21), interleukin 21 (1L21) and tumor necrosis factor alpha (tnf α) increased while dnmt3a expression level decreased.

Conclusion: Stevia treatment corrected impaired oxidant antioxidant balance, gene expression levels and blood glucose levels in group D.

Keywords: Type 2 diabetes, *Stevia rebaudiana*, leptin, fibroblast growth factor 21, tumor necrosis factor alfa

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Endüstrileşmiş uluslarda obezite ve Tip 2 diyabet hızla artmaya devam etmektedir. Örneğin yetişkin Amerikalılar'ın yaklaşık üçte ikisi aşırı kilolu veya obezdir ve bu nedenle başta Tip 2 diyabet, kalp hastalığı ve kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların riski artmıştır (Anton ve ark., 2010). Glukoz ve fruktozdan oluşan bir disakkarit olan sakkaroz tüketiminin, spesifik bir kanıtı olmamasına rağmen, diyabetin gelişimini etkilediği ve yüksek miktarda sakkaroz içeren diyetlerin kilo alımına neden olduğu bilinmektedir (Laville ve Nazare 2009).

Bununla birlikte fruktozun aşırı tüketilmesinin, tip 2 diyabet öyküsü olan ve olmayan aile bireylerinde dislipidemi ve ektopik lipit birikimine neden olduğu ve aşırı kilolu kişilerde visceral adipoziteyi artırıp insülin duyarlılığını azalttığı bildirilmiştir (Lê ve ark., 2009). Hayvan modellerinde yüksek glisemik diyetler ve doğal şeker olarak fruktozun yüksek tüketiminin hiperinsülinemi, hiperglisemi, hipertansiyon ve insülin direnci gibi birtakım metabolik komplikasyonlara neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca fruktoz infüzyonlarının insanlarda hepatik insülin direncini indükleyebileceği de gösterilmiştir (Barros ve ark., 2007).

Son yıllarda şeker tüketimi dünyada ve ülkemizde hızlı bir artış göstermiştir. Bununla birlikte şekerle tatlandırılmış yiyecek ve içeceklerin tüketimi, hem bir öğünün hem de bir bütün olarak tüm diyetin glisemik indeksini önemli ölçüde etkileyebilir. Ayrıca, yüksek kalori alımı ve yüksek glisemik endeksli gıda tüketimi postprandiyal glukoz ve insülin seviyelerinin aşırı artışına yol açabilir ve potansiyel olarak açlığı uyaran, yağ birikimini hızlandıran metabolik ve hormonal değişikliklere yol açabilir (O'Keefe ve Bell 2007). Buna paralel olarak, yapılan çalışmalar, şekerle tatlandırılmış içeceklerin tüketiminin kilo alımını ve Tip 2 diyabet riskini artırdığını göstermektedir (Anton ve ark., 2010).

Tüm bu nedenler ile beraber toplumda oluşan kilo alma kaygısından ötürü besleyici değeri olmayan yapay tatlandırıcı içeren gıdaların ve içeceklerin tüketimi son birkaç on yılda önemli ölçüde artmıştır ve ABD nüfusunun yaklaşık % 15'inin, yapay tatlandırıcılar tükettiği tahmin edilmektedir (Mattes ve Popkin 2009). Bununla birlikte yapay tatlandırıcılar ile ilgili yapılmış çalışmaların çelişkili sonuçları

bulunmaktadır. Örneğin aspartamın gıda tüketimini azaltıp kilo kontrolünde yararlı olduğu gösterilmişse de başka çalışmalarda aspartamın iştah arttırıcı etkileri gösterilmiştir (Anton ve ark., 2010, Blundell ve Hill, 1986). Stevia, *Stevia rebaudiana* Bertoni'nin yapraklarından elde edilen yapay tatlandırıcılara alternatif olarak kullanılan doğal ve kalorisiz bir tatlandırıcıdır. Stevia'nın kemirgen modellerinde insülin duyarlılığını arttırdığı (Chang ve ark., 2005) ve insan çalışmalarında kan glukozu ve insülin seviyeleri üzerinde yararlı etkileri gösterilmiştir (Gregersen ve ark 2004). Stevia tüketiminin, aspartam ve sukroz ile karşılaştırıldığında, postprandiyal insülin seviyelerini ve glukoz seviyelerini anlamlı derecede düşürdüğü bildirilmiştir (Anton ve ark., 2010).

Obezite Tip 2 diyabet gelişimi için bağımsız bir risk faktörüdür ve Tip 2 diyabetli kişilerin% 90'ından fazlası aşırı kilolu veya obez bireylerdir. Son yıllarda epigenetik düzenleyici mekanizmaların adipozite, enerji harcanması ve gıda tüketimi gibi obezite ile ilgili mekanizmalarda önemli rol oynadığı gösterilmiştir. DNA metilasyonu gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynayan önemli bir epigenetik mekanizma olup, organizmaların düzgün gelişimi için çok önemlidir. Son yıllarda DNA metilasyonunun metabolik hastalıkların patogenezinde rolü olabileceği, yaşlanma, obezite, anoreksia ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Xie ve ark., 2013).

Zebra balıklarının, diyet ile indüklenen obezite modelinde normal beslenen balıklara göre açlık kan glukoz düzeylerinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu hiperglisemik balıkların, Tip 2 diyabette (T2DM) glukoz tolerans testi, insülin üretimi ve anti diyabetik ilaç yanıtlarının ölçümü için uygun bir model olabileceği öne sürülmüştür. Ayrıca karaciğer ve pancreas dokularının RNA-sekans analizi T2DM zebra balıklarının insanlarla benzer patolojik yolları gösterdikleri bildirilmiştir (Zang ve ark., 2017). Zang ve ark. (2017) 1 haftalık fazla beslenmenin zebra balıklarında T2DM oluşturmak için yeterli olduğunu göstermiştir.

Tüm bu bilgilerin ışığında çalışmamızda fazla beslenme yolu ile T2DM oluşturulacak zebra balıklarında stevianın dnmt3a, fgf21, leptin ve IL-21 üzerinden insülin direnci üzerine olası etkileri incelenecektir. Stevianın ayrıca glukoz toleransına ve oksidan-antioksidan denge üzerine etkileri de incelenecektir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Diyabet Hastalığı

Diabetes Mellitus (DM), yetersiz veya eksik insülin salınımı ve/veya insülinin etkili şekilde kullanılamaması sebebiyle yüksek kan glukozu seviyeleri ile karakterize kronik metabolik bir hastalıktır. İnsülin, pankreasın Langerhans adacıklarındaki beta hücrelerinde üretilen, kandaki glukozun hücre içine alınmasını sağlayan hormondur. İnsülinin yetersizliği, eksikliği ve/veya hücrelerin insüline uygun yanıtı verememesi sebebiyle kandaki glukoz hücre içerisine alınmaz ve hiperglisemi oluşur (<https://www.idf.org/our-activities/advocacy-awareness/resources-and-tools/134:idf-diabetes-atlas-8th-edition.html>, Erişim tarihi: 30 Ağustos 2019).

WHO'ya göre DM tanısı yükselmiş kan glukozunun gözlenmesiyle gerçekleşir.

Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF, International Diabetes Federation), Amerikan Diyabet Birliği (ADA, American Diabetes Association) ve Türkiye Diyabet Derneği (TDD) tarafından kabul edilmiş genel diyabet tanı kriterlerine göre aşağıdaki şartlardan birinin sağlanması diyabet tanısı için yeterlidir.

Tablo 1: Genel diyabet tanı kriterleri (<https://www.idf.org/our-activities/advocacy-awareness/resources-and-tools/134:idf-diabetes-atlas-8th-edition.html>, Erişim tarihi: 30 Ağustos 2019; ADA, 2019; https://www.turkdiab.org/admin/PICS/files/Diyabet_Tani_ve_Tedavi_Rehberi_2019.pdf, Erişim tarihi: 1 Eylül 2019)

Açlık plazma glukozu ≥ 126 mg/dL
75 gramlık glukoz yüklemesi sonucu iki saatlik plazma glukozu ≥ 200 mg/dL
Hiperglisemi semptomu olan hastalarda anlık plazma glukoz ölçümünün 200 mg/dL vedaha yüksek olması
HbA1c ≥ 6.5 %

Bozulmuş glukoz toleransı, oral glukoz tolerans testine göre normal kan glukozu aralığından yüksek ancak diyabetin tanı eşiğinden düşük olan kan glukozu seviyeleri ile karakterizedir. Prediyabet olarak tanımlanır. Açlık plazma glukozunun 126 mg/dL'den düşük olması ve oral glukoz tolerans testi için 75 gramlık glukoz tüketiminden 2 saat sonra ölçülen değerin en az 140 en çok 199 mg/dL (7.8 - 11.0 mmol/L) olması ile tanı alır (<https://www.idf.org/our-activities/advocacy-awareness/resources-and-tools/134:idf-diabetes-atlas-8th-edition.html>, Erişim tarihi: 30 Ağustos 2019).

Bozulmuş açlık glukozu, açlık plazma glukoz seviyelerinin diyabet tanı eşiğinden düşük, normal aralıktan yüksek olması, yani 110-125 mg/dL (6.1 - 6.9 mmol/L) arasında olması durumudur. Prediyabet olarak tanımlanır(<https://www.idf.org/our-activities/advocacy-awareness/resources-and-tools/134:idf-diabetes-atlas-8th-edition.html>, Erişim tarihi: 30 Ağustos 2019). Glukoz tolerans testi için 75 gramlık glukoz tüketiminden 2 saat sonra ölçülen değerin 140 mg/dL'den düşük olması gerekmektedir (ADA, 2019).

Normal aralıktan yüksek, diyabetik eşikten düşük HbA1c değerleri de (%5.7 - 6.4) T2DM riski altındaki prediyabet hastalarını tanımlamak için kullanılabilir. Prediyabete sahip bireylerin, T2DM riski yüksektir. Ancak randomize kontrollü çalışmalar, Pre diyabetin T2DM'ye dönüşmesinin sağlıklı yaşam tarzı değişiklikleriyle önlenebileceğini açıkça ortaya koymuştur (<https://www.idf.org/our-activities/advocacy-awareness/resources-and-tools/134:idf-diabetes-atlas-8th-edition.html>, Erişim tarihi: 30 Ağustos 2019).

Uzun süre kontrol altında tutulamayan hipergliseminin, tüm diyabet tiplerinde aynı kronik komplikasyonları oluşturma riski mevcuttur. (ADA, 2019) Doğru müdahalelerle bu komplikasyonların önlenmesi ve ertelenmesi mümkündür (<https://www.idf.org/our-activities/advocacy-awareness/resources-and-tools/134:idf-diabetes-atlas-8th-edition.html>, Erişim tarihi: 30 Ağustos 2019).

4.1.1. Diyabet hastalığının sınıflandırılması

Diabetes Mellitus, başlıca Tip 1 DM, Tip 2 DM, Gestasyonel DM ve diğer spesifik tipler ile belli başlı sınıflara ayrılmaktadır (https://www.turkdiab.org/admin/PICS/files/Diyabet_Tani_ve_Tedavi_Rehberi_2019.pdf, Erişim tarihi: 1 Eylül 2019). T1DM'de T2DM ile ortak olarak beta hücrelerinin sayısında ve fonksiyonunda progresif azalma görülür (ADA, 2019).

4.1.1.1. Tip 1 diyabet

Tip 1 DM, immün aracılı ve idiyopatik olmak üzere iki türe ayrılır (<https://www.idf.org/our-activities/advocacy-awareness/resources-and-tools/134:idf-diabetes-atlas-8th-edition.html>, Erişim tarihi: 30 Ağustos 2019).

İmmün aracılı T1DM, genetik ve çevresel faktörlerin etkisiyle beta hücrelerinin hücre aracılı oto immün yıkımıyla oluşan ve insülinin hiç üretilmemesi veya çok yetersiz üretilmesi sebebiyle hiperglisemiyle sonuçlanan bir hastalıktır. T1DM hastalarının yaşamlarını sürdürebilmek için insülin enjeksiyonu kullanmaları şarttır. (IDF, 2017; ADA 2019). Beta hücrelerinin yıkımının nedenleri henüz tam olarak anlaşılammış olsa da bazı toksinler, beslenme ve viral enfeksiyonlar gibi çevresel nedenlerin genetik yatkınlıkla birleşiminin sebep olduğu düşünülmektedir (<https://www.idf.org/our-activities/advocacy-awareness/resources-and-tools/134:idf-diabetes-atlas-8th-edition.html>, Erişim tarihi: 30 Ağustos 2019).

İmmün aracılı T1DM, geçmişte insülin-bağımlı veya juvenil olarak bilinen diyabet, çoğunlukla çocuk ve adölesanlarda görülür ancak aslında her yaşta, hatta 80'li ve 90'lı yaşlarda bile ortaya çıkabilir. 30 yaşından sonra yetişkinlerde görülen T1DM, erişkinde latent otoimmün diyabet olarak adlandırılır. Vakaların %5-10'u arasında bir prevalansa tekabül eden T1DM hastalığı ilk safhada çocuk ve adölesanlarda diabetik ketoasidoz ile kendini gösterirken, diğer hastalarda açık

hiperglisemisi, enfeksiyon gibi streslerle indüklenen şiddetli hiperglisemi ve/veya DKA (Diyabetik ketoasidoz) ile kendini gösterir (ADA, 2019).

İdiyopatik tip 1 dm, beta hücrelerinin oto-immün yıkımına dair kanıt olmaksızın kalıcı insülinopeni ve DKA'ya yatkınlıkla karakterize olan çok yüksek oranda genetik aktarımlı, T1DM ile benzer belirti ve semptomları olan ancak klinik ilerleyişi T2DM' ye benzeyen DM türüdür (ADA, 2019; Pinero-Pilona ve Raskin, 2001).

T1DM teşhisi için WHO'nun tanımladığı genel DM tanı kriterleri ile birlikte anormal susama durumu ve ağız kuruluğu, sık ürinyasyon, ani kilo kaybı, görmede bulanıklık, enürezi (uyurken altını ıslatma), sürekli aç ve yorgun hissetme gibi semptomların görülmesi gereklidir (<https://www.idf.org/our-activities/advocacy-awareness/resources-and-tools/134:idf-diabetes-atlas-8th-edition.html>, Erişim tarihi: 30 Ağustos 2019).

Ayrıca, T1DM'li hastaların birinci derece yakınlarında iki veya daha çok oto antikorun varlığı klinik hiperglisemi ve diyabetin neredeyse kesin bir göstergesidir. (ADA, 2019) İdiyopatik T1DM'de oto antikor görülmez (https://www.turkdiab.org/admin/PICS/files/Diyabet_Tani_ve_Tedavi_Rehberi_2019.pdf, Erişim tarihi: 1 Eylül 2019).

Günlük uygun insülin alımı, düzenli olarak kan glukozunun ölçülmesi, sağlıklı beslenmenin sürdürülmesiyle hastalar T1DM'nin olası komplikasyonlarını önleyebilir veya oluşumunu geciktirebilirler (<https://www.idf.org/our-activities/advocacy-awareness/resources-and-tools/134:idf-diabetes-atlas-8th-edition.html>, Erişim tarihi: 30 Ağustos 2019).

4.1.1.2. Tip 2 diyabet

Yaşlanan popülasyon, ekonomik gelişim, artan şehirleşme, sedanter yaşam tarzı, obeziteyle ilişkilendirilen sağlıksız besinlerin tüketimindeki artış gibi sebeplerle T2DM prevalansı tüm dünyada giderek artmaktadır. En sık görülen diyabet türüdür. Diyabet vakalarının %90'ını oluşturur. Yetişkin, çocuk ve

adölesanlarda görülen T2DM vakaları sağlıksız beslenme ve yetersiz fiziksel aktiviteye bağlı olarak giderek artmaktadır. T2DM’de yetersiz insülin üretimi ve hücrelerin insüline yanıt verme yeteneğinin azalması olarak tanımlanan insülin direnci sonucu hiperglisemi gerçekleşir. T2DM’de T1DM’de görülen semptomların yanısıra şiddetli susama, çok sık idrara çıkma, yorgunluk, yaraların geç iyileşmesi, tekrarlayan enfeksiyonlar, el ve ayaklarda uyuşma ve karıncalanma yer alır. T2DM hastalığının oluşum süreci genellikle yavaştır ve genelde akut metabolik rahatsızlıklara yol açmaz. Bu yüzden vakaların 1/3’ünden 1/2 ‘si kadar bir kısmı yıllarca teşhis konulmadan ilerler. Hatta bazı hastalar, ayak ülseri, görmede bozukluklar, böbrek yetmezliği ve enfeksiyonlar gibi diyabete bağlı komplikasyonlarla karşılaşana kadar DM teşhisi almamış olabilirler (<https://www.idf.org/our-activities/advocacy-awareness/resources-and-tools/134:idf-diabetes-atlas-8th-edition.html>, Erişim tarihi: 30 Ağustos 2019).

T2DM nedenleri henüz tam olarak anlayamamış olmakla birlikte fazla kilo, obezite, ilerleyen yaş, etnik köken ve aile öyküsü ile arasında güçlü bir bağlantı vardır (<https://www.idf.org/our-activities/advocacy-awareness/resources-and-tools/134:idf-diabetes-atlas-8th-edition.html>, Erişim tarihi: 30 Ağustos 2019; ADA 2019).

Risk faktörleri arasında obezite, sağlıksız beslenme, yetersiz fiziksel aktivite, pre diyabet, bozulmuş glukoz toleransı, sigara, gestasyonel diyabet öyküsü yer almaktadır. Son çalışmalar, şeker ile tatlandırılmış içecek tüketiminin artması ile artmış T2DM riskini ilişkilendirmişlerdir. Diğer risk faktörleri arasında doymuş yağ tüketiminin artması; sebze, meyve, tam tahıl, lif tüketiminin azalması yer almaktadır. Yapılan son çalışmalarda işlenmemiş gıda tüketiminin artması ve Akdeniz tipi beslenmeye geçilmesi gerektiği vurgulanmıştır. T2DM tedavisindeki temel ilkeler sağlıklı beslenme, fiziksel aktivite ve tütün kullanımının bırakılması ile sağlıklı beden ağırlığının devam ettirilmesidir. Ancak tüm bunların hiperglisemiyi iyileştirmekte yetersiz kaldığı noktada, dünya üzerinde en yaygın kullanılan oral antidiyabetik olan metformin kullanılır. Tek oral antidiyabetik ilaç kullanımı yetersiz kalırsa belirli ilaç tedavisi kombinasyonları denenebilir. İlaç kombinasyonlarının hiperglisemiyi hedeflenen seviyelere düşürememesi durumunda insülin enjeksiyonlarına geçilebilir (<https://www.idf.org/our-activities/advocacy->

awareness/resources-and-tools/134:idf-diabetes-atlas-8th-edition.html, Erişim tarihi: 30 Ağustos 2019)

T1DM'nin genellikle 30 yaşından küçüklerde görölmesi, başlangıç şeklinin akut ve semptomatik olması, sıklıkla ketosiz görölmesi, genellikle düşük beden ağırlığına sahip yetişkinlerde görölmesi, ailede diyabet öyküsünün olmaması veya belirgin olmaması, C-peptid düzeylerinin düşük olması, otoantikörlerin (ICA, AntiGAD, IA2Ab, IAA) genellikle pozitif olması, beraberinde bir otoimmün hastalık daha görölmesi özellikleriyle T2DM'den ayrılır (https://www.turkdiab.org/admin/PICS/files/Diyabet_Tani_ve_Tedavi_Rehberi_2019.pdf, Erişim tarihi: 1 Eylül 2019).

4.1.1.3. Gestasyonel diyabet

Hipergliseminin ilk kez gebelik sürecinde saptanması durumudur. Gebelik süresince görölen hafif hiperglisemi gestasyonel diyabet olarak adlandırılırken, şiddetli hiperglisemi gebelik hiperglisemisi olarak adlandırılır. Vakaların %75-90'ı gestasyonel diyabettir. Genellikle gebeliğin ikinci ve üçüncü trimesterında görölmekle birlikte herhangi bir dönemde görülebilir. GDM (Gestasyonel diyabet) semptomlarını gebeliğin kendi semptomlarından ayırt etmek mümkün olmayabilir. Teşhis için oral glukoz tolerans testi (OGTT) uygulanmalıdır. Sağlıklı gebelere 24-28. haftalarında, yüksek riskli gebelere ise daha erken uygulanabilir (<https://www.idf.org/our-activities/advocacy-awareness/resources-and-tools/134:idf-diabetes-atlas-8th-edition.html>, Erişim tarihi: 30 Ağustos 2019).

OGTT, bir ve iki aşamalı olarak iki farklı şekilde uygulanabilir. Tek adımlı OGTT stratejisinde gebeliğinin 24.-28. haftaları arasındaki daha önceden DM tanısı almamış gebelere en az 8 saatlik gece aılığı ardından 75 gramlık glukoz yüklemesi yapılır ve aılık kan şekeri, yüklemeyi takiben 1.saat ve 2.saat sonundaki kan glukozu değerlerine bakılır. Aşağıdaki değerlerden herhangi birine ulaşılmasıyla GDM teşhisi konulur (ADA, 2019).

- ✓ Aılık kan glukozu: 92 mg/dL (5.1 mmol/L)

- ✓ 1.saat: 180 mg/dL (10.0 mmol/L)
- ✓ 2.saat: 153 mg/dL (8.5 mmol/L)

İki adımlı OGTT stratejisinde, gebeliğinin 24.-28. haftaları arasındaki daha önceden DM tanısı almamış gebelere 50 gram glukoz yüklemesi yapılır ve 1.saat sonundaki kan glukozu 130 mg/dL, 135 mg/dL veya 140 mg/dL'den yüksekse gebeye açken 100 gram glukoz yüklemesi yapılır ve açlık durumunda, 1.,2.,3.saat sonundaki kan glukozuna bakılır. The American College of Obstetricians and Gynecologist üç eşik değeri de kabul eder. Bu değerlerin birbirlerine göre sensitivite ve spesifite açısından üstün ve zayıf yönleri vardır. Teşhis için aşağıdaki değerlerden en az ikisinin karşılanması gereklidir(https://www.turkdiab.org/admin/PICS/files/Diyabet_Tani_ve_Tedavi_Rehberi_2019.pdf, Erişim tarihi: 1 Eylül 2019).

- ✓ Açlık kan glukozu ≥ 95 mg/dL (5.3 mmol/L)
- ✓ 1.saat: 180 mg/dL (10.0 mmol/L)
- ✓ 2.saat: 155 mg/dL (8.6 mmol/L)
- ✓ 3.saat: 140 mg/dL (7.8 mmol/L)

GDM risk faktörleri arasında ileri yaş, fazla kilo, obezite, gebelik sürecinde fazla kilo artışı, ailede DM varlığı, önceden yapılmış düşük ve önceden doğumsal abnormaliteyle doğmuş bebektir. GDM genellikle geçici bir durumdur. Ancak GDM'li kadınların sonraki gebeliklerinde tekrar GDM ile karşılaşma riskleri yüksektir. GDM geçmişine sahip kadınların yarısı doğum sonrası 5 ile 10 yıl arası bir süreçte T2DM oluştururlar. GDM'li bir gebelikten doğan bebeklerin hayatları boyunca obezite ve T2DM riskleri yüksektir. GDM, makrosoma ve annede yüksek kan basıncı gibi bazı olumsuz durumlara yol açabilir. GDM'li kadınlar sağlıklı beslenme, hafif egzersiz ve kan glukozunun düzenli kontrol edilmesiyle hiperglisemiye kontrol altına alabilir, gerekirse oral ilaç veya insülin enjeksiyonu kullanabilirler (<https://www.idf.org/our-activities/advocacy-awareness/resources-and-tools/134:idf-diabetes-atlas-8th-edition.html>, Erişim tarihi: 30 Ağustos 2019)

4.1.1.4. Monogenik diyabet-dençlerde görülen T2DM (MODY, Maturity diabetes onset of the young)

Obez olmayan gençlerde 25 yaşından önce ortaya çıkan, adacık otoantikörlerinin negatif olduğu en az 2-3 kuşakta görölerek otozomal geçişi sağlanan primer defekt insülin sekresyonu bozukluğudur. İnsülinin etkisinde bozukluk minimal düzeyde görülür veya hiç görülmez(https://www.turkdiab.org/admin/PICS/files/Diyabet_Tani_ve_Tedavi_Rehberi_2019.pdf, Erişim tarihi: 1 Eylül 2019).ADA 2019).

Diğer DM türleri: Neonatal DM, kistik fibroz ve pankreatite bağı DM, ilaç ve kimyasallarla indüklenen HIV/AIDS ve organ nakli sonrasındaki tedavilerde glikokortikoid kullanıma bağı DM, beta hücre fonksiyonunun genetik defektleri, insülinin etkisinde genetik defektler, endokrinopatilere bağı DM, infeksiyonlara bağı DM, belirli hastalıklarla eşlik eden DM olarak sıralanabilir(https://www.turkdiab.org/admin/PICS/files/Diyabet_Tani_ve_Tedavi_Rehberi_2019.pdf, Erişim tarihi: 1 Eylül 2019; ADA 2019).

4.2. Diyabet Hastalığının Klinik Belirtileri

4.2.1. Diyabetin primer etkileri

4.2.1.1. Hipoglisemi

Hipoglisemi, diyabetin en sık karşılaşılan akut komplikasyonudur. Kan glukoz seviyesinin aniden 70 mm Hg ve altına düşmesi ile tanımlanır. Hipogliseminin semptomları titreme, terleme, anksiyete, acıkma, çarpıntı, disoryantasyon, zihinsel bulanıklık, konuşmada bozulmalar, letarji, titreme nöbetleri ve bilinç kaybıdır. T1DM ve T2DM hastalarında morbiditenin artmasına sebep olabilirken, etkisi bazen ölüme kadar gidebilir. Hipogliseminin sebepleri arasında insülin enjeksiyonları ve oral sekretagog ilaçların kullanımında doz aşımaları,

zamanlama hataları, öğün atlanması, yetersiz besin alımı, planlanmamış, yüksek yoğunluklu ve uzun süreli fiziksel aktiviteler, besinsiz alkol alımı yer alır (Mahan ve Raymond, 2017).

4.2.1.2. Diyabetik ketoasidoz

İnsülin eksikliğine bağlı olarak glukozun kullanılmaması sonucu vücudun enerji kaynağı olarak yağları kullanması ve keton üretmesidir. Karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasında bozulmalara yol açar. Acil müdahale ile kontrol altına alınmazsa hayatı tehdit edici özellikte olabilir(Mahan ve Raymond, 2017).

Kanda ve idrarda keton bulunması ve 250-600 mg/dL hiperglisemi ile karakterizedir. DKA, T1DM'li çocuklarda en önemli morbidite ve mortalite nedenidir. Semptomları arasında bulantı, kusma, karın ağrısı, polidipsi, poliüri, hiperventilasyon, nefeste meyvemsi koku, dehidrasyon, bitkinlik yer alır. Acil müdahale yapılamayan, kontrol altına alınamayan DKA, hastayı bilinç bulanıklığı ve komaya kadar götürebilir. DKA'ya acil durum müdahale ilkeleri intravenöz insülin infüzyonu, sıvı ve elektrolit replasmanı ve eşlik eden hastalıkların tedavisi şeklindedir. (Mahan ve Raymond, 2017;

https://extranet.who.int/ncdccs/Data/TUR_D1_T%C3%BCrkiye%20Diyabet%20Program%C4%B1%202015-2020.pdf , Erişim tarihi: 30 Ağustos 2019).

4.2.1.3. Açlık hiperglisemisi

Diyabetli kişilerde kan glukozunu normal düzeyde tutmak için gereken insülin miktarı gün doğumu öncesinde, gün doğumu vaktine göre daha azdır. Gün doğumunda yetersiz kalan insülin düzeyi hiperglisemiye sebep olur. Bu durum gün doğumu (dawn) fenomeni olarak bilinir. Bu durum aynı zamanda, gece hepatik glukoz çıkışının aşırı miktarda olmasından da kaynaklanabilir. Bunu önlemek için saat 02.00-03.00'te kan glukozu ölçümü yapılması, T2DM'de hepatik glukoz çıkışını azaltacak metformin kullanımını, T1DM'de, gün doğumu öncesindeki vakitte pik etki göstermeyen uzun etkili insülin kullanılmalıdır. Hipoglisemiyi takip eden

hiperglisemi ise Somogyi etkisi olarak adlandırılır. Hipoglisemi sırasında salınan karşıt düzenleyici hormonlar olan glukagon, epinefrin, büyüme hormonu ve kortizol etkisiyle meydana gelir. Hepatik glukoz üretiminin uyarılması sonucu da kan glukozu yükselir. Eğer somogyi etkisi tanımlanamaz ve insülin dozları arttırılırsa, fazla insülinlenme gerçekleşebilir. Uzun vadeli insülinler ve gece alınan insülin dozunu düşürmek gereklidir. (Mahan ve Raymond, 2017)

4.2.1.4. Hiperglisemik hiperosmolar durum

Oluşum mekanizması DKA ile benzerdir. DKA'dan farklı olarak dehidratasyon daha ön plandadır ve az miktarda var olan insülin keton oluşumunu engeller. İleri derecede hiperglisemi (genelde 600 mg/dL'den yüksek), hiperozmolarite, bilinç bulanıklığı veya kaybı ile karakterizedir (https://extranet.who.int/ncdccc/Data/TUR_D1_T%C3%BCrkiye%20Diyabet%20Program%C4%B1%202015-2020.pdf , Erişim tarihi: 30 Ağustos 2019).

4.2.1.5. Laktik asidoz

Genellikle altta yatan ağır hastalığı bulunan, metformin kullanan yaşlı hastalarda nadir olarak görülen, dokulara yeterli oksijenin gitmemesi ve kullanılamamasından kaynaklanan ağır bir asidoz durumudur(https://extranet.who.int/ncdccc/Data/TUR_D1_T%C3%BCrkiye%20Diyabet%20Program%C4%B1%202015-2020.pdf , Erişim tarihi: 30 Ağustos 2019).

4.2.2. Diyabetin sekonder etkileri

4.2.2.1. Kardiyovasküler hastalıklar

Kardiyovasküler hastalıklar, T2DM'de başlıca ölüm nedenidir. Diyabetli bireylerdeki kardiyovasküler hastalık hastalığı ihtimali diyabeti olmayan bireylere göre 2-3 kat daha fazladır. Kardiyovasküler hastalık için en büyük risk faktörü

hipertansiyondur. Diyabetli kişilerin %67'si 140/90 mm Hg veya daha fazla kan basıncına sahiptir. Hipertansiyon T1DM hastalarında genelde diyabetik böbrek hastalığına bağlıyken, T2DM'de diğer kardiyometabolik risk faktörleriyle ilişkilidir. Diyabet, yüksek kan basıncıyla olduğu gibi yüksek kolesterol düzeyleriyle de ilişkilidir. Bu faktörler anjina, koroner arter hastalığı, miyokardial infarktüs, felç, periferik arter hastalığı, doğuştan kalp yetmezliği risklerini arttırmaktadır. Artmış kardiyovasküler hastalık riski T2DM hastalarının prelinik dönemlerinden itibaren başlamış olabilir. Ayrıca, kardiyovasküler hastalıktan kaynaklanan harcamalar, toplam sağlık harcamalarının en büyük kısmını oluşturmaktadır. Ortalama olarak, diyabet tanısı almış bireylerin medikal harcamalarının, diyabet tanısı almamış olsalardı yapmaları beklenen harcamadan 2 kat fazla olacağı tahmin edilmektedir. Kardiyovasküler hastalıkların yüksek risk gruplarında önlenmesi mortalite oranlarını düşürebilmekle beraber kalp krizi ve felcin sebep olduğu ekonomik harcamaları da düşürebilmektedir. Uzun vadeli tıbbi takiplerle T1DM ve T2DM hastalarının kardiyovasküler hastalık olgularında ciddi düşüşler gözlenmiştir. Kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi için ideal kilonun devam ettirilmesi, şeker, tuz ve yağ tüketiminin azaltılması, sebze meyve tüketiminin artırılması, fiziksel aktivitenin artırılması, aşırı alkol tüketiminden kaçınılması ve tütün ürünleri kullanımının sonlandırılması gerekmektedir. Ayrıca, yüksek risk gruplarında metabolik parametrelerin kontrolü için glukoz düşürücü ilaçlar, antihipertansifler, statin, aspirin kullanımı gerekebilir

(https://www.turkdiab.org/admin/PICS/files/Diyabet_Tani_ve_Tedavi_Rehberi_2019.pdf, Erişim tarihi: 1 Eylül 2019; Mahan ve Raymond, 2017).

4.2.2.2. Nefropati

Diyabetik nefropati, glomerül içi arteriollerin hasarına bağlı olarak proteinüri, hipertansiyon ve böbrek fonksiyonlarındaki progresif azalma ile karakterize bir mikrovasküler diyabet komplikasyonudur. Diyabet, hipertansiyon ve böbrek yetmezliği birbiriyle bağlantılıdır. T2DM, hipertansiyon riskini arttıran böbrek yetmezliğinin başlıca sebeplerinden biriyken, hipertansiyon böbrek hastalığını ilerletebilir. Hiperglisemi, böbrek hastalığının prediktörü olan hiperfiltrasyonu

indükler. Son dönem böbrek yetmezliği diyabetli bireylerde diyabeti olmayan bireylerden 10 kat fazla görülmektedir. Avrupa ve Amerika’da diyabet hastalarının %20-40’ında diyabetik böbrek hastalığı veya nefropati bulunmaktadır ((https://www.turkdiab.org/admin/PICS/files/Diyabet_Tani_ve_Tedavi_Rehberi_2019.pdf, Erişim tarihi: 1 Eylül 2019; Mahan ve Raymond, 2017).

54 ülkeden toplanılan verilere göre, son dönem böbrek yetmezliği vakalarının %80’i diyabetten, hipertansiyondan veya her ikisinden birden kaynaklanmaktadır. Klinik nefropatisi olan diyabetli bireylerin sağlık harcamaları, nefropatisi olmayan diyabetli bireylere göre %50 daha fazladır. Bu ekonomik yükten kurtulmanın etkili yolu en başta diyabeti önlemektir. Diyabetli bireylerde ise nefropatiyi erken safhada saptamaktır. Bu amaçla, T1DM’li hastalarda tanıdan 5 yıl sonra, T2DM’li hastalarda tanıdan itibaren her yıl albumin/kreatinin oranı (ACR) ve glomerüler filtrasyon hızı ölçümü suretiyle gerekli taramalar yapılmalıdır(https://www.turkdiab.org/admin/PICS/files/Diyabet_Tani_ve_Tedavi_Rehberi_2019.pdf, Erişim tarihi: 1 Eylül 2019).

Diyabet ve kronik böbrek hastalığı, kardiyovasküler hastalıklar ile yakından ilişkili olduğu için, hipertansiyon ve hiperglisemi gibi kardiyovasküler risk faktörlerinin kontrolü çok önemlidir. Hiperglisemi ve hipertansiyon kontrolü nefropati riskini de azaltabilmekte veya ilerlemesini geciktirebilmektedir. Kan glukozunun ve kan basıncının kontrolü diyabetik böbrek hastalığı riskini azaltmak ve ilerlemesini durdurma için optimize edilmelidir. Albuminüri durumunda renin-angiotensin aldosteron sistemini baskılayan ilaçların kullanımı diyabetli bireylerde kronik böbrek yetmezliğinin oluşumu ve ilerlemesini önlemek için çok işlevseldir (https://www.turkdiab.org/admin/PICS/files/Diyabet_Tani_ve_Tedavi_Rehberi_2019.pdf, Erişim tarihi: 1 Eylül 2019; <https://www.idf.org/our-activities/advocacy-awareness/resources-and-tools/134:idf-diabetes-atlas-8th-edition.html>, Erişim tarihi: 30 Ağustos 2019).

4.2.2.3. Retinopati

Diyabetik göz hastalıkları, retinal kapillerlerin yüksek kan glukoz seviyeleri yüzünden hasar görmesi sonucu kapiler sızıntı ve blokajlara yol açarak gelişen, ilerleyici, retinada yapısal ve fonksiyonel değişikliklere yol açan nörovasküler bir hastalıktır. Diyabetik göz hastalığı spektrumunda diyabetik retinopati, diyabetik maküler ödem, karatakt, glukoma, odaklanma yetisinde azalma, çift görme yer alır. Görme kaybı ve körlükle sonuçlanabilir. Uluslararası Körlüğü Engelleme Birliği (IAPB), 2015'te 145 milyon kişinin diyabetik retinopatisi olduğunu ve 45 milyon kişinin görme yetisini tehdit edici derecede diyabetik retinopatisi olduğunu belirtmiştir. Diyabetli kişilerde retinopati prevalansı %35'tir (<https://www.idf.org/our-activities/advocacy-awareness/resources-and-tools/134:idf-diabetes-atlas-8th-edition.html>, Erişim tarihi: 30 Ağustos 2019;https://www.turkdiab.org/admin/PICS/files/Diyabet_Tani_ve_Tedavi_Rehberi_2019.pdf, Erişim tarihi: 1 Eylül 2019). 20-74 yaş arası yetişkinlerdeki körlüğün en sık görülen sebebini diyabetik nöropati olduğu varsayılmaktadır (Mahan ve Raymond, 2017).

Diyabetik göz hastalıkları, ilk evrelerde oldukça asemptomatiktir. Bu yüzden diyabetli kişilerde diyabetik retinopati izleminin düzenli aralıklarla yapılması önemlidir. Diyabetik retinopatinin görülme sıklığı ve progresyonu birçok faktörden olumlu ve olumsuz etkilenebilmektedir. Modifiye edilemeyen risk faktörleri arasında diyabetin süresi yer alırken, modifiye edilebilir risk faktörleri arasında glisemi, kan basıncı, dislipidemi kontrolü bulunur. Bu faktörlerin regülasyonu, hastalığı önleyebilmekle birlikte, seyrini ve tedavisini olumlu etkileyebilmektedir. IDF tarafından, beslenme ve gerekirse ilaçla sağlanan etkin glisemik kontrol diyabetik retinopatinin oluşumunu %76 oranında; insülin tedavisi gören hastalarda diyabetik retinopati ilerleyişini %54 oranında önleyebileceği bildirilmektedir(<https://www.idf.org/our-activities/advocacy-awareness/resources-and-tools/134:idf-diabetes-atlas-8th-edition.html>, Erişim tarihi: 30 Ağustos 2019).

4.2.2.4. Nöropati

Diyabetik nöropati, yüksek kan glukozunun vücudun tamamına yayılmış sinirlerde hasara yol açmasıdır (<https://www.idf.org/our-activities/advocacy-awareness/resources-and-tools/134:idf-diabetes-atlas-8th-edition.html>, Erişim tarihi: 30 Ağustos 2019). Diyabetin en sık karşılaşılan komplikasyonlarından biridir (https://www.turkdiab.org/admin/PICS/files/Diyabet_Tani_ve_Tedavi_Rehberi_2019.pdf, Erişim tarihi: 1 Eylül 2019). CDC (Hastalık kontrol ve önleme merkezleri) göre, diyabetli kişilerin %60-70'inde sinir sistemi hasarı görülmektedir (Mahan ve Raymond, 2017).

Sinir hasarı yaralanmaların farkedilmemesine sebep olduğu için ülserleşmelerine, ciddi enfeksiyonlara hatta bazı durumlarda amputasyonlara sebep olabilirler. Diyabetik nöropati, vücuda yayılan sinirlerin aktivitelerinde bozulmalara yol açtıklarından dolayı otonomik, motor ve duyuşal fonksiyonların olumsuz etkilenmesine neden olur (<https://www.idf.org/our-activities/advocacy-awareness/resources-and-tools/134:idf-diabetes-atlas-8th-edition.html>, Erişim tarihi: 30 Ağustos 2019).

Diyabetik nöropatinin en sık karşılaşılan türü periferik nöropatidir (<https://www.idf.org/our-activities/advocacy-awareness/resources-and-tools/134:idf-diabetes-atlas-8th-edition.html>, Erişim tarihi: 30 Ağustos 2019). T2DM hastalarında DM teşhislerini takiben her yıl; T1DM hastalarında teşhisten 5 yıl sonrasında itibaren her yıl nöropati taraması yapılmalıdır (ADA, 2019).

Kardiyovasküler nöropati, postural hipotansiyon ve kardiyak sinir impulslarına cevapta azalmalar sonucu sessiz ve ağrısız iskemik kalp hastalığıyla sonuçlanabilir (Mahan ve Raymond, 2017).

Diyabetik nöropati aynı zamanda, erektil fonksiyon bozukluğu, sindirim problemleri ve üriner problemlere yol açabilir (<https://www.idf.org/our-activities/advocacy-awareness/resources-and-tools/134:idf-diabetes-atlas-8th-edition.html>, Erişim tarihi: 30 Ağustos 2019).

Alta yatan sinir hasarının tedavisi mümkün olmamakla beraber; kan glukoz seviyelerinin optimum kontrolü T1DM’de nöropati gelişimini önleyebilir ve geciktirebilir. T2DM’de ise ilerleyişini yavaşlatabilir (ADA, 2019).

Diyabetik otonomik nöropatiler kapsamında, gastrointestinal nöropatiler, gastroüriner rahatsızlıklar bulunmaktadır. Diyabetik otonomik nöropatiler arasında hipoglisemiyi farkına varamama, dinlenme taşikardisi, ortostatik hipotansiyon, gastroparez, konstipasyon, diyare, fekal inkontinans, erektil disfonksiyon, sudomotor disfonksiyonu, çok veya az terleme, ösofagel dismotilite yer almaktadır (https://www.turkdiab.org/admin/PICS/files/Diyabet_Tani_ve_Tedavi_Rehberi_2019.pdf, Erişim tarihi: 1 Eylül 2019).

4.2.2.5. Diyabetik ayak

Diyabetik ayak, motor, duyuşsal ve otonom nöropatiye bağılı olarak ortaya çıkan ülserleşebilen kronik derin doku lezyonları ile karakterize, ayakta biyomekanik anormallik ve deformatelerle sonuçlanan bir DM komplikasyonudur (<https://www.idf.org/our-activities/advocacy-awareness/resources-and-tools/134:idf-diabetes-atlas-8th-edition.html>, Erişim tarihi: 30 Ağustos 2019; https://www.turkdiab.org/admin/PICS/files/Diyabet_Tani_ve_Tedavi_Rehberi_2019.pdf, Erişim tarihi: 1 Eylül 2019). Diyabetik nöropati ve perifer arter hastalığının etkisiyle, ayak ülserleri ve amputasyonlarına kadar ilerleyebilir (ADA, 2019).

Düşük ve orta gelirli ülkelerde daha yaygın olmakla birlikte, yüksek gelirli ülkelerde diyabetli kişilerde ayak ülserinin yıllık insidansı %2 iken diyabetli kişilerin %1’i amputasyon geçirmektedir. Diyabetik ayak prevalansı erkeklerde daha yüksek ve T2DM’lilerde T1DM’ye göre daha yaygındır. İleri yaş, uzun diyabet süreci, hipertansiyon, diyabetik retinopati ve sigara diyabetik ayak hastalarının karakteristik özellikleri arasındadır. Diyabetik ayağı sahip DM hastaları diyabetik ayak problemi olmayan DM hastalarına kıyasla 5 kat daha fazla sağılık harcaması yapmaktadır. İleri derecedeki ayak ülserlerini tedavi masrafı düşük derecedekilerden 8 kat daha fazladır. HbA1c değerini %7’den düşürebilecek etkili bir glisemik kontrol

ampütasyon riskini %35 azaltabilir (<https://www.idf.org/our-activities/advocacy-awareness/resources-and-tools/134:idf-diabetes-atlas-8th-edition.html>, Erişim tarihi: 30 Ağustos 2019).

4.2.2.6. Oral sağlık

Kan şekeri regülasyonu kontrol altında olmayan diyabetli kişiler periodontit ve gingival hiperplazi riski altındadır. Periodontit, diş kaybının temel sebebi olmakla birlikte kardiyovasküler hastalıklarla ilişkilidir. Diyabetle ilişkili diğer oral hastalıklar diş çürümesi, kandidiyaz, liken planus, yanan ağız sendromu, tükürük disfonksiyonu, kserostomi, tat almada yetisinde bozulmalardır. Periodontal hastalıkların prevalansı diyabetli kişilerde (%92,6) diyabetli olmayanlara göre daha yüksektir. ABD’de yapılan bir çalışma ile, oral bakım sayesinde diyabetli kişilerin ağız sağlığı harcamalarında 39-53 milyar dolar karda olabileceklerini öne sürmüştür (<https://www.idf.org/our-activities/advocacy-awareness/resources-and-tools/134:idf-diabetes-atlas-8th-edition.html>, Erişim tarihi: 30 Ağustos 2019).

4.2.2.7. Hamilelikle ilişkili diyabetik komplikasyonlar

Hamilelikte yüksek kan glukozu seviyeleri fetal kayıp, konjenital malformasyon, düşük, perinatal ölüm, pre-eklempsi, eklempsi, obstetrik komplikasyon, maternal morbidite ve hamilelikle ilişkili mortalite riskini artırır. Yüksek kan glukozu aynı zamanda makrosomi, düşük doğum ağırlığı, omuz distoksisine ve böylece doğum anında problemlere yol açarak anne ve bebekte hasarlara sebep olabilir. Ayrıca, doğumdan sonra bebekte düşük kan glukozuna, sarılığa, nefes alma problemlerine sebep olabilir. Diyabetik intrauterin ortama maruz kalan bebekler gelecek yaşantılarında daha erken T2DM’ye yakalanma riski taşırlar. Hamilelik hiperglisemisinin hamilelik ve doğum vakası başına yıllık bütçeye etkisi ortalama olarak ekstra 16000 dolardır. Amerika’dan başka bir çalışma, diyabetli gebelerin ek harcamalarının diyabeti olmayan gebeliklere göre %30 daha fazla olduğunu göstermektedir. Hamilelikte kan glukozunun izlemi ve kontrolü olumsuz doğumsal sonuçların riskini düşürmek açısından çok önemlidir. Hamilelik

hiperglisemisinin izlem ve teşhisinde vücudun glukozu kullanma yetisini ölçmek amaçlı oral glukoz tolerans testi kullanılmaktadır (<https://www.idf.org/our-activities/advocacy-awareness/resources-and-tools/134:idf-diabetes-atlas-8th-edition.html>, Erişim tarihi: 30 Ağustos 2019).

4.3. Tip 2 Diyabet Gelişiminde Etkili Moleküler Mekanizmalar

İnsülin direnci, reseptör ve efektörlerdeki bazı mutasyonlar ve posttranslasyonel modifikasyonlardan dolayı insülin sinyalinde azalmanın sonucudur. Son yıllarda, inflamasyon, endoplazmik retikulum stresi ve mitokondriyel disfonksiyonun insülin direncini desteklediği anlaşılmıştır.

Normal şartlarda, insülinin biyolojik fonksiyonu bir membran proteini olan ve iki alfa, iki beta alt biriminden oluşan reseptörüne bağlandığında başlar. Beta alt birimleri, hücre dışı, transmembran ve hücre içi tirozin kinaz bölümlerinden oluşur. Hücre içi tirozin kinaz bölümü intrinsik otofosforilasyonla aktive edilen bir bölümdür.

İnsülinin, reseptörün alfa alt birimine bağlanmasıyla konformasyonel değişimler gerçekleşir. Bu değişimler katalitik aktiviteyi ve beta alt biriminin sitozolde bulunan kısımlarındaki tirozin kalıntılarının otofosforilasyona uğramasını indükler. Otofosforilasyona uğrayan kalıntılar IRS (İnsülin Reseptör Substratı) olarak bilinen adaptör proteinler tarafından tanınabilir hale gelir. IRS moleküler komplekslerin oluşumunu organize eden ve hücre içi sinyal kaskadlarını uyaran bir moleküldür.

Sonraki basamaklarda insülinin birçok işlevi iki temel sinyal yolağının aktifleşmesiyle gerçekleşir: PI3K/Akt ve MAPK/Ras yolakları.

İnsülin reseptör düzenlenmesiyle ilişkili diğer mekanizma beta alt birimlerindeki Ser/Thr kalıntılarının fosforilasyonudur. Bu fosforilasyonun insülinin reseptörüne bağlanmasına yanıt olarak kinaz aktivitesini etkilediği ve bu durumun

insülin direnci ve obezite oluşturulan rodent ve insanlarda bozulmalara uğradığı bilinmektedir.

IRS'nin Ser/Thr kalıntılarından bazılarının hiperfosforilasyona uğramasının da insülin sinyal inhibisyonunda anahtar mekanizmalardan biri olduğuna dair deneysel kanıtlar bulunmaktadır.

IRS'nin Ser/Thr kalıntılarındaki hiperfosforilasyonun, IRS'nin tirozin fosforilasyonunda azalmalara ve PI3K yolağıyla etkileşimlerin azalmasına, Akt kinaz fosforilasyonunun bozulmasına yol açar. Akt, kas ve adipoz dokuda glukozun hücre içine alımının GLUT4 translokasyonu ile gerçekleşmesinde görevlidir.

Özetle, insülin direnci mekanizmaları, insülin reseptörlerinin sayı ve katalitik aktitesinde azalma, insülin reseptör ve IRS'de artmış Ser/Thr fosforilasyonu, tirozin fosfataz aktivitesinde artış, PI3K ve Akt aktivitesinde azalma, GLUT4 ekspresyon ve fonksiyonunda azalmalar şeklinde sıralanabilir. Proinflamatuvar sitokinler, doymuş yağ asitleri, aminoasitler, endotelin I, anjiotensin II kinaz aktivitesini yükselten etkenlerdendir.

Bu bozulmalar kas ve adipoz dokuya glukoz alımında sorunlara yol açar ve metabolik düzeyde etkilere sebep olur.

Klinik çalışmalarda artmış IRS fosforilasyonunun IRS-1 ekspresyonunun %54 düşmesiyle ilişkili olduğu görülmüştür. Biyokimyasal ve genetik bulgular, Ser/Thr hiperfosforilasyonunun insülinle uyarılan Tyr fosforilasyonunu %50 azalttığı yönündedir. Beta hücrelerinin telafi amaçlı hiperinsülinemiye yol açmasının ve bu düşüşlerin de etkisiyle glukoz intoleransı T2DM'ye dönüşebilir. (Gutiérrez-Rodelo ve ark., 2015)

Tip 2 diyabet, periferel hedef dokulardaki fonksiyonel glukoz taşıyıcılarının populasyonundaki azalmadan kaynaklandığı düşünülen insülin direnci ile karakterizedir. Bunun altında yatan sebep kas hücrelerinde insülin stimülasyonuna cevap olarak glukoz taşıyıcı moleküllerinin translokasyon gerçekleştirmeleri ve hücre yüzeyine ulaşamamalarıdır. Adipositlerde ise bozulan translokasyonla birlikte, pretranslasyonel GLUT4 (Glukoz taşıyıcı 4) mRNA'sının eksikliğidir. İnsülin direncindeki sorun, insülinin hedef hücrelerdeki reseptörlere bağlanmasından sonra gerçekleşen hücrenin sinyale yanıt vermesi sürecindeki olaylar sekansında

gerçekleşir. Deneysel kanıtlar hücrenin glukoz taşıyıcılarının sentez ve mobilizasyonundaki sorunlardan kaynaklanabileceğini göstermektedir. İskelet kası hücrelerindeki insülin direnci glukoz taşıyıcılarının aktivitesinin düşmesi ve insüline yanıt olarak translokasyon gerçekleştirilememesi ile ilişkilidir. Buradaki hatanın, translokasyon sürecini başlatacak insülin sinyali iletim sekanslarındaki blokajdan kaynaklandığı düşünülmektedir. Bunun sonucunda, hücrenin yüzeyinde düşük glukoz taşıyıcısı konsantrasyonu ve bunu takiben azalmış glukoz alım hızı gerçekleşir. Buna benzer bir durum, obezite hastalarında ve T2DM hastalarının adipoz dokularında da gözlenmektedir; ancak buradaki temel problem adipositlerde GLUT4 kodlayıcı mRNA'ların ciddi düzeydeki eksikliğidir. Bu defekt pretranslasyoneldir. Yani protein sentezine translasyon basamağından önce mRNA şablonu gereken basamakta interferans yapmaktadır. Dolayısıyla bu durumda glukoz taşıyıcı translokasyonunda sorun çıkmayacak olsa bile, hücre yüzeyinde insülin stimülasyonuna gerekli yanıtı verecek yüzey reseptörü bulunmayacaktır (Gropper ve ark., 2009).

4.4. Tip 2 Diyabet ve Obezite İlişkisi

Günümüzde Amerikan toplumunun üçte ikisi fazla kilolu veya obezdir. Obezite, fiziksel ve psikososyal sağlığı tehdit edecek düzeyde adipoz doku birikimi ile tanımlanmaktadır. Obeziteyle ilişkilendirilen T2DM'nin 2030 yılında dünyada 360 milyon kişiyi etkileyeceği öngörülmektedir. Beden kütle indeksi ile diyabet ve insülin direnci arasında ciddi bir bağlantı vardır. Vücut kütle artışı T1DM ve T2DM oluşumu ve bunların yükselen insidansları için ciddi önem taşır. Obezite de T2DM gibi insülin direnciyle ilişkilendirilir ancak obez bireylerde yeterli düzeyde insülin salınımı mümkün olabileceği için her obez bireyde hiperglisemi görülmeyebilir (Al-Goblan ve ark., 2014).

T2DM pankreatik beta hücrelerinden salgılanan insülinin üretiminde düşme ve periferik insülin direnci ile ifade edilir. T2DM metabolik ve multifaktöriyel bir hastalıktır. Genetik, epigenetik, çevresel faktörlerden etkilenir. Bu faktörlerin içinde diyet ve fiziksel aktivite de yer alır. IDF, 2017'de dünyada 20-79 yaş arasındaki DM

hastalarının 425 milyondan fazla olduğunu belirtmiştir. Bu pandemik hastalık yol açtığı ekonomik bedel, sosyal tehlikeler ile morbidite ve mortalite oranları düşünüldüğünde bir an önce durdurulması gerekmektedir (Al-Goblan ve ark., 2014).

Obezite birçok medikal, psikososyal ve sosyal problemlere yol açar. Bunların arasında T2DM de yer alır. Çocuklar ve yetişkinler arasında hızla artan T2DM insidansı obezite ile ilişkilidir (Al-Goblan ve ark., 2014).

T2DM'de görülen insülin direncinin visceral adipozitedeki artış ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. İnsülin direncinin sonucu olarak, iskelet kasındaki ve diğer periferik hedef dokulardaki insülin aracılı glukoz alımı azalır ve alfa hücrelerinden salgılanan glukagondaki artış sebebiyle karaciğerdeki glukoz üretimi ve adipoz dokudan serbest yağ asiti mobilizasyonu artar. Bu durum postprandiyal hiperglisemi ve ardından açlık hiperglisemisine sebep olur (Bundgaard ve ark., 2019; Al-Goblan ve ark., 2014).

İnsülin direnci plazmadaki serbest yağ asitlerini yükseltir. Bunu kas hücrelerine glukoz transportunu azaltıp, yağların parçalanması arttırarak ve bunun sonucunda hepatik glukoz üretiminde artışa yol açarak gerçekleştirir. İnsülin direnci ve pankreatik beta hücresi disfonksiyonu T2DM oluşumu için gereklidir. İnsülin sekresyonunda bulunan genetik abnormaliteler, sürekli olarak kan glukozunun yüksek olması ve zaman içinde bu durumun devam etmesi beta hücrelerinin disfonksiyonel hale getirir. Beta hücresi disfonksiyonunun sürekli olarak kötüleşmesi T2DM oluşumunun en önemli sebeplerindendir. Literatüre göre, beta hücresi disfonksiyonu insülin sekresyonunda azalmalara yol açtıkça açlık kan glukozu ve postprandiyal kan glukozu yükselecektir. Takiben karaciğerdeki glukoz üretiminin inhibisyonu eşliğinde hepatik glukoz alımı ve kas hücrelerinin glukoz alımında azalmalar oluşacaktır. Kan glukozunun daha da artmasıyla hastalık kötüye gidecek, beta hücrelerinde oluşacak glukotoksik etki ile insülin alımı ve periferik doku sensitivitesi olumsuz etkilenecektir (Al-Goblan ve ark., 2014).

Serbest yağ asitlerinin insülin direnci ve beta hücre fonksiyonunun bozulmasında çok önemli bir yeri vardır. Esterleşmemiş serbest yağ asitlerindeki artış T2DM ve obezitede karşılaşılan insülin direnciyle ilişkilidir. İnsanlarda plazma serbest yağ asitlerindeki akut yükselmenin ardından insülin direnci oluşmaya başlar.

Aynı mantıkla, antilipolitik ajanların kullanımıyla serbest yağ asitlerinin seviyeleri düştüğünde periferal insülin alımı düzelmeye başlar. Serbest yağ asitlerine sürekli maruziyet glukozla uyarılan insülin sekresyon yollarında belirgin işlevsel bozukluklar ve azalmış insülin biyosentezi ile ilişkilidir (Al-Goblan ve ark., 2014).

İnsülin sensitivitesi aynı zamanda etkili bir diğer faktör olan vücut yağ dağılımından da etkilenir. Vücut yağ dağılımı daha periferal olan bireylerde insülin sensitivitesi santral olanlara göre daha yüksektir. Ayrıca abdominal yağlanma subkutan yağlanmaya kıyasla daha lipolitik olarak görülür ve insülinin antilipolitik etkisine karşı kolayca yanıt vermez. Bu durum intra-abdominal yağı insülin direncine ve T2DM'ye yol açmak açısından daha önemli kılar (Al-Goblan ve ark., 2014).

4.4.1. Leptin

Leptin ilk defa Zhang ve ark. tarafından 1994 yılında keşfedilmiştir. Molekül ağırlığı 16 kDA olan leptin, 167 aminoasit içeren protein yapısında bir hormondur. Leptin üretiminden sorumlu olan ob/ob geni insanlarda 7. kromozomun uzun kolundadır. Leptinin başlıca fonksiyonu, beyinde negatif “feedback” mekanizma ile gıda tüketimi ile enerji metabolizmasını düzenleyerek obezite gelişimini önlemektir. Bu etkisini leptin, beyinde kilo artışına sebep olan anabolik sinyal yollarını inhibe ederek, enerji harcanmasını uyaran katabolik sinyal yollarını ise aktive ederek fazla kilo alımını önler (Zhang ve ark., 1994; Aslan ve ark., 2004).

Leptin, beyaz yağ dokusu tarafından üretilip salgılanan, vücut yağ kütlesi ile orantılı olarak dolaşımda bulunan, SSS'ne plazma düzeyiyle orantılı olarak girerek gıda alımını, enerji harcamasını ve otonomik fonksiyonu düzenleyen beyindeki reseptörü ile etkileşime giren polipeptid bir hormondur. Vücutta başlıca adipoz dokuda sentezlenmekle beraber leptin, bir miktar plasenta, gastrik epitel, iskelet kası, hipofiz ve meme bezi tarafından da salgılanmaktadır. Kanda serbest halde ve proteine bağlı olarak bulunabilmekle beraber leptin aktivitesinin serbest şekli tarafından sağlandığı düşünülmektedir. Bunun nedeni obez bireylerde yapılan çalışmalarda tesbit edilen leptinin büyük oranda serbest formda bulunmasıdır. Bununla birlikte obezite durumuna serbest leptin düzeylerinde artış gözlenmesi,

obezitenin leptin eksikliğinden ziyade leptin direnci ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Aslan ve ark., 2004).

Vücut yağ kütlesi ile beraber vücut yağ indeksi, leptin düzeylerinin belirlenmesinde en etkili faktörlerdir. Bununla beraber leptin sentezi üzerine insülin, glukokortikoidler ve prolaktinin uyarıcı; tiroid hormonları, katekolaminler, büyüme hormonu ve serbest yağ asitleri ise inhibitör etkilidirler. Leptinin, enerji homeostazisinin düzenlenmesinde de etkili olduğu bilinmektedir, hiperfaji ve kilo alımını artması leptin direnci ile ilişkilidir. Bununla birlikte, son yıllarda leptinin sadece enerji dengesinin düzenlenmesinde değil aynı zamanda glukoz homeostazında da rol oynadığı gösterilmiştir (Meek ve Morton, 2012).

4.5. Fibroblast Büyüme Faktörü 21 (FGF21)

FGF ailesi, dizi homolojisine ve filogenisine dayanarak yedi alt aileye bölünebilen yapısal olarak benzer 22 üyeden oluşur. FGF15 / 19, FGF21 ve FGF23 dahil FGF19 alt familyasının üyeleri, karbonhidratların, lipidlerin, fosfatların ve D vitamini metabolizmasının düzenlenmesinde önemli endokrin fonksiyonlara sahiptir (Fukumoto 2008). Çoğu FGF, FGF reseptörlerine (FGFR) kararlı bir şekilde bağlanma için heparin gerektirir. Heparin bağlama bölgesinden yoksun endokrin FGF19 alt familya proteini, hücre zarına nüfuz etmesini ve dolaşıma girmesini sağlayan daha düşük bir heparin bağlama kapasitesine sahiptir FGF21 sinyal iletimi için, FGF21'nin FGFR ve yardımcı reseptörüne bağlanması gerekir. FGF21 ve FGF19'da, β -Klotho proteini ortak reseptör görevi görür (Zhang ve ark 2018). Bugüne kadar farklı FGF-bağlayıcı özelliklere sahip olan dört adet FGFR (FGFR1-FGFR4) tanımlandı. Örneğin, FGF21, esas olarak FGFR1 ile işlev görür, ancak FGFR ve P-Klotho da FGF21 sinyalinin oluşması için gerekli olan iki anahtar bileşendir. FGF21, N-terminalindeki FGFR'lerle etkileşime girer ve C-terminalindeki β -Klotho'ya bağlanır. β -Klotho'nun FGF21'in in vivo etkilerine aracılık eden bir reseptör olduğu gösterilmiştir. FGFR1 yaygın olarak ifade edilir, ancak β -Klotho

ifadesi beyaz ve kahverengi yağ dokusu, karaciğer, pankreas ve merkezi sinir sistemi dokularında ile sınırlıdır (Yie ve ark., 2009).

Normal koşullar altında, FGF21 karaciğerde, pankreasta ve beyaz ve kahverengi adipoz dokularda üretilirken, diğer dokularda ve organlarda ekspresyonu ve sentezi düşüktür. Ayrıca, pankreastaki FGF21'in, pankreas β hücrelerinin fonksiyonunu koruyucu etkili olduğu gösterilmiştir.

FGF21 dolaşıma verilebildiği gibi aynı zamanda lokal olarak otokrin veya parakrin mekanizmalarla işlev gösterebilir. Açlık gibi fizyolojik değişikliklerde, karaciğer, FGF21'i dolaşıma salgılayan tek organdır (Vandanmagsar ve ark., 2016) .

4.6. Diyabet Gelişimindeki Epigenetik Faktörler

Genetik, epigenetik ve genetik olmayan faktörlerin tip 2 diyabetin patogeneziyi etkilediği bilinmektedir. Tip 2 diyabet için genetik olmayan risk faktörleri, yaş, fiziksel hareketsizlik ve obeziteye neden olan enerji bakımından zengin diyetlerin tüketimini içerir. Tip 2 diyabet riski ile ilişkili yüzün üzerinde genetik değişken tanımlanmış olsa da, kalıtım derecesinin sadece az bir kısmı henüz açıklanabilmiştir. Tip 2 diyabet kalıtım derecesi için diğer açıklamalar, epigenetik modellerde yapılan değişiklikleri içermektedir. Epigenetik modifikasyonlar, DNA metilasyonu, kodlayıcı olmayan RNA'yı (noncoding RNA) ve histon modifikasyonlarını içerir. Bu modifikasyonlar hastalığa yatkınlıkla ilişkili olabildiği gibi bir hastalık geliştikten sonra oluşabilir (Davegårdh ve ark., 2018).

DNA metilasyonu, omurgalı hayvanlarında, bitkilerde ve mantarlarda çeşitli biyolojik işlemlerin düzenlenmesinde yer alan, kalıtsal ve geri dönüşümlü bir şekilde sitozin kalıntılarının kovalent modifikasyonunu içerir. DNA metilasyonu en yaygın ve en iyi anlaşılan epigenetik belirteçtir.

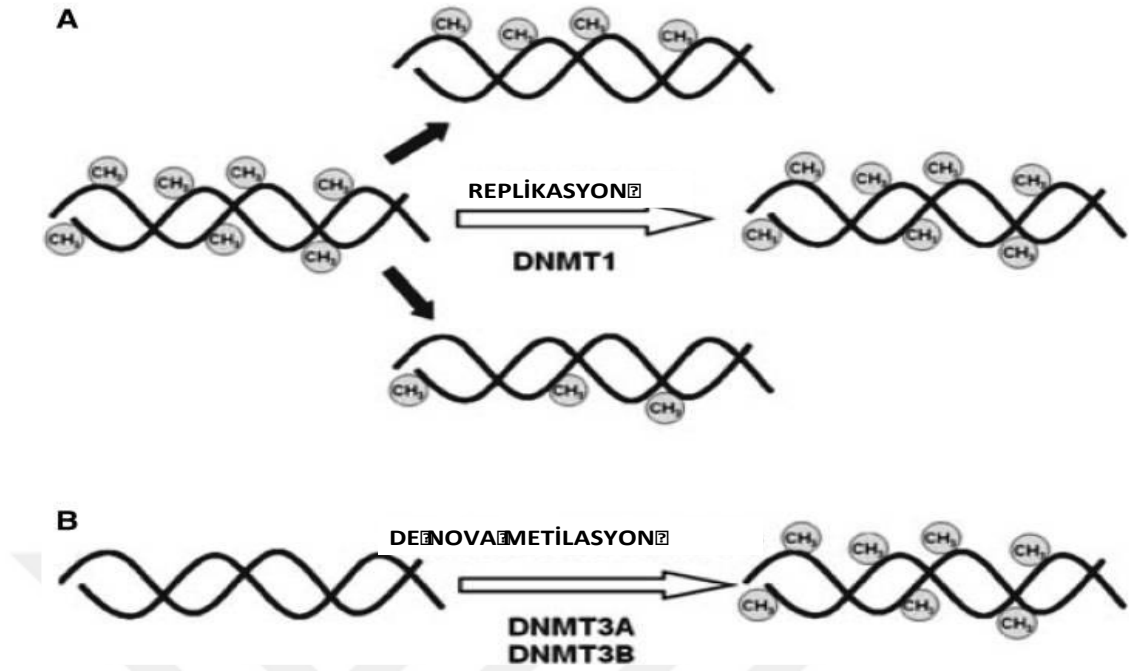
DNA metilasyonu, DNA metiltransferaz (DNMT) enzimleri yoluyla gerçekleşir ve metil grubunun S-adenil metiyonin (SAM) donöründen, CpG

dinükleotitlerindeki sitozin halkalarının 5 'pozisyonuna transferini içerir. Bu işlem DNA'da değişimlere neden olur ve bölünen hücrelerde hücre siklusunun S-fazından sonra oldukça aktiftir.

CpG (CG) bölgeleri DNA'da, bir sitozin nükleotidinin, 5 '→ 3' doğrultusu boyunca bir guanin ile takip edildiği ve yoğun şekilde metillendikleri genom boyunca yayılan bölgelerdir. CpG bölgeleri, CpG adaları (veya CG adaları) olarak adlandırılan genomik bölgelerde yüksek sıklıkta ortaya çıkar. Bu adalar, yüksek GC içeriği olan kısa DNA uzantılarını temsil eder ve gen susturulmasında önemli roller oynar. İnaktif genlerdeki CpG sekansları, ekspresyonlarını bastırarak şekilde genellikle metillenmiştir. Gen promotörlerinin çoğunda CpG adaları vardır ve bunların fareler ve insanlar arasında yüksek oranda korunmaları, bu bölgelerin işlevsel bir öneme sahip olduğuna işaret eder (Davegårdh ve ark., 2018).

4.6.1. DNMT3A

DNA metiltransferazlar (DNMT'ler), DNA'ya metil grupları eklemekten sorumlu enzimlerdir. DNMT1 replikasyon sırasında metil gruplarını hemimetile edilmiş DNA'ya bağlar, oysa DNMT3A ve DNMT3B, metillenmemiş DNA'nın CpG dinükleotitlerine metil grupları ekleyebilir. DNMT3A ve B *de nova* metilasyonundan sorumludur (Şekil X). Sitozinlerde gerçekleşen *de nova* metilasyon işlemi, DNA metiltransferazları 3A (DNMT3A) ve 3B (DNMT3B) ile DNA metilasyonu genom regülasyonu ve gelişimi için esastır. Dnmt3a ve Dnmt3b DNA metiltransferazları kodlayan genlerdir. Bu sürecin düzensizliği, özellikle kanser olmak üzere çeşitli hastalıklarda ortaya çıkar. DNA'nın, sitozin kalıntılarının metilasyonu ile kovalent modifikasyonu, omurgalı hayvanlarda, bitkilerde ve mantarlarda çeşitli biyolojik işlemlerin düzenlenmesinde rol oynayan kalıtsal ve geri dönüşümlü bir epigenetik işlemdir (Davegårdh ve ark., 2018).



Şekil 1: DNA metiltransferazların (DNMT) replikasyonda (A) ve De Nova Metilasyonda İşlevleri (Luczac ve Jagodziński, 2006)

Memelilerde, DNA metilasyonu normal embriyonik gelişim için gereklidir ve gen ekspresyonu, genomik baskılama, kromatin modifikasyonu ve endojen retrovirüslerin susturulması için önemli rol oynar. Değişmiş DNA metilasyon paternleri, tümör gelişim sürecinde gösterilmiştir (Okano ve ark., 1999).

Yapılan son çalışmalarda, tip 2 diyabetli deneklerden ve diyabetik olmayan kontrollerden alınan dokularda DNA metilasyonundafarklılıklar tanımlanmıştır. Bununla birlikte, tip 2 diyabetli kişilerden alınan dokulardaki histon modifikasyonlarındaki bilgisi sınırlıdır.

DNMT3A insan ve fare adipositlerinde insülin direnci gelişimine aracılık etmiştir. Fgf21, adipositlerde bir Dnmt3a hedef geni olarak bulunmuştur. Tip 2 diyabetli kişilerde DNA metilasyonunun arttığı ve bu metilasyonun adipoz dokusunda FGF21 ekspresyonu ile negatif korelasyonlu olduğu gösterilmiştir. Öte yandan artan Fgf21 ekspresyonunun, Dnmt3a'nın indüklediği insülin direncini iyileştirebileceği öne sürülmüştür. Dokularda yapılacak ileriye dönük prospektif

çalışmalar, metilasyonun tip 2 diyabetteki rolünü daha da destekleyecektir (You ve ark., 2017, Davegårdh ve ark., 2018) .

Yağ dokusu, lipidleri depolama ve dolaşıma verme kapasitesi nedeniyle enerji metabolizmasının kontrolünde kritik bir rol oynar. Ayrıca leptin, adiponektin ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF α) gibi adipokinleri salgılayarak endokrin bir organ olarak da işlev görür. Dolaşan adipokinler gıda alımını, insülin duyarlılığını ve metabolizmayı düzenler. Aşırı lipitler, karaciğer, kas ve adacıklar gibi yağ dokusu dışındaki dokularda birikerek, insülin direncine ve fonksiyon bozukluğuna neden olabilirler. Yağ dokusundaki fonksiyon bozuklukları ile birlikte, obezite tip 2 diyabet için önemli bir risk faktörüdür. DNA metilasyon düzenindeki değişikliklerin tip 2 diyabete ve obeziteye hem katkı sağlaması hem de neden olması mümkündür. Bugüne kadar, birçok çalışma tip 2 diyabet, obezite ve bunlarla ilişkili risk faktörlerinin insan adipoz dokusunda epigenetik modifikasyonlarla ilişkili olup olmadığını incelemiştir.

Karaciğer, hem tokluk hem de açlık kan glukoz seviyelerini düzenlemede büyük bir işleve sahiptir. Karbonhidrat alımından sonra karaciğer, insülin stimülasyonuna cevap olarak glikojeni depolarken, açlık sırasında salınan glukagon, hipoglisemiyi önlemek için karaciğerde glikojenoliz ve glukoneogenezi artırır. Tip 2 diyabette insülin etkisi bozulmakta ve glukagon etkisi artmakta ve sonuç olarak hiperglisemi gelişmektedir. İnsan karaciğerindeki epigenetik modifikasyonlar, tip 2 diyabette gözlenen değişmiş hepatik metabolizmaya genetik ve diğer risk faktörleriyle birlikte katkıda bulunabilir. Karaciğer, metil donörlerin metabolik yollarının en aktif olduğu ve çoğu metilasyon reaksiyonunun gerçekleştiği karbon metabolizması için ana organdır (Davegårdh ve ark., 2018).

Obezite tip 2 diyabet için önemli bir risk faktörüdür. Bu nedenle, obezite ile ilişkili DNA metilasyonunun diyabet gelişimine katkıda bulunması mümkündür. Birkaç çalışma, yağ dokusunda obezite ve DNA metilasyonu arasındaki ilişkileri tanımlamıştır (Ronn ve ark., 2015, Agha ve ark., 2015).

Diyetlerin insan adipoz dokusunda DNA metilasyonu üzerindeki etkisi de birkaç çalışmada araştırılmıştır. Gillberg ve ark. 'ın (2016) yaptığı bir çalışmada,

genç erkeklere 5 gün boyunca yüksek yağlı bir diyet verilmiş ve adipoz dokudaki 652 CpG bölgelerinde metilasyon değişiklikleri ile birlikte açlık glikozu ve insülin seviyelerinin yükselmeler tesbit edilmiştir.

4.7. Tip 2 Diyabet Gelişimde İnflamasyonun Rolü

İnsan vücudunda metabolik ve immün yollar birbirlerine bağlı şekilde çalışırlar. İmmün sistem ve metabolik sistem karşılıklı olarak birbirini düzenler. Birçok hormon, sitokin, sinyal proteini, transkripsiyon faktörü ve biyoaktif lipid hem metabolik hem de immün rollere sahiptir (Wellen ve Hotamışlıgil, 2005).

Obezite özellikle beyaz adipoz dokudaki kronik düşük seviyeli inflamasyon ile ilişkilidir. Adipoz doku bazı inflamatuvar biyobelirteçlerin başlıca üretim yeridir(Lontchi ve ark., 2013).

Epidemiyolojik çalışmalar inflamatuvar biyobelirteçler ve T2DM komplikasyonlarının oluşumu arasındaki ilişkiyi ortaya koymuştur (Lontchi ve ark., 2013).

İnflamatuvar ve stres cevaplarının insülin direncine aracılık ettiği merkezi mekanizma insülin sinyal yollarındaki inhibisyondur. Henüz tam olarak aydınlatılmayan bazı yolların, moleküllerin ve alternatif mekanizmaların varlığının da etkisi olduğu düşünülmektedir (Wellen ve Hotamışlıgil, 2005).

İnsülinin etki mekanizması göz önüne alındığında, insülin hücre zarında kendi reseptörüne bağlanır. Uyarılmış olan insülin reseptörü kendisini ve bazı substratları fosforilasyona uğratar. Bu substratlar arasında insülin substrat reseptör ailesi (IRS) de bulunmaktadır. Bunu takiben sıralı sinyal iletimi olayları gerçekleşir. Hücrelerin yüksek düzeyde TNF-alfa ve serbest yağ asitlerine maruz kalmasının etkisiyle bu olaylarda gerçekleşen inhibisyon, inflamatuvar etkinin insülin direncine yol açtığı başlıca mekanizmadır (Wellen ve Hotamışlıgil, 2005).

Ayrıca obezitenin, endoplazmik retikulumun fonksiyonel kapasitesini aşıcı etki göstererek oluşturduğu stresin ve obezite durumunda artan glukoz

metabolizmasının mitokondriyel ROS üretiminde yarattığı yükselmenin, inflamatuvar sinyal yollarının aktivasyonuna yol açarak insülin direncine sebep olduğu gösterilmiştir (Wellen ve Hotamışlıgil, 2005).

İnflamatuvar yollar hedef alınarak yapılacak çalışmaların büyük ihtimalle diyabet ve diyabete bağlı komplikasyonların önlenerek kontrol edebileceği düşünülmektedir(Lontchi ve ark., 2013).

4.7.1. İnterlökin 21(IL-21)

Obezite, insülin direnci ve tip 2 diyabet, anormal sitokin üretimi, artmış akut faz reaktanı ve mediyatörleri, inflamatuvar sinyal yollarının aktivasyonları şeklinde tanımlanan kronik inflamasyon ile yakından ilişkilidir (Fabrizi ve ark., 2014).

IL-21 dendritik, CD8+ T, B ve NK hücrelerin çoğalıp ve farklılaşmasıyla ilgili fonksiyonları bulunan proenflamatuvar etkisi olduğu bilinen bir sitokindir.Bununla beraber IL-21 bağışıklıkla ilgili reaksiyonları hem uyarabilir hem de baskılayabilir. Bu nedenle de IL-21'in biyolojik fonksiyonları aslından daha karmaşık niteliktedir (Yarım ve Kazak 2016).

Obezite immün hücre infiltrasyonuna sebep olarak kronik düşük seviyeli inflamasyonu provoke eder. IL-21 kronik inflamasyonun indüklenmesinde ve sürdürülmesinde rol oynar. IL-21, regülatuar T hücrelerinin farklılaşması ve aktivitesi üzerinde negatif etkiye sahiptir. IL-21'in, regülatuar T hücrelerinin immün baskılayıcı özelliğini çeşitli dokularda etkisiz hale getirdiği in vivo ve in vitro çalışmalarda görülmüştür. Ayrıca, IL-21'in adipoz dokuda açlık lipolizinin transkripsiyonel regülatörü olan IRF4 (interferon regülatuar faktör 4) üzerinde olumsuz etkisi vardır. Özetle, IL-21, IRF4 ve regülatuar T hücresi aktivitesi üzerinde olumsuz etki yaparak obezite durumunda adipoz doku inflamasyonuna katkı sağlar (Fabrizi ve ark., 2014).

Son dönemlerdeki çalışmalar regülatuar T hücrelerinin obeziteyle ilişkili olan inflamasyonu ve buna bağlı olarak insülin direncini baskılamada rolü olduğunu göstermiştir. Regülatuar T hücrelerinin sayısı obeziteyle azalmaktadır. Obez

farelerde ise bu hücrelerin desteklenmesinin insülin direncini iyileştirici etki göstermektedir. 2014 yılındaki bir çalışmada, obez bireylerin stromal vasküler fraksiyon örnekleri ve yüksek yağ ile beslenmiş farelerin adipoz dokularında diğer inflamatuvar belirteçlerle paralel olarak IL-21 ve IL-21 reseptör mRNA'sı ekspresyonlarında artış gözlenmiştir. Aynı zamanda, IL-21 knock out farelerden oluşan yüksek yağlı diyetle beslenerek obezite modeli oluşturulmuş farelerde, wild type farelere göre daha düşük beden ağırlığı, adipozite ve hepatik inflamasyon ve daha yüksek insülin sensitivitesi, gözlenmiştir (Fabrizi ve ark., 2014).

4.7.2. Tümör nekroz faktörü alfa (Tnf-alfa, Tnf- α)

Tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α), sistemik enflamasyonda rol oynayan ve akut faz reaksiyonunu stimüle eden bir adipositokindir. TNF- α , temel olarak makrofajlar ve ayrıca adipositler dahil olmak üzere çok çeşitli diğer hücreler tarafından salgılanır. TNF- α insülin transdüksiyonunu inhibe eder ve glukoz metabolizması üzerinde etkilidir. TNF- α metabolizmasındaki bozukluklar obezite ve insülin direnci gibi metabolik bozukluklarda rol oynamaktadır (Swaroop ve ark., 2012).

İlk olarak yağ dokuda makrofajlardan elde edildiği tanımlanan Tnf- α , immün işleyişi düzenleyen çok fonksiyonlu bir sitokindir (Frühbeck ve ark., 2001; Juan ve ark., 2001).

Tnf- α 'şlevlerini Tip 1 ve Tip 2 TNF- α reseptörleri üzerinden gösteren 26 kDa ağırlığında bir serum proteindir. En önemli üretim yerleri; T lenfositler, uyarılmış makrofajlar ve doğal öldürücü (natural killer) hücrelerdir. Az miktarda ise düz kas hücreleri, bağ dokusu hücreleri ve kanser hücrelerinde üretilirler (Naylor ve ark., 1993).

TNF- α salgı proteini olmasının yanı sıra transmembran proteini olarak da üretilir ve homotrimerik yapıya sahiptir (Li ve ark., 2000).

TNF- α kompleks işlevleri olan bir sitokindir. TNF- α 'nın bölgesel salınımı akut hastalık durumlarında vücut için yararlıdır. Bu faydasını vasküler endotel tabakasındaki adhezyon proteinlerinin yapımını artırarak, nötrofil ve makrofajlar başta olmak üzere bağışıklık hücrelerinin enfekte olmuş veya doku tahribatına uğramış bölgeye göçünü sağlayarak gösterir. Ayrıca TNF- α fagositleri uyararak onların patojenleri ve yıkım sonrası oluşan hücre parçalarını yok etmelerine aracı olur. Bunların yanı sıra yüksek konsantrasyonda TNF- α 'ya uzun süre boyunca maruz kalmanın sonucunda ciddi hasarlar oluşabilir. Yüksek TNF- α miktarının toksik şok ve travma hastalarında metabolizma hasarı ile ilişkili olduğu saptanmıştır (Tracey ve ark., 1986).

TNF- α , reseptörleri ile bağlantı kurduğunda iki farklı sinyal iletim mekanizmasını uyarılabilir: Birincisi NF- κ B (Nükleer Faktör Kappa B) aktivasyonudur. NF- κ B hücre çoğalması, hücre canlılığı, bağışıklık sistemi, apoptoz ve farklı proteinlerin transkripsiyonel düzenlenmesinde görev alan bir transkripsiyon faktörüdür. NF- κ B hematopoietik hücrelerin ya da solid tümörlerin gelişmesinde görev alır. Sağlıklı hücrelerde NF- κ B aktif değildir. İkincisi ise MAPK (Mitojen Aktive Protein Kinaz) yolağının aktive edilmesidir. MAP Kinazlar, hücre zarından nükleusa bilgi iletilmesinde önemli bir rol üstlenirler. MAP kinaz sinyal iletimi yolu embriyogenez, hücre canlılığı, hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve apoptozun regülasyonunda görev yapar. MAP kinazlar; p38 MAP kinaz ailesi, Ekstrasellüler sinyalle düzenlenen kinazlar (Extracellular signal regulated kinase= ERK) ve c-Jun NH₂-terminal kinazlar (JNK) olmak üzere üç ana gruptan oluşur. MAP kinaz sinyal iletim yolu reseptör bağımlı sinyalin hücre içerisine ulaştırılmasından sorumlu olan bir kinaz kaskadı olarak işlev görür (Platanias, 2003).

TNF- α kanserin düzenlenmesinde, hücre diferansiasyonunda, çeşitli enfeksiyonlara karşı immün yanıt oluşturulmasında görev almasının yanı sıra; yüksek dozlarda salgılanması insanlarda insülin direnci, alerji, septik şok, ve otoimmün hastalıklar gibi farklı semptomlara yol açabilir (Abbas ve ark., 2000).

4.8. Tip 2 Diyabette Oksidan-Antioksidan Durum

Oksidatif stres ve kronik inflamasyon, diyabet gibi metabolik hastalıkların oluşumuyla ilişkilidir. Krebs döngüsü ve resperatuar zincir gibi metabolik yolların çalışması sonucunda reaktif oksijen türleri (ROT) açığa çıkar ve bu da serbest radikallerin sentezine sebep olur. Oksidatif stres, hücre ve dokularda aşırı ROT üretimi ve bunun biyolojik sistem tarafından detoksifiye edilememesi sonucu oksidatif ve antioksidatif sistemlerin arasındaki dengenin bozulmasıdır. Bunun sonucunda oluşan hasarın yıkıcı etkileri olabilir (Newsholme ve ark., 2016).

Oksidanların hücrel proliferasyonda ve konak savunma mekanizmalarındaki fizyolojik rolünden dolayı birçok organizma ROT üretimi olmadan veya belirli bir homeostatik seviyenin altındaki ROT seviyelerinde yaşayamaz. Bu yüzden, yaşayan organizmalar ROT'un potansiyel zararlı etkilerine adapte olabilmenin yanında onlardan faydalanabilmek için çeşitli mekanizmalar geliştirirler. Örneğin, bir ROT olan hidrojen peroksit ve süperoksit anyonu glukoz ile uyarılan beta hücresi insülin sekresyonunun düzenlenmesinde ve beta hücrelerindeki sinyal yollarında potansiyel role sahiptir. Ancak aşırı miktardaki ROT hücrel lipid ve proteinlerin yapı ve fonksiyonlarında değişimlere yol açarak, enerji metabolizmasında, hücrel sinyallerde, hücrel gelişim evrelerinin kontrolünde, hücrel transport mekanizmalarında bozulmalara sebep olur ve immün aktivasyonla birlikte inflamasyonu ortaya çıkarır (Newsholme ve ark., 2016).

Yüksek karbonhidrat ve yağlı diyetler beslenme kaynaklı oksidatif stresin kaynağı sayılır. Çünkü lipid peroksidasyonu ve protein karbonilasyonunu yükseltmekle birlikte antioksidan defansı zayıflatır. Obezitede kronik oksidatif stresle ilişkili olan inflamasyon ve bunun altında yatan faktörler metabolik yolların regülasyonunda problemler, sinyal iletiminde bozulmalar, insülin sekresyonu ve fonksiyonunda ve immün yanıtlarda bozulmalara yol açarak diyabet, diyabete bağlı sekonder komplikasyonlar, ateroskleroz, kardiyomiyopati ve koroner kalp hastalığı gibi patolojilere yol açarlar. Aşırı ROT sentezi hedef dokularda bozulmuş insülin sinyaline ve azalmış insülin sekresyonuna yol açar. Bunun sebebi artmış glukoz ve

yağ asiti oksidasyonunun mitokondriyal ve metabolik disfonksiyonu destekleyerek oksidatif strese yol açmasıdır (Newsholme ve ark., 2016).

Beta hücrelerinde glutatyon peroksidaz, katalaz, tioredoksin, süperoksit dismutaz gibi serbest radikal detoksifikasyonunu sağlayıcı ve redoks düzenleyici enzimlerin azalması peroksit gibi ROT'ların birikimine yol açar (Newsholme ve ark., 2016).

Yükselmiş resperatuvar aktivite, elektron transport ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz aktivitesi [NAD(P)H] beta hücrelerindeki ROT konsantrasyonlarının hızlıca artmasına ve zararlı seviyelere ulaşmasına sebep olur. Bu durum diyabet patogeneziyle doğrudan ilgilidir (Newsholme ve ark., 2016).

Ayrıca ROT'un aşırı üretimi hücrel fonksiyonları bozucu etkisiyle böbrek, periferel sinirler, göz ve damarlarda hücrel ölümleri indükler (Newsholme ve ark., 2016).

Klinik T2DM çalışmalarında hastalığın derecesine bağılı olarak malonilaldehit, tiobarbitürik asit reaktif maddeleri, 8-izoprostan, okside LDL, lipid hidroperoksit ve oksisterol gibi belirteçlerde değışimler görölmüştür. Örneğın, T2DM hastalarının ürünlerinde araşidonik asitin ROT tarafından oksidasyonu sonucu yükselen 8-izoprostan oluşumu kan glukozuyla pozitif korelasyon halindedir (Newsholme ve ark., 2016).

ROS aracılı protein modifikasyon mekanizmalarında protein glikasyonu, karbonilasyon, nitrozilasyon ve glutatyonilasyon bulunur. HbA1c ROT aracılı protein modifikasyon ürünlerinden başlıcasıdır ve diyabetin tanısal belirteçlerinden biridir. T2DM de oksidatif stresin protein ve lipid belirteçleri yükselmiş durumdadır ancak tanısal amaçlı veya hastalık derecesini saptama amaçlı kullanılabilmeleri için bilinmesi gereken eşik değerler henüz tanımlanamamıştır (Newsholme ve ark., 2016).

T2DM'de normal antioksidan defansında bozulmalar söz konusudur. Katalaz hidrojen peroksitin nötralizasyonundan sorumludur ve yetersizliğinin T2DM ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu yüzden, hidrojen peroksit ile indüklenen kronik hasara beta hücrelerinin maruz kalması sonucu beta hücresi yetmezliğinin ortaya

çıkabildiği düşünülmektedir. Ayrıca, enzimatik olmayan hücrel bir antioksidan olarak GSH'ın de novo sentezinin L-glutamin utilizasyonuna bağlı olduğu ve T2DM hastalarında L-glutamin düzeylerinde düşüşler olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte GSH seviyelerinin T2DM hastalarında azaldığı ve sistein ve glisin takviyesiyle eski haline geri dönerek oksidatif stresi azalttığı bildirilmiştir (Newsholme ve ark., 2016)

Önemli enzimatik antioksidanlardan olan SOD, süperoksit anyonlarını daha az reaktif olan hidroje peroksit radikallerine dönüştürmekle görevlidir ve diyabete bağlı komplikasyonlara sahip olan T2DM hastalarında plazma SOD aktivitesi düşmüş durumdadır. Hidrojen peroksit hızlıca bertaraf edilemediği takdirde beta hücrelerinin metabolik aktivitesini baskılayarak insülin sekresyonunu inhibe eder. Rodentlerin pankreatik beta hücrelerinde hidrojen peroksiti detoksifiye edici ve redoks düzenleyici enzimlerin seviyelerinde azalmalar gözlenmiştir (Newsholme ve ark., 2016).

Özellikle dipeptid kombinasyonlarına sahip belirli aminoasitlerin besinsel takviyeleri GSH gibi antioksidan defansın önemli bileşenlerinin üretimini sağlayabilir. Son zamanlardaki çalışmalar inflamatuvar sitokin maruziyetini takiben verilen dipeptid L-alanil glutaminin beta hücrelerinin fonksiyonunda yararlı etkilerini ortaya koymuştur. Ancak, aminoasitlerin ve peptidlerin diyabet tedavisindeki potansiyel rolünün onaylanabilmesi için daha fazla in vivo çalışmaya ihtiyaç vardır (Newsholme ve ark., 2016).

Özetle, homeostaz ve yaşamda kalabilmek için ROS üretiminin, hücre içi sinyal yollarının ve doku inflamasyonun düzenlenmesi ve normal düzeyde tutulması gerekmektedir. Oksidatif stres ve inflamasyonun obezite ile provoke edilmesi metabolik hastalıklar ve diyabet progresyonunda anahtar faktördür. İnsülin direnci ve bozulmuş beta hücresi insülin sekresyonu obezite ve T2DM'de aşırı besin tüketimi sonucu bozulan disfonksiyonel redoks dengesinin sonucudur. Obezite ve aşırı besin tüketimi insülin direncine direkt olarak kas, karaciğer, adipoz doku ve insülin sinyaline etki yaparak yol açar. Beta hücreleri insülin direncinin üstesinden gelebilmek ve normoglisemiyi sürdürebilmek için insülin alımını artırırlar. Ancak aynı zamanda oksidatif hasarın etkisi altında kalırlar ve immün hücre filtrasyonu ve sitokin üretiminin daha da artmasına sebep olurlar. En sonunda beta hücrelerinin

yıkımı gerçekleşir ve insülin üretimi devamlı olarak yetersiz hale gelir. Bu kaskadı önleyebilmek için beslenmeye müdahale ve egzersiz gerekmektedir. Böylece insülin sensitivitesi iyileştirilir ve kilo kaybıyla birlikte kan glukoz seviyeleri düzelir ve bunun sonucunda hiperglisemi ile indüklenen oksidatif stres seviyesi düşer. Prediyabet hastalarında spesifik, stabil, güvenilir biyobelirteçlerin erken saptanması, yaşam tarzına zamanında müdahale ederek diyabetik komplikasyonlardan kaçınabilmek için önemlidir (Newsholme ve ark., 2016).

4.9. Tatlandırıcılar

Tatlandırıcılar, besleyici olan ve besleyici olmayan (diğer adıyla alternatif tatlandırıcılar) tatlandırıcılar olmak üzere ikiye ayrılır. Besleyici olan tatlandırıcıların vücuda sağladığı kalori değeri vardır ancak alternatif tatlandırıcıların vücutta kalori değeri yoktur. Tatlandırıcılar, şeker ve şeker alkollerini ve alternatif tatlandırıcılar üzere üç grupta toplanabilir. Şeker ve şeker alkollerini kalolik değeri sebebiyle besleyici olan tatlandırıcılar grubuna girer. Şeker grubunda laktoz, maltoz, glukoz, sükröz, değiştirilmiş şeker (glukoz ve fruktoza parçalanmış halde bal ve benzeri gıdaların içerisinde bulunan sükröz tipi şeker) ve fruktoz bulunur. Şeker alkollerini grubunda ise, sorbitol, mannitol, ksilitol, maltitol vardır. Kalolik değeri olmayan alternatif tatlandırıcı grubunda ise aspartam, asesülfam K, sakkarin, sükraloz, neotam, tagatoz ve siklamat bulunur. Ticari olarak erişilebilir olan yüksek fruktoz mısır şurubu mısır nişastasına yüksek enzimatik ve asit manipülasyonları yapılarak elde edilir. Şeker alkollerini ortalama olarak gram başına 2,6 kilokalori enerjiye sahiptirler. Tatlandırıcılar, gıda güvenliği yönünden FDA (Besin ve ilaç yönetimi, Food and Drug Administration) tarafından değerlendirilir. FDA tarafından tatlandırıcılar için oluşturulan ADI (Acceptable Daily Intake, Kabul edilebilir günlük alım düzeyi) kişinin gün içinde alabileceği tatlandırıcı miktarının güvenli aralığıdır. ADI değeri laboratuvar hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarda olumsuz bir etki görülmeyecek maksimum alım düzeyinin 100 kat azıdır (Wardlaw ve Smith, 2011).

Günümüzde bazı alternatif tatlandırıcı FDA tarafından onaylanmış durumdadır. Bunlar sakkarin, sükraloz, aspartam, asesülfam K ve neotamdır.

Siklamat 1958'de keşfedildiğinde GRAS olarak değendirilmiş ancak 1969'da diyetteki yüksek konsantrasyonlarının ratlarda mesane kanseri ile ilişkili olduğu anlaşıldığı için ABD'de kullanımı yasaklanmıştır. Fizyolojik ilgiyisorgulayan çalışmalar yapılmışsa da bu tatlandırıcı ABD'de yasaklanmış halde kalmıştır. Siklamat EU tarafından onaylanmıştır ve 100'den fazla ülkede kullanılmaktadır (Mattes ve Popkin, 2009).

Yüksek oranda sükröz içeren diyetlerin kilo alımına sebep olduğu ve sağlıklı bireylerde glukoz toleransına olumsuz etkileri olduğu bilinmektedir. fruktozun aşırı tüketiminin de fazla kilolu bireylerde ve ailesinde T2DM öyküsü olan sağlıklı bireylerde dislipidemi, ektopik lipid depolanması, viseral adipozite artışı, insülin sensitivitesinde düşüşe sebep olduğu anlaşılmıştır. (Anton ve ark., 2010)

Hayvan modellerinde, yüksek glisemik diyetlerin ve fruktozun aşırı tüketiminin birçok metabolik komplikasyonu indüklediği, bunların içinde hiperinsülinemi, hiperglisemi, hipertansiyon ve insülin direncinin bulunduğu gösterilmiştir (Anton ve ark., 2010).

Ayrıca, insan çalışmalarında fruktoz infüzyonlarının hepatik insülin rezistansını indüklediği gösterilmiştir. Şeker içeren yiyecek ve içeceklerin tüketimini öğünün ve diyetin glisemik indeksini etkiler. Ayrıca, aşırı kalori ve yüksek glisemik indeksli besin alımı postprandiyal insülin ve glukoz düzeylerini yükselterek açlığı uyarıcı metabolik ve hormonal değişimlere yol açar ve yağ depolanmasına yol açar. Sükrözla tatlandırılmış içeceklerin ve yüksek sükröz içerikli diyetlerin vücut ağırlığı üzerine olumsuz etkilerine ve diyabet, kardiyovasküler hastalık, kanser gibi hastalıklarla ilişkisine dair giderek çoğalan kanıtlar sonucu Amerikan Kalp Birliği (Amerikan Heart Association) harici şeker alımının azaltılması gerektiğini belirtmiştir. (Anton ve ark., 2010)

Alternatif tatlandırıcıların, özellikle aspartamın, enerji alımı ve vücut ağırlığı üzerinde etkileri hakkındaki bulgular karışıktır. Birçok çalışmada aspartamın besin alımını azaltarak ağırlık kontrolü sağladığı görülmüşse de, başka çalışmalarda aspartamın tam aksine iştahı uyarısı etkisine bağlı olarak kilo alımına yol açtığı gözlenmiştir. Sükröz ve alternatif tatlandırıcılar içeren yiyecek ve içeceklerin tüketimindeki artış sebebiyle, çeşitli tatlandırıcıların besin alımı, tokluk, glukoz ve

insülin düzeyleri üzerine etkilerini araştırmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (Anton ve ark., 2010).

Kalorik değeri olmayan alternatif tatlandırıcılar, diyetlerimize birkaç on yıl önce girmiştir. Uzun dönem patolojik etkiler ve akut toksisiteler açısından değerlendirilip güvenlik açısından onaylansalar da, iştah, enerji dengesi, beden ağırlığı üzerindeki etkileri tam anlamıyla tanımlanmış halde değildir (Mattes ve Popkins, 2009).

Aşırı kilo ve obezite kaygısının yaygınlaşmasına ve alternatif tatlandırıcıların ulaşılabilir olmasına rağmen, harici kullanımları ürün-içi kullanımlarıyla birlikte değerlendirildiğinde, popülasyonun sadece %15'i alternatif tatlandırıcıları kullanmaktadır. Ancak bu oran gittikçe büyümektedir. Akut dönem beslenme çalışmaları neredeyse hiç enerji sağlamayan alternatif tatlandırıcı ürün içeriklerinin artmış açlıkla ilişkili olduğunu göstermiştir. Ancak takip eden çalışmalar bu içeriğin enerji sağlayan bir ürünün içinde var olması halinde bu etkinin olmadığını ortaya koymuştur. Çünkü alternatif tatlandırıcı içeren içecekler genelde besinlerle tüketilir ve bu durumda açlığı şiddetlendirici etkisi görülmez. Ayrıca, şiddetlenmiş açlığın her zaman enerji alımına sebep olup olmadığı da tartışılır durumdadır (Mattes ve Popkins, 2009).

Uzun vadeli beslenme deneylerine göre, alternatif tatlandırıcıların diyetle enerji değeri olan tatlandırıcıların yerine geçmesi % 5-15 günlük enerji alımı düşüşüne sebep olmuştur. Ancak alternatif tatlandırıcıların, bireylerde kilo kaybı veya kilo korunmasını iyileştirdiğine yönelik yeterli kanıt yoktur (Mattes ve Popkins, 2009).

Alternatif tatlandırıcıların sefalik faz yanıtlarını aktive ederek, osmotik dengeyi değiştirerek veya besinin yenilebilirliğini iyileştirerek iştahı arttırdığına yönelik net bir kanıt yoktur. Aksine, özgür yaşayan bireyde tokluk hormonlarının ve enerji alımının arasındaki ilişki tartışmaya açık olsa da, alternatif tatlandırıcıların tokluk hormonlarını uyardığına dair birçok kanıt vardır (Mattes ve Popkins, 2009).

Derleme çalışmalarına göre, alternatif tatlandırıcı kullanımının yiyecek ve içeceklerde daha yüksek tatlandırıcı içerikli seçeneklere bireyleri yönlendirebileceği düşünülmekte ancak bunun toplam enerji alımını düşürmeye yönelik çabalara negatif etki yapıp yapmayacağı henüz bilinmemektedir. (Mattes ve Popkins, 2009)

Özetle, alternatif tatlandırıcıların enerji verici tatlandırıcılarla yer değiştirilerek kullanıldıklarında kilo yönetimini kolaylaştırıcı potansiyeli olduğu anlaşılmış ancak bu şekilde kullanılıp kullanılmayacakları net olarak anlaşılamamıştır. Bunun anlaşılabilmesi için, alternatif tatlandırıcıların kullanım paternleri ve amaca yönelik mekanizmalarda olumsuz etki yapacak etkenler hakkında bilgiye ihtiyaç duyulmakla birlikte, özgür yaşayan denekler üzerinde uzun dönem randomize kontrollü deneyler yapılması gerekmektedir (Mattes ve Popkins, 2009).

4.9.1. Stevia rebaudiana

WHO, yetişkin ve çocukların ilave şeker tüketiminin beslenmenin toplam enerjisinin %10'undan azına tekabül etmesi gerektiğini hatta %5'inden daha az olmasının ise sağlık açısından yararlı olacağını belirtmiştir. Günümüzde şeker tüketimini düşürmeye yönelik küresel politikalar şeker yerine LNCS'in (low and no calorie sweeteners, düşük ya da sıfır kalorili) ilgi odağı olmasını sağlamıştır (Samuel ve ark., 2018).

Pereniyel bir bitki olarak Stevia rebaudiana, doğal olarak Paraguay ve Brezilya başta olmak üzere, Kuzey Amerika, Asya ve Avrupa'da yetişmektedir. Bu bitkinin dünyanın geri kalanının ilgisini çekmesi ilk olarak bitkinin özelliklerini yerel halktan öğrenen Moises Santiago Bertoni tarafından 1887'de gerçekleştirildiği için, bitkinin adı Stevia rebaudiana Bertoni olarak da geçmektedir (Samuel ve ark., 2018).

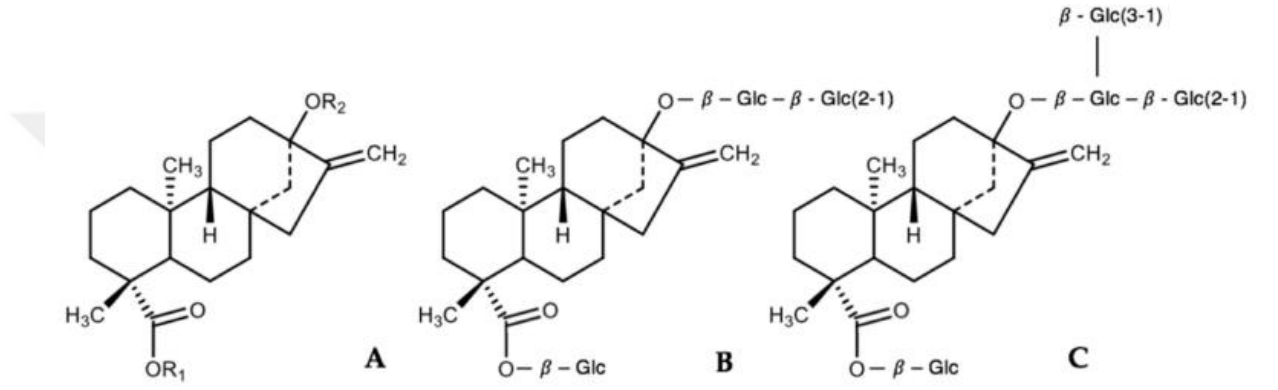
On yıllar boyunca bölgenin yerel halkı tarafından tatlandırıcı amaçlı ve anti-diyabetik etkilerinden yararlanmak amacıyla kullanılmış olmakla beraber; ürünlerindeki %95'tan fazla olan yüksek saflık derecesiyle Avrupa Birliği ve Amerika Birleşik Devletleri tarafından kullanımı onaylanmıştır (Anker ve ark., 2019).

Steviol glikozitler bitkideki steviol adı verilen aglukon iskeletine bağlı, çeşitli sayı ve türde şeker grubu bağlayabilen (glukoz, fruktoz, ramnoz, ksiloz, deoksiglukoz) 4 halkalı diterpen yapılarıdır (Samuel ve ark., 2018).

Stevia rebaudiana'dan elde edilen ve tatlandırıcı amaçlı kullanılan steviol glikozitlerinin anti diyabetik etkilere sahip olduğu düşünülmektedir. Stevia

rebaudiana'nın tanımlanmış 40'tan fazla steviol glikoziti var olmakla birlikte, Stevia rebaudiana'nın yapraklarında en yüksek miktarda bulunan steviol glikozitler Stevioside ve Rebaudioside A'dır (Samuel ve ark., 2018).

Bu glikozitler kimyasal yapı bakımından birbirlerine çok benzemelerinin yanısıra, 0,4 M sükrözdan 200-300 kat daha çok tatlandırıcı etki gösteren kalori içeriği olmayan glikozitlerdir (Anker ve ark., 2019).



Şekil 2: Steviol glikozitlerin iskeleti (A), Stevioside (B), Rebaudioside A (C) (Anker ve ark., 2019)



Resim 1: Stevia rebaudiana (Carrera-Lanestosa ve ark., 2016)

Doğal tatlandırıcı içeriğinin yanısıra, Stevia rebaudiana'nın terpen, tanin, sterol, uçucu gaz, vitamin, karoten, flavonoid, enzim, organik asit, polisakkarit, hormon, protein, lif, lipid, monosakkarit C vitamini, B2 vitamini, B1 vitamini, apigenin, kersetin, izokersetin, luteonlin, klorogenik asit, kafeik asit, miosen,

kaemferol, kobalt, magnezyum, demir, potasyum, forfor içeriğinin var olduğu da bilinmektedir (Carrera-Lanestosa ve ark., 2016; Gupta ve ark., 2013).

Gastrointestinal sistemde steviol glikozitleri sindirme kapasitesine sahip enzimin bulunmaması ve asit varlığı sebebiyle sindirilemeyen steviol glikozitler kolona girdiklerinde mikrobiyota tarafından hidrolize uğrarlar. İnsan, rodent ve hemstırların mikrobiyotası steviositi stevirole degrade edebilecek niteliktedir. Serbest kalan şeker kısımları bağırsak bakterileri tarafından emilir ve enerji kaynağı olarak kullanılır. Glikozit bağları açılır ve monosakkarit parçaları atılır, geriye sadece aglukon kısmı kalır. Kalan steviolun büyük bir kısmı emilerek karaciğere gönderilir ve glukuronik asite bağlanarak steviol glukuronit (SVG) oluşturulur. Geri kalan kısım feçesle atılır. Son ürün olarak SVG insanlarda ürinle ratlarda safra ile dışarı atılır (Anker ve ark., 2019). Tüm bu sebeplerle, Stevianın insan metabolizması için kalori değeri yoktur(Samuel ve ark., 2018).

Steviosidin alerjik özelliği yoktur. Diyabet hastaları ve fenilketonüri hastaları tarafından kullanılır (Genus., 2003).Saflaştırılmamış ham stevia özütlerinin erkek fertilitesinde hayvan çalışmalarında olumsuz etkilerinin görüldüğü bildirilmiştir.

Ancak ($\geq 95\%$) yüksek saflıkları steviol glikozitlerinden elde edilen özütlerin gebeler, çocuklar, diyabetliler ve emziren annelerde kullanımının güvenli olduğu bilinmektedir. (Anker ve ark., 2019).Çünkü fetal gelişimi olumsuz etkilediğine dair herhangi bir kanıt, en azından kısa süreli kullanımı için henüz bulunmamıştır. Hayvan çalışmaları erkek üreme sistemi üzerinde steviol glikozitlerin olumsuz etkisini gösterse de, bu durum henüz insan çalışmalarıyla onaylanmamıştır. Stevia rebaudiana türevi olan tatlandırıcı, Ayrıca Rebaudiosit A, FDA tarafından GRAS grubuna alınmıştır (Mahan ve Raymond, 2017).

4.10. Zebra Balıklarında Oluşturulan Diyabet Modelleri

Diyabet çalışmalarında model organizma olarak zebra balığı kullanımının birçok avantajı vardır. Bunlardan en önemlisi zebra balığı glukoz metabolizmasının, reaktif metabolit üretme yollarının ve bazı fizyolojik ve patofizyolojik

yolaklarının insanla ve diğer memelilerle büyük oranda benzer olmasıdır. Ayrıca, insanlarda hiperglisemi kaynaklı patolojik değişimlerin zebra balıklarında da görüldüğü bilinmektedir. Tüm bunlarla birlikte, zebra balığında yapılan çalışmaların büyük bir kısmı insan çalışmalarına tercüme edilebilmektedir. Örneğin, normoglisemik insanlarda hiperglisemi atakları sonrası devamlı ve progresif olarak görülen diyabetik komplikasyonlar 'metabolik hafıza' olarak bilinir. Streptozotosin enjeksiyonuyla hiperglisemi oluşturulmuş ve ardından hücre rejenarasyonu ile iyileşme fazı uygulanmış ve tekrar normoglisemik duruma geçişi sağlanmış zebra balıklarında da metabolik hafıza konseptiyle uyumlu olarak, geç yara iyileşmesi ve birtakım epigenetik değişimler gibi hiperglisemiye bağlı diyabetik komplikasyonların varlığı iyileşme periyodundan sonra dahi varlığını sürdürmüştür. Bu durum, zebra balığının DM hastalık mekanizması ve patofizyolojisi çalışmak için değerli bir model organizma olduğunu gösterir niteliktedir. Öte yandan zebra balıklarıyla yapılan genetik, farmakolojik çalışmalar zaman, kolay uygulanabilirlik, yüksek veri imkanı, ve gelişen in vivo görüntüleme teknikleri açısından da avantajlıdır. Dolayısıyla zebra balıkları sadece DM için değil, diyabetik komplikasyonlar ve diğer hastalıklar için de yollar ve terapötik ilaç çalışmalarında yeni hedefler geliştirmeye ve açıktır. CRISPR/Cas9 sistemi ve morfolino teknolojisi ile yüksek işlem hacminde genetik modifikasyonlar gerçekleştirilebilir. Üretimi oldukça kolay olarak zebra balıklarından yüksek miktarda embriyo alınabilir. Ayrıca, zebra balıkları pankreas rejenarasyonu, beta hücresi uyarımı ve glukoz seviyesinin düşmesini sağlayan maddelerin tanımlanması ve çalışmaları için elverişlidir. Beslenme yoluyla farelerde 6 aylık süreçte geliştirilen T2DM, yüksek yağlı diyet uygulamasıyla zebra balıklarında çok daha kısa bir sürede geliştirilebilir ve diyabetik organ değişimlerinin gözlenebilir. Zebra balığı organ gelişimlerinin, morfolojilerinin, fonksiyonlarının fizyolojik ve diyabetik koşullar altında görüntülenmesi için hızlı, esnek, ucuz, yüksek veri sunabilen bir hayvan modelidir. Hiperglisemi ile indüklenmiş organ bozukluklarından retina ve böbrek bozuklukları, diğer hayvan modelleriyle benzer fenotipleri çok daha kısa sürede gösterebilir. Zebra balığı DM modelleri oluşturulurken kullanılan bazı teknikler: toksin-aracılı beta hücresi ablasyonu, ENU ile indüklenen mutagenез izlem, morfolino ve gRNA/Cas9 aracılı knockdown tekniğidir. Bunların arasında, pankreatik ve duodenal homeobox 1 (pdx1, diğer

adıylı insülin promoter faktör 1, ipf1) mutasyonuna uğratılmış zebra balığı suşu T2DM'nin genetik modeli olarak bilinmektedir. Ancak pdx1 mutasyonu balığın vücut boyutunu, yaşayabilirliğini azalttığı için bu modelin T2DM modellerinde uygulanabilirliğini kısıtlamaktadır. Zebra balıklarında kan ve doku glukozunu yükseltmenin en kolay yollarından biri onları (200 mmol/L'den yüksek, %4'e kadar) yüksek glukoz içeren medium içerisinde 2 ay süresince inkübe etmektir. Ancak metabolik alt yapı açısından T1DM ve T2DM'ye benzemesi için daha farklı yöntemler tercih edilmelidir. İntraperitoneal streptozotosin enjeksiyonu beta hücrelerinde toksin etki gösterir. Bu yöntemle fare modellerinde insülin eksikliği oluşturularak T1DM modeli geliştirilebilir; yetişkin zebra balığı modellerinde ise yüksek açlık kan glukozu ve düşük insülin seviyeleri elde edilebilir. Genetik manipölasyonlar için CRISPR/Cas9 sistemi ve morfolinolar kullanılarak hücre gelişimi aksatılabilir. Sonuç olarak, pdx1 morfantlarında yükselmiş kan glukozu ile karakterize hızlı ama geğisi bir diyabetik fenotipi oluşturulabilir. Son zamanlarda düşük insülin seviyesine sahip stabil pdx1 mutant zebra balığı hattı oluşturulmayı başarmıştır. NTR (nitroredüktaz) ile beta hücrelerini yok ederek insülin eksikliği olan zebra balığı modeli geliştirilmiştir. Ayrıca, leptin reseptörü eksikliği olan zebra balıklarında besin alımı sonrası yükselen insülin seviyesi ve diyabet benzeri bozukluklar (yara iyileşmesinde gecikme) görölmesine rağmen yüksek kan glukozu seviyeleri ve obezite görölmemiştir. Bu durum leptinin fonksiyonunun glukoz homeostazı açısından zebra balıkları ve memeliler arasında benzerlik gösterdiğini ancak bu hormonun balıklarda adipoziteye yol ağmadığını göstermektedir. Fazla beslendiğinde bozulmuş glukoz klirensi ve glukoz toleransı gösteren transgenik zebra balığı hattı oluşturulmuştur (Heckler ve Kroll, 2017).

4.10.1. Fazla beslenme ile oluşturulan tip 2 diyabet modeli

2010 yılında Oka ve arkadaşları fazla beslenme yöntemi ile memeli obezitesiyle ortak patofizyolojik yolları paylaşan bir zebra balığı obezite modeli geliştirmişlerdir. Bu çalışmada zebra balıkları iki gruba ayrılmış ve bir grup yağ oranı yüksek canlı yem olan Artemia ile 60 mg kuru ağırlık/gün/balık olarak beslenmiştir. Diğer grup ise sadece günlük ihtiyacı karşılamaya yetecek kadar 5 mg

kuru ağırlık/gün/balık olarak beslenmiştir. Maruziyet süresi 8 hafta sürmüştür. Fazla beslenme uygulanan grupta kontrol grubunun aksine artmış beden kütle indeksi, hipertrigliseridemi, hepatosteatoz gözlenmiştir. Ardından uygulanan 2 haftalık kalori kısıtlama sürecinin ise vücut ağırlığı ve plazma trigliserit seviyeleri üzerinde olumlu etkileri görülmüştür. Diyetle indüklenen zebra balığı obezite modelinin, yine diyetle indüklenen sıçan, fare ve insan modelleri ile visceral adipoz doku komperatif transkriptom analizleri yapılmıştır. Bu analizler sonucunda zebra balığı ve memelilerin koagülasyon kaskadları ve lipit metabolizmasıyla ilgili olarak ortak patofizyolojik yollar içerdiği anlaşılmıştır (Oka ve ark., 2010).

2010'da Oka ve arkadaşlarının geliştirdiği Artemia'larla fazla beslenme sonucu indüklenen diyabet modeli daha sonra kullanılan balık yeminin değiştirilmesiyle modifiye edilmiştir(Oka ve ark.,2010).Modifiye edilen bu yeni modelde, fazla beslenen balıklar ile normal beslenen balıklar arasında yükselmiş açlık glukoz seviyesi farklılık görülmüştür. Hiperglisemik zebra balıklarının glukoz tolerans testi, insülin üretimi ölçümleri ve insan anti-diyabetik ilaçlarına verdikleri glisemik yanıtları değerlendirildiğinde T2DM için kullanışlı bir model oldukları anlaşılmıştır. Ayrıca, karaciğer-pankreas dokularının RNA sekans analizi T2DM zebra balığı modelinin patolojisinin insanla ortak yollar paylaştığını ortaya çıkarmıştır. Fazla beslenme yoluyla oluşturulan bu T2DM modelinde, FBG (fazla beslenen grup) günde 6 defaya bölünecek şekilde balık başına 120 mg yem ile beslenirken, kontrol grubu 20 mg yem ile beslenmiştir. Vücut ağırlıkları ve açlık kan glukozları haftada bir, plazma trigliserit iki haftada bir ölçülmüştür. Glukoz ölçümleri için intraperitoneal glukoz tolerans testi ve oral glukoz tolerans testi kullanılmıştır. Karaciğer-pankreas dokularının Western-Blot analizleri yapılmıştır. Balıkların sularına metformin ve glimepiride eklenerek inkübasyon gerçekleştirilmiştir. 8 haftalık fazla beslenme periyodunun sonunda balıkların karaciğer-pankreas doku örnekleri üzerinden RNA sekans dataları elde edilmiştir. Fazla beslenme periyodunun ilk haftasının sonunda FBG'da kontrol grubuna kıyasla vücut ağırlığı ve açlık kan glukozu açısından belirgin bir artış gözlenmiştir ve bu trend 8 haftalık deney sürecinin sonuna kadar bu şekilde devam etmiştir. Ayrıca, visceral adipoz doku hacmi, plazma trigliserit, ve karaciğerde lipit birikimi FBG

grubunda artış göstermiştir. T2DM'nin en sık önerilen tedavi yöntemlerinden biri kalori kısıtlaması olduğu için, 8 haftalık fazla beslenme periyodundan sonra 4 haftalık günde 1 defa balık başına 20 mg yem ile beslenme şeklinde bir kalori kısıtlama uygulanmıştır. Kalori kısıtlamasının ikinci haftasının sonunda açlık kan glukozu %24, dördüncü haftasının sonunda %34 düşmüş olsa da, hala kontrol grubuna kıyasla yüksek seviyelerde devam etmiştir. 7 günlük metformin maruziyeti sonucunda FBG'nun açlık kan glukoz seviyeleri, metformine maruz bırakılmamış fazla beslenmiş balıklara kıyasla ciddi oranda düşmüştür. 24 saatlik glimepirid maruziyeti de FBG'nin açlık kan glukozu seviyelerinde ciddi düşüşler sağlamıştır. Karaciğer-pankreatista glukoz intoleransının transkripsiyonel mekanizmalarını araştırmak üzere RNA sekanslama uygulanmıştır. FBG'ye ait örneklerde normal beslenen gruba kıyasla transkripsiyonu 83 artan ve 64 azalan gen bulunmuştur ve bu 147 genin Ensembl gen ortoloğu veri tabanına göre 121 insan ortoloğu bulunmaktadır. Böylece, zebra balığının gen ekspresyon profili insandaki T2DM ile ortak yolları ortaya konmuştur. Ayrıca, FBG balıkları ve T2DM hastaları arasında benzer insülin sekresyon yolları vardır ancak insülin direnci yolları RAS ve MAP3Kkaskadlarında farklılıklar göstermektedir. Bu çalışma ile 1 haftalık fazla beslenme periyodunun zebra balıklarında T2DM oluşturmak için yeterli olduğu gösterilmiştir (Zang ve ark., 2017)

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Zebra Balıkları Bakım ve Beslenme Prosedürü

Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanan çalışmamızda yetişkin yabani tip AB suşu zebra balıkları kullanılmıştır. Zebra balıkları ideal şartların sağlandığı maruziyet tanklarında barındırılmıştır. Günde 14 saat gün ışığına, 10 saat karanlık olacak şekilde aydınlatma sistemi kurularak sirkadiyen ritimleri oluşturulmuştur. Tanklarda, balıkların akvaryumlarında yaşadıkları ortamı oluşturmak için sistem suyu kullanılmış ve sıcaklık 28 ± 1 oC olarak ayarlanarak sabit tutulmuştur. Sistem suyunun pH'sı 6,9-7,2 arası ayarlanmış ve sabit tutulmuştur. Fiziksel ve UV sistemlerini içeren filtrasyon sistemi ile balıkların ortam temizliği sağlanmıştır. Gerekli oksijen pompaları tanklara yerleştirilmiştir. Yemlerin özel olarak ayarlanan saatlerde verilebilmesi için otomatik yemleyiciler tanklara monte edilerek kurulmuştur. Tankların temizliği her gün düzenli olarak, atıklardan pipet ucu yardımıyla arındırılarak sağlanmış ve sistem suları günlük olarak değiştirilmiştir. D, D+YDS, D+DDS gruplarına fazla beslenme uygulaması yapılmış; kontrol grubunun ise normal beslenme düzeni devam ettirilmiştir.



Resim 2:ZEBTEC Mini Akvaryum sistemi

5.2. Kullanılan Cihazlar

Deneyleerde kullanılan cihazlar Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2: Deneyleerde kullanılan cihazlar

Vortex	V-1 PLUS, Biosan	Buzdolabı	İndesit TAA 12 V
Santrifüj	Sigma 1-16K, Sigma	Akvaryum	Zebtec mini sistem
Spektrofotometre	Shimadzu UV- 120-02	pH metre	Hanna HI 2211
RT-PCR	Rotor Gene-Q, Qiagen	Magnetik karıştırıcı	Witeg Wisd Hotplate Stirrer MSH
DNA-RNA izolasyon cihazı	QIAcube, Qiagen	Hassas terazi	Shimadzu ATX224
Homojenizatör	Tissuelyser LT, Qiagen	Otomatik pipetler	Rainin
Etüv	Nüve EN 400	Distile su cihazı	Elga Option-Q Ultra saf su sistemi

5.3. Kullanılan Kimyasallar

Çalışmamızda kullandığımız maddeler analitik saflıktadır. Sigma, Merck, Fisher Bioreagents, Acros, Biovision, TRC Canada ve Bio-Optica firmalarından tedarik edilmiş ve kullanılmıştır (Tablo 3).

Tablo 3: Kullanılan kimyasallar listesi

Sodyum karbonat	MERCK 1.06392.1000
Sodyum hidroksit	MERCK 1.06482.1000
Bakır (III) sülfat	FISHER CHEMICAL C/8600/50
Sodyum potasyum tartarat	MERCK 1.08087.1000
Folin çözeltisi	SIGMA F9252
Sodyum klorür	SIGMA S9888
Albumin	SIGMA A3912
Tiyobarbük asit (TBA)	SIGMA T5500-25G
Triklorasetik asit (TCA)	ACROS 421451000
Hidroklorik asit	MERCK 1.00317.2500
n-bütanol	FISHER BIOREAGENTS B/4800/17
Çinko sülfat heptahidrat	MERCK 1.08883.1000
Vanadyum (III) Klorür	ACROS 197000250
Sülfaniamid (SULF)	SIGMA S9251
N-(1-Naftil)-etilendiamin dihidroklorür (NEDD)	MERCK 1.06237.0025
Dipotasyum hidrojen fosfat	SIGMA P2222-100G
Potasyum dihidrojen fosfat	SIGMA P5655-100G
Disodyum hidrojen fosfat	SIGMA 255793-10G
Sodyum Etilendiamin tetraasedik asit (Na- EDTA)	SIGMA E4884-100G
Riboflavin	FISHER BIOREAGENTS BP167-50
o-dianisin	ACROS 407890050
L-Glutatyon (GSH)	SIGMA G4251-5G
1-kloro-2,4-dinitro-benzen (CDNB)	ACROS 160511000
Stevioside	TCI,S0594

5.4. Maruziyet Grupları

Zebra balıkları deney grupları:

- Kontrol Grubu (20 balık)
- Diyabet grubu (Fazla beslenme uygulanan grup, 20 balık)
- Diyabet + düşük doz stevia grubu (Fazla beslenme uygulanan ve akvaryum suyuna 1mg/L stevia eklenen grup, 20 balık)
- Diyabet + yüksek doz stevia grubu (Fazla beslenme uygulanan ve akvaryum suyuna 5 mg/L stevia eklenen grup, 20 balık) şeklindedir.

5.5. Maruziyet Uygulaması

Stevia glikoziti, D+DDS grubunun bulunduğu tanka 1 mg/L dozunda DMSO (%0.1) ve distile suda çözülerek 24 saatte bir, tank temizliğini takiben içindeki suyun her yenilenmesiyle birlikte eklenmiştir. Aynı şekilde, D+YDS grubunun tankına ise 5 mg/L dozunda eklenmiştir.

Fazla beslenme uygulaması günde 6 defaya bölünecek şekilde toplamda balık başına 120 mg ticari balık yemi (Tetramin) verilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Tetramin içeriği minimum %11 ham yağ, % 51 ham protein, % 2,3 kalsiyum, % 1,5 fosfor, maksimum % 15 kül, % 3 ham fiber ve % 6,5 nem şeklindedir. Granül boyutu 0.36–0.65 mm ve enerjisi 3.39 kcal/g'dır. Kontrol grubu zebra balıkları balık başına günde 20 mg balık yemi ile beslenmiştir.

Maruziyet süresi 2 hafta süresince uygulanmıştır.

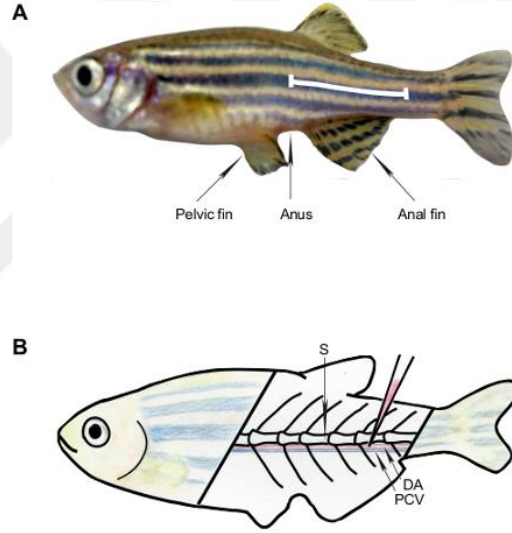
Fazla besleme maruziyetinin ardından OGTT ve açlık kan şekeri ölçümü gerçekleştirilmiş, sonrasında hayvanlara anestesi uygulanmış ve hayvanlar sakrifiye edilerek hepatopankreas (karaciğer ve pankreas) dokuları çıkarılmıştır.

5.6. Oral Glukoz Tolerans Testi (OGTT)

Fazla beslenme prosedürüne başlanmadan önce her gruptaki balıkların açlık kan şekerleri glukometre ile ölçülmüştür.

2 haftalık fazla beslenme prosedürünün bitiminde balıkların açlık kan şekerleri ölçülmüş; ve OGTT uygulanmıştır.

Açlık kan glukozu ölçümü ve OGTT için gerekli olan kan balığın dorsal aort damarından insülin enjektörüyle alınarak gerçekleştirilmiştir. Kan alımının öncesinde anestezi işlemi için Tricane (Sigma A5040) kimyasalı kullanılmıştır. Hazırlanan çözeltide 2 dakika boyunca inkübe edilen balıklar anestezi altına alınmıştır.

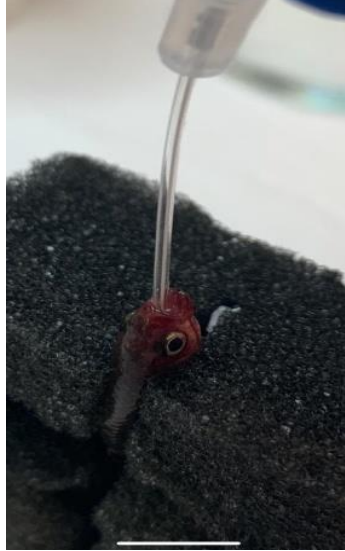


Şekil 3: Kan alımı yapılan dorsal aort damarının konumu (Zang ve ark., 2015)



Resim 3:Çalışmamızda gerçekleştirilen kan alımı uygulamasına ait görüntü

OGTT için, gavaj yöntemiyle balığın gram ağırlığı başına 1,25 mg glukoz çözeltisi verilmiştir. Gavajı takiben 30., 60. ve 120. dakikalarda balıklardan alınan kanın glukoz seviyesi glukometre ile ölçülmüştür.



Resim 4: Çalışmamızda mikropipet yardımıyla yapılan gavaj uygulamasına ait görüntü

5.7. Oksidan ve Antioksidan Parametrelerinin İncelenmesi

5.7.1. Parametreler için tayin yöntemleri

5.7.1.1. Total protein tayini (Lowry ve ark., 1951)

Bu metotta önce proteinler alkali ortamda bakır iyonları ile reaksiyona sokulur. Daha sonra fosfomolibdik - fosfotungstik asit reaktifi (folin reaktifi) ile indirgenir. Oluşan mavi rengin şiddeti spektrofotometrik olarak değerlendirilir. Oluşan mavi rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile orantılıdır.

Gerekli Çözeltiler

A çözeltisi:Sodyum karbonat çözeltisi (% 2 g, 0,1 N NaOH'teki); 0.4 g NaOH biraz suda çözülür ve hacmi 100 ml'ye distile su ile tamamlanır. 2 g sodyum karbonat hazırlanan 0,1 N NaOH çözeltisinde çözülür ve hacmi 100 ml'ye 0,1 N NaOH çözeltisi ile tamamlanır.

Bakır sülfat çözeltisi (% 1 g): 1 g bakır sülfat biraz distile suda çözülür ve hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

Sodyum potasyum tartarat çözeltisi (% 2 g): 2 g sodyum potasyum tartarat biraz distile suda çözülür ve hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

B çözeltisi: % 1 g lık Bakır sülfat çözeltisi ile % 2 g lık Sodyum potasyum tartarat çözeltisi eşit hacimde (1/1) karıştırılarak kullanılır.

C çözeltisi: 50 ml A çözeltisi ve 1 ml B çözeltisi karıştırılarak kullanılır.

Folin çözeltisi: 100 g sodyum tungstat, 25 g sodyum molibdat x2H₂O, 50 ml % 85 g lik fosforik asid, 100 ml derişik HCl ve 700 ml distile su bir balona konularak 10 saat geri soğutucu altında kaynatılır. Soğutulur. Üzerine 150 g Li₂SO₄ ilave edilip, geri soğutucu altında 15 dk daha kaynatılır. Soğuduktan sonra, 5-6 damla brom katılır.

(çözelti bozursa renk siyahlaşır, bu durumda çözelti tekrar hazırlanır, bozuk değilse renk sarı yeşil olur). Çözelti distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır ve kullanılır. Koyu renkli şişede saklanır, uzun süre dayanır.

Serum fizyolojik (% 0,9 g NaCl): 0,9 g NaCl biraz suda çözülür ve hacmi 100 ml'ye distile su ile tamamlanır.

Protein stok standart çözeltisi (% 100 mg lık albumin çözeltisi): 100 mg albumin biraz serum fizyolojik de çözüldükten sonra hacmi 100 ml'ye serum fizyolojik ile tamamlanır.

Protein çalışma standart çözeltileri: Stok çözeltilerden uygun hacimler alınarak % 5, 15, 25 mg albumin ihtiva edecek şekilde serum fizyolojik ile seyreltilerek hazırlanır.

Deneyin Yapılışı

5 deney tübü alınarak numune (N), standart 1 (St1), standart 2 (St2), standart 3 (St3) ve kör (K) olmak üzere işaretlenir ve aşağıdaki gibi çalışılır.

Tablo 4: Total protein tayini yöntemi

	Numune (N)	St1 % 5 mg Albumin	St2 % 10 mg Albumin	St3 % 15 mg Albumin	Kör (K)
Albumin (% 100mg)	-	25 µl	50 µl	75 µl	-
Doku homojenatı (veya süpernatant)	10 µl	-	-	-	-
Serum fizyolojik	490 µl	475 µl	450 µl	425 µl	500 µl
Toplam hacim	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
Vortekste karıştırılır.					
C çözeltisi	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
Vortekste iyice karıştırılır ve oda sıcaklığında 10 dk bekletilir.					
Folin ayıracağı	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml

Vortekste iyice karıştırılır, oda sıcaklığında karanlıkta 30 dk. bekletilir. 30 dk. sonunda 500 nm de cam küvette köre karşı absorbanslar kaydedilir. Standart grafiği çizilir. Doku protein miktarı hesaplanır.

5.7.1.2. Lipit peroksidasyon (LPO) tayini (Ledwozyw ve ark.,1986)

LPO ürünü olan malondialdehit (MDA) ile tiyobarbitürik asit (TBA) arasındaki reaksiyon sonucu oluşan pembemsi rengin absorbansı spektrofotometrik olarak değerlendirilir.

Gerekli Çözeltiler

NaOH (1 M): 4 gram NaOH tartılır, biraz distile suda çözülür, hacmi 100 ml ye distile su ile tamamlanır.

TBA çözeltisi (0.047 M): 500 mg TBA ile 6 ml 1 M lık NaOH ile karıştırılır. Üzerine 69 ml distile su ilave edilir.

Triklorasetik asit (TCA) çözeltisi (1,22 M, 0,6 M HCl deki): 20 ml TCA (% 100 g TCA) ile 5 ml HCl (% 37 g lık, d=1,19 g/dl lik HCl) karıştırılır ve hacmi distile su ile 100 ml ye tamamlanır.

n-butanol: Orijinal şişesinden kullanılır.

Deneyin Yapılışı

2 tane deney tübü alınarak numune ve kör olmak üzere işaretlenir ve aşağıdaki gibi çalışılır.

Tablo 5: Lipit peroksidasyon tayin yöntemi

	Numune	Kör
Doku homojenatı	0,25 ml	-
Distile su	-	-
TCA	1,25 ml	-
Vortekste karıştırılır ve 15 dk bekletilir.		
TBA	0,75 ml	-
Vorteks ile karıştırılır ve 30 dk kaynar su banyosunda inkübe edilir.		
n-butanol	2 ml	1 ml

İlave edilir. Vortekslenir ve 10 dk. 3000 rpm’de santrifüj edilir. 1ml butanol fazı alınarak 532 nm’de cam küvette köre karşı absorbanlar kaydedilir. MDA için saptanmış ekstinksiyon kat sayısı ($1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) kullanılarak sonuçlar hesaplanır.

5.7.1.3. Total nitrik oksid tayini (Miranda ve ark., 2001)

Nitrat, vanadyum (III) klorür ile nitrite indirgenir. Nitritle sülfanilamidin asidik ortamda N-(1-Naftil) etilendiamine dihidroklorür ile reaksiyonu sonucu kompleks diazonyum bileşiği oluşur. Oluşan bu renkli kompleks 540 nm’ de spektrofotometrik olarak ölçülür.

Gerekli Çözeltiler

0,3 M NaOH çözeltisi: 0,6 g NaOH tartılır, bir miktar distile suda çözülür ve üzeri distile su ile 50 ml’ ye tamamlanır.

% 10'luk ZnSO₄: 5 g ZnSO₄ yada 8,9 g ZnSO₄.7 H₂O tartılır bir miktar distile suda çözülür ve üzeri distile su ile 50 ml tamamlanır.

1 M HCl: 4,20 ml HCl çekilir ve üzeri distile su ile 50 ml ye tamamlanır.

VCl₃: 0,4 g VCl₃ bir miktar 1 M HCl de çözülür ve üzerine aynı çözelti ile 50 ml' ye tamamlanır.

% 5'lik HCl: 2,86 ml % 37'lik HCl çekilir ve üzeri distile su ile 25 ml ye tamamlanır.

% 2'lik SULF(Sülfanilamid): 0,5 g Sülfanilamid tartılır, 25 ml % 5' lik HCl içerisinde çözülür.

% 0,1'lik NEDD (N-(1-Naftil)-etilendiamin dihidroklorür): 0,025 g NEDD tartılır. Bir miktar deiyonize suda çözülür ve üzeri deiyonize su ile 25 ml' ye tamamlanır.

Deneyin Yapılışı

Doku homojenatı 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edilir. 0,3 ml süpernatant alınır, üzerine 0,3 ml 0,3 M NaOH ilave edilir. Oda sıcaklığında 5 dk beklenir. 0,3 ml % 10'luk ZnSO₄ ilave edilir. Vortekslenir. +4'de 14000 rpm'de 5 dk santrifüj edilir. Üst faz alınır ve +4'de 14000 rpm'de 5 dk santrifüj edilir. İki adet deney tübü alınır, kör ve numune olarak işaretlenerek aşağıdaki gibi çalışılır.

Tablo 6: Nitrik oksit tayin yöntemi

	Numune	Kör
Deproteinize Sıvı	0,3 ml	-
Distile Su	-	0,6 ml
VCl ₃	0,3 ml	0,3 ml
SULF	0,15 ml	-
NEDD	0,15 ml	-
30 dk 37 °C'de etüvde inkübe edilir.		

Köre karşı 540 nm'de absorbans kaydedilir. Sonuçlar $53000 \text{ M}^{-1}/\text{cm}^{-1}$ ekstinsiyon katsayısı ile $\mu\text{mol}/\text{L}$ cinsinden hesaplanır.

5.7.1.4. SOD aktivitesi tayini (Mylorie ve ark., 1986)

SOD aktivitesi, riboflavin ile duyarlandırılmış o-dianisidinin foto-oksidasyon hızını arttırma yeteneği olarak ölçülür. Riboflavinin floresans ışığı etkisiyle oluşturduğu süperoksit radikali, ortamdaki SOD'un etkisiyle hidrojen peroksit dönüşür. H_2O_2 ise o-dianisidin ile reaksiyona girerek renkli ürün oluşturur. SOD aktivitesi ne kadar çok ise renkli ürün oluşumu da o kadar fazla olur. Oluşan renkli ürünün absorbansı 460 nm'de spektrofotometrik olarak değerlendirilir.

Gerekli Çözeltiler

Fosfat Tamponu (50 mM, pH = 7,8): 0.136 gram KH_2PO_4 ve 0.697 gram K_2HPO_4 tartılıp ayrı ayrı biraz distile su içinde çözülür, birleştirilir ve hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlanır (hacim 100 ml ye tamamlanmadan önce pH kontrol edilir, pH 7,8 e ayarlanır) (2°C de saklanır).

Fosfat tamponu + 0,1 mM lık Na-EDTA: 0,0037 gram Na-EDTA tartılır biraz 50mM lık fosfat tamponunda çözülür ve hacmi 50 mM lık fosfat tamponu ile 100 ml'ye tamamlanır.

Potasyum fosfat tamponu (10 mM, pH=7,5): 0,041 gram KH_2PO_4 ve 0,122 gram K_2HPO_4 tartılıp ayrı ayrı biraz distile su içinde çözülür, birleştirilir ve hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlanır (hacim 100 ml ye tamamlanmadan önce pH kontrol edilir, pH 7,5 a ayarlanır). (2°C de saklanır).

Riboflavin (0,2 mM): 7,5 mg riboflavin 100 ml potasyum fosfat tamponunda (10mM lık, pH = 7,5) çözülür.

o- dianisin (6 mM): 19 mg o-dianisin 10 ml distile suda çözülür.

Deneyin Yapılışı

% 10 gramlık doku homojentı 10 dak. 4000 rpm de santrifüj edilir. Süpernatant alınır tam veya 1/10 oranında serum fizyolojik ile seyreltilerek çalışılır.

Numune, standart ve kör olmak üzere 3 deney tüpü alınır.

Tablo 7: Superoksit dismutaz tayin yöntemi

	Numune	Kör
Fosfat Tamponu (pH = 7,8)	2,6 ml	2,6 ml
o- dianisidin	0,1 ml	0,1 ml
Distile Su	--	0.1 ml
--	--	--
Dilue süpernetant	0.1 ml	--
Her tüpe 30 sn ara ile 0,2 ml riboflavin konur, vorteksle karıştırılır. Plastik makro küvette 460 nm 'de abs okunur		
Sonra tüpler oda sıcaklığında 20 W Floresans lamba bulunan kutu içinde 8 dk inkübe edilir. 460 nm'de abs okunur.		

Not: Lamba 20' önceden açılır ve ısınması sağlanır.

5.7.1.5. GST aktivitesi tayini (Habig ve ark., 1981)

GST aktivitesi tayini, GSH ve 1-kloro-2,4-dinitro-benzenin (CDNB) konjugasyonu ile oluşan ürünün, 340 nm'deki absorbansının spektrofotometrik olarak değerlendirilmesi esasına dayanır.

Gerekli Çözeltiler

Sodyum fosfat tamponu (0,2 M, pH= 6,5): 0,534 gram $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 2,3 gram KH_2PO_4 ayrı ayrı biraz distile suda çözülür ve birbirine karıştırılır ve hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır (hacim 100 ml ye tamamlanmadan önce pH kontrol edilir, 1M NaOH ile pH 6,5 e ayarlanır).

Glutasyon (GSH) (60 mM): 1,84 gram glutasyon biraz distile suda çözülür ve hacmi 100 ml'ye tamamlanır.

1-klor-2,4-dinitro-benzen (CDNB) (60 mM) : Absolü etanolde taze hazırlanır. 1,22 gram CDNB tartılır ve biraz etanolde çözülür. Sonra hacmi 100 ml'ye tamamlanır.

Deneyin Yapılışı

% 10 gramlık doku homojenti 10 dak. 4000 rpm de santrifüj edilir. Süpernatant alınır ve 1/40 oranında serum fizyolojik ile seyreltilerek çalışılır. Numune ve kör olarak işaretlenmiş iki tüp alınır ve aşağıdaki gibi çalışılır.

Tablo 8: GST tayin yöntemi

	Numune	Kör
Dilue süpernatant	0,5 ml	--
SF veya Distile Su	--	0,5 ml
Fosfat Tamponu	1,5 ml	1,5 ml
GSH çözeltisi	0,05 ml	0,05 ml
CDNB çözeltisi	0,05 ml	0,05 ml
Distile su	0,90 ml	0,90 ml
Toplam Hacim	3 ml	3 ml

Karıştırılır. 3 dakika süre (0., 1., 2., 3. dakikalarda) ile karışımın 340 nm'de (25 ° C) absorbansları izlenir ve kaydedilir. Absorbans artışı hesaplanır. Glutasyon

ve CDNB'nin konjugasyonu sonucu oluşan ürün için saptanmış olan ekstrinksiyon katsayısı $9,6 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ kullanılarak sonuçlar aşağıdaki gibi hesaplanır. Enzimsel konjugasyon sonucundan, enzimsel olmayan konjugasyon değerleri çıkarılır.

5.8. Gen İfadesi Analizi (RT-PCR)

Maruziyet sonrası gen ifadeleri analizi için çıkarılan hepatopankreas (karaciğer ve pankreas) dokuları RLT Lizis tamponu içinde homojenize edilmiştir (Tissue lyser, Qiagen). Bu homojenatlardan mRNA elde edilerek cDNA sentezi yapılmış ve daha sonrasında *lepa*, *tnf-alfa*, *dnmt3a*, *fgf21*, *IL-21* ve *beta aktin 1* (*actb1*) ifade düzeyleri RT SYBR Green kiti (Qiagen, Almanya) kullanılarak Rotor Gene-Q (Qiagen, Almanya) ile analiz edilmiştir.

RNA izolasyonu için, beyin dokuları RLT lizis tamponu eklenerek homojenize edilmiştir. Daha sonra lizata etanol eklenerek RNA'nın RNeasy membranına bağlanabilmesi için gerekli koşullar sağlanmış ve örnekler RNeasy spin kolonuna aktarılmıştır. Total RNA membrana bağlandığında kontaminantların da yıkanması ile RNA elüsyonu RNase-free su içinde gerçekleştirilmiştir. Bağlanma, yıkanma ve elüsyon işlemleri Qiacube (Qiagen) izolasyon cihazı kullanılarak yapılmıştır.

Elde edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi, One Script (ABM) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Analiz edilecek genlerin ifadeleri, RT² SYBR Green Master Mix karışımına elde edilen cDNA örneklerinin eklenmesi şeklinde Rotor-Gene Q cihazı kullanılarak tespit edilmiştir. Housekeeping gen olarak *actb1* kullanılmıştır. Örnekler tekrarlı çalışılmıştır.

5.8.1. Delta delta C_t metodu ile veri analizi

Verilerin analizi house keeping gen *actb1* ile normalizasyona dayalı delta delta C_t ($\Delta\Delta C_t$) metodu kullanılarak yapılmıştır.

Bu yöntem ile PCR’da belirlenen eşik değeri döngü sayısı (threshold cycle number = C_t), kontrol ve araştırılan gen için karşılaştırılır. Kontrol (referans) ile incelenecek gen bölgesi arasındaki C_t değeri farklılığı housekeeping gen ile normalize edilip $\Delta\Delta C_t$ oranı belirlenerek bulunur. “Housekeeping” genler tüm çekirdekli hücrelerde aktif olarak bulunan genlerdir ve bunlara spesifik primerlerle amplifiye edilerek belirlenirler. Bu amaçla kullanılan gen bölgeleri arasında β -aktin, albumin, β -globin, hipoksantin fosforibozil transferaz sayılabilir. Karşılaştırmalı C_t metodu aynı zamanda $2^{-[\Delta\Delta C_t]}$ olarak bilinmektedir (Yuan ve ark., 2008).

$$[\Delta\Delta C_t] = [\Delta C_t]_{\text{örnek}} - [\Delta C_t]_{\text{referans}}$$

Bu formülde $[\Delta C_t]_{\text{örnek}}$; ilgilenilen örneğe ait C_t değeri ile housekeeping genin C_t değeri farklılığıdır. $[\Delta C_t]_{\text{referans}}$ ise kontrole ait C_t değeri ile housekeeping genin C_t değeri farklılığıdır (Yuan ve ark., 2008).

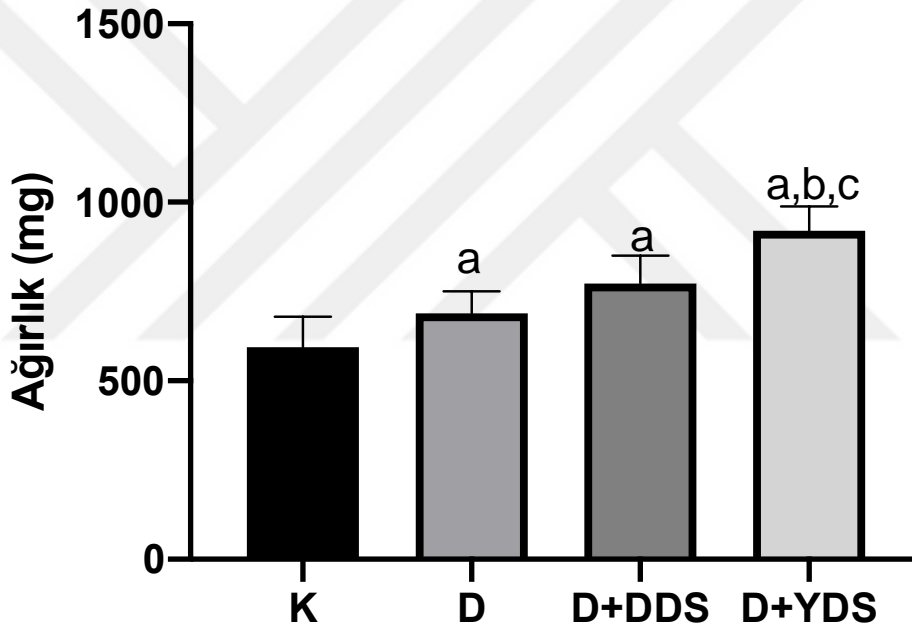
5.9. İstatistiksel Analizi

Verilerin istatistiksel analizi One Way Anova sonrası Post Hoc Tukey Çoklu Karşılaştırma Analizi kullanılarak Graph Pad 7 İstatistik programı ile yapılmıştır. Sonuçlar Ortalama \pm Standart Sapma şeklinde verilmiş, $p < 0,05$ anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

6. BULGULAR

6.1. Grupların 15.gün Vücut Ağırlıkları Karşılaştırması

Kontrol (K), Diyabet (D), Diyabet+Düşük Doz Stevia (DDS) ve Diyabet+Yüksek Doz (YDS) gruplarında vücut ağırlıklarının karşılaştırması Şekil 4'te verilmiştir. 15. gün vücut ağırlıkları tüm D gruplarında K grubuna göre anlamlı derecede artmıştır. D+YDS grubunda ise D ve D+DDS gruplarına göre anlamlı derecede artmıştır.



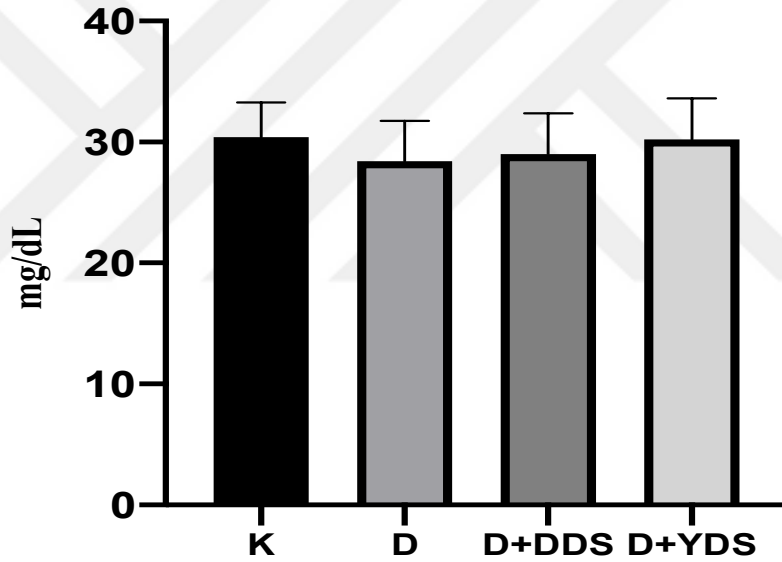
Şekil 4:Grupların 15.gün vücut ağırlıkları karşılaştırması grafiği

Veriler ortalama \pm SD şeklinde verilmiştir. Anlamlı farklar a, b ve c harfleri ile gösterilmiştir. n=13; K: Kontrol; D: Diyabet; D+DDS: Diyabet+ Düşük Doz Stevia; D+YDS: Diyabet+ Yüksek Doz Stevia;^a p<0,05 K grubundan anlamlı derecede farklı; ^b p<0,05D grubundan anlamlı derecede farklı; ; ^cp<0,05D+DDS grubundan anlamlı derecede farklı

6.2. Kan Glukoz Değerleri

6.2.1. Başlangıç (0.gün) açlık kan glukoz değerleri

Kontrol (K), Diyabet (D), Diyabet+Düşük Doz Stevia (DDS) ve Diyabet+Yüksek Doz (YDS) gruplarında kan glukoz değerleri karşılaştırması Şekil 5'te verilmiştir. Başlangıç (0.gün) açlık kan glukoz değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır.

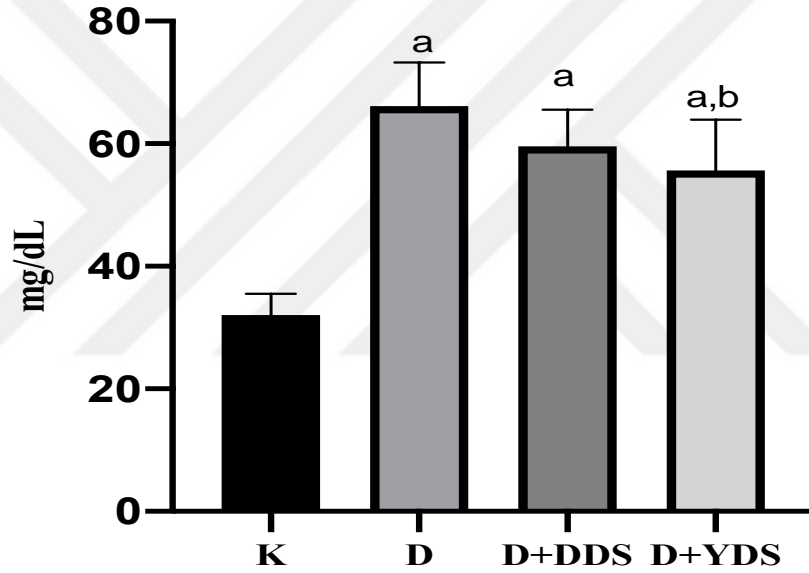


Şekil 5: Grupların başlangıç (0.gün) açlık kan glukoz değerleri karşılaştırılması grafiği

n=13, Veriler ortalama \pm SD şeklinde verilmiştir. Kontrol; D: Diyabet; D+DDS: Diyabet+ Düşük Doz Stevia; D+YDS: Diyabet+ Yüksek Doz Stevia

6.2.2. 15. Gün açlık kan glukoz değerleri

Kontrol (K), Diyabet (D), Diyabet+Düşük Doz Stevia (DDS) ve Diyabet+Yüksek Doz (YDS) gruplarında 15.gün kan glukoz değerleri karşılaştırması Şekil 6’te verilmiştir. Açlık kan glukoz değerleri D, D+DDS, D+YDS gruplarında K grubuna göre anlamlı derecede artmıştır. D+YDS grubunda ise açlık kan glukoz değerleri D grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır.

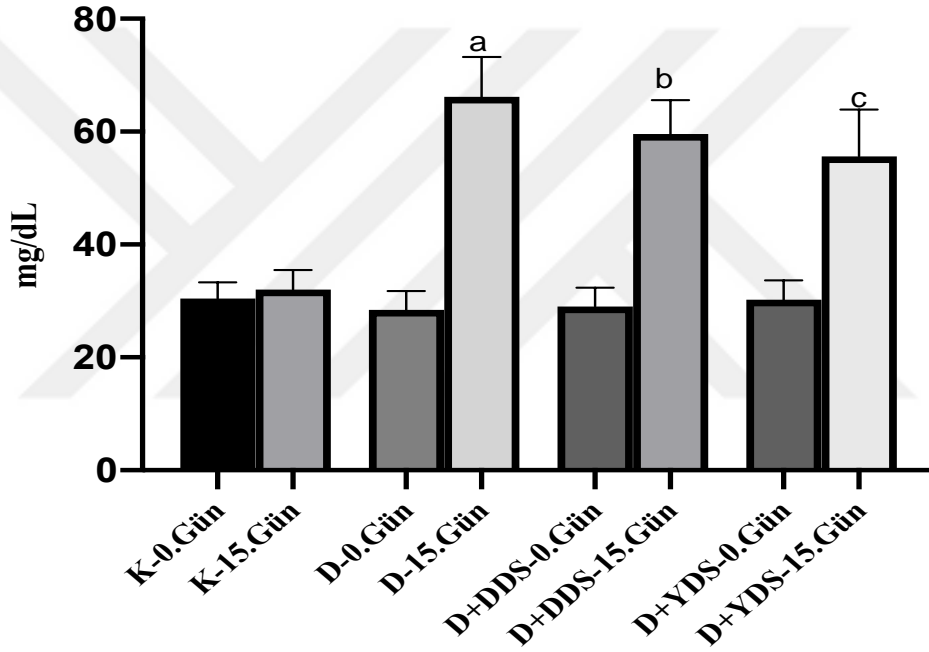


Şekil 6:Grupların başlangıç (15.gün) açlık kan glukoz değerlerikarşılaştırılması grafiği

Veriler ortalama \pm SD şeklinde verilmiştir. Anlamlı farklar a ve b harfleri ile gösterilmiştir. n=13; K: Kontrol; D: Diyabet; D+DDS: Diyabet+ Düşük Doz Stevia; D+YDS: Diyabet+ Yüksek Doz Stevia;^a $p<0,05$ K grubundan anlamlı derecede farklı; ^b $p<0,05$ D grubundan anlamlı derecede farklı

6.2.3. Grupların 0-15. gün açlık kan glukoz değerleri karşılaştırması

Kontrol (K), Diyabet (D), Diyabet+Düşük Doz Stevia (DDS) ve Diyabet+Yüksek Doz (YDS) gruplarında 0. Gün ile 15.gün kan glukoz değerleri karşılaştırması Şekil 7’da verilmiştir. Açlık kan glukozun 15.gün değerleri D, D+DDS, D+YDS gruplarında 0. gün değerlerine göre anlamlı derecede artmıştır. K grubunda ise 0. Gün ve 15. Gün glukoz değerleri arasında bir fark bulunmamaktadır.

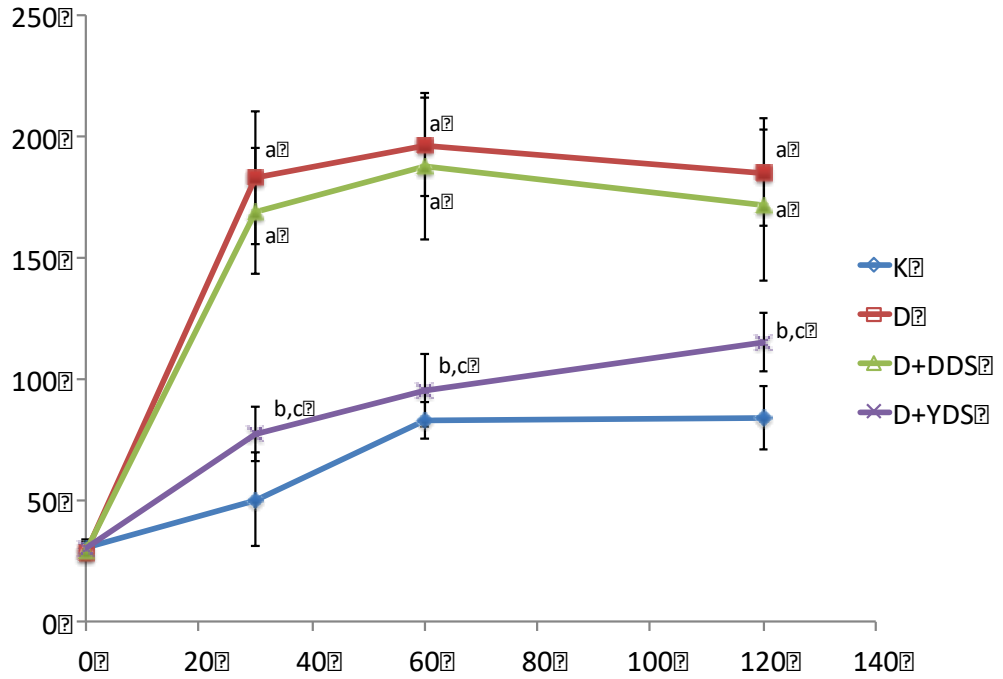


Şekil 7:Grupların başlangıç (0.gün) ve 15. gün açlık kan glukoz değerlerikarşılaştırılması grafiği

Veriler ortalama \pm SD şeklinde verilmiştir. Anlamlı farklar a ve b harfleri ile gösterilmiştir. K: Kontrol; D: Diyabet; D+DDS: Diyabet+ Düşük Doz Stevia; D+YDS: Diyabet+ Yüksek Doz Stevia;^a $p < 0,0001$ D-0.Gün'den farklı; ^b $p < 0,0001$ D-DDS 0.Gün'den farklı; ^c $p < 0,0001$ D-YDS 0.Gün'den farklı

6.2.4. Grupların oral glukoz test sonuçlarının karşılaştırılması

Kontrol (K), Diyabet (D), Diyabet+Düşük Doz Stevia (DDS) ve Diyabet+Yüksek Doz (YDS) gruplarında 15. Günde yapılan oral glukoz testi sonuçları karşılaştırması Şekil 8’de verilmiştir. Oral yolla glukoz yüklemesinden sonraki 30, 60 ve 120.dk kan glukoz değerleri D ve D+DDS gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttı. D+YDS grubunda ise oral glukoz yüklemesinden sonraki 30, 60 ve 120. dk kan glukoz değerleri D ve D+DDS gruplarına göre anlamlı derecede azaldı.



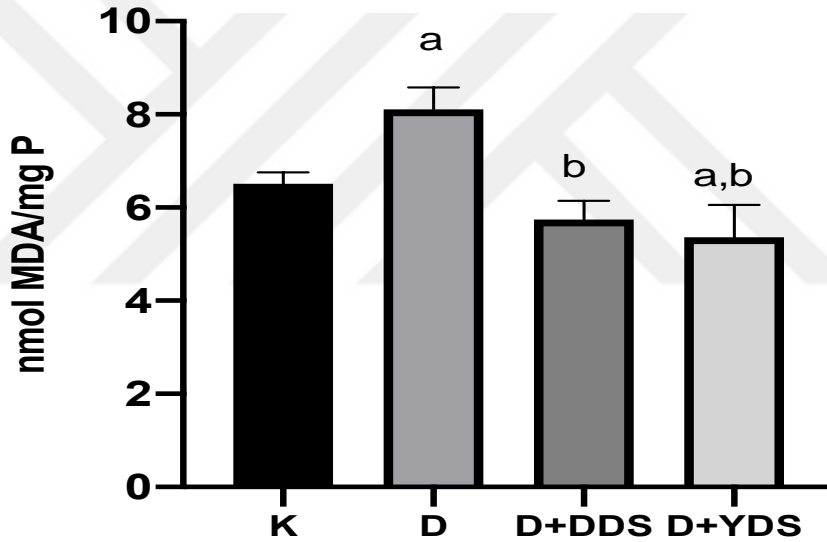
Şekil 8:Grupların başlangıç oral glukoz tolerans test sonuçları grafiği (15.gün)

Veriler ortalama \pm SD şeklinde verilmiştir. Anlamlı farklar a, b ve c harfleri ile gösterilmiştir. K: Kontrol; D: Diyabet; D+DDS: Diyabet+ Düşük Doz Stevia; D+YDS: Diyabet+ Yüksek Doz Stevia; ^a $p < 0,05$ K grubundan farklı; ^b $p < 0,05$ D grubundan farklı; ^c $p < 0,05$ D+DDS grubundan farklı

6.3. Oksidan-Antioksidan Sistem Parametreleri

6.3.1. Grupların lipit peroksidasyon (LPO) analizi sonuçları

Kontrol (K), Diyabet (D), Diyabet+Düşük Doz Stevia (DDS) ve Diyabet+Yüksek Doz (YDS) gruplarında malondialdehit(MDA) olarak ölçülen LPO düzeylerinin karşılaştırması Şekil 9'de verilmiştir. D grubunda LPO düzeyi K grubuna göre anlamlı derecede artmıştır ($p<0,001$). D+DDS grubunda D grubuna göre LPO düzeyi anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,001$). LPO düzeyi D+YDS grubunda K ve D gruplarına göre anlamlı derecede azalmıştır($p<0,001$).

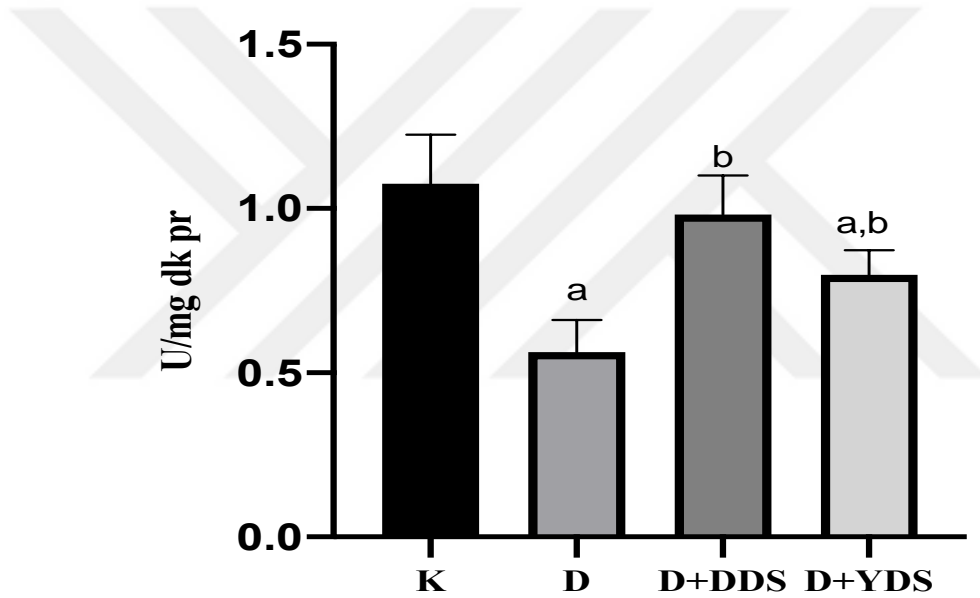


Şekil 9:Grupların lipit peroksidasyon değerlerinin karşılaştırılması grafiği

Veriler ortalama \pm SD şeklinde verilmiştir. Anlamlı farklar a ve b harfleri ile gösterilmiştir. $n=5$; K: Kontrol; D: Diyabet; D+DDS: Diyabet+ Düşük Doz Stevia; D+YDS: Diyabet+ Yüksek Doz Stevia;^a $p<0,05$ K grubundan anlamlı derecede farklı; ^b $p<0,05$ D grubundan anlamlı derecede farklı

6.3.2. Grupların süperoksit dismutaz (SOD) analizi sonuçları

Kontrol (K), Diyabet (D), Diyabet+Düşük Doz Stevia (DDS) ve Diyabet+Yüksek Doz (YDS) gruplarında SOD aktivitesi karşılaştırması Şekil 10'da verilmiştir. D grubunun K grubuna göre SOD aktivitesinde anlamlı azalma olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). D+DDS grubunda SOD aktivitesi D grubuna göre artmıştır. D+YDS grubunda ise SOD aktivitesi K grubuna göre azalmış, D grubuna göre anlamlı derecede artmıştır ($p<0,05$).

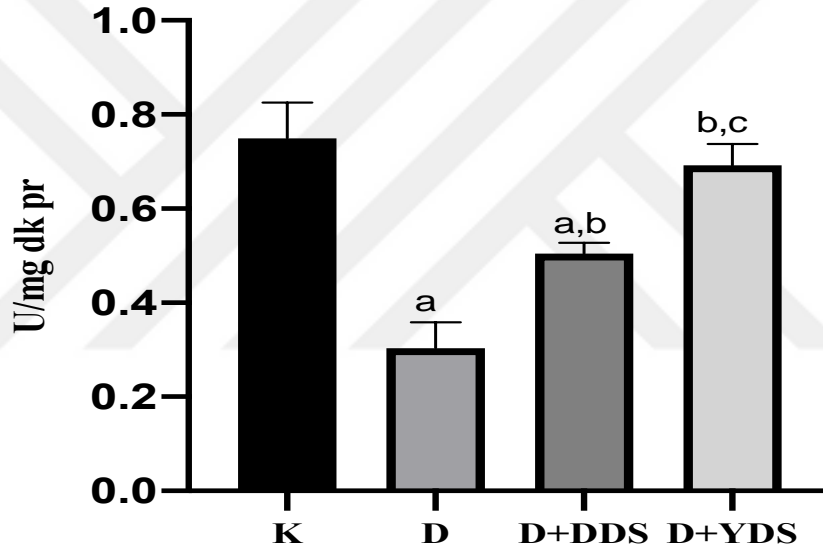


Şekil 10: Grupların süperoksit dismutaz aktivitelerinin karşılaştırılması grafiği

Veriler ortalama \pm SD şeklinde verilmiştir. Anlamlı fark a ve b harfleri ile gösterilmiştir. $n=5$; K: Kontrol; D: Diyabet; D+DDS: Diyabet+ Düşük Doz Stevia; D+YDS: Diyabet+ Yüksek Doz Stevia; ^a $p<0,05$ K grubundan anlamlı derecede farklı; ^b $p<0,05$ D grubundan anlamlı derecede farklı

6.3.3. Grupların glutatyon S-transferaz (GST) analizi sonuçları

Kontrol (K), Diyabet (D), Diyabet+Düşük Doz Stevia (DDS) ve Diyabet+Yüksek Doz (YDS) gruplarının GST aktivitesi karşılaştırması Şekil 11’da verilmiştir. D ve D+DDS gruplarında K grubuna göre GST aktivitesinde anlamlı derecede azalma olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). D+DDS grubunda GST aktivitesi D grubuna göre, D+YDS grubunda ise D+DDS grubuna göre anlamlı derecede artmıştır ($p<0,05$).

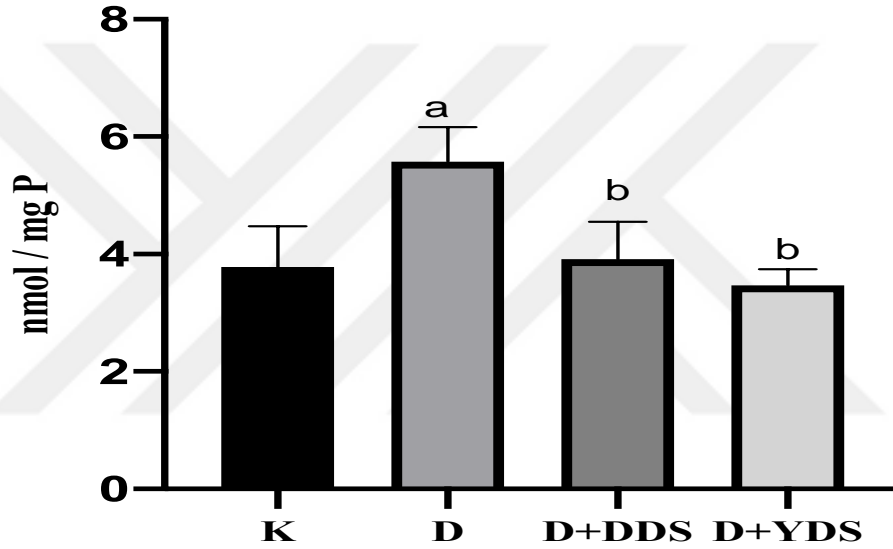


Şekil 11: Grupların glutatyon S-transferaz aktivitelerinin karşılaştırılması grafiği

Veriler ortalama \pm SD şeklinde verilmiştir. Anlamlı fark a, b ve c harfleri ile gösterilmiştir. $n=5$, K: Kontrol; D: Diyabet; D+DDS: Diyabet+ Düşük Doz Stevia; D+YDS: Diyabet+ Yüksek Doz Stevia, ^a $p<0,05$ K grubundan anlamlı derecede farklı; ^b $p<0,05$ D grubundan anlamlı derecede farklı ^c $p<0,05$ D+DDS grubundan anlamlı derecede farklı

6.3.4. Grupların nitrit oksit (NO) analizi sonuçları

Kontrol (K), Diyabet (D), Diyabet+Düşük Doz Stevia (DDS) ve Diyabet+Yüksek Doz (YDS) gruplarının NO sonuçlarının karşılaştırması Şekil 12’de verilmiştir. NO düzeyleri K grubuna göre D grubunda artmıştır ($p<0,05$). D+DDS ve D+YDS gruplarında ise NO düzeyleri D grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,05$).



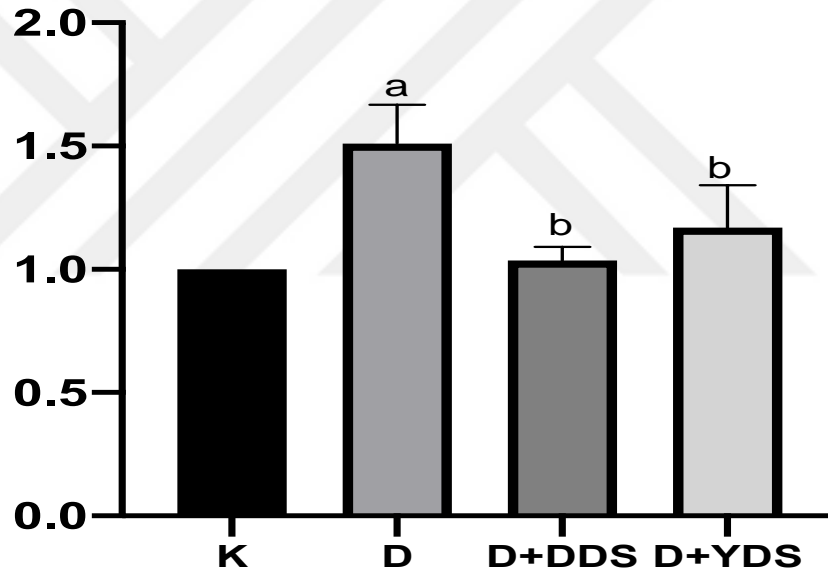
Şekil 12: Grupların nitrik oksit değerlerinin karşılaştırılması grafiği

Veriler ortalama \pm SD şeklinde verilmiştir. Anlamlı fark a, b ve c harfleri ile gösterilmiştir. $n=5$; K: Kontrol; D: Diyabet; D+DDS: Diyabet+ Düşük Doz Stevia; D+YDS: Diyabet+ Yüksek Doz Stevia, ^a $p<0,05$ K grubundan anlamlı derecede farklı; ^b $p<0,05$ D grubundan anlamlı derecede farklı

6.4. RT-PCR Analizi Sonuçları

6.4.1. *fgf21* mRNA ekspresyon analizi sonuçları

Kontrol (K), Diyabet (D), Diyabet+Düşük Doz Stevia (DDS) ve Diyabet+Yüksek Doz Stevia (YDS) gruplarının *fgf21*mRNA ifadesi sonuçlarının karşılaştırması Şekil 13’de gösterilmiştir. D grubunda *fgf21*mRNA ifade düzeyinde K grubuna göre anlamlı derecede artma olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). D+DDS ve D+YDS gruplarında *fgf21*mRNA ifade düzeyleri D grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,05$).

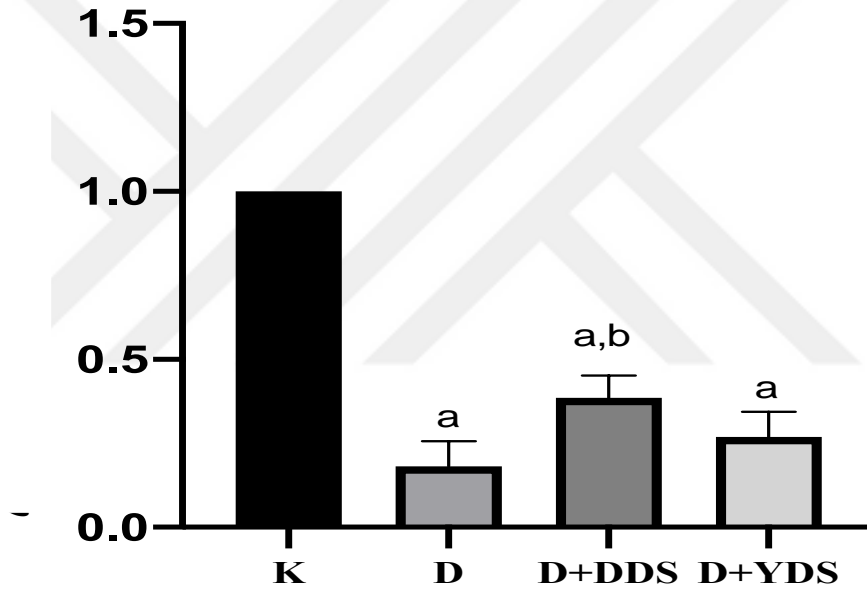


Şekil 13: Grupların *fgf21*mRNA ekspresyon analiz grafiği

Tüm RT-PCR normalizasyonu hem deney setlerinde hem de kontrol gruplarında β -*aktin* amplifikasyonu ile sağlanmıştır. Ortalama değerler üç tekrar çalışmasının sonucu elde edilmiştir. Veriler ortalama \pm SD şeklinde verilmiştir. Anlamlı fark a ve b harfleri ile gösterilmiştir. Kontrol (K), Diyabet (D), Diyabet+Düşük Doz Stevia (DDS) ve Diyabet+Yüksek Doz Stevia (YDS), ^a $p<0,05$ K grubundan anlamlı derecede farklı; ^b $p<0,05$ D grubundan anlamlı derecede farklı

6.4.2. *dnmt3a*mRNA ekspresyon analizi sonuçları

Kontrol (K), Diyabet (D), Diyabet+Düşük Doz Stevia (D+DDS) ve Diyabet+Yüksek Doz Stevia (D+YDS) gruplarının *dnmt3a*mRNA ekspresyonu sonuçlarının karşılaştırması Şekil 14'te gösterilmiştir. D, D+DDS ve D+YDS gruplarında *dnmt3a*mRNA ekspresyon düzeyi K grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır ($p < 0,05$). D+DDS grubunda *dnmt3a*mRNA ekspresyon düzeyi D grubuna göre anlamlı derecede artmıştır ($p < 0,05$).

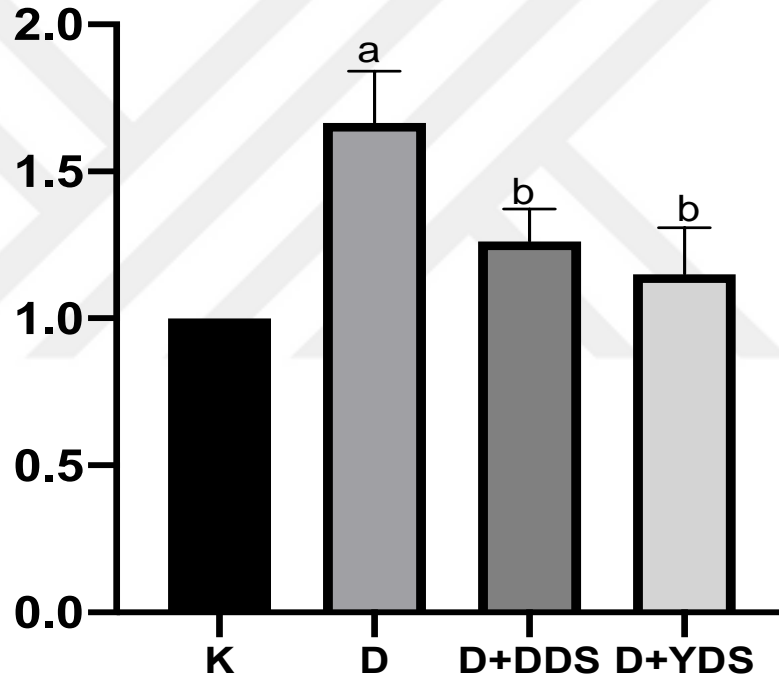


Şekil 14: Grupların *dnmt3a*mRNA ekspresyon analiz grafiği

Tüm RT-PCR normalizasyonu hem deney setlerinde hem de kontrol gruplarında β -*aktin* amplifikasyonu ile sağlanmıştır. Ortalama değerler üç tekrar çalışmasının sonucu elde edilmiştir. Veriler ortalama \pm SD şeklinde verilmiştir. Anlamlı fark a ve b harfleri ile gösterilmiştir. Kontrol (K), Diyabet (D), Diyabet+Düşük Doz Stevia (DDS) ve Diyabet+Yüksek Doz Stevia (YDS), ^a $p < 0,05$ K grubundan farklı; ^b $p < 0,05$ D grubundan farklı

6.4.3. *lepam*RNA ifade analizi sonuçları

Kontrol (K), Diyabet (D), Diyabet+Düşük Doz Stevia (D+DDS) ve Diyabet+Yüksek Doz Stevia (D+YDS) gruplarının *lepam*RNA ekspresyonu sonuçlarının karşılaştırması Şekil 15'te gösterilmiştir. D grubunda K grubuna göre *lepam*RNA ekspresyon düzeyi anlamlı derecede artmıştır ($p<0,05$). D+DDS ve D+YDS gruplarında D grubuna göre *dj-1* mRNA ifade düzeyi anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,05$).

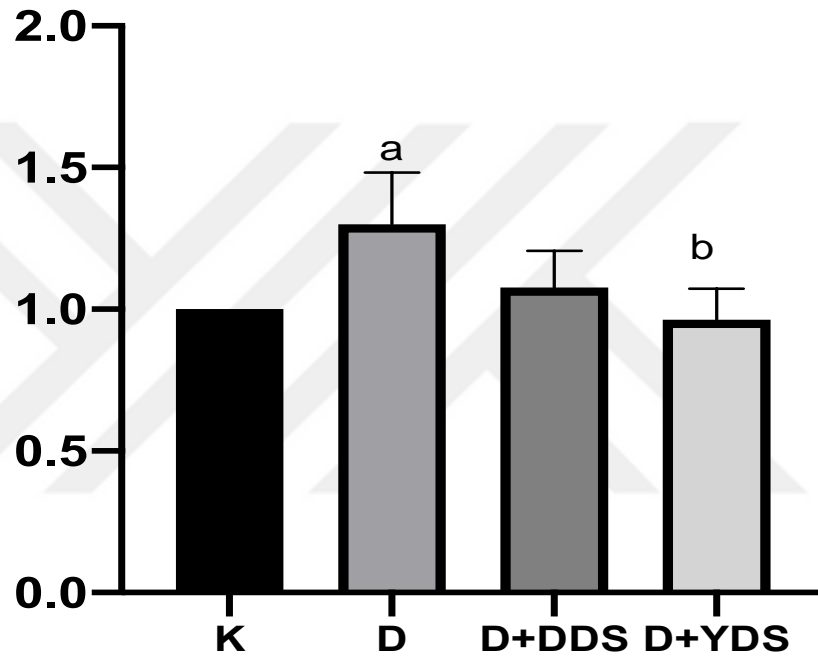


Şekil 15: Grupların *lepam*RNA ekspresyon analiz grafiği

Tüm RT-PCR normalizasyonu hem deney setlerinde hem de kontrol gruplarında β -*aktin* amplifikasyonu ile sağlanmıştır. Ortalama değerler üç tekrar çalışmasının sonucu elde edilmiştir. Veriler ortalama \pm SD şeklinde verilmiştir. Anlamlı fark a ve b harfleri ile gösterilmiştir. Kontrol (K), Diyabet (D), Diyabet+Düşük Doz Stevia (DDS) ve Diyabet+Yüksek Doz Stevia (YDS), ^a $p<0,05$ K grubundan farklı; ^b $p<0,05$ D grubundan farklı

6.4.4. *IL21*mRNA ifade analizi sonuçları

Kontrol (K), Diyabet (D), Diyabet+Düşük Doz Stevia (D+DDS) ve Diyabet+Yüksek Doz Stevia (D+YDS) gruplarının *IL21*mRNA ifadesi sonuçlarının karşılaştırması Şekil 16'da gösterilmiştir. D grubunda K grubuna göre *IL21*mRNA ifade düzeyi anlamlı derecede artmıştır ($p<0,05$). D+YDS grubunda D grubuna göre *IL21*mRNA ifade düzeyi anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,05$).

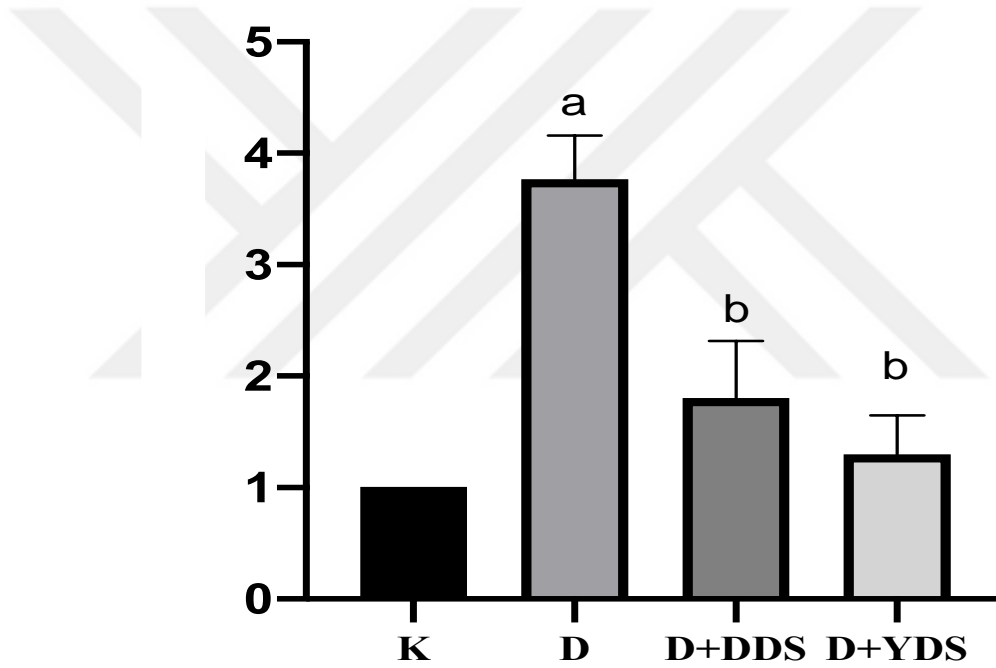


Şekil 16: K ve maruziyet gruplarının *IL21*mRNA ifade analizi grafiği

Tüm RT-PCR normalizasyonu hem deney setlerinde hem de kontrol gruplarında β -*aktin* amplifikasyonu ile sağlanmıştır. Ortalama değerler üç tekrar çalışmasının sonucu elde edilmiştir. Veriler ortalama \pm SD şeklinde verilmiştir. Anlamlı fark a ve b harfleri ile gösterilmiştir. Kontrol (K), Diyabet (D), Diyabet+Düşük Doz Stevia (DDS) ve Diyabet+Yüksek Doz Stevia (YDS), ^a $p<0,05$ K grubundan farklı; ^b $p<0,05$ D grubundan farklı

6.4.5. *tnfam*RNA ifade analizi sonuçları

Kontrol (K), Diyabet (D), Diyabet+Düşük Doz Stevia (D+DDS) ve Diyabet+Yüksek Doz Stevia (D+YDS) gruplarının *tnfam*RNA ifadesi sonuçlarının karşılaştırması Şekil 17’de gösterilmiştir. D grubunda K grubuna göre *tnfam*RNA ifade düzeyi anlamlı derecede artmıştır ($p<0,05$). D+DDS ve D+YDS gruplarında ise *tnfam*RNA ifade düzeyleri D grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,05$).



Şekil 17: K ve maruziyet gruplarının *tnfam*RNA ifade analizi grafiği

Tüm RT-PCR normalizasyonu hem deney setlerinde hem de kontrol gruplarında β -*aktin* amplifikasyonu ile sağlanmıştır. Ortalama değerler üç tekrar çalışmasının sonucu elde edilmiştir. Veriler ortalama \pm SD şeklinde verilmiştir. Anlamlı fark a ve b harfleri ile gösterilmiştir. Kontrol (K), Diyabet (D), Diyabet+Düşük Doz Stevia (DDS) ve Diyabet+Yüksek Doz Stevia (YDS), ^a $p<0,05$ K grubundan farklı; ^b $p<0,05$ D grubundan farklı

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmamız sonucunda on beş gün süre ile fazla beslenmenin vücut ağırlığında, açlık kan glukoz düzeylerinde artışa neden olduğu, LPO ve NO düzeyleri ile *lepa*, *fbf21*, *IL21*, *tnfa* gen ekspresyon düzeyleri artar, SOD, GST aktivitelerini ve *dnmt3a* ekspresyonunu azalttığı belirlenmiştir. Düşük ve yüksek dozlarda stevia uygulaması ise D grubunda bozulan oksidan antioksidan dengeyi, gen ekspresyon düzeylerini ve kan glukoz düzeylerini düzeltmiştir.

Çalışmamızda 15.gün açlık kan glukozu değerlerinin fazla besleme uygulaması yapılmış olan D gruplarında K grubuna göre anlamlı derecede artmış olması oluşturulan diyabet modelinin açlık kan glukozu üzerinde beklenen etkisini göstermektedir. Ayrıca, yüksek doz verilen D grubundaki değer D grubuna göre düşük olması, uygulanan stevia dozunun literatür bilgisiyle uyumlu olarak açlık kan glukoz düzeylerini olumlu etkilediğini ortaya koymaktadır.

OGTT sonuçlarının yüksek doz stevia verilen D grubunda düşük doz uygulanan gruba göre daha düşük bulunması, stevia'nın kan glukozu üzerindeki olumlu etkilerinde doz ayarlanmasının önemini vurgular niteliktedir.

Obezite ve tip 2 diyabet, patofizyolojilerinde çevresel ve genetik faktörler arasındaki önemli sinerjiyi vurgulamak için “medeniyet sendromları” olarak tanımlanmıştır (Wang ve ark 2001) .

Bu kavramın önemli bir prensibi, besinlerin artan mevcudiyetine karşı biyolojik reaksiyonların aktivasyonunun duyarlı bireylerde susturulmasıdır. Bu değişen durum, kilo almanın ve insülin direncinin başlamasına katkıda bulunur ve leptin metabolizmasının bozulması da muhtemeldir.

Çalışmamızda fazla beslenmeye maruz kalan D grubundaki zebra balıklarında insanlardaki leptin geninin ortoloğu olan *lepa* ekspresyonu kontrol grubuna göre artmıştır. Stevia'nın hem düşük hem de yüksek dozda verilmesi ise *lepa* mRNA ifadesini azaltmıştır. Leptin, vücuttaki yağ miktarına orantılı olarak adipositler tarafından salgılanır ve beyine vücut enerji rezervlerinin durumunu gösteren periferik verileri sağlar. Leptinin bu rolüne uygun olarak, bu hormonun veya reseptörlerinin

genetik eksikliği, hem kemirgenlerde hem de insanlarda hiperfaji ve obeziteye neden olur. Bununla birlikte obezite durumuna serbest leptin düzeylerinde artış gözlenmesi, obezitenin leptin eksikliğinden ziyade leptin direnci ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Aslan ve ark., 2004). Zebra balıklarında diyetle indüklenen obezite modelinde vücut kütle indeksinde artış, hipertrigliseridemi ve hepatosteatoz olduğu bildirilmiş ve bu modelde leptin protein düzeylerinin de arttığı gösterilmiştir (Oka ve ark., 2010). Bu modelin bir sınırlaması, zebra balıklarında kahverengi yağ dokusunun olmamasıdır. Memelilerde şişmanlığın gelişimi sadece gıda alımı ve kalori kullanımı arasındaki dengeye değil, aynı zamanda beyaz ve kahverengi yağ dokuları arasındaki dengeye bağlıdır. Bu nedenle, zebra balığında diyetle oluşturulan obezite modeli kahverengi yağ dokusu ile ilgili sinyal yollarını tanımlamak için uygun bir model olmayabilir (Oka ve ark., 2010).

Leptinin gıda alımını ve vücut adipozitesini azaltıcı etkisi, periferik dokularda insülin duyarlılığını artırabilir. Bunun yanında leptin, glukoz metabolizmasını enerji dengesi üzerindeki etkilerinden bağımsız olarak doğrudan da etkileyebilmektedir. Leptin eksikliğinin glukoz metabolizmasını bozduğu ve leptin tedavisinin düzeltici etkili olduğu gösterilmiştir (Gavrilova ve ark., 2000).

Leptinin enerji homeostazı üzerindeki etkilerinin çoğuna beyin aracılık ettiğinden, leptinin glukoz metabolizması üzerindeki etkilerinin de benzer bir mekanizma ile gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu hipotez ile uyumlu olarak, düşük dozda leptin dozlarının intraserebroventriküler uygulanması, ob/ob ve lipodistrofik farelerin insülin direncini ve diyabet fenotipini sistemik olarak verilen leptin dozları ile aynı derecede arttırdığı gösterilmiştir. Benzer bir şekilde, diyabetik farelerde doğrudan beyine leptin uygulaması, sistemik olarak uygulandığında etkili olmayan dozlarda kan glukoz seviyelerini normalleştirmiştir. Ayrıca, diyabetik olmayan sıçanlarda, leptin gen terapisi, yüksek yağ diyetine bağlı kilo alımını, hiperleptinemi ve hiperinsülinemi önlemiştir. Leptinin doğrudan beyine uygulanması ise, 3 gün boyunca yüksek yağ diyetine maruz kalan diyabetik olmayan sıçanlarda diyete bağlı hepatik insülin direncini iyileştirmiştir (Pocai ve ark. 2005). Tüm bu veriler SSS'nin leptinin glukoz metabolizması üzerindeki anahtar etkilerine aracılık ettiğini göstermektedir. Hepatik glukoz üretimini düzenlemeye ek olarak, leptin, periferik dokularda insülin bağımsız mekanizmalarla glukoz alımını artırma kapasitesine

de sahiptir. Glukoz kullanımının leptin ile uyarımı, SSS'yi içerir, çünkü leptinin intrahipotalamik uygulaması, SSS'yi içeren bir mekanizma yoluyla iskelet kası, kahverengi yağ dokusu ve kalbin insüline bağlı olmayan glikoz alımını artırır (Meek ve Morton 2012).

Leptin veya leptin reseptörü genlerinin ekspresyonunun azalmasının, gıda yoksunluğu durumunda hayatta kalabilme becerisi ile ilişkili olduğunu gösterilmiştir. obeziteye eğilimli sıçanlarda aşırı besleme sonrası leptinin ve insülin direncinin hızlı indüksiyonunu bildirilmiştir.

Çalışmamızda D grubunda *fgf21* mRNA ekspresyonunun K grubuna göre anlamlı derecede arttığı, Stevia'nın hem düşük hem de yüksek dozda verilmesinin *fgf21*mRNA ifadesini azalttığı tespit edilmiştir. Tip 1 diyabet, adacık hücrelerinin otoimmün seçici imhası ile karakterizedir (Nokoff ve ark. 2012). İnsülin analogları, tip 1 diyabet tedavisinde yaygın olarak kullanılır. Bununla birlikte, bazen, insülin tedavisi glisemik kontrol üzerinde istenilen etkiyi oluşturmaz, birçok yan etki gözlemlenebilir (Andersen ve ark., 2015). Son yıllarda, birçok sayıda çalışma, fibroblast büyüme faktörü 21'in (FGF21) obezite, tip 2 diyabet ve komplikasyonları üzerinde faydalı etkilerinin olduğunu göstermiştir (Kim ve ark.2013; Wang ve ark. 2018). Hem akut hem de kronik 8 FGF21 uygulaması tip 2 diyabet hastalarının metabolik durumunu iyileştirebilir. Diğer çalışmalar FGF21'in tip 2 diyabet hastalarında sadece biyolojik değil aynı zamanda hipoglisemik etkiler de gösterdiğini belirtti. Ayrıca, FGF21'in kahverengi yağ dokusu işlevini geri kazandırdığı ve çeşitli komplikasyonları inhibe ettiği gösterilmiştir (Zhang ve ark, 2018). Bu nedenle, tip 1 diyabette FGF21'in, tip 2 diyabete benzer roller oynayabildiği öne sürüldü. FGF21 Tip 1 diyabet tedavisi için yeni bir yaklaşım olup olmadığı günümüzde önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir (Zhang ve ark, 2018).

Çalışmamızda D grubunda artan *fgf21* ekspresyonu ile uyumlu olarak FGF21 konsantrasyonunun Tip 2 diyabet ve obez hastalarda daha yüksek düzeyde olması dikkat çekicidir. Tip 2 diyabet hastalarında dolaşımdaki FGF21 seviyelerindeki artış, koruyucu ya da telafi edici bir cevap olarak kabul edilmiştir (Chen ve ark. 2011).

Diyetle indüklenen obezite, ob / ob ve db / db farelerinde dolaşımdaki yüksek FGF21 seviyeleri, artan karaciğer ve adipoz FGF21 mRNA ekspresyonu ile

ilişkilendirilmiştir (Fisher ve ark. 2010). Yetişkinlerde FGF21 obezite, açlık insülini ve trigliseritlerle pozitif, yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) ile ise negatif korelasyon içinde olduğu gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2008). Serum FGF21'in obez çocuklarda yükseldiği, serbest yağ asidi ve leptin ile ilişkili olduğu, kilo kaybının ise FGF21 seviyelerinde düşüş ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar obezitenin FGF21 düzeylerinde artışa neden olduğunu göstermektedir (Reinehr ve ark., 2012).

Başka bir çalışmada, streptozotosin (STZ) ile indüklenmiş tip 1 diyabetik farelerde plazmada düşük FGF21 seviyeleri belirlenmiştir (Kim ve ark., 2015). Bu çalışmada tip 1 diyabette pankreatik hasar ve nekroz sonucu, pankreasta FGF21'in sentezi ve sekresyonu bozulmuştur. Öte yandan, glukoneogenezdeki bozukluklarının bir sonucu olarak tip 1 diyabetik farelerinin vücut yağlarında önemli bir azalma gözlenmiştir. FGF21'in hipoglisemik etkisini ve kahverengi adipoz doku fonksiyonunun restore edici etkisini gösterilmiştir. Bu bulgular, karaciğerin, tip 1 diyabette dolaşımdaki FGF21'i üreten tek ana organ olduğu ve tip 1 diyabette dolaşımdaki FGF21 konsantrasyonlarının düşmesinden kısmen sorumlu olabileceğini göstermektedir (Zhang ve ark, 2018).

Glukoz, FGF21 salgılanmasını etkileyen ana faktörlerden biri olarak kabul edilir. Yang ve arkadaşlarının normal koşullar altında, insülin seviyelerindeki yükselmenin, FGF21 üretimini inhibe ettiğini göstermiştir (Yang ve ark., 2011). Fakat Zibar ve arkadaşlarının insülin tedavisi altındaki Tip 1 diyabet hastalarının kan glukozu ve postprandiyal FGF21 değerleri arasında bir ilişki bulamamıştır (Zibar ve ark., 2015).

İlginç bir şekilde, kadın popülasyonunda daha yüksek FGF21 konsantrasyonları bulunmuş ve bu durum tespit edilen yüksek trigliserit düzeyleriyle açıklanmıştır (Bisgaard ve ark. 2014).

Güçlü bir metabolik düzenleyici olan FGF21'in, sıçanlarda glikoz ve lipit metabolizmasını iyileştirdiği, ayrıca vücut ağırlığını ve yağ dokusu kütlesini azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca leptin enjeksiyonlarının erişkin Wistar sıçanlarında plazma FGF21 seviyelerini arttırdığı bulunmuştur. Leptinin pankreas FGF21 ekspresyonunu ve salımını uyarabileceği öne sürülmüştür. Leptinin HepG2 hücrelerinde de FGF21 ekspresyonunu arttırdığı *in vitro* olarak doğrulanmıştır (Asrih ve ark. 2016).

Çalışmamızda ise zebra balıklarında fazla besleme ile oluşturulan tip 2 diyabet modelinde *fgf21* ve *leptin* ekspresyon düzeyleri artmıştır. Çalışmamızda dışarıdan leptin uygulanması yapılmamış olup endojen leptin ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. Tip 2 diyabet oluşturulan diğer modellerde artmış leptin düzeylerigösterilmiştir. Zhang ve arkadaşları tip 2 diyabet modeli gelişimi sırasında, sıçan vücut ağırlığındaki artışla birlikte, serum leptin konsantrasyonlarının ve adiposit leptin üretiminin önemli ölçüde arttığını göstermiştir. Bu durum hipotalamik leptin reseptörünün down regülasyonu ile ilişkilendirilmiştir(Zhang ve ark., 2013).

Hiperfaji ve hem insülin hem de leptinin artmış seviyeleri obezitenin ortak özellikleridir. Bu aslında paradoksal bir durumdur. Çünkü leptin güçlü bir beslenme inhibitörüdür ve insülin sekresyonunun inhibisyonu yoluyla insülin seviyelerini düşürmesi beklenir. Bu durumun obezitenin hem insülinin hem de leptinin biyolojik etkilerine karşı gelişen dirençle ilişkili olduğu öne sürülmüştür. Bununla birlikte, genel olarak leptin direncinin hiperfajiye katkıda bulunduğunu bilmekle hiperfajinin de leptin direncine ve diğer metabolik obezite sekansına neden olabilmesi mümkündür (Wang ve ark., 2001).

Çalışmamızda grupların oksidan antioksidan parametreleri incelendiğinde, D grubunda LPO ve NO düzeylerinin K grubuna göre anlamlı derecede arttığı, SOD ve GST enzim aktivitelerinin ise azaldığı görülmektedir. D grubunda Stevia'nın hem yüksek hem de düşük dozda verilmesi LPO ve NO düzeylerini azaltmış; SOD ve GST aktivitelerini arttırmıştır.

Steviol glikozitler endüstride tatlandırıcı olarak kullanılmakla beraber, aynı zamanda gıdaların depolanma esnasında tatlılığını koruma ve farklı iş koşullarda stabilitelelerini kaybetmemeleri için kullanılmaktadır (Balkır, 2016). Stevia yaprakları antimikrobiyal ve antioksidan etkili fenolik yapıları, C vitaminini, karotenoidleri ve klorofilleri yüksek oranda içermektedirler. Stevia yapraklarında yüksek antioksidan etkili on sekiz adet 18 fenolik birleşik gösterilmiştir. Stevia yapraklarının antioksidan etkisi özellikle folik asit, pirogalol, flavonoitler ve fenolik bileşiklerin yüksek içeriğinden kaynaklanmaktadır (Criado ve ark., 2014).

Normal yetişkin insanlarda *Stevia rebaudiana* özütlerinin tüketilmesi ile plazma glukoz düzeylerinde baskılanma ve glukoz toleransında artma arasında korelasyon olduğunu gösterilmiştir (Anker ve ark., 2019).

Randomize kontrollü çalışmalarda, düşük şeker ve kalori içerikli öğünlere saflaştırılmış steviol glikozitlerinin eklenmesinin ve takviye formunda sağlıklı ve diyabetik deneklere verilmesinin postprandiyal kan glukozu seviyelerinde belirgin bir düşüş sağladığı gözlenmiştir. Normal ağırlıkta (BKİ: 20.0 – 24.9) ve obez deneklerde kuşluk vaktinde *stevia* tüketilmesinin sükroza kıyasla postprandiyal kan glukozu ($p < 0.01$) ve insülin konsantrasyonunda ($p < 0.05$) belirgin bir düşüş sağladığı gözlemlenmiştir (Samuel ve ark., 2018).

5 mg steviosit/kg/gün ölçüsünde steviositin gastrointestinal gavaj ile normal ratlara uygulanmasının kan glukoz seviyesini farklı iki diyabet modelinde de olduğu gibi doza bağımlı şekilde olduğu gibi yine düşürdüğünü ve bunu sadece insülin sekresyonunu olumlu yönde geliştirerek değil aynı zamanda glukoneogenez yolağında yer alan fosfoenol pirüvat karboksikinaz enziminin konsantrasyonunu düşürerek karaciğerdeki glukoneogenezi yavaşlatmak üzerinden gerçekleştirdiği bildirilmiştir (Samuel ve ark., 2018)

4 hafta boyunca fruktozdan yüksek beslenmiş ratlarda, bir kerelik 90 dakika süreli oral 0.5 mg stevioside/kg/gün uygulamasının plazma glukoz konsantrasyonlarını düşürdüğü, glukoz-insülin indeksi (insülinin glukoz bertarafındaki etkisinin ölçüsü) geri çevirdiği gözlemlenmiştir (Samuel ve ark., 2018).

Doza bağlı olarak (1 nmol/L ve 1 mmol/L) steviosit ve steviolün insülin sekresyonunu olumlu yönde geliştirici etkisi glukozda inkübe edilmiş fare adacıklarında gösterilmiştir ($p < 0.05$) (Samuel ve ark., 2018).

Stevioside ve steviolün insülinotropik etkisi glukoz konsantrasyonuna bağlıdır ve bu etki ≥ 8.3 mmol glukoz/L'de görülebilir ($P < 0.05$). Ayrıca çalışmada, stevioside ve steviolün direkt olarak beta hücreleri üzerinde etki gösterip göstermediğini anlayabilmek için, beta hücre hattı INS-1 kullanılmıştır ve steviosit ve steviolün insülin sekresyonunu beta hücreleri üzerinde direkt etki göstererek uyardığı sonucuna varmıştır ($P < 0.05$) (Samuel ve ark., 2018).

Biyoyararlılığı yüksek olan isosteviolün genetik olarak obez ve diyabet olan Kkay fareleri üzerinde 20 mg/kg/gün dozunda 9 haftalık uygulamasının glukoz-insülin indeksi üzerinde olumlu etkisi olduğu, insülin rezistansını azalttığı ve diyabet gelişimini yavaşlattığı ortaya konmuştur. Ayrıca, KkAy farelerinin kontrol ve isosteviol uygulaması yapılan deney gruplarının pankreatik adacıklarındaki isosteviol GLUT2 (glukoz taşıyıcısı 2) transkriptinin, insülin regülasyonundaki anahtar genlerin ve insülin transkripsiyon faktörlerinin gen ifadesinde upregülasyon sağlayarak glukoz sensitivitesini ve insülin ekspresyonunu ve sekresyonunu iyileştirdiğini göstermişlerdir(Anker ve ark., 2019).

2019 yılında yapılan sistematik derleme ve randomize kontrollü deneylerin meta analiz çalışmasına göre, bugüne kadar yapılan çalışmaların büyük bir çoğunluğu steviol glikozitlerin farmakolojik tedavi yönünü araştırmaktan ziyade tatlandırıcı olarak kullanımlarının güvenliği üzerine olduğu görülmüştür. Bu yüzden uygulanan dozların fizyolojik değişiklikleri indükleyecek kadar yüksek olmadığı düşünülmektedir. Ayrıca, insan çalışmalarında kullanılan anti-diyabetik ve anti-hipertansif ilaçların çalışmaların sonuçlarını etkilemiş olabileceği düşünülmektedir. Halen bu konuda diyabetik denekler üzerinde yapılacak daha çok klinik çalışmaya gereksinim duyulmaktadır (Anker ve ark., 2019).

Stevia yapraklarının ve ekstrakte edilmiş polifenollerin ve liflerinin streptozotosin ile indüklenen diyabetik sıçanlar üzerindeki etkilerini incenen çalışmalar sonucunda steviadan ekstrakte edilen polifenollerin takviyesinin diyabet ve komplikasyonlarında bir azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Konu ile ilgili bir çalışmanın sonucunda hem stevia yapraklarından elde edilen ekstrenin hem de polifenollerin kan şekerini, ALT ve AST'yi azalttığı ve insülin seviyesini arttırgösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada stevia karaciğerdeki MDA konsantrasyonunu azaltıp antioksidan kapasiteyi iyileştirmiş; glukoz toleransı ve insülin duyarlılığını düzeltmiştir.

Başka bir çalışmada *Stevia rebaudiana* yapraklarının sulu ekstraktının albino sıçanlarda anti-diyabetik etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, streptozotosin (40 mg / kg vücut ağırlığı, intraperitoneal) uygulanarak sıçanlarda diyabet oluşturulmuş ve farklı dozlarda stevia uygulanmıştır. Bu çalışmanın sonucunda stevia sulu ekstresi, yem alımını ve vücut ağırlığını azaltarak kilo kontrolünü iyileştirmiştir. Ayrıca, stevia

ekstresikan glukoz seviyesinde, açlık kan glikozunda ve glikozile edilmiş (HbA1c) hemoglobinde önemli ölçüde düşüşe neden olurken, ve karaciğer glikojen düzeyleri ile insülini iyileştirmiştir (Ahmad ve Ahmad, 2018).

Yüksek glukoz kaynaklı oksidatif stresin diyabetik retinopati patofizyolojisinde yer alan epigenetik değişiklikler ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (Kowluru ve ark., 2015). Çalışmamızda diyabet grubunda karaciğer-pankreas dokusunda oksidatif stresin bir belirteci olarak LPO düzeyleri artmıştır.

Oksidatif stresteki bu artış ise *dnmt3a* ekspresyon düzeylerine yansımamıştır. Çalışmamızda artan LPO düzeylerine rağmen *dnmt3a* ekspresyon düzeylerinde bir artış oluşmamıştır. Bunun nedeni karaciğer dokusunda değişen metabolik aktiviteye bağlı olarak metilasyonun da azalması olabilir.

Çalışmamızda D grubunda *dnmt3a* mRNA ekspresyonunun K grubuna göre anlamlı derecede azaldığı, Stevia'nın düşük dozda *dnmt3a* mRNA ekspresyonunu arttırdığı yüksek dozda ise değiştirmedeği belirlenmiştir. DNA metilasyonu çevresel faktörlerden etkilenebilir ve çeşitli metabolik süreçler ve hastalıklar bu şekilde düzenlenir. Yüksek glukoz kaynaklı oksidatif stresin, retinal epitel hücrelerinde DNMT ekspresyonu ve aktivitesinin artışından önce gerçekleştiği ve dolayısı ile DNMT fonksiyonundaki değişikliklerin oksidatif strese bağlı olabildiği gösterilmiştir. Erken etki, en yüksek ROS üretimi ile birlikte DNMT aktivitesinin azalmasına neden olurken, uzun vadeli oksidatif stres DNMT aktivitesini ve DNMT1 ekspresyonunu arttırmıştır (Maugeri ve ark 2018). Yüksek glukoz kaynaklı oksidatif stres ile DNMT fonksiyonundaki değişiklikler arasındaki ilişkinin antioksidanlar ve DNMT inhibitörleri kullanarak, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir. Çalışmamızda karaciğer dokusunda artan oksidatif stres bu dokuda *dnmt3a* ekspresyon düzeylerinin azalmasına neden olmuş olabilir.

Dnmt3a, öncelikle gen ekspresyonunun bir baskılayıcısı olarak çalışır. Dnmt3a'nın negatif hedef genleri başında Fgf21 bulunmaktadır. Dnmt3a, Fgf21 promotor bölgesindeki CpG leri metile ederek yağ hücrelerinde insülin direncini indükleyebilir. Fgf21 genlerinin ekspresyonunun azalması da yağ hücrelerinin insüline daha dirençli olmasını sağlar Öte yandan Fgf21'in, Dnmt3a aracılı insülin direncini düzeltebileceği bildirilmiştir. Bu veriler, adipoz Dnmt3a'nın *in vitro* ve *in*

vivo olarak insülin direncinin yeni bir epigenetik aracı olduğunu göstermektedir (You ve ark 2017).

Çalışmamızda ise bu çalışmalardan farklı olarak karaciğer-pankreas dokusunda *dnmt3a* ekspresyon düzeyi belirlenmiş ve tip 2 diyabet grubunda kontrole göre anlamlı derecede bir azalma belirlenmiştir. Yağ dokusunda DNMT insülin direncinin epigenetik bir düzenleyici olarak tanımlanmış olmakla beraber bulgularımız bu durumun karaciğer için geçerli olmadığını göstermiştir. Bu durum yine tip 2 diyabet grubunda karaciğer dokusunda belirlediğimiz artmış *fgf21* ekspresyonu ile de uyumludur. Yağ dokusunda artmış DNMT3a'nın FGF21 inhibisyonu yaptığı bilinmektedir. Çalışmamızda ise Tip 2 diyabet grubunda karaciğer *dnmt3a* ekspresyonu artmamış ve *fgf21* ekspresyonunda herhangi bir inhibisyon gözlenmemiş aksine artış gerçekleşmiştir.

Sonuç olarak çalışmamızda uygulanan 15 gün süre ile oluşturduğumuz bu modelde, zebra balıklarında açlık kan glukozunun 15.gün değerlerinin fazla beslenen diyabet gruplarında 0.güne kıyasla artması, K grubunun değerlerinde ise bir değişim görülmemesi fazla besleme yoluyla oluşturulan bu modelinin geçerliliğini kanıtlar niteliktedir. Ayrıca stevia uygulanması bu gruplarda kan glukoz değerlerini ve insülin direnci gelişimi ile parametreleri doza bağımlı şekilde olumlu yönde etkilemiştir.

8.KAYNAKLAR

Abbas AK, Lichtman Ah, Pober JS. Cytokines. In: Abbas AK, Lichtman Ah, Pober JS, eds. Cellular and Molecular Immunology. 4th ed. Philadelphia: W.B.Saunders; 2000, p:235-269.

ADA. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes, Diabetes Care 2019;42(Suppl 1):13–S28.

Ahmad U, Ahmad RS. Anti diabetic property of aqueous extract of Stevia rebaudiana Bertoni leaves in Streptozotocin-induced diabetes in albino rats. BMC Complement Altern Med. 2018;18(1):179.

Agha G., Houseman EA., Kelsey KT., Eaton CB., Buka SL., Loucks EB. Adiposity is associated with DNA methylation profile in adipose tissue. Int J Epidemiol. 2015;44:1277–1287.

Al-Goblan AS, Al-Alfi MA, Khan MZ. Mechanism linking diabetes mellitus and obesity. Diabetes Metab Syndr Obes. 2014;7:587-591.

Andersen B, Omar BA, Rakipovski G, Raun K, Ahrén B. Fibroblast growth factor 21 prevents glycemic deterioration in insulin deficient mouse models of diabetes. Eur J Pharmacol. 2015;764:189-94.

Anton SD, Martin CK, Han H, Coulon S, Cefalu WT, Geiselman P, Williamson DA. Effects of stevia, aspartame, and sucrose on food intake, satiety, and postprandial glucose and insulin levels. Appetite. 2010;55(1):37-43.

Aslan K, Serdar Z, Tokullugil HA. Multifonksiyonel Hormon: Leptin. Uludağ Univ Tıp Fak Derg. 2004;30(2):113-118.

Asrih M, Veyrat-Durebex C, Poher AL, Lyautey J, Rohner-Jeanrenaud F, Jornayvaz FR. Leptin as a Potential Regulator of FGF21. Cell Physiol Biochem 2016;38:1218-1225.

Balkır P. Stevia; fonksiyonel özellikleri ve gıdalarda kullanım olanakları. Gıda 2016; 41(6):435- 442.

Barros CM, Lessa RQ, Grechi MP, Mouço TL, Souza Md, Wiernsperger N, Bouskela E. Substitution of drinking water by fructose solution induces hyperinsulinemia and hyperglycemia in hamsters. *Clinics (Sao Paulo)* 2007;62(3):327-34.

Bisgaard A, Sørensen K, Johannsen TH, Helge JW, Andersson AM, Juul A. Significant gender difference in serum levels of fibroblast growth factor 21 in Danish children and adolescents. *Int J Pediatr Endocrinol.* 2014;2014(1):7.

Blundell JE, Hill AJ. Paradoxical effects of an intense sweetener (aspartame) on appetite. *Lancet.* 1986;1(8489):1092-1093.

Bundgaard Anker CC, Rafiq S, Jeppesen PB. Effect of Steviol Glycosides on Human Health with Emphasis on Type 2 Diabetic Biomarkers: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Nutrients.* 2019;11(9):1965.

Burgos-Morón E, Abad-Jiménez Z, Marañón AM, Iannantuoni F, Escribano-López I, López-Domènech S, Salom C, Jover A, Mora V, Roldan I, Solá E, Rocha M, Víctor VM. Relationship between Oxidative Stress, ER Stress, and Inflammation in Type 2 Diabetes: The Battle Continues. *J Clin Med.* 2019;8(9):1385.

Carrera-Lanestosa A, Moguel-Ordóñez Y, Segura-Campos M. Stevia rebaudiana Bertoni: A Natural Alternative for Treating Diseases Associated with Metabolic Syndrome. *J Med Food.* 2017;20(10):933-943.

Chang JC, Wu MC, Liu IM, Cheng JT. Increase of insulin sensitivity by stevioside in fructose-rich chow-fed rats. *Horm Metab Res.* 2005;37(10):610-616.

Chen C, Cheung BM, Tso AW, Wang Y, Law LS, Ong KL, Wat NM, Xu A, Lam KS. High plasma level of fibroblast growth factor 21 is an Independent predictor of type 2 diabetes: a 5.4-year population-based prospective study in Chinese subjects. *Diabetes Care.* 2011;34(9):2113-2115.

Criado MN, Barba FJ, Frigola A, Rodrigo D. Effect of Stevia rebaudiana on oxidative enzyme activity and its correlation with antioxidant capacity and bioactive compounds. *Food Bioprocess Tech.* 2014;7(5):1518–1525.

Davegardh C, García-Calzón S, Bacos K, Ling C. DNA methylation in the pathogenesis of type 2 diabetes in humans. *Mol Metab.* 2018;14:12–25.

Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(2):98-107

Fabrizi M, Marchetti V, Mavilio M, Marino A, Casagrande V, Cavalera M, Moreno-Navarrete JM, Mezza T, Sorice GP, Fiorentino L, Menghini R, Lauro R, Monteleone G, Giaccari A, Fernandez Real JM, Federici M. IL-21 is a major negative regulator of IRF4-dependent lipolysis affecting Tregs in adipose tissue and systemic insulin sensitivity. *Diabetes.* 2014;63(6):2086-96.

Fisher FM, Chui PC, Antonellis PJ, Bina HA, Kharitononkov A, Flier JS, Maratos-Flier E. Obesity is a fibroblast growth factor 21 (FGF21)-resistant state. *Diabetes.* 2010;59(11):2781-2789.

Frühbeck G, Gomez-Ambrosi J, Muruzabal FJ, Burrell MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signalling in energy metabolism regulation. *Am J Physical Endocrine Metal.* 2001;280:827-847.

Fukumoto S. Actions and mode of actions of FGF19 subfamily members. *Endocr J.* 2008;55:23–31.

Gavrilova O, Marcus-Samuels B, Leon LR, Vinson C, Reitman ML. Leptin and diabetes in lipoatrophic mice. *Nature.* 2000;403(6772):850

Gillberg L, Perfilyev A, Brons C, Thomasen M, Grunnet LG, Volkov P. Adipose tissue transcriptomics and epigenomics in low birthweight men and controls: role of high-fat overfeeding. *Diabetologia.* 2016;59:799–812.

Gregersen S, Jeppesen PB, Holst JJ, Hermansen K. Metabolism. Antihyperglycemic effects of stevioside in type 2 diabetic subjects. *Metabolism.* 2004;53(1):73-76.

Gropper SS, Smith JL, Groff JL. Diabetes: Metabolism out of control. In: Adams P, Lustig A, Feldman E, eds. *Advanced Nutrition and Human Metabolism.* 5th Ed. California: Wadsworth; 2009, p:276.

Gutierrez-Rodelo C, Roura-Guiberna A, Olivares-Reyes JA. Molecular Mechanisms of Insulin Resistance: An Update. *Gac Med Mex.* 2017;153(2):214-228.

Habig WH, Jacoby WB. Assays for differentiation of glutathion-s-transferases. *Methods Enzymol.* 1981;77:398-405.

Heckler K, Kroll J. Zebrafish as a model for the study of microvascular complications of diabetes and their mechanisms. *Int J Mol Sci.* 2017;18(9):2002.

Juan CC, Au LC, Fang VS. Suppressed gene expression of adipocyte resistin in an insulin-resistant rat model probably by elevated free fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;289:1328-1333.

Kim HW, Lee JE, Cha JJ, Hyun YY, Kim JE, Lee MH, Song HK, Nam DH, Han JY, Han SY, Han KH, Kang YS, Cha DR. Fibroblast growth factor 21 improves insulin resistance and ameliorates renal injury in db/db mice. *Endocrinology.* 2013;154(9):3366-3376.

Kim JH, Bae KH, Choi YK, Go Y, Choe M, Jeon YH, Lee HW, Koo SH, Perfield JW 2nd, Harris RA, Lee IK, Park KG. Fibroblast growth factor 21 analogue LY2405319 lowers blood glucose in streptozotocin-induced insulin-deficient diabetic mice by restoring brown adipose tissue function. *Diabetes Obes Metab.* 2015;17(2):161-169.

Kowluru RA, Kowluru A, Mishra M, Kumar B. Oxidative stress and epigenetic modifications in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res.* 2015;48:40-61.

Laville M, Nazare JA. Diabetes, insulin resistance and sugars. *Obes Rev.* 2009;10(Suppl 1):24-33.

Ledwozyw A, Michalak D, Stepień A, Kadziolka A. The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipids and lipid peroxidation products during human atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta.* 1986;155:275-283.

Le KA, Ith M, Kreis R, Faeh D, Bortolotti M, Tran C, Boesch C, Tappy L. Fructose overconsumption causes dyslipidemia and ectopic lipid deposition in healthy subjects

with and without a family history of type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr.* 2009;89(6):1760-1765.

Li DH, Havell EA, Brown CL, Cullen JM. Woodchuck lymphotoxin- α , - β and tumor necrosis factor genes: structure, characterization and biological activity. *Gene.* 2000;242:295-305.

Liqing Zang, Yasuhito Shimada, Norihiro Nishimura. Development of a novel zebrafish model for type 2 diabetes mellitus. *Sci Rep.* 2017;7:1461.

Lontchi-Yimagou E, Sobngwi E, Matsha TE, Kengne AP. Diabetes mellitus and inflammation. *Curr Diab Rep.* 2013;13(3):435-44.

Lowry O H, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-275.

Luczak MW, Jagodziński PP. The role of DNA methylation in cancer development. *Folia Histochem Cytobiol.* 2006;44:143–154.

Mattes RD, Popkin BM. Nonnutritive sweetener consumption in humans: effects on appetite and food intake and their putative mechanisms. *Am J Clin Nutr.* 2009;89(1):1-14.

Maugeri A, Mazzone MG, Giuliano F, Vinciguerra M, Basile G, Barchitta M, Agodi A. Curcumin Modulates DNA Methyltransferase Functions in a Cellular Model of Diabetic Retinopathy. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:5407482.

Meek TH, Morton GJ. Leptin, diabetes, and the brain. Central leptin acutely reverses diet-induced hepatic insulin resistance. *Indian J Endocrinol Metab.* 2012;16(Suppl 3):534–542.

Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric oxide.* 2001;5:62-71.

Mylorie AA, Collins H, Umbles C, Kyle J. Erythrocyte superoxide dismutase activity and other parameters of copper status in rats ingesting lead acetate. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1986;82:512-520.

Naylor MS, Stamp GW, Foulkers W, Eccles D, Balkwill FR. Tumor necrosis factor and its receptors in human ovarian cancer. Potential role in disease progression. *J Clin Invest.* 1993;91:2194-2206.

Newsholme P, Cruzat VF, Keane KN, Carlessi R, de Bittencourt PI Jr. Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes. *Biochem J.* 2016;473(24):4527-4550.

Nokoff NJ, Rewers M, Cree Green M. The interplay of autoimmunity and insulin resistance in type 1 diabetes. *Discov Med.* 2012;13(69):115-22.

Oka T, Nishimura Y, Zang L, Hirano M, Shimada Y, Wang Z, Umemoto N, Kuroyanagi J, Nishimura N, Tanaka T. Diet-induced obesity in zebrafish shares common pathophysiological pathways with mammalian obesity. *BMC Physiol.* 2010;10:21.

Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development. *Cell.* 1999;(3):247-257.

O'Keefe JH, Bell DS.-Postprandial hyperglycemia/hyperlipidemia (postprandial dysmetabolism) is a cardiovascular risk factor. *Am J Cardiol.* 2007;100(5):899-904.

Platanias LC. Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood.* 2003;101:4667-4679.

Reinehr T, Woelfle J, Wunsch R, Roth CL. Fibroblast growth factor 21 (FGF-21) and its relation to obesity, metabolic syndrome, and nonalcoholic fatty liver in children: a longitudinal analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(6):2143-2150.

Ronn T, Volkov P, Gillberg L, Kokosar M, Perfilyev A, Jacobsen AL. Impact of age, BMI and HbA1c levels on the genome-wide DNA methylation and mRNA expression patterns in human adipose tissue and identification of epigenetic biomarkers in blood. *Hum Mol Genet.* 2015;24:3792–3813.

Samuel P, Ayoob KT, Magnuson BA, Wölwer-Rieck U, Jeppesen PB, Rogers PJ, Rowland I, Mathews R. Stevia Leaf to Stevia Sweetener: Exploring Its Science, Benefits, and Future Potential. *J Nutr.* 2018;148(7):1186-1205.

Shivanna N, Naika M, Khanum F, Kaul VK. Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of *Stevia rebaudiana*. *J Diab Comp*. 2013;27(2):103-113.

Swaroop JJ, Rajarajeswari D, Naidu JN. Association of TNF- α with insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *Indian J Med Res*. 2012;135(1):127–130.

Vandanmagsar B, Warfel JD, Wicks SE, Ghosh S, Salbaum JM, Burk D, Dubuisson OS, Mendoza TM, Zhang J, Noland RC, Mynatt RL. Impaired Mitochondrial Fat Oxidation Induces FGF21 in Muscle. *Cell Rep*. 2016;15(8):1686-1699.

Wang Q, Yuan J, Yu Z, Lin L, Jiang Y, Cao Z, Zhuang P, Whalen MJ, Song B, Wang XJ, Li X, Lo EH, Xu Y, Wang X. FGF21 Attenuates High-Fat Diet-Induced Cognitive Impairment via Metabolic Regulation and Anti-inflammation of Obese Mice. *Mol Neurobiol*. 2018;55(6):4702-4717.

Wardlaw GM, Smith AM. Alternative Sweeteners. In: Wardlaw GM, Smith AM, eds. *Contemporary Nutrition*. 8th Ed. Canada: Mc Graw Hill; 2009, p:135.

Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest*. 2005;115(5):1111-1119.

Xie M, Hong C, Zhang B, Lowdon RF, Xing X, Li D, Zhou X, Lee HJ, Maire CL, Ligon KL, Gascard P, Sigaroudinia M, Tlsty TD, Kadlecsek T, Weiss A, O'Geen H, Farnham PJ, Madden PA, Mungall AJ, Tam A, et al. 2013. DNA hypomethylation within specific transposable element families associates with tissue-specific enhancer landscape. *Nat Genet*. 2013;45:836–841.

Yang M, Dong J, Liu H, Li L, Yang G. Effects of short-term continuous subcutaneous insulin infusion on fasting plasma fibroblast growth factor-21 levels in patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *PLoS One*. 2011;6(10):e26359.

Yarım GF, Kazak F. Metabolik Sendrom ve Bileşenlerinde Sitokin Yanıtı. *Harran Üniv Vet Fak Derg*. 2016;5(1):90-99.

Yie J, Hecht R, Patel J, Stevens J, Wang W, Hawkins N, Steavenson S, Smith S, Winters D, Fisher S, Cai L, Belouski E, Chen C, Michaels ML, Li YS, Lindberg R,

Wang M, Véniant M, Xu J. FGF21 N- and C-termini play different roles in receptor interaction and activation. *FEBS Lett.* 2009;583(1):19-24.

You D., Nilsson E., Tenen D.E., Lyubetskaya A., Lo J.C., Jiang R. Dnmt3a is an epigenetic mediator of adipose insulin resistance. *Elife.* 2017;6(1):e30766.

Yuan JS, Wang D, Steward CN JR. Statistical methods for efficiency adjusted real-time PCR quantification. *Biotechnol J.* 2008;3:112-123.

Zang L, Shimada Y, Nishimura Y, Tanaka T, Nishimura N. Repeated Blood Collection for Blood Tests in Adult Zebrafish. *J Vis Exp.* 2015;(102):e53272.

Zhang J, Weng W, Wang K, Lu X, Cai L, Sun J. The role of FGF21 in type 1 diabetes and its complications. *Int J Biol Sci.* 2018;14(9):1000–1011.

Zhang S, Zhang Q, Zhang L, Li C, Jiang H. Expression of ghrelin and leptin during the development of type 2 diabetes mellitus in a rat model. *Mol Med Rep.* 2013;7(1):223-228.

Zhang X, Yeung DC, Karpisek M, Stejskal D, Zhou ZG, Liu F, Wong RL, Chow WS, Tso AW, Lam KS, Xu A. Serum FGF21 levels are increased in obesity and are independently associated with the metabolic syndrome in humans. *Diabetes.* 2008;57(5):1246-1253.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994;372:425-432.

Zibar K, Blaslov K, Bulum T, Cuca JK, Smircic-Duvnjak L. Basal and postprandial change in serum fibroblast growth factor-21 concentration in type 1 diabetic mellitus and in healthy controls. *Endocrine.* 2015;48(3):848-855.

9.EKLER

EK-1. Uluslararası Kongre Bildiri Özeti



2nd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2019)

28-29 June 2019, Ankara, Turkey
www.EurasianBioChem.org

➤ ORAL PRESENTATION

Overfeeding-induced type 2 diabetes mellitus zebrafish model for drug research

Esra Dandin¹, Ünsal Veli Üstündağ², Perihan Seda Ateş¹, İsmail Ünal¹, Ebru Emekli-Alturfan¹

¹ Marmara University, Faculty of Dentistry, Department of Biochemistry, Istanbul, Turkey

² MedipolUniversity, Faculty of Medicine, Department of Biochemistry, Istanbul, Turkey

*Corresponding author e-mail: esra-dandin@hotmail.com

Abstract

Obesity and Type 2 diabetes (T2DM) continue to increase rapidly in industrialized nations. High calorie intake may lead to excessive increase in post-prandial glucose and insulin levels and lead to metabolic and hormonal changes that stimulate hunger, accelerate fat accumulation (1). Zebrafish have been shown to be a suitable model for metabolic diseases (2). Aim of this study was to construct a T2DM zebrafish model that may be used in biomedical and drug research by overfeeding.

Animal procedures were approved by the Ethics Committee of Marmara University. Adult zebrafish (4–6 months old) were assigned to either an overfeeding or a control group (n=15). In the overfed group each fish was fed with 120 mg commercially available fish food divided as six times daily for 2 weeks. Body weights and fasting blood glucose were measured at the beginning and at the end of each week. Oral glucose tolerance test (OGTT) was performed using a micropipette to insert a glucose solution into the mouth of the anesthetized zebrafish. 30, 60, and 120 minutes after, blood samples were collected to determine the blood glucose levels using a glucometer.

Overfeeding led to significant alterations in body weights and fasting blood glucose levels. Orally glucose administration for OGTT at a dose of 1.25 mg/g led to increases in the blood glucose levels. Zang et al showed that one week of overfeeding was enough to induce T2DM in zebrafish and increase fasting blood glucose levels, and suggested that zebrafish may be more susceptible to glucose intolerance than the mouse (3).

Overfed zebrafish model may be suggested as a rapid and suitable T2DM model for drug research.

Keywords: zebrafish, overfeeding, obesity, diabetes, OGTT

References

- 1) Laville M, Nazare JA. *Obes Rev.* 2009;10Suppl 1:24-33.
- 2) Lawrence, C. *Aquaculture* 2007; 269, 1–20.
- 3) Zang L, Shimada Y, Nishimura N. *Sci Rep.* 2017; 3;7(1):1461.

EK-2. Etik Kurul Onayı



MARMARA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

PROJE ONAY FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	98.2018.mar	ÇALIŞMA: BİLİMSEL		
	PROJE ADI	Zebra Balıklarında Oluşturulan Tip 2 Diyabet Modelinde <i>Stevia rebaudiana</i> 'nın Olası Etkilerinin İncelenmesi			
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ ADI	Prof. Dr Ebru Işık ALTURFAN			
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	DEHAMER			
	DESTEKLEYİCİ				
KARAR BİLGİLERİ	TARİH: 05. 11. 2018 Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığı için kurulumuzca onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir. Onay sonrasında yapılacak her türlü proje değişiklikleri (katılımcılar, başlık vb.) veya protokol değişikliklerinin Etik Kurula bildirilerek proje onayının yenilenmesi gerekmektedir.				
ETİK KURUL BİLGİLERİ					
ÇALIŞMA ESASI	Deney hayvanları ile yapılacak olan bilimsel araştırma, test, sağlık hizmetleri uygulamaları ve eğitim-öğretim gibi temel etkinliklerde kullanılan yöntem ve materyaller ile ilgili etik standartları gözetmek, etik ilkeler doğrultusunda görüş bildirmek, araştırma önerilerini incelemek ve sertifikası olmayanların deney hayvanı kullanmalarını engellemektir.				
ÜYELER					
Ünvanı/ Adı/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu/ Ek Üyeliği	Onaylanan Proje ile İlişkisi	Toplantıya Katılım	İmza
Prof.Dr. Göksel ŞENER	Farmakoloji	M.Ü. Eczacılık Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Başkanı	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Levent KABASAKAL	Farmakoloji	M.Ü. Eczacılık Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Ayşen YARAT	Biyokimya	M.Ü. Dış Hekimliği Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Serap ŞİRVANCI	Histoloji Embriyoloji ABD	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Rezzan GÜLHAN	Farmakoloji	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Doç.Dr. Gürkan SERT	Tıp Tarihi ve Etik	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Vet. Dr. Dilek ÖZBEYLİ	Veteriner Hekim	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Bio. Arif GÜMÜŞ	Biyoloji	Sivil Toplum Kuruluşu Üyesi ve Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	Var Yok	Evet Hayır	
Cihanşah MURATOĞLU	Serbest Danışmanlık	Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	Var Yok	Evet Hayır	

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Esra	Soyadı	Dandin
Doğum Yeri	Bahçelievler/İstanbul	Doğum Tarihi	25.01.1994
Uyruğu	Türk	Tel	0538 824 77 50
E-mail	esra-dandin@hotmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	T.C. İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi	2017
Lise	Küçükçekmece Gazi Anadolu Lisesi	2012

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Yarı zamanlı öğretim görevlisi	T.C. İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi – Beslenme ve Diyetetik bölümü	2018-2019
Diyetisyen	Gentest	2018-2018

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*

Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi
---------	---------	---------	---------

Yabancı Dil Sınav Notu #									
YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE	YÖKDİL
									93,25

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	69		
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi
Adobe Photoshop Cs6	Zayıf

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.