



**STREPTOZOTOSİN İLE DİYABET OLUŞTURULMUŞ SIÇAN  
PANKREASINDA RESVERATROL KULLANIMINA BAĞLI  
PROİNFLAMATUAR GEN İFADELENMELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Buket YURTERİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MAYIS 2016**

Buket YURTERİ tarafından hazırlanan “Streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş sıçan pankreasında resveratrol kullanımına bağlı proinflatuar gen ifadelenmelerinin araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile Gazi Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

**Danışman:** Prof. Dr. Sevda MENEVŞE

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

**Başkan:** Doç. Dr. Akın YILMAZ

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Hitit Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

**Üye:** Doç. Dr. Hacer İlke ÖNEN

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Tez Savunma Tarihi: 18.05.2016

Jüri üyeleri tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Doç. Dr. Ufuk KOCA ÇALIŞKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
  - Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
  - Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
  - Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
  - Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,
- bildirim, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Buket YURTERİ

18.05.2016



STREPTOZOTOSİN İLE DİYABET OLUŞTURULMUŞ SIÇAN PANKREASINDA  
RESVERATROL KULLANIMINA BAĞLI PROİNFLAMATUAR GEN  
İFADELENMELERİNİN ARAŞTIRILMASI  
(Yüksek Lisans Tezi)

Buket YURTERİ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mayıs 2016

ÖZET

Diabetes mellitus (DM) un gelişiminde inflamasyon ve oksidatif stres önemli bir rol oynar.  $\beta$ - hücreler oksidatif strese karşı duyarlı hücrelerdir.  $\beta$ - hücrelerde, artmış reaktif oksijen türlerinin üretim (ROS) seviyeleri insülin salınımında bozulmaya ve tip 2 diabetes mellitus (T2DM) ve insülin direncine neden olmaktadır. NF- $\kappa$ B, TNF $\alpha$ , IL-6, iNOS ve COX2 genleri inflamatuvar düzenleyici genlerdir. Yüksek ROS bu genlerin transkripsiyonuna yol açan inflamasyon sinyal yollarını aktive etmektedir. İnflamasyon sinyal yollarının aktivasyonu da tip 2 diyabet ve insülin direncine neden olmaktadır. Streptozotosin (STZ), pankreasta serbest radikal temizleyicisi olan superoksit dismutazı inhibe eder ve böylece serbest radikallerin birikmesi sonucu  $\beta$  hücreleri yıkıma uğrar. Resveratrol (RSV), pankreatik  $\beta$  hücrelerinde oluşan bozulmayı inhibe edici etkiye sahiptir. Bu bilgilere dayanarak çalışmamızda, STZ ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda RSV' nin pankreasta NF- $\kappa$ B, TNF $\alpha$ , IL-6, iNOS ve COX2 genlerinin ifadenmesinin DM'nin komplikasyonları üzerine etkisini araştırmayı amaçladık. Çalışmamızda, STZ ile diyabet oluşturulmuş ve diyabet oluşturulduktan sonra RSV uygulaması yapılmış sıçanlara ait pankreas dokuları kullanıldı. Elde edilen dokulardan sırasıyla RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapıldı. NF- $\kappa$ B, TNF $\alpha$ , IL-6, iNOS ve COX2 genlerinin mRNA ifadenme düzeyleri real-time PCR reaksiyonu ile gerçekleştirilerek sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi. Çalışmamızda kontrol ile sham kontrol ve kontrol+DMSO grupları arasında COX2, iNOS, NF- $\kappa$ B, TNF $\alpha$  ve IL-6 mRNA düzeyinde anlamlı bir fark gözlenmedi. Kontrol ile diyabet grubu karşılaştırıldığında COX2, iNOS, NF- $\kappa$ B, TNF $\alpha$  ve IL-6 genlerinin mRNA düzeylerinde, diyabet grubunda hedef genlerin mRNA ifadenme düzeylerinde artış olduğu gözlemlendi ve bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlam bulundu. Diyabet ile diyabet+RSV grubu karşılaştırıldığında ise COX2, iNOS, NF- $\kappa$ B, TNF $\alpha$  ve IL-6 genlerinin mRNA düzeylerinde bir azalma gözlenirken, bu azalışın istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı gözlemlendi.

BilimKodu : 1055  
AnahtarKelimeler : NF- $\kappa$ B1, COX2, iNOS, TNF $\alpha$ , IL-6, diabetes mellitus, streptozotosin, resveratrol, real-time PCR  
SayfaAdedi : 73  
Danışman : Prof. Dr.Sevda Menevşe

# EFFECT OF RESVERATROL ON PROINFLAMMATORY GENE EXPRESSION IN PANCREAS OF STREPTOZOTOCIN INDUCED DIABETIC RATS

(M. Sc. Thesis)

Buket YURTERİ

GAZI UNIVERSITY  
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

May 2016

## ABSTRACT

Inflammation and oxidative stress has a big influence on diabetes mellitus (DM) improvement. Production levels of increased reactive oxygen species in  $\beta$ -cells cause insulin release corruption and type 2 diabetes (T2DM) and insulin resistance. NF- $\kappa$ B, TNF $\alpha$ , IL-6, iNOS and COX2 genes are inflammation regulatory genes. High reactive oxygen species (ROS) activates inflammatory signaling pathways which cause these genes to transcript. Inflammatory signaling pathways activation cause T2DM and insulin resistance, too. Streptozotocin (STZ) inhibits superoxide dismutase which is free-radical scavenger in pancreas and as a result of cumulation of free-radicals  $\beta$  cells are dispersed. Resveratrol (RSV) has an influence to inhibit corruption which is formed in pancreatic  $\beta$  cells. In light of this information in our study we purpose to investigate in streptozotocin-treated rat with diabetes and the effects of resveratrol in their pancreas to enlargement of NF- $\kappa$ B, TNF $\alpha$ , IL-6, iNOS ve COX2 genes levels complications of DM. In our study pancreatic tissues are used with STZ-induced diabetic rats and RSV induced diabetic rats after application made. RNA isolation and cDNA synthesis are made to obtained tissues. Real-time PCR results are evaluated statistically after the level of expression levels of NF- $\kappa$ B, TNF $\alpha$ , IL-6, iNOS ve COX2 genes are executed with real-time PCR Reaction. In our study no significant difference between control with sham control and control+DMSO groups in levels of COX2, iNOS, NF- $\kappa$ B, TNF $\alpha$  ve IL-6 mRNA. In level of mRNA of genes COX2, iNOS, NF- $\kappa$ B, TNF $\alpha$  ve IL-6 when compared control with diabetes group, it is observed that in the level of mRNA expression level in target gene has increased and the meaning has been found between these two groups statistically. When diabetes and diabetes+RSV group are compared, COX2, iNOS, NF- $\kappa$ B, TNF $\alpha$  and IL-6 genes are decreased in levels of mRNA, but this reduction has no meaning statistically.

ScienceCode : 1055  
KeyWords : NF- $\kappa$ B1, COX2, iNOS, TNF $\alpha$  and IL-6, diabetes mellitus, streptozotocin, resveratrol, real-time PCR  
PageNumber : 73  
Advisor : Prof. Dr. Sevda Menevşe

## TEŐEKKÖR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen, sonsuz sabır ve hoşgörüyü bana yol gösteren değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Sevdâ MENEVŞE'ye, tezimin her aşamasında ilgi ve bilgisiyle bana destek olan, içten yardımını esirgemeyen Uzm. Dr. Atiye Seda YAR SAĞLAM'a, desteğini her zaman yanımda hissettiğim engin bilgisi ve deneyimleri ile beni her zaman ileriye taşıyan kıymetli hocam Prof. Dr. Nurten AKARSU'ya, bu süreçte desteğini benden esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Ahmet YEŞİLYURT` a, hayatım boyunca sonsuz sevgi ve desteklerini her zaman yanımda hissettiğim aileme ve dostlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.





## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
ÖZET .....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	5
2.1. Diabetes Mellitus .....	5
2.1.1. Diabetes Mellitus'un tanımı .....	5
2.1.2. Diabetes Mellitus'un tarihçesi .....	6
2.1.3. Diabetes Mellitus'un insidansı, prevalansı ve epidemiyolojisi.....	8
2.2. İnflamasyon.....	9
2.2.1. İnflamatuar genler .....	11
2.2.2. İnflamatuar sitokinler ve diyabet .....	18
2.3. Serbest Radikaller ve Hücre .....	21
2.3.1. Antioksidanlar .....	21
2.4. Resveratrol .....	22
2.4.1. Resveratrol'ün tanımı ve tarihçesi .....	22
2.4.2. Resveratrol'ün biyolojik etkileri .....	25
2.4.3. Resveratrol'ün enflamatuar karşıtı etkileri.....	26
2.4.4. Resveratrol'ün diabetes mellitus üzerindeki etkisi .....	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	29

	<b>Sayfa</b>
3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	29
3.2. Yöntemler.....	30
4. BULGULAR .....	43
4.1. Diyabetik Bulgular .....	43
4.2. Genetik Bulgular .....	43
5. TARTIŞMA .....	47
6. SONUÇ .....	55
KAYNAKLAR .....	57
EKLER.....	69
EK-1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararları.....	70
ÖZGEÇMİŞ .....	73

## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Diabetes mellitus tanı kriterleri .....	6
Çizelge 2.2. Antioksidanların sınıflandırılması .....	21
Çizelge 2.3. RSV'nin fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	24
Çizelge 3.1. cDNA RT-PCR tepkime karışımı.....	33
Çizelge 3.2. cDNA ters transkripsiyon polimeraz zincir tepkimesi programı.....	34
Çizelge 3.3. $\beta$ -aktin real-time PCR tepkime karışımı.....	35
Çizelge 3.4. NF- $\kappa$ B1, COX2, iNOS, TNF $\alpha$ ve IL-6 light-cycler deney programı .....	41
Çizelge 3.5. Program 2 hibridizasyon ve polimerizasyon (primer bağlanması ve uzama).....	41

**ŞEKİLLERİN LİSTESİ**

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
Şekil 3.1. $\beta$ -aktin genine ait UPL Prob ve primerlerin özellikleri ve gen bölgesindeki yerleşimleri.....	35
Şekil 3.2. NF- $\kappa$ B1 genine ait UPL prob ve primerlerin özellikleri ve gen bölgesindeki yerleşimleri.....	36
Şekil 3.3. COX2 genine ait UPL prob ve primerlerin özellikleri ve gen bölgesindeki yerleşimleri.....	37
Şekil 3.4. iNOS genine ait UPL prob ve primerlerin özellikleri ve gen bölgesindeki yerleşimleri.....	38
Şekil 3.5. TNF $\alpha$ genine ait UPL prob ve primerlerin özellikleri ve gen bölgesindeki yerleşimleri.....	39
Şekil 3.6. IL-6 genine ait UPL prob ve primerlerin özellikleri ve gen bölgesindeki yerleşimleri.....	40
Şekil 4.1. $\beta$ -aktin gen ifadenmesinin real-time PCR ile analizi.....	44
Şekil 4.2. Gruplar arasında COX2, iNOS, NF- $\kappa$ B1, TNF $\alpha$ ve IL-6 mRNA düzeylerindeki değişiklik .....	45

## SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklamalar</b>
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IRF5	Interferon Regülatör Faktör 5

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklamalar</b>
ADA	Amerikan Diyabet Birliği
AP-1	Aktive Edici Protein-1
ALX	Alloksan
BAP	Bilimsel Araştırma Projeleri
COX2	Siklooksijenaz-2
Cp	Crossingpoint
CRP	C-Reaktif Protein
DAG	Diaçilgliserol
DM	Diabetes Mellitus
DMSO	Dimetilsülfoksit
G-CSF	Granülosit Koloni Stimüle Edici Faktör
GEP	Granülin Epitelin Prekürsörü
GM-CSF	Granülosit-Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör
IDF	Uluslararası Diyabet Federasyonu
IL	İnterlökin
LT	Lenfotoksin
M-CSF	Monosit-Makrofaj Stimüle Edici Faktör
MIF	Migrasyon İnhibe Edici Faktör
NF- $\kappa$ B	Nükleer Faktör- $\kappa$ B
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
PCDGF	PC-Hücre Kökenli Büyüme Faktörü

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklamalar</b>
PI3K	Fosfoinozitol-3 Kinaz
PPAR	Peroksizom Proliferatör Reseptör
PTK	Protein Tirozin Kinaz
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RTK	Reseptör Tirozin Kinaz
SLE	Lupus Eritematozus Sistemi
SOD	Süper Oksit Dismutaz
STZ	Streptozotosin
T1DM	Tip 1 Diabetes Mellitus
T2DM	Tip 2 Diabetes Mellitus
TPA	Doku Plazminojen Aktivatörü
TURDEP	Türkiye Diyabet Epidemiyolojisi Çalışması-I
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

## 1. GİRİŞ

Diabetes Mellitus (DM) insülin hormonunun yetersizliği, yokluğu ve/veya eksikliği sonucu oluşan, karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında bozukluklara yol açan, kronik hiperglisemiyle karakterize endokrin ve metabolik bir hastalıktır. DM akut metabolik komplikasyonlarının yanı sıra (diyabetik ketoasidoz ve ketoasidoz koması, hiperozmolar nonketotik diyabet koma, laktik asidoz koması gibi), uzun dönemde vasküler, renal, retinal ya da nöropatik bozukluklara yol açan, morbidite ve erken mortalite riski yüksek, yaygın bir hastalıktır.

DM Türkiye’de ve dünyada hızla artan prevalansı ile en önemli halk sağlığı sorunları arasında yer almaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) 2000 yılı verilerine göre dünya üzerinde 175 milyon diyabetik insan varken yine WHO tahmini verilerine göre 2025 yılı itibariyle bu sayının 300 milyona ulaşması beklenmektedir (King, Aubert ve Herman, 1998). TURDEP-I’de (Türkiye diyabet epidemiyolojisi çalışması-I) Türkiye’de %7.2 olarak saptanan diyabet prevalansı, TURDEP-II çalışmasında 12 yılda %90 artarak 2010 yılında %13.7’ye yükselmiştir (Satman ve diğerleri, 1998; Satman ve diğerleri, 2013).

Diyabet, bilinen patolojik ve etiyolojik mekanizmalara göre dört ana grupta sınıflandırılır: tip 1 diyabet, tip 2 diyabet, diğer spesifik tipler ve gestasyonel diyabet. Tip 1 diyabet (T1DM) çoğunlukla otoimmün mekanizmalar ile gelişen pankreatik adacık  $\beta$  hücrelerinin hasarı sonucu ortaya çıkar. Bu hastalar insülin replasmanına gereksinim duyarlar. Tip 2 diyabet (T2DM), diyabetin en yaygın türü olup; olguların büyük çoğunluğunda, insülin direncine eşlik eden insülinin kompensatuvar sekresyon yetersizliği mevcuttur (Gardner ve Shoback, 2011).

DM hiperglisemi ve hızlanmış enzimatik olmayan glikasyon, artmış oksidatif stres ve serbest radikal üretimi ile ilişkilidir (Kostolanská, Jakus ve Barák, 2009). Güncel kanıtlar pankreatit, metabolik sendrom ve T2DM gibi klinik durumların gelişmesinde inflamasyon ve oksidatif stresin önemli rol oynadığını ileri göstermektedir (Choudhury, Ghosh, Gupta, Mukherjee ve diğerleri, 2015).

Oksidatif stres, serbest radikal ve antioksidanlar arasındaki dengenin radikaller lehine ortaya çıkmasıyla karakterizedir (Kalousová, Zima, Tesar ve Stípek, 2001). Hem deneysel hem de klinik çalışmalardaki artan kanıtlar oksidatif stresin DM'nin her iki tipinin patogeneğinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Maritim, Sanders ve Watkins, 2003). Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin üretimi (ROS) üzerinden, insülin direnci,  $\beta$ -hücre işlev bozukluğu, bozuk glukoz toleransı ve T2DM gelişiminin altında yatan temel neden olarak ileri sürülmektedir (Wright, Scism-Bacon ve Glass, 2006).

$\beta$ -hücreler, büyük olasılıkla düşük antioksidan kapasitelerinden dolayı, diğer hücre tipleri ile karşılaştırıldıklarında oksidatif strese karşı daha duyarlıdırlar.  $\beta$ -hücrelerde, artmış ROS seviyeleri insülin salınımında bozulmaya ve T2DM'de insülin direncine neden olmaktadır (Montane, Cadavez ve Novials, 2014). Yüksek ROS seviyeleri; NF- $\kappa$ B (Nükleer faktör- $\kappa$ B) yolu, monosit kemotaktik protein-1, hücresel adezyon molekülleri, nitrik oksit (NO) ve interlökinlerin (IL) transkripsiyonuna yol açan inflamasyon sinyal yollarını aktive etmektedir (Montane, Cadavez ve Novials, 2014). Nitrik oksit, pankreas patofizyolojisinde rol oynayan bir sinyal molekülüdür ve beta hücre kitlesi düzenlenmesine katılmaktadır. Nitrik oksit, NO sentaz (NOS) enzimi tarafından üretilmektedir ve bu enzimin başlıca üç izoformu vardır: nöronal NOS (nNOS veya NOS1), endotelial NOS (eNOS ve NOS3) ve uyarılabilir NOS (iNOS veya NOS2). Adacık iNOS ekspresyon artışı; aşırı NO üretimine neden olmakta,  $\beta$ - ve  $\alpha$ -hücrelerinin disfonksiyonuna katkıda bulunmakta ve insülin salınımını inhibe etmektedir. NF- $\kappa$ B, iNOS gen ekspresyonunu indüklemektedir (Keklikoglu ve Akinci, 2013).

NF- $\kappa$ B; sitokinler, adezyon molekülleri ve diğer medyatörlerin transkripsiyonunda merkezi rol oynamaktadır. NF- $\kappa$ B ailesinin hücre içindeki inflamatuvar ve diğer sinyal yollarında rol oynayan genlerin regülasyonun da önemli rolü vardır (Sun ve Andersson, 2002). COX2 enzimi inflamasyon sürecinde çok önemli role sahiptir ve inflamasyon cevabında rol oynayan prostoglandinlerin üretiminde rol almaktadır. COX2 sadece bir çeşit immün cevap sırasında uyarılır. COX2 geninin transkripsiyonu NF- $\kappa$ B, Aktivatör protein-1 (AP-1), siklik AMP cevap elemanı bağlanma proteini (CREB), CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP  $\beta$  ve  $\delta$ ), USF-1 (upstream uyarıcı faktör-1) gibi çeşitli transkripsiyon faktörleri tarafından düzenlenmektedir (Dubois, Abramson ve Crofford, 1998; Heitmer, Kelly, Ensor ve Gibson, 2004; Inoue, Tanabe ve Umesono, 2000).



DM patogenezinde, tümör nekrozis faktör (TNF)  $\alpha$  ve İnterlökin (IL)-6 gibi proinflatuar sitokinler makrofajlar gibi immünositler ve adipositler tarafından üretilmektedir. TNF- $\alpha$  ve IL-6, insülin direncinin önemli araçlarıdır, bunlar JNK aktivasyonu ya da NF- $\kappa$ B yolu aracılığıyla insülin reseptör substratın (IRS) serin fosforilasyonunu indükleyebilmektedirler. Pankreasta TNF $\alpha$  ve IL-6'nın aşırı üretimi adacık disfonksiyonuna neden olmakta ve diyabet gelişimini hızlandırmaktadırlar (Jiang, Kong, Li ve Gengmplement, 2014).

Diyabetin neden olduğu komplikasyonların incelenmesi ve tedavi yaklaşımlarının belirlenmesinde deneysel diyabet modelleri önemli bir yer tutmaktadır. Deneysel diyabet çalışmalarında cerrahi, kimyasal, viral yolla oluşturulan veya kendiliğinden gelişen modeller kullanılmaktadır (Baxter ve Duckworth, 2004).

Günümüzde deney hayvanlarında çeşitli kimyasal ajanlar kullanılarak deneysel diyabet modeli oluşturmak mümkündür. Laboratuvar hayvanlarında kimyasal diyabet (tip I), yaygın olarak streptozotosin (STZ) ya da alloksan (ALX) enjeksiyonuyla oluşturulmaktadır. STZ ve alloksan pankreatik  $\beta$  hücrelerine olan spesifik toksisite nedeniyle diyabetojenik ajan olarak kabul edilmektedirler. Her iki ajan da kan şekeri düzeyinde üç fazlı etki oluşturur. Maddenin kullanımını izleyen 2 saat içinde kan şekeri karaciğer glikojeninin ani yıkımı nedeniyle yükselir. İkinci faz ölümle sonuçlanabilecek hipoglisemik fazdır. Bu sırada hasara uğrayan  $\beta$  hücrelerinden hızla salıverilen insulinin plazma düzeyi hızla yükselir. Üçüncü faz, kalıcı hiperglisemik fazdır.

Bu noktadan başlayarak insülin düzeyleri, kullanılan diyabetojenik ajanın dozu ile ilişkili olarak düşer ve kan şekeri yükselir (Szkudelski, 2001). STZ, pankreasta serbest radikal temizleyicisi (scavenger) olan superoksit dismutazı inhibe eder ve böylece serbest radikallerin birikmesi sonucu  $\beta$  hücreleri yıkıma uğrar (Aruzmozhi, Veeranjaneyulu ve Bodhankar, 2004). Hayvan modellerinde gözlenen diyabetik durum klinik diyabete çok benzemekle birlikte, deneysel modeller aslında hem kendi aralarında farklı özellikler taşımakta, hem de bu modellerden hiçbiri insanda gözlenen diyabeti tam olarak yansıtmamaktadır. Ancak, insanlar üzerindeki araştırmaların etik nedenlerden dolayı kısıtlı olması, diyabet hastalığı ile ilgili araştırmalarda kullanılmak amacıyla çok çeşitli deneysel modellerin geliştirilmesini sağlamıştır. Yine de diyabet araştırmalarında kullanılan hayvan

modellerinin, insanlardaki diyabetin birçok özelliğini taşıdığı kabul edilmektedir (Öztürk, Altan ve Yıldızoğlu-Arı, 1996).

Bazı araştırmacılar ALX ve STZ ile pankreatik  $\beta$  hücrelerinde oluşan deformasyonun süper oksit dismutaz, vitamin E, nikotinamid gibi bazı antioksidan ajanlar ile tedavi sonucu iyileştirilebileceğini öne sürmüşlerdir (Halifeoğlu, Karataş, Çolak, Canatan ve diğerleri, 2005). Son zamanlarda en çok çalışılan antioksidanlardan bir tanesi de resveratrol (3, 5, 4'-trihidroksilstilben)'dur. Resveratrol (RSV), üzüm, kırmızı şarap, yer fıstığı, asma yaprağı, keçi boynuzu ve yaban mersininde bulunan polifenolik bir bileşiktir (Ergin ve Yaylalı, 2013).

RSV'nin etkileri araştırıldığında; antikanser aktivite, yaşamı uzatıcı etki, kalbi koruyucu etki, antioksidan aktivite, platelet agregasyonunu inhibe edici etki, antiinflamatuvar aktivite ve damar gevşetici etki gibi etkileri olduğu gözlenmiştir (Hung, Chen, Huang, Lee ve Su, 2000; Bertelli ve diğerleri, 1995). Diyabetik sıçanlarda RSV'nin metabolik parametreleri iyileştirdiği, plazma glukoz ve trigliserit konsantrasyonlarını azalttığı, bunlara paralel olarak da insülineminin etkisini azalttığı gösterilmiştir (Cai ve diğerleri, 2005; Kim ve diğerleri, 2004).

Ayrıca diyabette hipergliseminin yol açtığı oksidatif stres sonucunda böbrekte gelişen nefropatiyi önleyebileceği bildirilmiştir (Yar, Menevşe, Alp ve Helvacıoğlu, 2009). İzole edilmiş hücrelerde de RSV'nin antioksidan özelliği ile yüksek glukoz düzeyinin neden olduğu oksidatif stresi sınırladığı gösterilmiştir (Chan, 2005).

Bu bilgilerden yola çıkılarak bu tez çalışmasında, STZ ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda RSV kullanımına bağlı olarak inflamasyon ile ilişkili olan NF- $\kappa$ B1, COX2, iNOS, TNF $\alpha$  ve IL-6 genlerinin pankreasdaki mRNA ifadenin düzeylerinin araştırılması hedeflenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1.Diabetes Mellitus

#### 2.1.1. Diabetes Mellitus'un tanımı

Eski bir Yunanca kelime olan diabetes'in karşılığı sifondur ve vücuttan aşırı idrarın çıkışını ifade eder. Mellitus'a baktığımız zaman ise yine eski bir Yunanca kelime olduğunu ve aynı dildeki karşılığı "bal" olan "mel"den türetildiğini görmekteyiz (Robertson ve Harmon, 2006). DM, vücutta insülin üretiminin hiç olmaması, insülin düzeyinin yeterli olmaması ya da üretilen insülinin gerektiği gibi üretilmemesi durumlarından kaynaklanan ve böylece de hiperglisemiyi tetikleyen; diğer taraftan ise metabolizma bozukluğuyla (lipit, protein ve karbonhidrat) karakterize ve kronik niteliği olan bir metabolik hastalıktır (Robertson ve Harmon, 2006; Canda, 1994).

Hipergliseminin belirgin olması durumunda şu semptomlar gözlenir: sık sık su içme (polidipsi), nadiren polifaji (sık sık acıkma), sık idrara çıkma (poliüri), kilo kaybı, bulanık görme. İnsülin, üretimi pankreasta gerçekleştirilen ve kan şekerinin düzenleme görevini üstlenmiş olan bir hormondur. İnsülinin görevi; hücrede yakıt işlevi gören glukozun hücrelere geçişini ve hücrelerin glukozu yakarak enerji üretmesini sağlamaktır. Kan dolaşımı süresince insülin glukozla eşlik etmektedir ve böylece insülin, hücrelerin kilidini açarak glukozun içeriye girişine olanak sağlar (Dinççağ, 2011).

Hücrenin kullandığı asıl yakıt glukoz, yani basit şekerdir. Hücrelerin büyümelerini gerçekleştirmek ve fonksiyonlarını devam ettirmek için ihtiyaç duyduğu enerjiyi glukoz kullanarak ürettiği görülmektedir. Vücudun ihtiyacını duyduğu kadar insülini üretememesi durumunda hücre, glukozu kandan alarak enerjiye çeviremez, böylece kandaki kullanılmayan glukoz miktarı artar ve sonuçta hipergliseminin ortaya çıkmasına neden olur (Canda, 1994).

DM, dolaşımda olan serbest yağ asidi miktarının, uzun süreli hipergliseminin ve hiperinsülineminin bulunmasından, çevresel ve genetik faktörlerin varlığından kaynaklanan metabolik bir hastalıktır. Pankreasta yetersiz insülin salımının olması ya da hedef hücrenin insüline direnç duyması ile kendini belli eden bu hastalıkta tanının

konması, kandaki glukoz konsantrasyonunun kronik bir biçimde yüksek oluşu ile gerçekleşmektedir. Diyabet vakalarının %85'i tip 2 diyabettir. Tip 1 diyabete, Langerhans adacıklarındaki (pankreasta insülin salımı yapar) beta hücrelerinin otoimmün yıkımı yol açar. Bu durumun sonucunda ise mutlak insülin yetersizliği ortaya çıkar. Tip 2 diyabetin genellikle orta ve ileri yaşlarda görülen bir hastalık olduğu söylenebilir. Bu tip hastaların %80'i obezdir ve hem yetersiz aktivite hem obezite bu tip diyabeti ortaya çıkaran risk faktörlerinin başlıcalarıdır. Çocukluk obezitesindeki artışlardan dolayı pek çok ülkede arttığı gözlenen tip 2 diyabetin patogenezinde daha ziyade insülin direnci yer almaktadır. Bu doğrultuda Amerikan Diyabet Birliği (ADA)'nin diyabet hastalığının tanısı ve kriterlerinde 2004 yılında değişikliklere giderek yeni tanımlar geliştirmiş olduğunu belirtebiliriz (American Diabetes Association, 2004).

Çizelge 2.1. Diabetes mellitus tanı kriterleri

	Normal	Bozulmuş Açlık Glukozu (IFG)	Bozulmuş Glukoz Toleransı (IGT)	Diabetes Mellitus
Açlık plazma glukozu	<100 mg/dL	100-125 mg/Dl		≥126 mg/Dl
Postprandiyal 2. saat plazma glukozu			140-199 mg/dL	≥200 mg/dL
				DM bulguları ile beraber herhangi bir zamanda alınan kan glukozunun ≥126 mg/dL olması

2007 itibariyle dünya'da diyabet hastası 246 milyon kişinin olduğu, bunların %46'sının orta yaş grubunda yer aldığı ve önlem alınmadığı takdirde 2025'te diyabet hastası olan kişi sayısının 380 milyona varacağı tahmin edilmektedir. Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF)'nin verilerine göre T2DM'nin gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde sık görüldüğünü ifade edebiliriz. Modern çağın çevresel ve kültürel etmenlerinin genetik yapıya eklenmesi sonucunda tip 2 diyabetin prevalansında artışa yol açtığı söylenebilir (Sağlık Bakanlığı, 2006).

### 2.1.2. Diabetes Mellitus'un tarihçesi

Diyabet hastalığı antik çağdan beri bilinmektedir. Diabetes kelimesini de ilk kez Kapadokyalı Arateus 2. yüzyılda kullanmıştır. Kökeni Yunanca olan diabetes'in anlamı içinden sıvı akan borudur. Arateus, diyabetin klinik tanımını şu şekilde yapmıştır: idrar miktarında artış, kiloda düşüş ve susuzluk. 5. ve 6. yüzyılda ise Susruta gibi Hindu

hekimler poliürik durumda karınca ve diğer böceklerin yavaşmasına sebep olan bal tadında bir idrarın varlığından bahsetmiştir. Bu tanımlarda diyabette iki farklı formun olduğundan bahsedildiğini görmekteyiz. Daha sık görülen form yaşlı, kilolu ve tembel bir yaşam biçimi olan kişilerde görülürken, diğer formda yaşam süresi kısa olan zayıf kişiler görülmektedir. Ampirik olan bu sınıflandırma, tip 1 ve tip 2 diyabet tanımının temeli olmuştur (Güz, 2010).

Daha yakın dönemlere geldiğimizde diyabetin 17. yüzyıla, yani hekim Thomas Willims'in diyabetik özelliği olan idrarın tatlı olduğu şeklindeki keşfine kadar ihmal edildiğini görmekteyiz. II. Charles'ın da hekimi olan Willims, diyabetin yaşadığı dönemde artış gösterdiğini, antik çağlarda ise ender görüldüğünü düşündü. Hemen hemen bir asır sonra ise Liverpool'lu hekim Matthew Dubson (1735-1784), idrarda ve serumda görülen tatlılığın sebebinin glukoz olduğunu gösterdi (Güz, 2010). John Rollo'nun ise Yunanca'da ve Latince'de karşılığı bal olan mellitus'u hastalığın tanımına ekleyen ilk kişi olduğunu görüyoruz. 19. yüzyılda ise Claude Bernard (1813-1878), ünlü Fransız fizyolog, idrardaki glukozun karaciğerde glikojen formunda depolanmış olduğunu belirtti. Ayrıca diyabetin merkezi sinir sistemi ile olan bağlantısını da ortaya koydu (Güz, 2010).

Sık idrara çıkma, susama, kilo kaybı v.b. glukozüri ve hiperglisemiye dair tipik bulguların ortaya konması, 1889'da Oskar Minkowski ve Josef von Mering'in bir köpeğin pankreasını çıkartması ile gerçekleşmiştir. Bu deneyde bu iki bilim insanı diyabete yol açan nedenin pankreatik bir hastalık olduğunu düşündü. Paul Langerhans ise pankreastan alınmış olan preparatlarda küçük hücre kümeciklerin varlığını gösteren kişi oldu. Ancak bu hücrelerin işlevlerine dair herhangi bir açıklama getirmedi. Fransız Edouard Laguesse, söz konusu hücreleri Langerhans adacıkları olarak isimlendirdi ve bunların pankreastaki endokrin dokusu olduğunu ve glukozun düşmesine yol açan bir hormon salgıladığını öne sürdü (Güz, 2010).

İnsülinin bulunması ise Toronto üniversitesinden cerrah Fredrick Banting ve fizyolog JJR Macleod'un ortak çalışması ile 1921'de gerçekleşti. Fredrick Banting ve Charles Best 1921 yılında köpeğin pankreasından almış oldukları soğutulmuş özü, pankreası çıkarılmış olan köpeklere enjekte ettiler ve bunun sonucunda kan glukoz konsantrasyonunda düşme gerçekleştiğini gördüler. Bu iki bilim insanının deney notlarında kendilerinin insülin dediği hormonun uygulanış biçimi yer almaktadır. Collip ise 1922 yılında pankreastan insülin

elde etme ve saflaştırma yöntemlerini geliştirmiştir. İnsülin ilk kez 1922 yılında 14 yaşında bir çocuk olan Leonard Thompson'a uygulandı. ABD'li Eli Lilly firması ise uygulanabilir insülin üretimini gerçekleştirdi. 1923 yılına geldiğimizde insülin, Kuzey Amerika ve Avrupa'da yaygın bir şekilde bulunabilir hale gelmiştir (Güz, 2010).

1950'lerde, insülin tedavisi uygulansa dahi uzun süreli diyabette gözlenen göz ya da böbrek tutulumu gibi komplikasyonların ilerlemesinin devam edeceği ve önlenemeyeceği kabul görmüştür. Gliseminin normalleştirilmesi yoluyla komplikasyonların önlenmesinin ya da geciktirilmesinin gerçekleştirilebileceğine dair kesin kanıtların tip 1 diyabette 1993'de (the diabetes control and complication trial, DCCT), tip 2 diyabette ise 1998'de (UK prospective diabetes study, UKPDS) bulunduğunu görmekteyiz (Güz, 2010).

### **2.1.3. Diabetes Mellitus'un insidansı, prevalansı ve epidemiyolojisi**

Tip 2 diyabetin metabolizma hastalıkları arasında en yaygın görülen hastalık olduğunu ve pek çok ülkede sonu ölüm ile biten ilk beş hastalıktan birisi olduğunu söyleyebiliriz (Satman, 2001). Diyabet hastalığının prevalansı giderek artmaktadır. 1960-1990 arası dönemde bu artış %50 düzeyinde gerçekleşmiştir. Söz konusu artış, daha ziyade orta ve ileri yaş grubunda görülürken son zamanlarda genç, yetişkin ve çocuklarda da görülme sıklığının arttığını kanıtlayan bulgular vardır.

Önümüzdeki on yıl içerisinde diyabet hastalığından muzdarip kişilerin sayısında ciddi bir artışın gerçekleşmesi beklenmektedir. Dünya genelinde 1985'te yaklaşık olarak 30 milyon diyabetli mevcuttu; bu sayının 2025 itibarıyla 380 milyonu aşacağı tahmin edilmektedir (Satman, 2001). Türkiye'de 1997 ve 1998'de yapılan TURDEP (Türkiye Diyabet Epidemiyoloji Çalışması) çalışması, 20-80 yaş aralığındaki diyabet sıklığının %7.2, bozulmuş glukoz toleransı sıklığının %6.7, bilinmeyen diyabetlerin oranının ise %30 olduğunu göstermektedir (Kabalak ve Çetinkalp, 2009). Diyabet hastalığının prevalansında görülen bu önemli ölçüdeki artış, nüfustaki yaşlanma, sağlıklı olmayan diyet uygulamaları, obezite ve sedanter yaşam tarzlarına bağlanmaktadır.

İçinde bulunduğumuz bu çağda dünyanın DM pandemisi ile karşı karşıya olduğunu rahatlıkla söyleyebiliriz. Çağımızın çevresel ve kültürel etmenlerinin genetik özelliklere eklenmesi, özellikle tip 2 diyabetin prevalansındaki artışın sebebi olmuştur. DM'nin sinsi

seyirli karakteri, bu hastalığın prevalansının belirlenmesinde zorluk yaşatmaktadır. DM prevalansı bölgesel ve ırksal farklılıklar açısından değerlendirildiğinde en yüksek oran (%55) ABD'deki prima yerlilerinde tespit edilmiştir. Türkiye'de gerçekleştirilen Türkiye diyabet epidemiyolojisi çalışması, 20 yaş ve üzeri tip 2 diyabet prevalansının %7,2, bozulmuş glukoz toleransının prevalansının ise %6,7 olduğunu ortaya koymuştur (Satman ve diğerleri 2002).

## 2.2. İnflamasyon

İnflamasyon dokusal işlev bozukluğuna karşı özgül olmayan tepki olarak tanımlanan, yayılma kabiliyetine sahip bir savunma biçimidir ve patojenik saldırılara karşı hem doğuştan gelen hem de adaptif bağışıklık sistemleri tarafından harekete geçirilir. İnflamatuvar tepkileri diğer antiparazit savunma sistemlerinden ayıran en önemli özellik kendine verilen zararın kaçınılmaz olmasıdır. İnflamasyonun sebep olduğu ikincil zararın, bağışıklık tarafından artık yabancı madde olarak tanımlanan hedef dokuya özel bir immün aracılı saldırı barındıran immunopatoloji ile benzerlik göstermemesi önemlidir. Otoimmün, antikor ve hücre aracılı işlevler gibi adaptif bağışıklık bileşenlerinde düzensizliği ifade eder ve hem genetik hem de çevresel etkilere sahiptir (Yang ve diğerleri, 2005). Her ne kadar inflamasyon uyarıcılarla gelişen ikincil hasar immünopatolojiye katkı sağlayabilecek kapasitede olsa da (örn. eklem iltihabı, multipl skleroz, diyabet), inflamasyonun sebep olduğu hasar kontrolü ve öz bakım arasında basit bir biyolojik değişimi temsil eder ve harekete geçmesi için öz antijenlerin varlığını gerektirmez.

İnflamasyon yapısı bozulan doku homeostazisine karşı biyolojik bir reaksiyondur (Medzhitov, 2008). Temelde inflamasyon; plazma proteinleri, sıvı, lökosit gibi kandan türetilmiş maddelerin hedef dokuya gönderildiği bir savunma mekanizmasıdır. Bu maddelerin etkilerini göstermeleri vazodilasyon, artmış vasküler permeabilite ve artmış kan akışına sebep olan lokal vaskülatürde değişimlerle kolaylaştırılır.

Mikrobik saldırıların neden olduğu enfeksiyon genelde inflamatuvar tepkileri geliştiren başlıca sebep olarak görülür. Bununla birlikte hasar veya travma (parazit enfeksiyonların bulunmadığı durumlarda) ve yabancı parçacıklara/tahriş edici/kirliliğe sebep olan maddelere maruz kalma da inflamasyon başlatma potansiyeline sahip etkenlerdir (Medzhitov, 2008) ve bu tepki hasar görmüş veya işlevi bozulmuş dokularla mücadele

yönünde evrilmektedir (Matzinger, 2002). Enfeksiyon ve travmanın neden benzer inflamatuvar tepkiler uyandırdığı sorusuna getirilen genel açıklama enfeksiyonun daha çok yaralanmayı takip etmesidir ve bu da travma durumunda enfeksiyon varmış gibi karşılık vermek faydalı olur demektir (Nathan, 2002). Bu konuda daha tedbirli bir açıklamaya göre ise hem patojenler hem de yaralanma hücre ve dokuda hasara sebep olur ve benzer tepkileri tetikler (Bianchi, 2007).

İnflamasyonun başlıca fonksiyonları; inflamasyona neden olan kaynağı hızlıca yok etmek veya izole etmek, hasarlı dokuyu ortadan kaldırmak ve doku homeostazisini yenilemektir (Ashley, Weil ve Nelson, 2012). Normal bir şekilde işlediğinde inflamasyon adaptiftir. Bu ifade nötrojeni (dolaşımdaki nötrofil seviyesinin anormal derecede düşük olması) gibi ana inflamasyon maddelerinde genetik bozukluk bulunan kişilerde ciddi enfeksiyon riskinin yüksek olma durumu ile desteklenmektedir. Nakavt fare çalışmalarında, proinflamatuvar sitokinleri kodlayan genler ve inflamasyon etkenlerindeki kusurlar da yüksek enfeksiyon hassasiyeti ile nitelendirilmiştir (Martinon, Mayor ve Tschopp, 2009). Buna karşılık, kusurları spontan inflamasyona sebep olan bağışıklıkla ilgili pek çok gen bulunmaktadır ve bu durum inflamatuvar uyarıcı bulunmadığı durumlarda inflamatuvar tepkinin düzenleyici genler tarafından sağlığı korumak adına aktif biçimde bastırıldığını göstermektedir. Düzgün biçimde işlemediğinde aşırı inflamasyon yıkıcı etkilere yol açabilir ve aşırı ikincil hasara ve patolojiye sebep olabilir.

Evrimsel düzeyde inflamasyon oldukça iyi korunmuş bir olgudur ve hem omurgalı hem de omurgasız hayvanlarda ilk savunma mekanizması açısından önemli bir yere sahiptir. Kemotaksi ve fagositoz gibi inflamatuvar kaskad ile ilişkili pek çok madde tek hücreli organizmalar tarafından kolayca bulundurulabilir ve daha sonra daha kompleks çok hücreli organizmaların bütünlüğünü korumak adına savunma mekanizması olarak kullanılabilir (Rowley, 1996). Fagositoz ve antimikrobiyal peptidler şeklinde doğuştan bağışıklık ilk omurgasızlarda bulunmaktadır, buna karşılık adaptif bağışıklık sistemi sonradan gelişmiştir ve çeneli-omurgalılara özgüdür (Flajnik ve Pasquer, 2004). Adaptif bağışıklığın omurgalı sindirim bölgesine yerleşen daha karmaşık patojen topluluklarını tanımak ve kontrol etmek yönünde evrildiği varsayılmaktadır (McFall-Ngai, 2007).



### 2.2.1. İnflamatuvar genler

Pek çok kompleks inflamatuvar hastalıkta inflamatuvar genlerdeki polimorfizmler tek belirleyici faktör olmaktan çok düzenleyici görevi görmeye daha yatkındırlar. Yakın tarihte yapılan pek çok araştırmada, (TNF $\alpha$  kodlayan) TNF'deki tek nükleotid polimorfizm (SNP)'ler ile artmış astım riski, lupus eritematozus sistemi (SLE) ve psoriatik artrit arasında çok az ilişki görülmüştür. Lenfoid-spesifik protein tirozin fosfataz kodlayan bir PTPN22 varyantının multiple otoimmün hastalıklar (eklem iltihabı, SLE, tip 1 diyabet ve hipertiroid) ile ilişkisi olduğu belirlenmiştir. IRF5 (interferon regülatör faktör 5) genetik değişkenler ile artmış SLE riskinin ilişkisi ise oldukça incelenmiştir (Satman ve diğerleri, 2002).

Doğuştan bağışıklık viral mRNA detektör kodlayan (erken tip I IFN- $\beta$  responsif gen, Helicard) IFIH1, tip 1 diyabet riski ile son derece ilişkilidir. Tip 1 diyabet düşük riski ve CTLA4 ilişkisi devamlı olarak test edilmiştir. Mikrobiyal nükleotid detektör Nod2 kodlayan gen olan CARD15'te bulunan bir insersiyon polimorfizm Crohn hastalığı için büyük risk faktörü oluşturmaktadır. SNP/L23R'si (IL-23 reseptör  $\beta$ -zinciri) ile artmış inflamatuvar bağırsak hastalığı riski arasındaki ilişkinin genom-çaplı bir ilişki olduğu belirtilmiştir. Yeni yapılan çalışmaya göre, bir IL4R (IL-4 reseptör alfa zinciri) değişkeni atopik astım riskinin artmasında düşük etkiye sahiptir (Satman ve diğerleri, 2002).

İnflamatuvar/otoimmün hastalıklara ek olarak, inflamasyon-bağlantılı genlerdeki polimorfizmler de inflamatuvar/immün-bozukluklarının birincil özellikte olmadığı hastalıkların risk seviyesinde rol alabilir. Göğüs kanseri dernekler birliği'nin elde ettiği bulguya göre CASP8 interferon regülatör faktör 5 (kaspaz 8) ve TGFB1 (TGF- $\beta$ 1) değişkenleri düşük penetransa rağmen göğüs kanserinde risk etkeni olabilmektedirler. Pek çok PTGS2 (COX2) genetik varyantı ve kolorektal kanser riski arasında ilişki bulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca, düşük frekans COX2 varyantının prostat kanseri riskini düşürdüğüne dair bulgular vardır (Satman ve diğerleri, 2002).

#### Sitokinlerin tanımı ve sınıflandırılması

Sitokinlerin, biyolojik fonksiyonları düzenlediği ve hücreler arasında iletişimi sağladığı görülmektedir (Suzuki, 1999; Viviani, Bartesaghi, Corsini ve Galli, 2004; Özlem ve

Turgay, 2009; Yılmaz, Taşkiran ve Aydar, 2004). Bir tür polipeptid olan sitokinler etkilerini gen transkripsiyonundan sitoplazmik sinyal sistemlerini, hücre membranı üzerindeki reseptörlere bağlanıp aktifleştirerek gösterirler (Rakesh ve Agrawal, 2005).

Reseptörler işlev ve yapılarına göre değişik şekilde tanımlanabilir. Reseptör tirozin kinaz (RTK) direkt sitoplazmik protein kinaz kaskadını başlatmaktadır. Enzimatik bir aktiviteye sahip bu reseptör, birinci ve ikinci tip reseptörlerle beraber proteinler aracılığıyla hücre içi sinyal yollarını düzenler. Tirozin kinaz ile aynı etkiye sahip diğer reseptörler serine/treonin kinaz bünyesinde çalışan Ras/Raf/MEK/MAPK gibi yapıları kullanabilirler. Uyarılar, bahsedilen adaptör proteinler aracılığıyla transdüksiyon etkenlerine gönderilir. Eğer gen transkripsiyonu uyarılırsa apoptozis veya proliferasyon uyarılmak durumundadır (Asirvatham, William ve Thomas, 2009).

Bazı reseptörler tirozin kinaz aktivitesine sahip değildir. Bunlar diğer tirozin kinazları (JAK/STAT, SRC gibi) fosforilleyerek hücre içi sinyal merkezlerini harekete geçirirler. Yani hücrenin gen ekspresyonu her durumda düzenlenir. Buna sitokinin bağlandığı reseptörün bir etkisi yoktur (Hao, Cao, Hu, Li, Xiao ve Tang, 2009).

Sitokinler, kendilerini uyarıcı unsurların meydana getirdiği etki ile immün ve immün olmayan hücrelerden sentezlenir. Sistem hormonları da denilen sitokinler bu şekilde üretildikleri hücrelerde veya komşu hücrelerde etkilidirler. Ayrıca sitokinler sistemik etki gösterebilme yeteneğine sahip aracı maddelerdir. Kemokinler, glikoprotein yapısındaki bu aracı maddeler lökosit kemotaksisini tetiklerken interlökinler, hücreler arasında uyarıcı veya baskılayıcıdır ve fibroblast, epitel hücreleri, dendritik hücreler, keratinositler gibi hücrelerden salgılanırlar (Bernal, 2007; Bilgehan, 1999).

Sitokinlerin sınıflandırılması (Bernal, 2007; Gülmezoğlu ve Ergüven, 1994):

1. Doğal immüniteye aracılık edenler:

- Birinci tip interferon
- TNF
- IL-1
- IL-6
- IL-8

2. Lenfositlerin aktive edilmesi, gelişimi ve farklılaşmasına etkisi olanlar
  - IL-2
  - IL-4
  - TGF- $\beta$
  
3. İnflamasyonlu hücreleri aktive edenler
  - İnterferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )
  - Lenfotoksin (LT)
  - IL-5
  - Migrasyon inhibe edici faktör (MIF)
  
4. Hematopoezisi uyaranlar
  - IL-3
  - Granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF)
  - Monosit-makrofaj stimüle edici faktör (M-CSF)
  - Granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF)
  - IL-7 (Bernal, 2007; Goldenberg, Culhane, Iams ve Romero, 2008; Gülmezoğlu ve Ergüven, 1994).

### İnflamatuvar sitokinler

İnflamatuvar sitokinler grubu osteoartrit (OA) patojenezine katılan en önemli bileşimlerdir. İnflamatuvar sitokinler, katılımı en geniş çaplı ve kesin şekilde kayıt altına alınan bileşimlerdir. Katabolik ve destrüktif faaliyetleri artırarak eklem oluşturan dokuların metabolik homeostazisinden büyük oranda sorumludurlar (Gülmezoğlu ve Ergüven, 1994).

OA patojenezinde oynadıkları en önemli rol, bazı inflamatuvar bileşim ve enzimlerin yanısıra, bu bileşimlerin eklemden bulunan hücrelerin büyük bölümünde ve sinyal iletimi intraselüler geçitleri yoluyla sitokin üretimi üzerinde bıraktıkları etkidir. Bu grubun üyeleri arasında en çok çalışılanlar IL-1, TNF, IL-6, IL-15, IL-17 ve IL-18'dir (Gülmezoğlu ve Ergüven, 1994).

### Tümör nekroz faktörü alfa (TNF $\alpha$ )

Tümör nekroz faktörü alfa (TNF $\alpha$ ), IL-1 $\beta$  ile birlikte OA sürecinde ortaya çıkan patofizyolojik süreçlerle ilgili önemli bir inflamatuvar sitokin olarak görülür. Tümör nekroz faktörleri üst ailesinde bulunan 19 ligandan biridir (TNF üst ailesi) (Bodmer, Scheneider ve Tschopp, 2002). Temelde, bir sonraki aşamada ortama salgılanabilen ve serbest bir TNF $\alpha$  formu (sTNF $\alpha$ ) meydana getiren, TACE/ADAM17 metalloproteinaz içeren homotrimer transmembran protein tip II (mTNF $\alpha$ ) olarak oluşur (Kriegler, Perez, DeFay, Albert ve Lu, 1988).

TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  sentezleyen eklem hücreleri tarafından salgılanır ve yüksek derecede IL-1 $\beta$  görülen sinovyal sıvı, sinovyal membran, kıkırdak ve subkondral kemik tabakası gibi aynı unsurlarda görülür. Sitokin, hemen hemen her çekirdekli TNF-R1 (p55, CD120a ve TNFRSF1a) ve TNF-R2 (p75, CD120b ve TNFRSF1b) hücrenin yüzeyinde bulunan iki membran reseptör izotipini bağlama yeteneğine sahiptir. TNF-R1 reseptör çözünür ve membran formlar tarafından etkin bir biçimde aktive edilebilirken, TNF-R2 daha çok membran formu bağlar (Asirvatham, William ve Thomas, 2009). TNF-R2 ile kıyaslandığında TNF-R1'in yerel eklem kıkırdağı kaybı üzerinde daha çok etki ettiği görülmektedir; ancak, bu durum OA sürecinde, her iki reseptörün de TNF $\alpha$  tarafından aktive edildikten sonra sinyal iletimine katıldığı gerçeğini değiştirmemektedir (MacEwan, 2002; Webb, Westacott ve Elson, 1998).

TNF-R1 ekspresyonu aynı zamanda FLS hücrelerinde de artmış durumdadır. Yukarıda da bahsedildiği üzere, her iki reseptörün de TNF $\alpha$  ile ilişkisi, aminoasit bileşimi, glikozilasyonu ve yapısı farklıdır; özellikle de intraselüler açıdan farklılıkları vardır: TNF-R1'de bulunan ölüm etki alanı (DD) TNF-R2 reseptörde bulunmaz (Micheau ve Tschopp, 2003).

İntraselüler bölümde homoloji bulunmaması durumunu göz önüne alırsak, her iki reseptör de farklı sinyalleri iletme yeteneğine sahiptir. TNF-R1, iki farklı TNF-R1 sinyal kompleksini (TNF-RSC) iletme gücüne sahiptir (Micheau ve Tschopp, 2003). Kompleks II'nin ana fonksiyonlarından biri hücre disintegrasyonuna sebep olan sinyal iletimi iken kompleks I daha çok son ürünlerin inflamatuvar tepki yarattığı geçiş yolu aktivasyonunda,

özellikle de sitokinlerin üretimini ve salgılanmasını ve apoptozu önleyen proteinin üretiminde yer alır (Han, Chuan-Qi ve Duan-Wu, 2011).

TNF $\alpha$ 'nın TNF-R1 ile asosiyasyonu, TRADD adaptör proteini ile ölüm alanı (death domain, DD) arasında etkileşime ve TRAF2, c-IAP1, c-IAP2, RIP1 gibi diğer adaptör proteinlerin bağlanmasına sebep olur. Kompleksin oluşumunu TAK1, TAB1 ve TAB2 de bağlayan RIP1 proteinin ubiquitinasyonu izler ve böylece IKK kompleksinin fosforilasyonuna, son olarak da OA—NF- $\kappa$ B süresince en önemli transkripsiyon yolunun aktivasyonuna sebep olur. Ayrıca, kompleks I'in oluşumu ve etkisi sırasında, ekstraselüler-regüle kinaz (ERK) yolu ve p38MAPK'nın yanısıra, diğer önemli sinyal yolu da JNK kinaz tarafından aktive edilir (Haas ve diğerleri, 2009).

Kompleks II'nin oluşumu ise aktive edilmiş reseptörün endositozu ile birlikte gerçekleşir, yapısını ve FADD ve pro-Kaspaz 8 işleyişini değiştirir. Bu da hücre ölümüne sebep olur (Micheau ve Tschopp, 2003). Buna karşılık olarak, mTNF $\alpha$ 'nın TNF-R2 reseptörüne bağlanması sinyal iletiminde önemli olan TRAF2'nin ve TRAF3, c-IAP1, c-IAP2 gibi diğer proteinlerin bağlanmasına ve karşılıklı etkileşimine sebep olacaktır.

Kompleks etkileşiminin etkisi, JNK kinazın aktivasyonu ve transkripsiyon faktör NR- $\kappa$ B'dir (Rothe, Pan, Henzel, Ayres ve Goeddel, 1995). Reseptör protein TNF-R2 kodlayan gendeki (M196R) polimorfizmin, aşırı MTNF $\alpha$  aktivasyonu sebebiyle fonksiyonları bozulacak olan kondrositlerin yüzeyinde reseptör proteinlerin sayısını artırarak OA gelişimini önceden tayin edebileceği kanıtlanmıştır (Oregon-Romero ve Vazquez-Del Mercado, 2006). Ayrıca, analiz edilmiş özel popülasyonlar konusunda, yalnızca reseptörde değil, aynı zamanda TNF $\alpha$  liganddaki polimorfizm de OA oluşumu sağlayabilir. OA patogenezinde önemi gittikçe artan ve hem TNF-R1 hem de TNF-R2 birleştirebilen ek bir ligandan, yani granülin epitelin prekürsörü (GEP), PC-hücre kökenli büyüme faktörü (PCDGF), proepitelin veya akrogranin olarak da bilinen progranülinen bahsetmek faydalı olacaktır (Liu ve Bosch, 2012).

PGRN anti-flamatuar ve immünomodülatör özelliklere sahip bir büyüme faktörüdür (Jian, Konopka ve Liu, 2013). OA dahil olmak üzere kıkırdak artropati rahatsızlıklarına sahip hastalarda PGRN seviyesinin yüksek olduğu görülür (Guo, Lai, Tian, Lin, Kong ve Liu, 2010). Hastalık süresince yüksek seviyede bulunmasının yanısıra, özel TNF $\alpha$

reseptörlerine bağlanabilmesi, sinyal yolu TNF $\alpha$ /TNF-R1 ve TNF $\alpha$ /TNF-R2'ye mühadale eden, TNF'nin doğal bir antagonisti olduğunu gösterir. Bu da göstermektedir ki, TNF $\alpha$ /PGRN dengesizliği OA gelişimini hem hızlandırabilir hem de önleyebilir. Ayrıca, otoimmün bileşenli bazı eklem hastalıklarında PGRN otoantikörlerinin varlığı gözlenmiştir. TNF $\alpha$  etkisi pek çok durumda IL-1 $\beta$  faaliyetiyle uyuşmaktadır ve OA süresince meydana gelen pek çok durumda bu iki sitokin arasında göze çarpan bir eş etki vardır. Bu etki aynı grup intraselüler sinyal yollarının aktivasyonu sonucu meydana gelir ve bunun sonucunda da eklem dokularında inflamasyonu ve katabolizmi artıran benzer etkiler tetiklenir (Konopka, Richbourgh ve Liu, 2014; Saklatvala, 1986).

TFN etkisini kondrositlerin proteoglikan bileşimleri, proteoglikan bağlayan proteinleri ve tip II kolajenleri sentezini bloke ederek gösterir (Saklatvala, 1986). Aktive edilen kondrositler aynı zamanda MMP-1, MMP-3, MMP-13 ve ADAMTS-4 üretirler (Lefebvre, Chantal ve Vaes, 1990). Yukarıda da bahsedildiği üzere, kıkırdağın yenilenme olasılığını ortadan kaldıran bir kondrosit ölümü indüksiyonu ve kondrojenik progenitör hücre (CPCler) göçü bozukluğu bulunmaktadır. Ayrıca, TNF $\alpha$  ve IL-1 $\beta$ 'nin açık bir etkisi de solunum dizisi etkinliğinin azalması ve buradan hareketle de kondrositlerdeki mitokondride üretilen ATP'nin düşüşü şeklinde görülür; bunlara ek olarak, mitokondriyal membran potansiyelinde bir azalma meydana gelmektedir. TNF $\alpha$ ; örneğin yüksek IL-6, IL-8, RANTES ve VEGF sentezinden sorumludur. Ayrıca, IL-1 $\beta$  ve TNF $\alpha$ , yukarıda görüldüğü üzere iNOS, COX2 ve PGE2 sentaz üretimini indükler ve bu şekilde verdikleri ürün miktarını artırır (Honorati, Cattini ve Facchini, 2007; Jones, Brockbank, Clements, Le Good ve Campbell, 2009).

### İnterlökin-6 (IL-6)

İnterlökin-6 (IL-6), insan vücudunda meydana gelen süreçlerde çok yönlü etkileşimler tarafından karakterize edilen bir bileşimdir. Her ne kadar bazı etkileri göz önüne alındığında anti-inflamatuar etkileşim olarak sınıflandırılabilirse de, bağışıklık sistemini oldukça harekete geçiren ve inflamatuvar tepkiyi hızlandıran bir sitokindir. IL-6; posttranslasyonel işlemlerde birbirine bağlanmış dört  $\alpha$ -sarmallı bir yapı olan 184 amino asitten oluşan bir glikoproteindir (Hammacher, Ward, Simpson, Weinstock, Treutlein ve Yasukawa, 1994).

IL-6'nın zarar görmüş eklem dokularında üretimi genellikle IL-1 $\beta$  ve TNF $\alpha$ 'ya tepki sonucu meydana gelir ve daha çok kondrositler, osteoblastlar, FLS, makrofajlar ve adipositler tarafından gerçekleştirilir (Bender ve diğerleri, 1990). Yüksek IL-6 konsantrasyonu hem sinovyal sıvıda hem de serumda bulunmaktadır ve X-ray görüntülerinde lezyonların yoğunluğu ile ilişkilendirilmektedir (Kaneko, Satoh, Chiba, Ju ve diğerleri, 2000). IL-6 etkisi özel bir reseptör sistemi sayesinde gözlenebilir.

IL-6R reseptörün iki alt türü bulunmaktadır (gp80, CD126). Sinyali hücre içine iletebilmek için ilave gp130 proteinin (CD130) varlığı gerekmektedir (Hibi, Murakami, Saito, Hirano, Taga ve Kishimoto, 1990). gp130 proteini aynı zamanda membran form mgp130 ve çözünebilir sgp130'da da bulunmaktadır (Nazaraki ve diğerleri, 1993). IL-6 ve IL-6R'nin sgp130 ile birleşimi IL-6 sinyal yolunun engellenmesiyle ilişkilidir. Ligand-reseptör kompleksinin mgp130'a takviyesi homodimerizasyona ve bunun sonucunda da hücreye etkin sinyal iletimine olanak tanıyan heksamer oluşumuna sebep olur. JAK kinaz, ileri safhalarda STAT3 aktivasyonu, MAPK forforilasyonu ve P13K/AKT yolu aktivasyonuna sebep olan gp130'un ayrılmaz bir parçası olan tirozin kalıntılarının forforilasyonunu sağlar (Hirano, Nakajima ve Hibi, 1997).

IL-6'nın OA'daki rolünü analiz ederken, gen kodlayan IL-6 polimorfizminin (-174G/C) OA gelişimini belirleyebileceğine dikkat etmek gerekir (Honsawek ve diğerleri, 2011). IL-6'nın eklem kıkırdığı üzerindeki etkisi diğer sitokinlerden farklı değildir ve diğer sitokinlerle eş etkili biçimde, tip II kolajen üretiminin düşmesine ve MMP'ler grubundan enzim üretimlerinin artmasına sebep olur (Poree ve diğerleri, 2008).

Ayrıca, bu etkilerin hasar durumunda hızlandırılabilmesi görülmüştür (Sui Poree ve diğerleri, 2009). IL-6 subkondral kemik tabakasında değişikliklere yol açan önemli bir sitokin olarak görülmektedir (Steeve, Marc, Sandrine, Dominique ve diğerleri, 2004). Etkisi büyük ölçüde osteoklastların oluşumunu ve böylece IL-1 $\beta$  ve TNF $\alpha$  ile eş etki göstermekle beraber kemik rezorpsiyonunu desteklemek üzerine kuruludur. IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , ve IL-6 tarafından uyarılan osteoblastlar bu nedenle bir kaynağa dönüşürler ve etrafında bulunan kıkırdakta ters etki yaratarak MMP'lerin üretiminde bulunabilirler (Sakao ve diğerleri, 2009).

Diğer sitokinlerin IL-6 üretimini tetikleme konusunda belirtilen rolüne ek olarak, kondrositler de prostaglandin E2'den etkilenirler (Wang, Zhuve ve Konstantopoulos, 2010). Hayvan modellerde yapılan testler analiz edildiğinde, IL-6'nın bazı durumlarda farklı etkiler gösterebileceği görülür. IL-6 geni bulunmayan fareler üzerinde yapılan bir deney, bu farelerin sağlıklı farelere kıyasla daha gelişmiş dejeneratif değişimler geliştirmeye yatkın olduklarını göstermiştir (de Hooge, van de Loo, Bennink, Arntz, de Hooge ve van den Berg, 2005). Bir başka deney esnasında, IL-6 geni bulunmayan farelerde eklem içi IL-6 injeksiyonunun kronik eklem inflamasyonu akut evresinde proteoglikan kaybını azalttığı ve osteofit oluşumunu tetiklediği görülmüştür (Van de Loo, Kuiper, Enkevort ve diğerleri, 1997).

### **2.2.2. İnflamatuar sitokinler ve diyabet**

Tip 1 diyabetin inflamatuvar süreçlerindeki kesin rolünü çevreleyen bazı tartışmalar olsa da, ilgi çekici bulgular C-tepkisel protein (CRP) ve inflamatuvar biyoişaretçilerin ölçümü olan C-reaktif protein (CRP) seviyelerinin araştırmalarında ortaya çıkmıştır. Bireylerdeki C-tepkisel protein konsantrasyonları tip 1 diyabetin başlangıcında sağlıklı bireylerdeki ile benzer olsa da, uzun dönemli diyabette gözle görülür biçimde yüksektir (Van de Loo, Kuiper, Enkevort ve diğerleri, 1997).

Tip 1 diyabette inflamasyonu destekleyen en önemli faktör komplikasyon alanıdır. İnflamatuar ve oksidatif stres belirteçlerindeki artışların, diyabet komplikasyonlarının gelişimiyle, C-tepkisel protein'in plazma seviyelerinin yükselmesiyle ve çözünür vasküler adezyon molekülü 1 ve mikrovaskülerli hastalardaki nitrotirozinle olmayanlara göre bağlantılı olduğu bulunmuştur. Monositlerin interlökin salınımının artışı (IL)-1b ve süperoksit anyonlar tip 1 diyabet hastalarında mikrovasküler ve kardiyovasküler hastalıklarının inflamatuvar markörlerinde yükseliş gösterdiği saptanmıştır (Van de Loo, Kuiper, Enkevort ve diğerleri, 1997).

İnsülin direnci, beta hücre ayrışmasının ve ilgili insülin eksiliğinin sonucu olarak bozulmuş glikoz toleransı olan tip 2 diyabetinden önce başlar. Bozulmuş glukoz toleransına sahip hastalarda insülin direncinin gelişmesi birkaç faktöre bağlıdır ve tip 2 diyabet genetik ve çevresel etkilere dahil olmakla beraber, obezite ve kronik inflamatuvar ya da enfeksiyonla bağlantılıdır. Obezite ihtimali ve yağ dokusu aktivasyonu insülin direncinin gelişmesinin



altında yatan inflamatuvar faktörlerini artırabilir, bu da diyabet alanında yoğun bir ilgi ortaya çıkarmıştır.

Tip 2 diyabet hastalarının önemli bir kısmı fazla kilolu veya obezdir ve obezite tip 2 diyabetinin gelişmesinde önemli bir risk faktörüdür. Obez bireylerde; yağlar, yağlı asitler ve çeşitli inflamatuvar sitokinler insülin direncinin gelişmesiyle bağlantılıdır. kronik inflamasyon obezite, insülin direnci ve metabolik sendrom olarak bilinen metabolik patoloji kümelerinin bütün özelliklerine sahip olan tip 2 diyabet ile ilgilidir. Ancak tip 2 diyabet insülin direnci için zemin hazırlayan bir faktör olarak obezite ile ilgili olmasına rağmen insülin duyarlılığı kaybı için eşit derecede önemli başka mekanizmaların ortaya atıldığı vurgulanmalıdır. Tip 2 diyabetli genç bir hastada, benzer vücut kitle indeksi ve inflamatuvar markörlerinin tümör nekroz faktörünün plazma konsantrasyonları ve insülin direncindeki adiponektin ile insüline hassas bireylerdekine benzer olduğu görülmüştür (Van de Loo, Kuiper, Enckevort ve diğerleri, 1997).

Obezite ile ilgili insülin direnci gelişimi modelinde, bir kez aktifleşen adipositler anormal seviyede lipid, yağ asitleri, monosit kemotaktik proteinleri ve çeşitli inflamatuvar sitokinler örneğin C-tepki proteinini, plazminojen aktivatörü-1 ve TNF $\alpha$  salınımına neden olur. Bu sitokinlerin ve diğer mediyatörlerin salınımı adipoz doku içindeki monositlerin görevlendirilmesine yol açar. Monositlerin, makrofajlara diferansiyasyonu inflamasyon faktörlerinin yüksek salınımıyla ve çeşitli dokulara yayılmış inflamatuvar yanıtlarının bölgesel yağ dokusuyla birlikte gerçekleşmektedir. İnflamatuvar maddelerinin yağ dokularından tip 2 diyabetlerine kadar obezite ve diyabetin kemirgenlerle ilgili olduğu bağlantısı kurulmuştur. Bu fare ve sıçan modellerinde TNF $\alpha$ , mRNA ve protein, sistemsel olarak plazmanın içinde olduğu kadar bölgesel olarak da yağ dokularının içinde başlatılmıştır. Bir kemirgen modelindeki TNF $\alpha$  ekspresyonunun inhibisyonu TNF $\alpha$  reseptörü kullanan immunglobülin G kimerik proteini insülin hassaslığını geliştirip, insülin direncine karşı direkt bir rol oynadığı ortaya çıkmıştır. İnsülin duyarlılığındaki bu artışlarda özel bir TNF $\alpha$  inhibitörünün kullanımı tekrarlanmamıştır, ancak bulguların onaylanabilmesi için daha geniş çapta çalışmalar ve deneme süreleri gerekmektedir (Van de Loo, Kuiper, Enckevort ve diğerleri, 1997).

Bir çok çalışma IKKB/NF- $\kappa$ B'nin hayvan ve insan klinik deneylerinde, insülin direncinin gelişmesinde önemli bir rolü olduğunu desteklemektedir. Yüksek yağlı diyetle beslenen bir

fare modelinde, (normal/homozigot IKKb kontrollerine kıyasla, daha yavaş artış gösteren insülin ve glukoz yoğunluğu aracılığıyla ölçüldüğü gibi) IKKb'nin heterozigot silinmesi doğumdan sonraki 23 hafta boyunca insülin direncinden koruduğu görülmüştür. Ek olarak; genç, obez ve diyabetik olmayan, salsalate ile tedavi edilen yetişkinlerde yapılan klinik çalışmada, asetillenmemiş salisilat ve IKKb/NK-Kb'nin bilinen engelleyicisi plasebo kontrollerine kıyasla insülin duyarlılığını geliştirmiştir. Salsalate tedavisinin bu hastalardaki inflamatuvar markörlerini geliştirmesi, yağ asitlerinde azalmaya yol açmıştır (Van de Loo, Kuiper, Enckevort ve diğerleri, 1997).

Bu tür sonuçlar lokal, akış aşağı hiperglisemi PKC yolunun açığa çıkmasını sağlar. Bu, değiştirilmiş gen, açığa çıkmasıyla ve/veya protein fonksiyonu yoluyla komplikasyonların gelişmesine neden olup hücre disfonksiyonunda ve zararında pay sahibi olur. İyi tanımlanmış diyabetik vasküler komplikasyonlarının seyri diaçilgliserol (DAG)-PKG yolunun aktivasyonudur. DAG seviyelerindeki artış ve PKC aktiviteleri diyabetli hayvanlar ve insanlardan izole edilen dokular ve kültürü yapılmış hücrelerde bulunmaktadır. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gibi oksidanların indüksiyonunu içeren artmış DAG oluşumunun ve AGE'lerdeki birikimin altında birtakım işlemler yatabilir (Van de Loo, Kuiper, Enckevort ve diğerleri, 1997).

DAG sentezinin uyarılması PKC izoformlarını aktive ederek retina, böbrek, kalp ve vaskülatür gibi dokularda komplikasyonların gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Vaskülatürdeki PKC aktivasyonu, temel matris protein sentezi, lökositlerin aktivasyonu, endotelial hücrelerin aktivasyonu ve çoğalması, endotelial geçirgenlik, sitokinlerin aktivasyonu, vasküler endotelial büyüme faktörü, endotelin ve anjiyogenez gibi süreçlerin artışta bulunması ile ilgilidir. Vasküler komplikasyonlar selektif insülin direncinin kardiyovasküler dokularda bulunan artan PKC ve MAPK aktivitelerinden ortaya çıkmaktadır.

Normal fizyolojik şartlar altında insülin ile insülin reseptörleri kalp dokusundaki iki ana yolu uyarmak için etkileşim halindedir: Fosfoinositid-3 kinaz (PI3K) aterojenezi engelleyen ve antiaterojenik etkilere sahip olan yol ve MAPK hücrelerin büyümesini kolaylaştıran ve aterojenezi geliştiren yol. Diyabetin ve insülin direncinin varlığında, glukozun artmasına ve serbest yağ asitleri inflamatuvar sitoksinlerinin yüksek salınımına ve PKC ve MAPK aktivitelerinin değişmesine yol açar. PKC, PI3K yolunu engeller ve antiaterojenik nitrik oksit üretiminin azalmasına ve bozulmuş endotele bağımlı damar

genişlemesi gibi gelişmiş aterojezeziye yol açar. Bununla beraber, insülin direnci tarafından başlatılan işlemler ve diyabet proaterojenik eylemleri uygulamak için MAPK yolunu hızlandırır. Çeşitli kanıtlar PKC-b'nin selektif aktivasyonunun diyabetik retinopati ve nefropati dahil olmak üzere diyabet mikrovasküler komplikasyonları patogenezi için olası bir mekanizma olduğunu düşündürmektedir (Van de Loo, Kuiper, Enckevort ve diğerleri, 1997).

### 2.3. Serbest Radikaller ve Hücre

Oksijen toksik olduğu için birtakım savunma mekanizmaları, aerobik organizmaları oksijen toksisitesinden korumaktadır. Bu mekanizmalara enzim sistemleri ve radikal tutucuları örnek verilebilir. Ancak serbest radikallerin oluşum hızı, korunma sistemlerini elverişsiz bırakınca serbest radikallerin kötü etkileri ortaya çıkmaktadır (Satman ve diğerleri, 2002).

#### 2.3.1. Antioksidanlar

Organizmalar, serbest radikallerin kötü etkilerini ortadan kaldırmak için koruyucu sistemler geliştirir. Bu sistemlerin iki görevi vardır: İlki serbest radikallerin üretimini durdurmak iken ikincisi ise var olan serbest radikallerin kötü etkilerini yok etmektir.

Bu görevleri yerine getiren bütün maddeler antioksidanlardır. Kaynağı endojen ile ekzojen olmak üzere iki çeşit olan antioksidanlar aşağıdaki çizelgede sınıflandırılmıştır (Satman ve diğerleri, 2002):

Çizelge 2.2. Antioksidanların sınıflandırılması

ANTIÖKSİDAN SİSTEMLER			
Enzimatik Antioksidanlar	Enzimatik Olmayan Antioksidanlar		
	Süpürücü Antioksidanlar	Koruyucu Antioksidanlar	Sentetik Antioksidanlar
Süperoksit dismutaz	Askorbik asit (vit C)	Transferrin	N-asetilsistein
Glutasyon peroksidaz	$\alpha$ -tokoferol (vit E)	Albumin	Allopurinol (Ksantin oksidaz inhibitörleri)
Paraoksonaz	Tiyoller	Seruloplasmin	Probakol
Katalaz	$\beta$ -karoten	Ferritin	Penisilamin
	Ürik asit		Deferoksamin
	Flavanoidler		Butil-Hidroksitoluen
	Koenzim Q		

## Flavonoidler

Flavonoidler; bitkilerde bulunan sarı, kırmızı ve mavi renk pigmentlerinin oluşmasını sağlayan polifenollerdir. Enzimatik olmayan antioksidanlar ve lipidler aracılığı ile çözünen antioksidanlar grubuna giren flavonoidlerin besinsel kaynaklarının temelinde elma, limon, üzüm, portakal, karnibahar ve patates bulunmaktadır. Ayrıca şarap, çay ve üzüm suyu gibi bitkisel içeceklerde de mevcut olan flavonoidlerin 3'-4 dihidroksi yapısının antioksidan etkinliği bulunmaktadır. ROO ve RO radikalini parçalayarak lipid peroksit zincir reaksiyonunu bitirmeyi amaçlayan fenolik antioksidan, lipid radikallere hız verir ve lipid oksidasyonu ile etkileşime girer. Flavonoidler, serbest radikalleri bağlayarak antioksidan etkinliklerini gösterir. RSV polifenolik fitoaleksinin sınıfındadır ve antioksidan grubundan flavonoidlerin içerisinde bulunmaktadır (Shahidi, Janitha ve Wanasundara, 1992; Avcı, 2001).

### **2.4. Resveratrol**

#### **2.4.1. Resveratrol'ün tanımı ve tarihçesi**

Stilben, moleküler ağırlığı düşük olan doğal bir bileşiktir ve bitkilerin çoğunda bulunmaktadır. Fitoaleksinler ise stilben ailesine dahil olan moleküllerin kısıtlı bir grubunu oluşturmaktadır. Bitkilerin ürettiği fitoaleksinler, biyotik ve abiyotik stres ile mücadele etme amacını taşımaktadır. Fitoaleksinlerin diğer özellikleri ise sekonder bitki metabolitleri olmaları; antibakteriyel ve antifungal nitelikler taşımalarıdır (Szewczuk, Lawrence, Stivala ve Penning, 2004). Polifenolik fitoaleksinin sınıfı, genellikle antibiyotik bileşiklerinden oluşmaktadır ve RSV (trans-3,4',5-trihidroksi-stilben) bu sınıfa aittir. Yani RSV, stilben sentaz enzimi ile bitkilerden edinilen stilbenin yan ürünü olan stilbenoid'dir. Polifenolik steroid olmayan RSV bileşiğinin kimyasal olarak flavonoiddir. RSV; dut, üzüm ve yer fıstığı gibi bitkilerin büyürken uğradığı dış etkilere (çeşitli enfeksiyonlar, soğuk hava, UV ışınları ve yaralanmaya) karşı kendisini savunabilmek için doğal olarak üretilmektedir (Martinez ve Moreno, 2000).

İlk olarak 1940'ta beyaz karacaotu kökünden elde edilen RSV, 1963 yılında da Ko-jo-kon'dan izole edilmiştir. Ko-jo-kon, uzakdoğu tıbbında kullanılan *polygona cuspidatum* bitkisi kökünün kurutulup toz haline getirilmesi ile elde edilen bir ilaçtır. Fitoaleksini ise

ilk defa Langcake ve Pryce 1976'da üzüm bitkisinin tanelerinde ve yapraklarında (vitis vinifera) tespit etmiştir. Takip eden yıllarda RSV'nin antifugal etkinliğini araştırmak için Avustralya'da bulunan okaliptüs ağacı üzerinde çalışmalar yapılmıştır. RSV'den, hastalıklara karşı dayanıklılık göstermede üzüm türlerinin seçilimi için bir "marker" gibi faydalanılmıştır (Fremont, 1940).

Uzun süre dikkat çekmeyen RSV, 1992 yılında kırmızı şarabın içerisinde tespit edilmiştir. Bu saptamadan sonra üzerinde araştırmalar yapılmış ve RSV'nin birçok organizmanın hayatta kalma süresini artırdığı; artan strese karşı direnci yükselttiği; kardiyovasküler hastalıklar, iskemik yaralanmalar ve kanserin gelişimi gibi sorunları önlediği ya da hızlarını azaltabildiği belirlenmiştir (Takaoka, 1940). RSV'nin karsinogenezi inhibe edebildiğini ise 1997'de Jang vd. keşfetmiştir (Law, Stampfer ve Rimm, 1999).

Stilben sentaz, RSV'yi üreten enzimdir. Schoeppner ve Kindl (1984), Melchior ve Kindl (1990), Schroder vd. (1999) gibi araştırmacılar bu enzim üzerine çalışmış; pek çok bitki konakçısında tespit etmiş ve kopyalamıştır (Law, Stampfer ve Rimm, 1999). 1997 yılında gerçekleştirilen hayvan deneylerinde ise RSV'nin antiinflamatuvar etkisi keşfedilmiştir (Martinez ve Moreno, 2000).

Cis ve trans izomerik formlarından oluşan RSV'nin trans-formu (E) tepe görüntüsü; cis-formu (Z) ise dönen görüntüsü anlamına gelmektedir. Trans-formu biyolojik açıdan etkindir. Ultraviyole (UV) ışınları ya da ısı alması durumunda trans-formu, cis-formuna geçebilmektedir. Trans-RSV'nin stabilitesinin sürdürülmesi için ışıktan uzak tutulması gerekmektedir (Martinez ve Moreno, 2000).

RSV'nin üzümde (bu sebeple de şarapta) mevcut olmasının sebebi, üzümlerin mantar enfeksiyonuna maruz kalması olabilir. Tane ve yapraklar RSV'yi, biyotik veya abiyotik stresin ardından sentezler. Bunun amacı, küf enfeksiyonuna sebep olan Botrytis cinerea (kurşuni küf)'nin engellenmeye çalışılmasıdır (Martinez ve Moreno, 2000).

Botrytis cinerea, üzümü enfekte ettiğinde RSV yoğunluğu artmaktadır. Aljinat ve musik asit, bu mantarın iki metabolitidir ve birinci dereceden RSV uyarıcısıdır. Botrytis cinerea, şarap biliminde esas küf diye bilinir; pek çok araştırmada RSV bileşimindeki görevinin altı çizilmiştir. Bu küfün fazla olmadığı bilinen üzümlerden elde edilen şaraplarda bile RSV

oranı yüksek derecelerde tespit edilmiştir (Sbaghi, 1994; Jeandet, Sbaghi, Bessis ve Meunier, 1995).

Beslenmede yaygın kullanılan dut, kuru üzüm, yer fıstığı, yaban mersini, üzüm, şarap, sirke, pekmez ve pestil gibi ürünler RSV'yi doğal olarak üretebilme yeteneğine sahiptir (Langcake ve McCarthy, 1979; Creasy ve Creasy, 1998).

Bir antioksidan olan RSV, büyük oranda siyah üzümün kabuk bölümünden sentezlenmektedir. Üzümün kök, sap ve çekirdek kısımlarında ise daha az miktarda mevcuttur. RSV bileşiminin çoğunlukla üzümün kabuk bölümünde bulunduğu, meyve etinde ise az yoğunlukta bulunduğu ya da hiç bulunmadığı tespit edilmiştir (Langcake ve McCarthy, 1979).

Üzüm, şarap ve yer fıstığında bulunan RSV miktarları şu şekildedir (Szewczuk, Forti, Stivala ve Penning, 2004; Martinez ve Moreno, 2000):

Taze üzüm kabuğu (1 gr): 50-100 µg

Siyah üzümünden elde edilen kırmızı şarap: 160 µg

Yer fıstığı (1 adet): 73 µg

Yapılan araştırmalara göre (üzümünden yapılmış olan) kırmızı şarabın RSV oranı beyaz şaraba nazaran daha fazladır. Bunun sebebi, şarap yapılırken üzüm kabuklarının da dahil edilmesi ve yumuşama süresinin fazla olmasıdır. Kırmızı üzüm fermantasyona uğrarken kabukları da kullanıldığı için kırmızı şarapta RSV 5 g/l bulunurken beyaz şarapta bu oran daha azdır (Takaoka, 1940). RSV'nin fiziksel ve kimyasal özellikleri Çizelge 2.3.'te belirtilmektedir (Fremont, 2000).

Çizelge 2.3. RSV'nin fiziksel ve kimyasal özellikleri

OZELLİK	BILGI
Fiziksel durumu	Kati, toz
Renk	Hafif grimsi beyaz
Kaynama noktası (°C)	253-255
pKa (Çoğu asidik H-donor)	9.14 ± 0.20
Etanolde çözünürlük (mg/mL)	50
DMSO'da çözünürlük (mg/mL)	16
Suda çözünürlük (mg/mL)	0.03
Kimyasal formülü	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>
Açık formülü	Trans-3,4',5-trihidroksi-stilben
Moleküler ağırlığı	228.25
Toksosite	Yok

### 2.4.2. Resveratrol'ün biyolojik etkileri

Güney Fransa'da yapılan epidemiyolojik araştırmalara göre yağlı beslenme ve sigara tüketiminin yüksek olmasına karşın koroner kalp hastalığı insidansının diğerk bölgelere göre daha düşük seviyede olmasına bol miktarda tüketilen kırmızı şarabın neden olduğu saptanmış ve bu duruma "Fransız Paradoksu" denmiştir. Yapılan yayınlarda bu çelişkiye sebep olanın kırmızı şarapta yüksek miktarda bulunan RSV olduğu söylenmektedir. Maserasyon işlemi sırasında şaraba kırmızı üzümün kabuğundan geçen RSV'nin, son yıllarda yapılan çalışmalarda biyolojik tepkileri şöyle yer almıştır (Creasy ve Coffee, 1988; Kanner, Frankel, Granit, German ve Kinsella, 1994; Cui, Juhasz, Tosaki, Maulik ve Das, 2002):

- Antibakteriyel ve antifungal etkinliğı vardır.
- Antioksidan özelliğine sahiptir.
- Serbest radikallerin sitotoksik özelliğini azalma etkisine sahiptir. Serbest radikal çöpçüsü denmektedir.
- Lipid peroksidasyonu inhibisyonuna neden olmaktadır (LDL, membranlar).
- Eikosanoid (PG, tromboksan, prostasiklin) sentezi inhibisyonuna neden olmaktadır.
- Metal tutucusu/şelatörü (bakır) antiinflamatuvar özelliğindedir.
- Damar açıcı olma özelliğinden dolayı kalp hastalığı riskini düşürmektedir.
- Lipid ve lipoprotein metabolizmasını düzene sokmaktadır.
- Östrojenik / anti-östrojenik etkinliğı vardır.
- Antitumoral özellik (İnsanlarda görülen ağız, deri, böbrek, karaciğer, meme, böbrek, kolon gibi tüm kanser çeşitlerinde azalma göstererek; kanserin başlangıç, gelişme ve ilerleme aşamalarında etkisini ortaya koymaktadır).
- LDL (düşük yoğunluklu lipoprotein-kötü kolesterol) artışını engellemekte ve kolesterol düzeyini düşürmektedir.
- Triaçilgliserol seviyesini düşürmekte ve karaciğerin lipit peroksidasyonundan zarar görmesini engellemektedir.
- Hücre membranını korumaktadır.
- NO sentezini arttırarak damarların büyümesini destekleyip kan akımının rahat olmasına yol açmaktadır.

- C vitamininden 30 kat, E vitamininden 50 kat daha etkili bir antioksidandır. PG sentezinin inhibisyonu ile eikosanoid sentezini engellemekte ve platelet agregasyonunun (trombosit birikiminin) önüne geçmektedir.
- COX1 ve COX2, lipoksijenaz, ribonükleotid redüktaz, P450, protein kinaz C (PKC), protein tirozin kinaz (PTK) ve iNOS gibi hücredeki birçok anahtar enzimi düzenleyici etkiye sahiptir.
- iNOS'u inhibe edip, NO'in sitotoksik etkisinin önüne geçmektedir.

Bazı uluslararası organizasyonlar RSV'yi ticari olarak çoğaltmaktadır. Japonya ve Çin'de Polygonum cuspidatum isimli bitkinin kökünü toz şeklinde kurutup çoğaltılarak ve "Ko-jo-kon" ismiyle piyasaya sürülen ilaçtan, ateroskleroz, hipertansiyon, hiperlipidemi, ateşli hastalık ve alerji gibi rahatsızlıkların tedavi edilme aşamasında yararlanılmaktadır (Goldberg, 1996). Yine Çin ve Japonya'da üretime sunulan, RSV içeren "Huzang" (Rhizoma polygoni cuspidati) adıyla adlandırılan ilaç; felç, ülser, romatizma, yanık tedavisinde ve adet dönemlerinde kullanmak üzere tavsiye edilmektedir. HIV-1 (human immunodeficiency virus-1) enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmak üzere, nükleozid analogları ile beraber RSV bileşiklerinin kullanımı için bir patent başvurusu vardır (Calabrese, 1999).

Kanada'nın Montreal şehrinde bulunan Pharmascience şirketi saf halde bulunan trans-RSV üretmektedir. "Resverin" adı verilen ürünün patenti alınmış durumdadır. Concor'ta bulunan InterHealt isimli organizasyon ise trans-RSV'ün standardize edilmiş ekstraktını üretime sunmaktadır. İçeriğinde trans-RSV, emodin ve polifenol bulunan ürün "Protykin" olarak adlandırılmıştır. Laboratori Italiano Biochimico Farmaceutical Lisapharma'da, özellikle RSV ile maya ve şarap polifenolleri içeren yeni bir ürünün patenti alınmış durumdadır (Okuda ve Yokotsuka, 1996). Cilt iltihabı, damar tıkanıklığı, bel soğukluğu ve iltihaplı birçok hastalığın tedavisi için etken maddesi RSV olan bu ürünler kullanılmaktadır (Goldberg, 1996).

### 2.4.3. Resveratrol'ün enflamatuar karşıtı etkileri

Resveratrol, tek başına uyarılabilir gen transkripsiyonunun bir inhibitörü olmamasına rağmen; gen transkripsiyonuna çoklu etkileri olan bir moleküldür. İnsan göbük damarı endotel hücrelerinin RSV'ye ilgili kuersetin molekülü, fibrinolitik protein ifadesindeki yani



doku plazminojen aktivatörü (TPA) ve ürokinaz tipi plazminojen aktivatöründe artışa neden olur. RSV'nin estradiol ile bazı yapısal benzerlikleri vardır ve östrojen reseptörü ile zayıf bir bağılılığı bulunmaktadır (Gehm, McAndrews, Chien ve Jameson, 1997). Ayrıca RSV'nin aril hidrokarbon nükleer reseptör için antagonizma gösterdiği görülmüştür (Casper ve diğerleri, 1999). Ancak bu tür agonist-antagonist etkileşimler; bu molekülün terapötik etkilerini açıklamada yeterli değildir. Daha yakın zamanlarda, RSV'nin mürin beyinde (Inoue, Jiang, Katayama, Osada, Umesono ve Namura, 2003) bulunan peroksizom proliferatör reseptöre (PPAR)-A bağlandığı ve bu reseptör aracılığıyla antiinflamatuvar kapasitesinin bir kısmını kullanabildiği görülmüştür. Yapısal olarak benzer diğer; kuersetin ve deoksihapontin gibi fenolik bileşenler, RSV'nin bazı özelliklerini gösterebilirler.

Aynı zamanda, stilben kuersetin, RSV'ninkilere benzer antioksidan ve antiproliferatif kapasite gösterir (Wadsworth ve Koop, 1999). Daha yakın zamanlarda, RSV'nin antiinflamatuvar etkileri; NF- $\kappa$ B transkripsiyon faktörünün inhibasyonu ve IKB kinazının muhtemel kolaylaştırılmış taşınımı ile ilişkilendirilmiştir (Manna, Mukhopadhyay ve Aggarwal, 2000). NF- $\kappa$ B aktivasyonuna; granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), IL-8, COX2 ve oluşturulabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) (Newton, Kuitert, Bergmann, Adcock ve Barnes, 1997) gibi birçok enflamatuvar proteinlerin ifadesi için ihtiyaç duyulur. Böylece, NF- $\kappa$ B inhibasyonu; inflamatuvar genlerin sentezlenmesini azaltabilir. Antiinflamatuvar madde glukokortikosteroidler tarafından onların antiinflamatuvar etkilerini ortaya çıkarabilen bir mekanizmadır (Newton, 2000). İkinci transkripsiyon faktörü, aktive edici protein-1 (AP-1), RSV tarafından inhibe edilebilir (Manna, Mukhopadhyay ve Bharat, 2000). NF- $\kappa$ B ve AP-1, oksidatif stres ile bağlantılı olan birçok genin düzenlenmesinde önemli olabilir (Karin, 1995) ve RSV'nin bazı antioksidatif özelliklerini açıklayabilir. Bu durum, bu bileşenlerin eylem mekanizmalarının anlaşılmasının, özgün antiinflamatuvar terapilerin keşfine yol açabileceğini gösterir.

#### **2.4.4. Resveratrol'ün diabetes mellitus üzerindeki etkisi**

Diyetle indüklenerek obezite geliştirilmiş ve genetik olarak obez olan sıçanlarda RSV'nin insülin hassasiyetinde artış meydana getirdiği, plazma glukoz seviyesini azalttığı ve mitokondriyal kapasiteyi yükselttiği ortaya çıkarılmıştır. Zucker sıçanlar kullanılarak yapılan hiperinsülinemik öglisemik araştırmalarda tüm vücudun glikoz dengesini koruduğu ve bununla beraber yağ dokusu, kas dokusu ve karaciğerde insülin duyarlılığı açısından

iyileştirme sağladığı ortaya konmuştur. SIRT 1 aktivasyonu bu sebeple yaşlılığın getirdiği hastalıkların tedavi edilmesi ve T2DM'de terapötik yaklaşımlar için umut vermektedir (Donnelly ve Barnes, 2002). İnsülinin yetersiz salgılanması ya da insülinin hedef organda etkisini ortaya çıkaramaması sebebiyle hiperglisemi ile meydana gelen DM, dünyada prevalansı % 1-5 arasında değişen metabolik bir hastalıktır (Fremont, 2000).

Elde edilen son deneysel bulgulara göre RSV'nin diyabetten korunmada ve diyabetin getirdiği bazı komplikasyonların hafifletilmesinde yararlı olduğu söylenmiştir. RSV diyabetik sıçanlarda metabolizmaya ait değerleri iyileştirmiş, plazma glukoz ve trigliserit derişimini ve bunlarla beraber insülineminin etkisini azalmıştır (Gehm, McAndrews, Chien ve Jameson, 1997). Ayrıca diyabette hipergliseminin ortaya çıkarmış olduğu oksidatif stres ile böbrekte gelişmiş olan nefropatiyi engelleyebileceği söylenmiştir. İzole edilmiş hücrelerde de RSV'nin sahip olduğu antioksidan özelliği sayesinde yüksek glukoz seviyesinin neden olduğu oksidatif stresi kısıtladığı ortaya çıkarılmıştır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

##### Kullanılan laboratuvar gereçleri

- Hassas terazi (And-Er-182A, Japonya)
- Spin vorteks ( Biosan, Rusya )
- Kuru ısıtıcı blok (Biosan, Rusya)
- Manyetik karıştırıcı (Tma 2071, Almanya)
- Soğutmalı santrifüj (Hettich Mikro 22 R, Almanya)
- Spektrofotometre (NanoDrop ND-1000, ABD )
- Mikropipetler (10 µL, 100 µL, 1000 µL) (Bt10, Bt100, Bt1000 Biohit, CLP, ABD)
- Derin dondurucu (-86<sup>0</sup>C) (Sanyo, Japonya)
- Derin dondurucu (-30<sup>0</sup>C) (Sanyo, Japonya)
- Güvenlik kabini (Vfrs 1206 E, Danimarka)
- Filtreli mikropipet uçları (Axygen, ABD)
- 0.2-0.5-1.5 µl'likependorf tüpler (Axygen, ABD)
- Filtre kağıdı (Whatman, İngiltere)
- ThermalCycler (Hybaid PCR-sprint, Thermoelectroncorp., ABD)
- LightCycler real-time PCR cihazı (Roche, Almanya)
- Homojenizatör (TissueRuptor, Qiagen, Almanya)

##### Kullanılan kimyasal maddeler

- Dimetilsülfoksit (DMSO) (Amresco, ABD)
- MgCl<sub>2</sub> (Sigma, ABD)
- Tris-HCl (Sigma, ABD)
- KCl (Sigma, ABD)
- CaCl<sub>2</sub> (Merck, Amanya)
- EDTA (Etilendiamintetraasetikasitdisodyumdihidrat) (Sigma, ABD)
- Sodyum hidroksit peleti (Merck, Amanya)
- Serum fizyolojik (Eczacıbaşı, Türkiye)

- Steril dH<sub>2</sub>O (Eczacıbaşı, Türkiye)
- DEPC'li (Dietilpirokarbonat) su (BiologicalIndustries, İsrail)
- Absolüt etanol (Carlo Erba, İtalya)
- DNaz I recombinant (Roche, Almanya)
- TaqMan master miks (Roche, Almanya)
- Bölgeye özgü primerler (NF-KB1, COX2, INOS, TNF $\alpha$  ve IL-6,) (Roche, Almanya)
- Bölgeye özgü UPL problemler (UPL prob NF-KB1, COX2, INOS, TNF $\alpha$  ve IL-6, UPL prob 17, Beta aktin için) (Roche, Almanya)
- Kloroform (Amresco, ABD)
- İzopropanol (Amresco, ABD)

#### Kullanılan kitleler

- peqGOLD TriFast™ Dokudan RNA İzolasyon kiti (Peqlab, Erlangen, Almanya)
- Transcriptor first strand cDNA sentez kiti (Roche, Almanya)

#### Etik Kurul

Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından desteklenen 01/2007-34 no'lu çalışma için 117-17826 no'lu Gazi Üniversitesi hayvan yerel etik kurul izni 12.12.2007 tarihinde alınmış olup, çalışma sırasında Gazi Üniversitesi Etik Kurulu yönergelerinin 13. maddesinde belirtilen "Etik kurallara uygunluk esası" kararına uyulmuştur.

### **3.2. Yöntemler**

#### Çalışmada kullanılan doku grupları

Deneyde kullanılan 6 gruba ilişkin hazır doku gruplarının dağılımı aşağıda gösterilmiştir (Yar, 2008).

I. Grup: Kontrol Grubu (n=6)

II. Grup: Sodyum sitrat Grubu (n=6)

III. Grup: Diyabet Grubu (n=6)

IV. Grup: Kontrol + DMSO Grubu (n=6)

V. Grup: Sodyum sitrat + RSV Grubu (n=6)

VI. Grup: Diyabet + RSV Grubu (n=6)

1. Grup; Kontrol grubu\*: Deney boyunca hiçbir madde uygulanmayan ve deney süresince serbest ve içme suyu ile beslenen grup (n=6).
2. Grup; Sodyum sitrat grubu (Sham\*\*): pH'sı 4.5 olan sodyum sitrat tamponu tek doz olacak şekilde i.p olarak verilen, deney sonuna kadar başka hiçbir madde verilmeyen ve deney süresince serbest ve içme suyu ile beslenen grup (n=6).
3. Grup; Diyabet (STZ) grubu: Sodyum sitrat tamponu 55 mg/kg olacak şekilde STZ hazırlanıp tek doz olacak şekilde i.p olarak verilen, deney sonuna kadar başka hiçbir madde verilmeyen ve deney süresince serbest diyet ve içme suyu ile beslenen grup (n=6).
4. Grup; Kontrol + DMSO grubu: Deneyin başlangıcından itibaren 1 ay süre ile hiçbir madde verilmeyerek, 1 ay sonunda, her gün aynı saatte Dimetilsülfoksit (DMSO) i.p olarak 1 ay süre ile verilen deney süresince serbest diyet ve içme suyu ile beslenen grup (n=6).
5. Grup; Sodyum sitrat grubu (Sham\*\*) + RSV grubu: Deney başlangıcında tek doz i.p olarak sodyum sitrat tamponu enjeksiyonu verilen ve 1 ay boyunca başka hiçbir madde verilmeyerek, 1 ay sonunda hergün aynı saatte RSV i.p olarak 1 ay süre ile verilen ve deney süresince serbest diyet ve içme suyu ile beslenen grup (n=6).
6. Grup; Diyabet (STZ) + RSV grubu: Deney başlangıcında tek doz i.p olarak STZ enjeksiyonu verilen ve 1 ay boyunca başka hiçbir madde verilmeyerek, 1 ay sonunda hergün aynı saatte RSV i.p olarak 1 ay süre ile verilen ve deney süresince serbest diyet ve içme suyu ile beslenen grup (n=6).

\* = Hiçbir madde verilmeyen grup

\*\* = Bir maddenin çözülmesi için gerekli olan tamponun, yalnız verildiği grup

### Sıçan pankreaslarından Toplam RNA saflaştırılması

Sterilpetri kabında steril serum fizyolojik ile yıkanan pankreas dokuları steril bistüri kullanılarak RNA izolasyonuna uygun (50mg-100mg) büyüklüklerde küçük parçalara ayrılmıştır. DNaz ve RNAz free 1.5 ml'lik ependorf tüplerine alınan doku örnekleri hızlı bir şekilde sıvı azot içinde dondurularak çalışma anına kadar - 80°C' de saklanmıştır (Yar, 2008).

Doku örneklerinden RNA izolasyon kiti kullanılarak aşağıdaki kit protokolüne uygun olarak toplam RNA saflaştırıldı. Kontaminasyonu önlemek amacıyla saflaştırma işlemi güvenlik kabininin içinde gerçekleştirildi.

### Dokudan RNA izolasyon protokolü

1. 1.5 ml' lik ependorf tüp içinde bulunan 50-100 mg arasındaki dokular çözünmeden pastle veya mortar ile homojenize edildi. Örnekler çözünmeye başladığı anda tekrar sıvı azotta donduruldu ve homojenizasyon işlemine devam edildi.
2. Homojenizasyon işlemine 1000 µl TriFast ile devam edildi. (Doku büyüklüğü arttığı oranda kullanılan Trifast miktarında arttırıldı). Örnek hacminin, homojenizasyon sırasında kullanılan TriFast hacminin %10'nu geçmemesine dikkat edildi.
3. Örnekler oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi.
4. 200 µl kloroform eklendikten sonra 15 saniye boyunca (tamamen karışincaya kadar) vortekslendi ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
5. Örnekler 11.000 rpm'de 5 dakika 4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda karışım, altta kırmızı faz (fenol kloroform fazı), arafaz ve üstte renksiz sıvı faz olmak üzere üç faza ayrıldı.
6. Üst faz yeni bir steril 1.5 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı.
7. Başlangıçta kullanılan TriFast miktarının yarısı kadar izopropanol eklenip vortekslendi.
8. Örnekler 1 ya da 1.5 saat -20°C' de bekletildi. 11.500 rpm'de 10 dakika 4°C'de santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant atıldı.

9. DNA kontaminasyonunu engellemek için 60 µl DNAz (ug başına 5U DNAz), 300 µl DNAz Buffer I (200mM Tris-HCL (pH:8.4), 20mM MgCl<sub>2</sub>, 500mM KCl) ve 400 µl DEPC'li su eklenerek 30 dakika 37°C sıcaklığında bekletildi.
10. Örneklerin üzerine 300 µl 25mM EDTA eklendi ve 65°C'de 10 dak bekletildi.
11. 12.000 rpm'de 10 dakika 4°C'de santrifüj edildi. Pelete dokunmadan üstte kalan süpernatant atıldı.
12. 1000 µl %75'lik alkol ( taze hazırlanır) eklenerek, 12.000 rpm'de 10 dakika 4°C'de santrifüj edildi. Pelete dokunmadan üstte kalan süpernatant atıldı.
13. Peletin üzerine tekrar 1000 µl %75'lik alkol eklenerek, 12.000 rpm'de 10 dakika 4°C'de santrifüj edildi. Pelete dokunmadan üstte kalan süpernatant atıldı.
14. Pelet kurumaya bırakıldı. 30-50 µl DEPC'li su ile sulandırıldı.

#### cDNA sentezi

Elde edilen RNA'lar nanodrop cihazı ile spektrofotometrik olarak ölçüldü. RNA miktarları 260 nanometre (nm)'de ölçüldü ve mikrolitredeki (µl) mikrogram değerleri saptandı. Toplam RNA'dan cDNA sentezi, primer olarak random heksamerler kullanılarak gerçekleştirildi. cDNA sentezi sırasında kullanılan maddeler ve miktarları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. cDNA RT-PCR tepkime karışımı

	Son konsantrasyon	Hacim
Steril H <sub>2</sub> O-PCR Grade	-	RNA miktarına göre değişken
Reaksiyon Tamponu	1x (8mM MgCl <sub>2</sub> )	4 µl
Dntp	1mM	2 µl
Random Heksamer Primeri	60 µM	2 µl
RNaz İnhibitörü	20 ünite	0.5 µl
Transcriptor Ters Transkriptaz	10 ünite	0,5 µl
Total RNA	1 µg	1 µg olacak şekilde

cDNA için PCR karışımı ince çeperli 0.2'lik tüplere dağıtıldıktan sonra saflaştırılan toplam RNA eklendi.

### cDNA RT-PCR programı

cDNA ters transkripsiyon polimeraz zincir tepkimesi, otomatik ısı döngüsü cihazı ile aşağıdaki programa ayarlanarak gerçekleştirildi.

Çizelge 3.2. cDNA ters transkripsiyon polimeraz zincir tepkimesi programı

	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
Primer Bağlanması	25°C	10 dk	1 döngü
Ters transkripsiyon	50°C	60 dk	1 döngü
İnaktivasyon	85°C	5 dk	1 döngü
Soğutma	4°C	-	1 döngü

Reaksiyon sonucu elde edilen cDNA örnekleri real-time PCR’da çalışılmaya kadar 20°C’de saklandı.

### $\beta$ -aktin, NF- $\kappa$ B1, COX2, iNOS, TNF $\alpha$ ve IL-6 genlerinin ifadenemesinin real-time PCR ile ölçümü

NF- $\kappa$ B1, COX2, iNOS, TNF $\alpha$  ve IL-6 genlerinin ifadenemesinin (NF- $\kappa$ B1, COX2, iNOS, TNF $\alpha$  ve IL-6 mRNA miktarlarının) real-time PCR ile ölçümü için LightCycler™ cihazı kullanıldı. Amplifikasyonlar 10  $\mu$ l toplam tepkime hacmi içerisinde, cDNA, bölgeye özgü primerler, UPL TaqMan probu ve LightCycler TaqMan Master miks kullanılarak gerçekleştirildi. TaqMan Master’ın içinde bulunan beyaz kapaklı 1A (enzim) ependorfundan 10  $\mu$ l alındı ve kırmızı kapaklı 1B (reaksiyon buffer’ ı, MgCl<sub>2</sub> ve dNTP miks) ependorfunun içine eklendi. Böylece kullanıma TaqMan master miks elde edildi. COX2 gen ifadenemesini normalize etmek için elde edilen cDNA örnekleri,  $\beta$ -aktin genine özgü primer ve UPL TaqMan probu kullanılarak çalışıldı. Relatif gen ifadenemesi sonuçları “Pfaffl” matematiksel yöntemi ile hesaplandı.

### Beta aktin geninin mRNA analizi

Beta aktin genine ait UPL prob ve primerlerin özellikleri ve gen bölgesindeki yerleşimleri Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



#### 4. NM\_031144.2

ProbeFinder has designed an optimal real-time PCR assay for:  
NM\_031144.2 *Rattus norvegicus actin, beta (Actb)*, mRNA.

Use probe #17 (cat. no. 04686900001)

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	19	20 - 38	60	58	cccgcgagtacaaccttct
Right	18	74 - 91	60	56	cgatcatccatggcgaact
Amplicon (72 nt)					
cccgcgagtacaaccttcttgcagctcctccgtcgcgggtccacacccgccaccagtctgccatggatgaag					

The search was for intron spanning assays.  
This assay has: **All criteria met.**

Length of intron(s) spanned by this assay: 938 nt



Şekil 3.1.  $\beta$ -aktin genine ait UPL Prob ve primerlerin özellikleri ve gen bölgesindeki yerleşimleri

Roche firmasından temin edilen prob ve primerlerin özelliklerini gösteren şekil UPL assaydesign sayfasından alınmıştır.

#### $\beta$ -aktin, NF- $\kappa$ B1, COX2, iNOS, TNF $\alpha$ ve IL-6 genlerinin real-time PCR tepkime karışımı

Real-time PCR tepkime karışımını hazırlamak için kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3.  $\beta$ -aktin real-time PCR tepkime karışımı

Kimyasallar	Hacim	Son Konsantrasyon
dH <sub>2</sub> O	6.7 $\mu$ l	-
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	0.8 $\mu$ l	4 mM
Aktin Primer F (10 pmol/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l	10 pmol
Aktin Primer R (10 pmol/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l	10 pmol
Beta aktin TaqMan Prob 17 (100 pmol/ $\mu$ l)	0.1 $\mu$ l	10 pmol
LC TaqMan Karışımı (10x)	1.4 $\mu$ l	1x
cDNA	2 $\mu$ l	-

#### NF- $\kappa$ B1 geninin mRNA analizi

NF- $\kappa$ B1 genine ait UPL prob ve primerlerin özellikleri ve gen bölgesindeki yerleşimleri Şekil 3.2'de gösterilmiştir.

[XM\\_001075876.2](#) PREDICTED: *Rattus norvegicus* nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (Nfkb1), mRNA

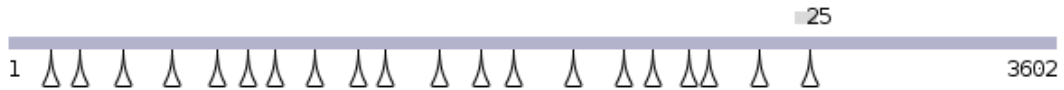
#### Assay details:

#### Use Universal ProbeLibrary probe: #25, cat.no. 04686993001

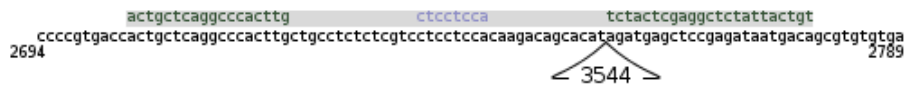
Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left Primer	18	2704 - 2721	59	61	actgctcaggcccacttg
Right Primer	23	2757 - 2779	60	43	tgtcattatctcggagctcatct
<b>Amplicon (76 nt)</b>					
actgctcaggcccacttgctgcctctctcgtcctcctccacaagacagcacatagatgag ctccgagataatgaca					

[Download pack insert](#)
[PDF report](#)
[Text report](#)
[Order probes or set](#)

#### Transcript overview:



#### Detailed view:



Şekil 3.2. NF- $\kappa$ B1 genine ait UPL prob ve primerlerin özellikleri ve gen bölgesindeki yerleşimleri

Roche firmasından temin edilen prob ve primerlerin özelliklerini gösteren şekil UPL assaydesign sayfasından alınmıştır.

#### COX2 geninin mRNA analizi

COX2 genine ait UPL prob ve primerlerin özellikleri ve gen bölgesindeki yerleşimleri Şekil 3.3'te gösterilmiştir.

[S67722.1|S67722:EMBL|ENSRNOESTG00000827193:Ensembl-GO|ENSRNOG00000002525:Ensembl-Gn|ENSRNOESTT00000827198:Ensembl-TO|ENSRNOT00000003567:Ensembl-Tr](#) *Rattus norvegicus* cyclooxygenase isoform COX-2 (Cox2) mRNA, complete cds.

#### Assay details:

### Use Universal ProbeLibrary probe: #77, cat.no. 04689003001

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left Primer	18	80 - 97	60	56	accaacgctgccacaact
Right Primer	20	178 - 197	59	45	ggttggaacagcaaggattt
<b>Amplicon (118 nt)</b>					
accaacgctgccacaactgctgccaccaccgctgccacctctgcgatgctcttccgagct gtgctgctctgcgcttgcctggcctcagccatgcagcaaatccttgctgttccaacc					

Download pack insert

PDF report

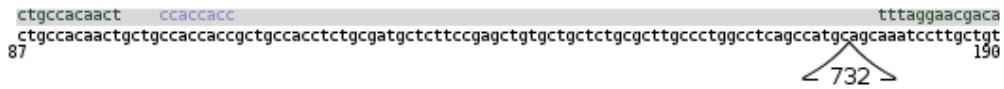
Text report

Order probes or set

#### Transcript overview:



#### Detailed view:



Şekil 3.3. COX2 genine ait UPL prob ve primerlerin özellikleri ve gen bölgesindeki yerleşimleri

Roche firmasından temin edilen prob ve primerlerin özelliklerini gösteren şekil UPL assaydesign sayfasından alınmıştır.

#### iNOS geninin mRNA analizi

iNOS genine ait UPL prob ve primerlerin özellikleri ve gen bölgesindeki yerleşimleri Şekil 3.4'te gösterilmiştir.

[NM\\_012611.3](#) *Rattus norvegicus nitric oxide synthase 2, inducible (Nos2), mRNA*

**Assay details:**

**Use Universal ProbeLibrary probe: #128, cat.no. 04693647001**

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left Primer	19	1169 - 1187	60	53	accatggagcatccaagt
Right Primer	19	1210 - 1228	60	58	cagcgcataccacttcagc
<b>Amplicon (60 nt)</b>					
accatggagcatccaagtagcagtggttccaggagctcgggctgaagtggatgctg					

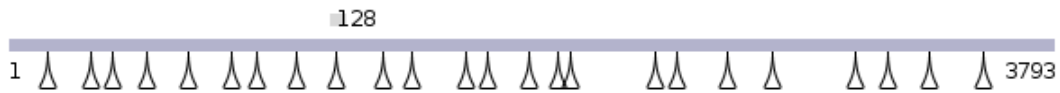
[Download pack insert](#)

[PDF report](#)

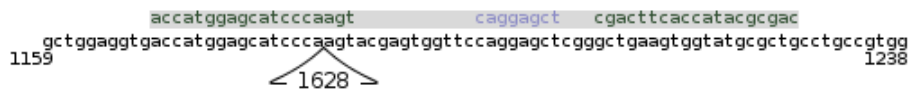
[Text report](#)

[Order probes or set](#)

**Transcript overview:**



**Detailed view:**



Şekil 3.4. iNOS genine ait UPL prob ve primerlerin özellikleri ve gen bölgesindeki yerleşimleri

Roche firmasından temin edilen prob ve primerlerin özelliklerini gösteren şekil UPL assaydesign sayfasından alınmıştır.

TNF $\alpha$  geninin mRNA analizi

TNF $\alpha$  genine ait UPL prob ve primerlerin özellikleri ve gen bölgesindeki yerleşimleri Şekil 3.5'te gösterilmiştir.

[NM\\_012675.3](#) *Rattus norvegicus* tumor necrosis factor (Tnf), mRNA

**Assay details:**

**Use Universal ProbeLibrary probe: #63, cat.no. 04688627001**

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left Primer	18	296 - 313	60	56	tgaacttcggggtgatcg
Right Primer	20	398 - 417	59	50	gggcttgctcactcgagttt
<b>Amplicon (122 nt)</b>					
tgaacttcggggtgatcggtcccaacaaggaggagaagtcccaaatgggctccctctca tcagttccatggcccagaccctcacactcagatcatcttctcaaaactcgagtgacaagc cc					

**Transcript overview:**



**Detailed view:**



Şekil 3.5. TNF $\alpha$  genine ait UPL prob ve primerlerin özellikleri ve gen bölgesindeki yerleşimleri

Roche firmasından temin edilen prob ve primerlerin özelliklerini gösteren şekil UPL assaydesign sayfasından alınmıştır.

IL-6 geninin mRNA analizi

IL-6 genine ait UPL prob ve primerlerin özellikleri ve gen bölgesindeki yerleşimleri Şekil 3.6'da gösterilmiştir.

[NM\\_012589.1](#) *Rattus norvegicus* interleukin 6 (IL6), mRNA

**Assay details:**

**Use Universal ProbeLibrary probe: #20, cat.no. 04686934001**

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left Primer	21	49 - 69	59	48	cccttcaggaacagctatgaa
Right Primer	21	102 - 122	59	48	acaacatcagtccaagaagg
<b>Amplicon (74 nt)</b>					
cccttcaggaacagctatgaaagtttctctccgcaagagacttccagccagttgccttctt gggactgatgtt					

[Download pack insert](#)
[PDF report](#)
[Text report](#)
[Order probes or set](#)

**Transcript overview:**



**Detailed view:**



Şekil 3.6. IL-6 genine ait UPL prob ve primerlerin özellikleri ve gen bölgesindeki yerleşimleri

Roche firmasından temin edilen prob ve primerlerin özelliklerini gösteren şekil UPL assaydesign sayfasından alınmıştır.

Real-time PCR karışımları hazırlandıktan sonra kapiller tüplere dağıtıldı ve üzerlerine cDNA eklendi. Kapiller tüpler 3000-5000 rpm'de 10 sn santrifüj edildi. Tüpler yerleştirildikten sonra LightCycler cihazında aşağıda belirtilen amplifikasyon programı kullanılarak PCR tepkimesi gerçekleştirildi. NF- $\kappa$ B1, COX2, iNOS, TNF $\alpha$  ve IL-6 için aynı PCR programı kullanıldı.

Çizelge 3.4. NF- $\kappa$ B1, COX2, iNOS, TNF $\alpha$  ve IL-6 light-cycler deney programı

Program Verisi	Değer
Döngü Sayısı	1
Analiz Modu	-
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1
Hedef Sıcaklık (°C)	95
İnkübasyon Zamanı (s:dk:sn)	10:00
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0

Çizelge 3.5. Program 2 hibridizasyon ve polimerizasyon (primer bağlanması ve uzama)

Program Verisi	Değer	
Döngüler	50	
Analiz Modu	Çoğalma	
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1	Kısım 2
Hedef Sıcaklık (°C)	95	60
İnkübasyon Zamanı (s:dk:sn)	10	20
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0	10.0

Deney grupları arasındaki NF- $\kappa$ B1, COX2, iNOS, TNF $\alpha$  ve IL-6 mRNA düzeylerindeki artış ya da azalış deney sonucunda elde edilen Cp (Crossingpoint) değerleri kullanılarak, Pfaffl matematiksel metodu ile belirlendi. NF- $\kappa$ B1, COX2, iNOS, TNF $\alpha$  ve IL-6 düzeylerini normalize etmek amacı ile beta aktin mRNA seviyeleri kullanıldı.

#### İstatistiksel analiz yöntemleri

Diyabetli ve kontrol grubu sıçanların pankreas dokularında izlenen NF- $\kappa$ B1, COX2, iNOS, TNF $\alpha$  ve IL-6 mRNA ifadenmesine ait veriler REST (2005 Beta V1.9.9) programı kullanılarak karşılaştırıldı. Anlamlılık değeri  $p < 0.05$  olarak kabul edildi. Sıçanların diyabete bağlı kilo ve şeker değişimleri Kruskal-Wallis veya Mann-Whitney U nonparametrik testleriyle karşılaştırıldı. Veriler SPSS 15.0 istatistik programı kullanılarak değerlendirildi. Anlamlılık değeri  $p < 0.05$  olarak kabul edildi.





## 4. BULGULAR

### 4.1. Diyabetik Bulgular

Çalışma kapsamında ağırlıkları yaklaşık 250-300 g olan 36 adet Wistar albino erkek sıçanların pankreas dokuları kullanıldı. STZ ile diyabet oluşturulduktan 3 gün sonra, tüm gruplardaki sıçanların ağırlıkları ve açlık kan şekeri ölçülmüştür. Normal kan şekeri değeri 90-110 mg/dl olarak alınarak açlık kan şekeri değerleri 250 mg/dl'nin üzerinde olan sıçanlar diyabetik kabul edilmiştir (Yar, 2008).

### 4.2. Genetik Bulgular

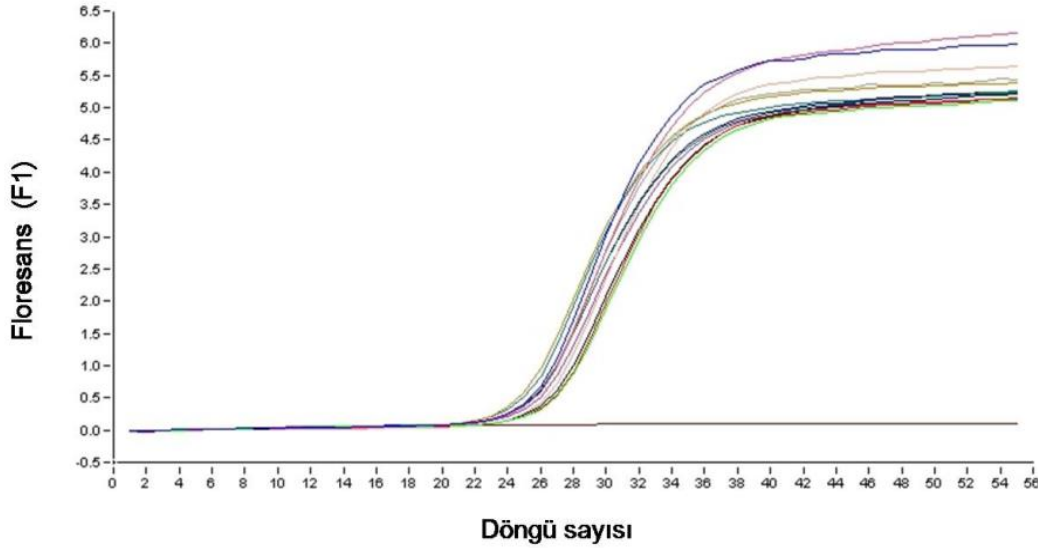
Bu çalışmada STZ ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda RSV'nin pankreastaki COX2, iNOS, NF-κB1, TNFα ve IL-6 genlerinin mRNA ifadelenmeleri üzerine etkisi araştırılmış ve elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

COX2, iNOS, NF-κB1, TNFα ve IL-6 gen ifadelenmesini normalize etmek için diyabet ve kontrol gruplarına ait her bir cDNA örneği, β-aktin genine özgü primer ve UPL probu kullanılarak çalışıldı. Relatif gen ifadelenmesi sonuçları REST programı kullanılarak "Pfaffl" matematiksel yöntemi ile hesaplandı. Pfaffl eşitliği aşağıda belirtilmiştir (Pfaffl, 2001).

$$R = \frac{E(\text{hedef})^{\Delta C_t(\text{kontrol-hasta})}}{E(\text{referans})^{\Delta C_t(\text{kontrol-hasta})}}$$

Eşitlikte belirtilen E, PCR etkinliğini ifade etmektedir. Ct değeri ise kontrol ile hasta örneklerinin Ct değerleri arasındaki farkı göstermektedir. Eşitlikte elde edilen R ise ekspresyon oranını göstermektedir. Ct, tepkime sırasında oluşan floresan sinyalin eşikdeğeri geçtiği andaki döngü sayısını ifade eder. Ct değeri tepkimenin başında mevcut olan mRNA (cDNA) miktarı ile ters orantılıdır (Walker, 2002; Kuramochi ve diğerleri, 2004).

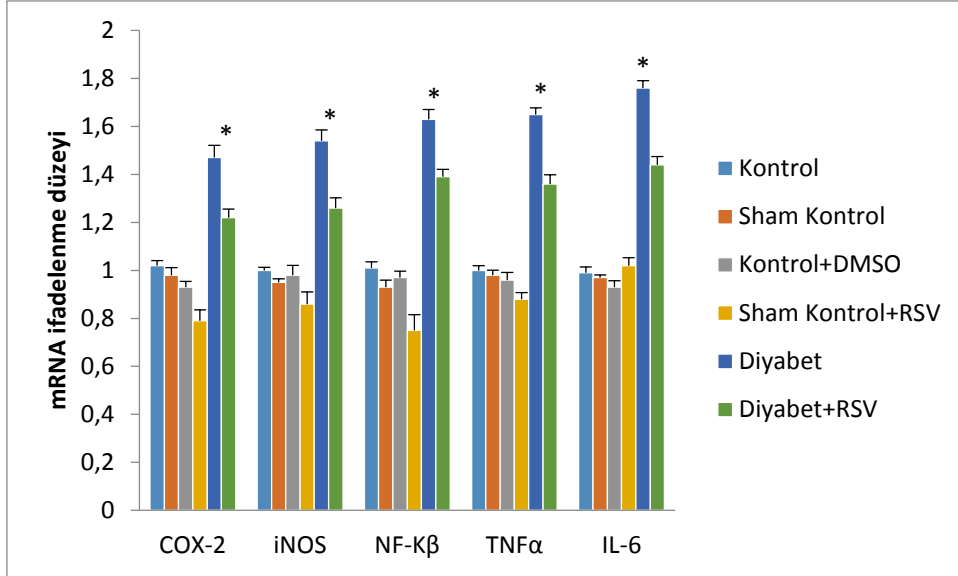
Gen ifadenmesinin Pfaffl matematiksel yöntemi ile hesaplanabilmesi için gerekli olan  $\beta$ -aktin geninin mRNA düzeyinde ifadenmesini gösteren real-time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.



Gen ifadenmesinin Pfaffl matematiksel yöntemi ile hesaplanabilmesi için gerekli olan  $\beta$ -aktin tepkimesine ait  $C_T$  (threshold cycle) değerleri yatay eksende yer almaktadır. Dikey eksende floresan sinyali izlenmektedir.

Şekil 4.1.  $\beta$ -aktin gen ifadenmesinin real-time PCR ile analizi

Kontrol ile sham kontrol ve kontrol+DMSO grupları karşılaştırıldığında COX2, iNOS, NF- $\kappa$ B1, TNF $\alpha$  ve IL-6 genlerinin mRNA ifadenme değerlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ( $p > 0.05$ ). Yine benzer şekilde sham kontrol grubu ile sham kontrol+RSV grupları karşılaştırıldığında COX2, iNOS, NF- $\kappa$ B1, TNF $\alpha$  ve IL-6 gen ifadenme düzeylerinde gruplar arasında istatistiksel açıdan herhangi bir anlam bulunmadı ( $p > 0.05$ ). Bunun yanı sıra kontrol ile diyabet grubu karşılaştırıldığında, diyabet grubunda COX2, iNOS, NF- $\kappa$ B1, TNF $\alpha$  ve IL-6 genlerinin ifadenme düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir artış olduğu belirlendi ( $p < 0.05$ ). Diyabet ile diyabet+RSV grubu karşılaştırıldığında COX2, iNOS, NF- $\kappa$ B1, TNF $\alpha$  ve IL-6 genlerinin mRNA düzeylerinde bir azalma gözlenirken, bu azalışın istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı belirlendi ( $p > 0.05$ ). COX2, iNOS, NF- $\kappa$ B1, TNF $\alpha$  ve IL-6 genlerin gruplar arasındaki mRNA düzeylerindeki değişiklikleri şekil 4.2. ile gösterilmiştir.



Hedef genlerin ifade düzeyleri  $\beta$ -actin mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edilmiştir. \*;  $p < 0.05$ .

Şekil 4.2. Gruplar arasında COX2, iNOS, NF- $\kappa$ B1, TNF $\alpha$  ve IL-6 mRNA düzeylerindeki değişiklik



## 5. TARTIŞMA

STZ ile diyabet modeli oluşturulmuş sıçanlarda RSV kullanımının diyabet ile bağlantılı olduğu bilinen NF- $\kappa$ B1, COX2, iNOS, TNF $\alpha$  ve IL-6 genlerinin mRNA düzeylerinde neden olduğu değişimlerin saptanması ve bu değişimlerin diyabet hastalığı ile olan ilişkisinin belirlenmesi bu tezin ana konusunu oluşturmaktadır.

Hücreler üzerine biyolojik etkileri olduğu bilinen NO serbest radikali, pankreatik fizyoloji için gerekli bir sinyal molekülü olmakla birlikte pankreasın patofizyolojik sürecinde de rol oynayabilmektedir. iNOS, arginin'in sitrulin'e transformasyonunu katalize eden NO üretiminde yer almaktadır. NO üretiminin yüksek düzeyleri özellikle pankreas adacıklarında beta hücre fonksiyonunu olumsuz etkileyebilmektedir (Keklikoğlu ve Akıncı, 2013).

Oksidatif stres, diyabetik komplikasyonların patogenezinde önemli rol oynamaktadır. Ayrıca, proinflamatuvar sitokinlerin aşırı ifadenmesi, diyabetik komplikasyonları ilerleten bir diğer patojenik faktördür. Hiperglisemi ve oksidatif stresin büyüme faktörleri, proinflamatuvar sitokinler ve adezyon molekülleri gibi çeşitli inflamasyon düzenleyici genlerin üretiminden sorumlu olan NF- $\kappa$ B aktivasyonunu tetiklediği bildirilmiştir (Li, Geng, Jiang ve Kong, 2014). DM patogenezinde TNF $\alpha$  ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinler; immunositler (makrofajlar gibi) ve adipositler tarafından üretilebilmektedir. TNF $\alpha$ , IL-6, JNK ya da NF- $\kappa$ B yolağı aktivasyonu, insülin reseptör substratının (IRS) serin fosforilasyonuna neden olarak insülin direncini oluşturmakta ve aynı zamanda aşırı ifadenmeleri adacık fonksiyon bozukluğuna neden olarak diyabetin ilerlemesini hızlandırmaktadır.

COX2 olarak bilinen prostaglandin sentetaz enzimi, inflamatuvar süreçte yer alan ve PG sentezinden sorumlu olan uyarılabilir bir enzimdir (Szyberg, Janiczek, Popiel ve Marszalek, 2016). In vitro çalışmalar, COX2'nin pek çok hücre tipinde IL-1 ve TNF $\alpha$  gibi proinflamatuvar sitokinler ile uyarımı sonrasında ifadenmesinde artış olduğunu ortaya koymuştur. Bazal koşullar altında, COX2 ifadenmesi oldukça sınırlı iken DM gibi inflamatuvar hastalıklarda ifadenme düzeyi önemli ölçüde artmaktadır (Crofford, 1997).

Saha ve diğeri, yapmış oldukları çalışmalarında STZ indüklü diyabetli sıçanların kanlarında TNF $\alpha$  ve IL-6 gibi inflamatuvar sitokinlerin ve hepatik NF- $\kappa$ B'nin ifade düzeylerinde anlamlı bir artış bulmuşlardır (Saha ve Ghosh, 2012). Lekshmi ve diğeri, STZ indüklü diyabetik sıçanlar ile yapmış oldukları çalışmalarında, diyabetik grupların adipoz dokularında TNF $\alpha$ , IL-6 ve NF- $\kappa$ B mRNA ifadenme düzeylerinin anlamlı bir şekilde arttığını tespit etmişlerdir (Lekshmi, Raiesh ve Mini, 2015). Yaptığımız çalışmamızda kontrol grubu ile diyabetik grubu karşılaştırdığımızda, pankreas dokularında TNF $\alpha$ , IL-6 ve NF- $\kappa$ B genlerinin mRNA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğunu gözlemledik. Kataoka ve diğeri, T2DM'li sıçanlar ile yapmış oldukları çalışmalarında iNOS, TNF $\alpha$  ve IL-6 mRNA düzeylerinin artmış olduğunu göstermişlerdir (Kataoka, Hotta, Maeda ve Kimura, 2014). He ve diğeri, STZ indüklü diyabetik sıçanların pankreaslarında iNOS ifadenmesinin arttığını saptamışlardır (He ve diğeri, 2015). Akcılar ve diğeri, STZ indüklü T2DM'li sıçanların pankreas dokularında TNF $\alpha$ , IL-6 ve iNOS mRNA düzeylerini değerlendirmiş ve diyabetli grupta TNF $\alpha$ , IL-6 ve iNOS ifadenme düzeylerini kontrol grubuna göre anlamlı derece yüksek bulmuşlardır (Akcılar ve diğeri, 2016). Bizim çalışmamızda kontrol grubu ile diyabetik grup karşılaştırılmış olup, iNOS mRNA düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır. Çalışmamızda sağlıklı sıçanlarla STZ indüklü sıçanların pankreas dokularında iNOS, NF- $\kappa$ B, COX2, TNF $\alpha$  ve IL-6 mRNA düzeyleri karşılaştırılmıştır. Kontrol grubu ile diyabetik grup karşılaştırıldığında iNOS, NF- $\kappa$ B1, COX2, TNF $\alpha$  ve IL-6 mRNA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlenmiştir. Bulgularımız Saha ve diğeri, Lekshmi ve diğeri, Kataoka ve diğeri, He ve diğeri, Akcılar ve diğeri'nin yapmış oldukları çalışmalarla uyumludur.

Son yıllarda diyabetin patogeneğinde oksidatif stres ve proinflamatuvar sitokinlerin merkezi rolü ile ilgili olarak yapılan çok sayıda araştırmada, diyabetik komplikasyonların önlenmesi ve diyabet tedavisinde RSV'nin rolü üzerine odaklanılmıştır (Soufi, Mohammed-Nejad ve Ahmedieh, 2012). RSV'nin antioksidan, antimutajenik, anti-inflamatuvar, östrojenik, antiplatelet etkileri başta olmak üzere pek çok farmakolojik etkisi bulunmaktadır (Palsamy ve Subramanian, 2011). Yapılan çalışmalar RSV'nin serbest radikalleri tutarak güçlü bir antioksidan görevi yaptığını doğrulamaktadır. Aynı zamanda RSV, NF- $\kappa$ B sinyal yolu ve sitokin ifadesini baskılayarak anti-inflamatuvar etki göstermektedir (Chang, Chang, Huang ve Hung, 2012). Güncel veriler, RSV'nin diyabetin önlenmesinde yararlı bir rol oynadığını ayrıca kardiyomiyopati, nefropati, nöropati ve

retinopati gibi bazı diyabetik komplikasyonları azalttığını ortaya koymaktadır (Yar, Menevşe, Alp ve Helvacıoğlu, 2009).

RSV'nin anti-hiperglisemik etkisi obez rodentlerde ve diyabetli iki hayvan modelinde (STZ indüklü ya da STZ nikotinamid indüklü diyabetik sıçanlarda) gösterilmiştir (Szkudelski ve Szkudelska, 2011). Hayvanların kullanıldığı çeşitli çalışmalarda RSV'nin toksisitesine yönelik testler farklı doz uygulamalarında denemeye tabii tutulmuştur. Bu çalışmalardan birine örnek olarak; Williams ve diğerlerinin yaptığı iki aşamalı çalışmalar gösterilebilir. Çalışmalarında 28 gün boyunca her gün 50 mg/kg, 150 mg/kg ve 500 mg/kg dozları kullanılarak üç farklı sıçan grubunda testler yapılmıştır. Çalışmalarının bu ilk aşamasında RSV'nin sebep olduğu herhangi bir olumsuz etki bulamayan araştırmacılar daha sonra 90 günlük benzer bir araştırmada dozu 700 mg/kg'a çıkarmalarına rağmen sıçanlarda sıradışı bir sonuca rastlamamışlardır (Williams, Burdock, Edwards, Beck ve Bausch, 2009). Diğer bir çalışmada Horn ve diğerleri sıçanlarda aşırı doz RSV kullanımının onkojenik etkilerinin bulunup bulunmadığını araştırmışlardır. Test dozları olarak seçilen, gün başına 1000 mg/kg, 2000 mg/kg ve 4000 mg/kg dozlarının uygulanması sonucunda onkojenik etkilerin ancak orta seviye ya da yüksek seviye uygulamalarda ortaya çıktığını, 1000 mg/kg dozundaki uygulamanın dahi direkt olarak ölümcül bir etkisinin gözlenmediği ortaya konulmuştur (Horn ve diğerleri, 2007). Bu örnek çalışmalardan çok daha düşük bir dozun, 20 mg/kg, uygulandığı bir başka çalışmada sıçanların otopsilerinde yapılan histopatolojik kontrollerde, sıçanların organlarının RSV uygulaması sonrası herhangi bir değişime uğramadığı ortaya konmuştur (Juan, Vinardell, ve Planas, 2002). RSV'nin aynı zamanda olası pozitif etkilerinin test edildiği çalışmalar incelendiğinde, uygulanması gereken doz konusunda benzer bulgulara rastlanmaktadır. Lai ve diğerleri tarafından RSV ile NF- $\kappa$ B'nin aktivasyonu araştırılmış, 15 mg/kg ve 30 mg/kg RSV dozları uygulanmış ve bu uygulama sonucunda NF- $\kappa$ B'nin doza bağlı olarak artış gösterdiği ortaya konulmuştur (Lai ve diğerleri, 2016). Tüm bunlara bağlı olarak, literatürdeki RSV uygulamasına yönelik tedavi ve toksisite çalışmaları incelendiğinde, çalışmamızda pankreas dokularını kullandığımız sıçanlara uygulanmış olan gün başına 10 mg/kg RSV dozunun uygun miktarda olduğu görülmektedir (Yar, 2008).

Crofford'ın yaptığı çalışma başta olmak üzere COX2'nin PG biyosentezinde rolü olduğunu gösteren çalışmalar; COX enzimlerinin ve özellikle COX2'nin diyabet ve diyabet gibi inflamatuvar yönü bulunan hastalıklarda önemli bir faktör olduğunu ortaya çıkarmıştır

(Crofford, 1997). RSV'nin COX2 enziminin metabolik yolağını ve PGE2 sentezini baskılayarak anti-inflamatuar etki gösterdiği birçok çalışma grubu tarafından ortaya konmuştur (Martinez ve Moreno, 2000). Yar ve diğerleri, RSV uygulaması sonrasında diyabetik sıçan böbreklerinde COX2 mRNA ifadenmesi ve protein düzeylerinin değişimlerini araştırmışlardır. Kontrol grubu ile RSV uygulanmış gruplar karşılaştırıldığında COX2 mRNA ya da protein düzeylerinde anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. RSV'nin COX geni ve protein ifadenmesi üzerine anlamlı etkisinin olmadığı sonucuna varmışlardır (Yar, Menevşe, Alp, Helvacıoğlu ve diğerleri, 2009). COX2 mRNA'sının transkripsiyon faktörü olan AP-1 ve NF-κB'nin baskılanmasıyla inhibe edildiği Newton ve diğerleri tarafından ortaya konulmuştur (Newton, Kuitert, Bergmann, Adcock ve Barnes, 1997). Yine Newton ve diğerlerinin bir diğer çalışmasında, RSV'nin hem NF-κB aktivasyonunu hem de NF-κB ifadenmesini inhibe ettiği ve bu sürecin bir sonucu olarak COX2 ve iNOS ifadenmesini baskıladığı görülmektedir (Mana, Mukhopadhyay ve Aggarwal, 2000). Hem NF-κB'nin iNOS transkripsiyonu üzerindeki etkisi hem de iNOS transkripsiyonunun inflamasyon üzerindeki etkileri Zamora ve diğerleri tarafından gösterilmiştir (Zamora, Vodovotz ve Billiar, 2000). Youn ve diğerleri yaptığı çalışmada birbirini takip eden oral RSV uygulamasının 7 günlük süreç sonucundaki iNOS ifadenmesi ve NF-κB aktivasyonu üzerindeki etkileri ve bu etkilerin inflamatuvar doku hasarları üzerindeki pozitif etkileri gösterilmiştir (Youn, Lee, Na, Kundu ve Surh, 2009). Bizim çalışmamızda RSV uygulanan STZ indüklü sıçanların pankreaslarında COX2, iNOS, NF-κB1 mRNA düzeylerinde azalma gözlenmiş ancak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

iNOS ifadenmesi ile inflamasyon durumunda sinyal proteini olarak çalışan TNFα arasındaki ilişki çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Green ve diğerleri, 1994). Bu ilişkiden yola çıkarak Bertelli ve diğerleri, RSV'nin TNFα kaynaklı endotel hücre aktivasyonunu önleyerek anti-inflamatuar etki gösterdiğini *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda ortaya koymuşlardır (Bertelli, Baccalini, Battaglia, Falchi ve diğerleri, 2001). TNFα'nın NF-κB aktivasyonu üzerindeki rolü de van Antwerp'in çalışmasında gösterilmiş ve apoptozis başta olmak üzere olası inflamatuvar sonuçları değerlendirilmiştir (Van Antwerp, Martin, Kafri, Green ve diğerleri, 1996). Csiszar ve diğerlerinin yaptığı bir diğer çalışmada ise RSV'nin TNFα uyarımına bağlı olan NF-κB aktivasyonunu baskıladığı ve buna bağlı olarak anti-inflamatuar etkisi olduğu bildirilmiştir (Csiszar, Smith, Labinsky, Orosz, Rivera ve Ungvari, 2006). Çalışmamızda RSV uygulanan STZ indüklü sıçanların pankreaslarında



TNF $\alpha$  mRNA düzeylerinde azalma gözlenmiş ancak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Tüm bunlara bağlı olarak, inflamatuvar süreç ve sonrası komplikasyonlara karşı yeni yöntemler geliştirilmesi adına RSV uygulamaları ile ilgili çalışmalar devam etmektedir.

RSV'nin etki ettiği faktörlerden biri de, inflamasyon ile ilişkisi sıkça araştırılan IL-6 genidir. Akut faz yanıtının gerçekleşmesinde rolü olduğu ortaya konan IL-6, kronik inflamatuvar hastalıkların tedavisinin geliştirilmesi adına hedeflenen faktörlerden biridir (Scheller, Chalaris, Schmidt-Arras ve Rose-John, 2011). RSV'nin, IL-6 salınımına yönelik inhibitör etkisinin Zhong ve diğerleri tarafından yapılan çalışma ile anlaşılması sonucunda tedavi yöntemlerinde inhibisyonu hedeflenen moleküllerden birinin daha RSV uygulaması ile baskılanabildiği ortaya konulmuştur (Zhong, Cheng, Wang, Guo, Zhu ve Zhang, 1999). Çalışmamızda RSV uygulanan sıçanların pankreaslarında IL-6 mRNA düzeylerinde azalma gözlenmiş ancak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.

Gao ve diğerleri, STZ indüklü sıçanların kalpleri ile yapmış oldukları çalışmalarında RSV'nin TNF $\alpha$ , IL-6 ve IL-1 $\beta$  gibi inflamatuvar faktörleri inhibe ederek diyabet indüklü kardiyak fonksiyon kaybını azalttığını saptamışlardır (Gao ve diğerleri, 2016). Zheng ve diğerleri, STZ indüklü T2DM'li sıçanlarda RSV uygulamasının, kanda NF- $\kappa$ B'nin nükleer translokasyonunda azalmaya, yine kanda TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve IL-6 düzeylerinin ve vasküler duvarda TNF $\alpha$  ifadenmesinin azalmasına yol açtığını bulmuşlardır (Zheng ve diğerleri, 2013). Palsamy ve diğerleri, STZ nikotinamid indüklü diyabetik sıçanların karaciğer dokularında, RSV'nin karaciğeri koruyucu etkisini araştırmışlar ve hepatik TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, NF- $\kappa$ B, p65 ve NO düzeylerini kontrol ve denek gruplarında çalışmışlardır. Diyabetik sıçanlarda oral RSV uygulamasının hepatik proinflamatuvar sitokinlerin ifade düzeylerini anlamlı derecede azalttığını tespit etmişlerdir (Palsamy ve Subramanian, 2011). Kumar ve diğerleri diyabetik nöropatide RSV'nin NF- $\kappa$ B'nin inflamatuvar yolağı, COX2, TNF $\alpha$  ve IL-6 düzeyleri üzerine etkisini araştırmışlardır. RSV uygulamasının sıçanlarda p65 ifadenmesini azalttığını ve yüksek COX2, TNF $\alpha$  ve IL-6 düzeylerini iyileştirdiğini bulmuşlardır (Kumar ve Sharma, 2010). Chang ve diğerleri, STZ indüklü T1DM'li hayvan modellerinde RSV'nin oksidatif stres ve inflamatuvar cevap üzerine etkilerini araştırmışlardır. NF- $\kappa$ B ve proinflamatuvar sitokin TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve IL-6 düzeyleri ile inflamatuvar stresi değerlendirmişlerdir. Diyabetik ve diyabetik olmayan grupları karşılaştırmış ve TNF $\alpha$  ve IL-6 konsantrasyonlarında belirgin bir fark bulamamışlardır. RSV uygulamasıyla diyabetik sıçanların karaciğerlerinde NF- $\kappa$ B ve IL-1 $\beta$  düzeyleri

anlamli bir azalış gösterirken, hepatik TNF $\alpha$  ve IL-6 düzeylerinde anlamli bir değişiklik bulunamamıştır. Sonuç olarak, RSV'nin hem dokularda hem de hepatik inflamasyonda (NF- $\kappa$ B ve IL-1 $\beta$ ) oksidatif stresi anlamli bir şekilde azalttığını göstermiş ancak RSV'nin diyabetik dalakta (TNF $\alpha$  ve IL-6) proinflamatuvar potansiyeli olduğu sonucuna varmışlardır (Chang, Chang, Huang ve Hung, 2012). Pektaş ve diğerleri, yapmış oldukları çalışmalarında STZ indüklü diyabetik erkek wistar sıçanların karaciğerleri üzerine RSV'nin etkisini araştırmışlardır. TNF $\alpha$ , IL-6 ve iNOS düzeylerini diyabetik sıçanlarda kontrol grubuna göre anlamli derecede yüksek bulurken, RSV uyguladıkları diyabetik sıçanlarda, RSV uygulamadıkları gruba göre anlamli bir azalma saptamışlardır. Bunun yanı sıra, RSV uyguladıkları diyabetik gruplarda RSV uygulamadıkları kontrol grubuna göre anlamli bir azalma bulmuşlardır (Pektaş ve diğerleri, 2016). Palsamy ve diğerleri., oral RSV uygulamasının STZ nikotinamid indüklü diyabetik sıçanlarda TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 ve NF- $\kappa$ B düzeylerinde anlamli bir azalmaya yol açtığını göstermişlerdir. Ayrıca, RSV uygulanmış diyabetik sıçanların hem plazma hem de pankreas dokularında lipid peroksit, hidroperoksit ve protein karbonil düzeylerinin belirgin şekilde azaldığını saptamışlardır. Bu çalışmaları sonucunda RSV'nin, diyabetik sıçanların pankreatik beta hücrelerinde hiperglisemiye azaltıp, insülin salınımını ve antioksidan yeteneği arttıran önemli bir antidiyabetik potansiyeli olduğu sonucuna varmışlardır (Palsamy ve Subramanian, 2011).

Diyabette yeni tedavi yöntemleri geliştirmek adına son zamanlarda RSV ile ilgili çalışmalara sıklıkla başvurulmaktadır. RSV'nin COX2 üzerindeki baskılayıcı etkisiyle beraber NF- $\kappa$ B, iNOS, TNF $\alpha$  ve IL-6 üzerindeki etkilerinin de ortaya konması, diyabet hastalığına yönelik işlevsel bozuklukları anlamamız açısından önem taşımaktadır.

Yaptığımız çalışmada STZ indüklü sıçanların pankreaslarında RSV uygulamasının COX2, iNOS, NF- $\kappa$ B1, TNF $\alpha$  ve IL-6 mRNA düzeyleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Diyabetik sıçan grubu ile RSV uygulanmış diyabetik sıçan grubu karşılaştırıldığında COX2, iNOS, NF- $\kappa$ B1, TNF $\alpha$  ve IL-6 mRNA düzeylerinde azalma gözlenmiş ancak anlamli bir farklılık saptanamamıştır. Zhang ve diğerleri, Newton ve diğerleri, Mana ve diğerleri, Surh ve diğerleri, Bertelli ve diğerleri, Gao ve diğerleri, Zheng ve diğerleri, Palsamy ve diğerleri, Kumar ve diğerleri, Pektaş ve diğerleri, Palsamy ve diğerleri yapmış oldukları çalışmalarda RSV'nin inflamatuvar faktörleri azalttığını bulurken, Chang ve diğerleri, Yar ve diğerleri yapmış oldukları çalışmalarında bizim bulgularımızla uyumlu olarak istatistiksel olarak anlamli bir farklılık bulamamışlardır.

Sonuç olarak, diyabetik sıçanlarda oksidatif stres ve proinflamatuvar sitokin gen ifadenmelerinde artış saptanmış olup, RSV uygulamasında bu genlerin ifadelerinde azalma tespit edilmiş olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Sonuçlarımız RSV'nin oksidatif stres ve inflamatuvar genler üzerine anlamlı etkisinin olmadığını göstermiştir. Bu nedenle, STZ indüklü diyabetik sıçan gruplarında, diyabetik semptomların azaltılması ve genlerin ifade düzeylerindeki değişimlerin araştırıldığı, diğer antidiyabetik ilaçların birarada kullanıldığı farklı tedavi stratejileri denenebilir.





## 6. SONUÇ

Çalışmamızda, RSV'nin STZ ile diyabet modeli oluşturulmuş sıçanlarda ki inflamatuvar genlerin mRNA düzeylerine etkisi ve bu genlerin ifadelerindeki değişimlerin diyabet hastalığı ile olan ilişkisi değerlendirilmiştir. Yaptığımız çalışmada RSV uygulamasının STZ indüklü sıçanların pankreaslarında COX2, iNOS, NF-κB1, TNFα ve IL-6 mRNA düzeyleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Diyabetik sıçan grubu ile RSV uygulanmış diyabetik sıçan grubu karşılaştırıldığında COX2, iNOS, NF-κB1, TNFα ve IL-6 mRNA düzeylerinde azalma gözlenmiş ancak istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.

Sonuç olarak, diyabetik sıçanlarda inflamatuvar genlerin ifade düzeylerinde artış bulunmuş olup, RSV uygulamasının bu genlerin ifade düzeyleri üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda, sadece RSV uygulamasının diyabetle ilişkili inflamatuvar genlerin ifade düzeylerini değiştiremeyeceği düşüncesindeyiz. Bundan dolayı, diğer antidiyabetik ilaçların birarada kullanıldığı daha kapsamlı araştırmalar yapılmasının gerekli olduğu sonucuna varmaktayız.



## KAYNAKLAR

- American Diabetes Association (2004). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 27 (1), 5-10.
- Akcılar, R., Kocak, F., Simsek, H., Akcılar, A., Bayat, Z., Ece, E. ve Kokdasgil, H. (2016). Antidiabetic and hypolipidemic effects of adropinin streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. *Bratislavske Lekarske Listy*, 117(2), 100-105.
- Aruzmozhi, D., Veeranjanyulu, A., and Bodhankar, S. (2004). Neonatal streptozotocin-induced rat model of type 2 diabetes mellitus: a glance. *Indian Journal of Pharmacology*, 36(4), 217- 221.
- Ashley, N. T., Weil, Z. M., and Nelson, R. J. (2012). Inflammation: mechanisms, costs, and natural variation. *Annual Reivew of Ecology, Evolution and Systematics*, 43, 385-406.
- Asirvatham, A., William, J., and Thomas, B. (2009). miRNA regulation of cytokine genes. *Cytokine*, 45(2), 58-69
- Avcı, A. (2001). Diyabet Oluşturulmuş Ratlarda Böbrek Antioksidan Savunma Sistemi ve E Vitamininin Etkileri. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınlanmamış Uzmanlık Tezi*.
- Baxter, A. and Duckworth, R. (2004). Models of type I (autoimmune) diabetes. *Drug discovery Today: Disease Models*, 1(4), 451-455.
- Bender, S., Haubeck, H., Van de Leur, E., Dufhues, G., Schiel, X. and Lauwerjins, J. (1990). Interleukin-1 $\beta$  induces synthesis and secretion of interleukin-6 in human chondrocytes. *FEBS Letters*, 583(22), 3611-7
- Bernal, A. (2007). Overview. Preterm Labour: Mechanisms and Management. *BMC Pregnancy Childbirth*, 1(7), 1-2.
- Bertelli, A., Baccalini, R., Battaglia, E., Falchi, M. and Ferrero, M. (2001). Resveratrol inhibits TNF alpha-induced endothelial cell activation. *Therapie*, 56(5), 613-6.
- Bertelli, AA., Giovannini, L., Giannessi, G., Migliori, M., Bernini, W., Fregoni, M. and Bertelli, A. (1995). Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine. *International Journal of Tissue Reactions*, 17(1), 1-3.
- Bianchi, M. (2007). DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal Of Leukocyte Biology*, 81(1), 1-5.
- Bilgehan, H. (1999). Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi. *İzmir: Barış Yayınları*.
- Bodmer, J., Scheneider, P. and Tschopp, J. (2002). The Molecular Architecture of the TNF Superfamily. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(1), 19-26.

- Cai, D, Yuan, M, Frantz, DF, Melendez, PA, Hansen, L, Lee, J. and Shoelson, S.E. (2005). Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKKbeta and NF-kappaB . *Nature Medicine*, 11(2), 183-90
- Calabrese, G. (1999). Nonalcoholic Compounds of Wine: The Phytoestrogen Resveratrol and Moderate Red Wine Consumption During Menopause. *Drugs Under Experimental And Clinical Research*, 25(2-3), 111-4.
- Canda, M. (1994). *Temel Patoloji*. İstanbul: Nobel Yayınları.
- Casper, R., Quesne, M., Rogers, I., Shiota, T., Jolivet, A., Milgrom, E. and Savouret, JF. (1999). Resveratrol Has Antagonist Activity on the Aryl Hydrocarbon Receptor: Implications for Prevention of Dioxin Toxicity. *Journal of Histochem Cytochem*, 56(4), 784-90.
- Chan, W. (2005). Effect of resveratrol on high glucoseinduced stress in human leukemia K562 cells. *Journal of Cellular Biochemistr*, (94), 1267-1279.
- Chang, C., Chang, C., Huang, J. and Hung, L. (2012). Effect of resveratrol on oxidative and inflammatory stress in liver and spleen of streptozotocin-induced type 1 diabetic rats. *Chinese Journal of Physiology*, 55(3), 192-201.
- Choudhury, S., Ghosh, S., Gupta, P. and Mukherjee, S. (2015). Inflammation-induced ROS generation causes pancreatic cell death through modulation of Nrf2/NF-κB and SAPK/JNK pathway. *Free Radical Research*, 2(1), 1-13.
- Creasy, L. and Coffee, M. (1988). Phytoalexin Production Potential of Grape Berries in Wine. *HortScience*, 230-235.
- Creasy, L. and Creasy, M. (1998). Grape Chemistry and the Significance of Resveratrol: An Overview. *Pharmaceutical Biology*, 36(5), 8-13
- Crofford, L. (1997). COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *Journal of Rheumatology Supplement*, 49, 15-9.
- Csiszar, A., Smith, K., Labinsky, N., Orosz, Z., Rivera, A. and Ungvari, Z. (2006). Resveratrol attenuates TNF-alpha-induced activation of coronary arterial endothelial cells: role of NF-kappaB inhibition. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 291(4), 1694-9.
- Cui, J., Juhasz, B., Tosaki, A., Maulik, N. and Das, D. (2002). Cardioprotection With Grapes. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 40(5), 762-769.
- de Hooge, A. S., van de Loo, F. A., Bennink, M. B., Arntz, O. J., de Hooge, P. and van den Berg, W. B. (2005). Male IL-6 gene knock out mice developed more advanced osteoarthritis upon aging. *Osteoarthritis and Cartilage*, 13(1), 66-73.
- Dinççağ, N. (2011). Diabetes Mellitus Tanı ve Tedavisinde Güncel Durum. *İç Hastalıkları Dergisi* , 18(4), 181-223.



- Donnelly, L. and Barnes, P. (2002). Expression and regulation of inducible nitric oxide synthase from human primary airway epithelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 26(1), 144-51.
- Dubois, R., Abramson, S. and Crofford, L. (1998). Cyclooxygenase in biology and disease. *The FASEB Journal*, 12(12), 1063-73.
- Ergin, K. and Yaylalı, A. (2013). Resveratrol ve etkileri üzerine bir gözden geçirme. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 20(3), 115-120.
- Flajnik, M. and Pasquer, L. (2004). Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line? *Trends in Immunology*, 25(12), 640-644.
- Fremont, L. (1940). Biological Effects of Resveratrol. *Journal of Faculty Science*, 1-16.
- Fremont, L. (2000). Biological Effects of Resveratrol. *Life Science*, 66(8), 663-73.
- Gao, Y., Kang, L., Li, C., Wang, X., Sun, C., Li, Q., Liu, R. and Wang, J4. (2016). Resveratrol Ameliorates Diabetes-Induced Cardiac Dysfunction Through AT1R-ERK/p38 MAPK Signaling Pathway. *Cardiovascular Toxicology*, 16(2), 130-137.
- Gardner, D. and Shoback, D. (2012). *Greenspans's Basic and Clinical Endocrinology*. Yale Journal of Biology and Medicine, 85(4), 559.
- Gehm, B., McAndrews, J., Chien, P. and Jameson, J. (1997). Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(25), 14138-14143
- Goldberg, D. (1996). Regional Differences in Resveratrol Isomer Concentrations of Wines from Various Cultivars. *Journal of Wine Research*, 13-24.
- Goldenberg, R., Culhane, J., Iams, J. and Romero, R. (2008). Epidemiology and Causes of Preterm Birth. *Lancet*, 371(9606), 75-84
- Green, S., Scheller, L., Marletta, M., Seguin, M., Klotz, F., Slayter, M., Nelson, B.J. and Nancy, CA. (1994). Nitric oxide: cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens. *Immunology Letters*, 43(1-2), 87-94.
- Guo, F., Lai, Y., Tian, Q., Lin, E., Kong, L. and Liu, C. (2010). Ranulin-Epithelin Precursor Binds Directly to ADAMTS-7 and ADAMTS-12 and Inhibits Their Degradation of Cartilage Oligomeric Matrix Protein. *Arthritis and Rheumatism*, 62(7), 2023-36.
- Gülmezoğlu, E. ve Ergüven, S. (1994). *İmmünoloji*. Ankara: Hacettepe Taş Kitapçılık, 67-87.
- Güz, G. (2010). Tip 2 diabetes mellitus hastalarında egzersizin HbA1c, insülin direnci, koroner akım rezervi üzerine etkileri. *İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi*.
- Haas, T., Emmerich, C., Gerlach, B., Schmukle, A., Cordier, S. and Rieser, E. (2009). Recruitment of the linear Ubiquitin Chain Assembly Complex Stabilizes The TNF-

- R1 Signaling Complex and is Required for TNF-Mediated Gene Induction. *Molecular Cell*, 36(5), 831-44
- Halifeoğlu, İ., Karataş, F., Çolak, R., Canatan, H. and Telo, S. (2005). Tip 2 Diyabetik Hastalarda Tedavi Öncesi ve Tedavi Sonrası Oksidan ve Antioksidan Durum. *Fırat Tıp Dergisi* , 10(3), 117-122.
- Hammacher, A., Ward, L., Simpson, R., Weinstock, J., Treutlein, H. and Yasukawa, K. (1994). Structure-function analysis of human IL-6: identification of two distinct regions that are important for receptor binding. *Protein Science*, 3(12), 2280-93.
- Han, J., Chuan-Qi, Z. and Duan-Wu, Z. (2011). Programmed Necrosis: Backup to and Competitor with Apoptosis in the Immune System. *Nature Immunology* , 12(12), 1143-9.
- Hao, X., Cao, D., Hu, Y., Li, X., Xiao, J. and Tang, C. (2009). IFN- $\gamma$  down-regulates ABCA1 expression by inhibiting LXR $\alpha$  in a JAK/STAT signaling pathway-dependent manner. *Atherosclerosis*, 203(2), 417-28.
- He, J., Yang, Z., Yang, H., Wang, L., Wu, H. and Fan, Y. W. (2015). Regulation of insulin sensitivity, insulin production, and pancreatic  $\beta$  cell survival by angiotensin-(1-7) in a rat model of streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Peptides*, 64, 49-54.
- Heitmer, M., Kelly, C., Ensor, N. and Gibson, K. (2004). Role of Cyclooxygenase-2 in Cytokine-induced B-cell Dysfunction and Damage by Isolated Rat and Human Islets. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(51), 53145-51.
- Hibi, M., Murakami, M., Saito, M., Hirano, T., Taga, T. and Kishimoto, T. (1990). Molecular Cloning and Expression of an IL-6 Signal Transducer. *Cell*, 63(6), 1149-57.
- Hirano, T., Nakajima, K. and Hibi, M. (1997). Signaling Mechanisms Through gp130: A Model of the Cytokine System. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 8(4), 241-52.
- Honorati, M., Cattini, L. and Facchini, A. (2007). VEGF Production by Osteoarthritic Chondrocytes Cultured in Micromass and Stimulated by IL-17 and TNF- $\alpha$ . *Connective Tissue Research*, 48(5), 239-45.
- Honsawek, S., Deepaisarnsakul, B., Tanavalee, A., Yuktanandana, P., Bumrunghanichthaworn, P. and Mailla, S. (2011). Association of the IL-6-174G/C Gene Polymorphism with Knee Osteoarthritis in a Thai Population. *Genetics and Molecular*, 10(3), 1674-80.
- Horn, T., Cwik, M., Morrissey, R., Kapetanovic, I., Crowell, J. and Booth, T. (2007). Oncogenicity evaluation of resveratrol in p53(+/-) (p53 knockout) mice. *Food and Chemical Toxicology*, 45(1), 55-63.
- Hung, L., Chen, J., Huang, S., Lee, R. and Su, M. (2000). Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovascular Research*, 47(3), 549-55.

- Inoue, H., Jiang, X., Katayama, T., Osada, S., Umesono, K. and Namura, S. (2003). Brain Protection by Resveratrol and Fenofibrate Against Stroke Requires Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\alpha$  in Mice. *Neuroscience Letter*, 352(3), 203-6.
- Inoue, H., Tanabe, T. and Umesono, K. (2000). Feedback control of cyclooxygenase-2 expression through PPAR $\gamma$ . *The Journal of Biological Chemistry*, 275(36), 28028-32.
- Jeandet, P., Sbaghi, M., Bessis, R. and Meunier, P. (1995). The Potential Relationship of Stilbene Synthesis to Anthocyanin Content in Grape Berry Skins. *Vitis*, 34(2), 91-94
- Jian, J., Konopka, J. and Liu, C. (2013). Insights Into The Role of Progranulin in Immunity, Infection and Inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, 93(2), 199-208
- Jiang, J.D., Kong, W.-J., Li, Z. and Gengmplement, Y. N. (2014). Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Berberine in the Treatment of Diabetes Mellitus. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 289264.
- Jones, S., Brockbank, S., Clements, K., Le Good, N., Campbell, D. and Read, S. (2009). Mitogen-Activated Protein Kinase-Activated Protein Kinase 2 (MK2) Modulates Key Biological Pathways Associated With OA Disease Pathology. *Osteoarthritis and Cartilage*, 17(1), 124-31
- Juan, M., Vinardell, M. and Planas, J. (2002). The daily oral administration of high doses of trans-resveratrol to rats for 28 days is not harmful. *Journal of Nutrition*, 132(2), 257-60.
- Kabalak, T. ve Çetinkalp, Ş. (2009). Tip 1 Diabetes Mellitus. *İstanbul: Deomed Medikal Yayıncılık*.
- Kalousová, M., Zima, T., Tesar, V. and Stípek, S. (2001). New markers of advanced damage caused by oxidative and carbonyl stress. *Sbornik Lekarsky*, 102(4), 465-72.
- Kaneko, S., Satoh, T., Chiba, J., Ju, C. and Kagawa, J. (2000). Interleukin-6 and Interleukin-8 Levels in Serum and Synovial Fluid of Patients With Osteoarthritis. *Cytokines, Cellular and Molecular Therapy*, 6(2), 71-9.
- Kanner, J., Frankel, E., Granit, R., German, B. and Kinsella, j. (1994). Natural Antioxidants in Grapes and Wines. *Agricultural Food Chemistry*, 42(1), 64-69
- Karin, M. (1995). The Regulation of AP-1 Activity by Mitrogen-Activated Protein Kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 351(1336), 127-34.
- Kataoka, T., Hotta, Y., Maeda, Y. and Kimura, K. (2014). Assessment of androgen replacement therapy for erectile function in rats with type 2 diabetes mellitus by examining nitric oxide-related and inflammatory factors. *The Journal of Sexual Medicine*, 11(4), 920-929.
- Keklikoglu, N. and Akinci, S. (2013). The role of iNOS in beta cell destruction in diabetes. *Oxidants and Antioxidants in Medical Science*, 2(4), 251-254.

- Kim, J., Fillmore, J., Sunshine, M., Albrecht, B., Higashimori, T. and Kim, D. (2004). PKC-theta knockout mice are protected from fat-induced insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(6), 823-7.
- King, H., Aubert, R. and Herman, W. (1998). Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care*, 21(9), 1414-31.
- Konopka, J., Richbough, B. and Liu, C. (2014). The Role of PGRN in Musculoskeletal Development and Disease. *Frontiers in Bioscience*, 19, 662-671.
- Kostolanská, J., Jakus, V. and Barák, L. (2009). HbA1c and serum levels of advanced glycation and oxidation protein products in poorly and well controlled children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 22(2), 433-42.
- Kriegler, M., Perez, C., DeFay, K., Albert, I. and Lu, S. (1988). A Novel form of TNF/Cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell*, 53(1), 45-53.
- Kumar, A. and Sharma, S. (2010). NF-kappaB inhibitory action of resveratrol: a probable mechanism of neuroprotection in experimental diabetic neuropathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 394(2), 360-5.
- Kuramochi, H., Vallböhmer, D., Uchida, K., Schneider, S., Hamoui, N. and Shimizu, D. (2004). Quantitative, tissue-specific analysis of cyclooxygenase gene expression in the pathogenesis of Barrett's adenocarcinoma. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 8(8), 1007-16
- Lai, X., Pei, Q., Song, X., Zhou, X., Yin, Z. and Jia, R. (2016). The enhancement of immune function and activation of NF -kB by resveratrol-treatment in immunosuppressive mice. *International Immunopharmacology*, 33, 42-7.
- Langcake, P. and McCarthy, W. (1979). The Relationship of Resveratrol Production to Inflection of Grapevine Leaves by Botrytis Cinerea. *Vitis*, 244-253.
- Law, M. W., Stampfer, M. and Rimm, E. (1999). Why Heart Disease Mortality is Low in France: The Time Lag Explanation. *British Medical Journal*, 318(7196), 1471-6.
- Lefebvre, V., Chantal, P. and Vaes, G. (1990). Modulation by interleukin 1 and tumor necrosis factor  $\alpha$  of production of collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases and collagen types in differentiated and dedifferentiated articular chondrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1052(3), 366-78.
- Lekshmi, R., Raiesh, R. and Mini, S. (2015). Ethyl acetate fraction of *Cissus quadrangularis* stem ameliorates hyperglycaemia-mediated oxidative stress and suppresses inflammatory response in nicotinamide/streptozotocin induced type 2 diabetic rats. *Rhytomedicine*, 22(10), 952-960.
- Li, Z., Geng, Y., Jiang, J. and Kong, W. (2014). Antioxidant and anti-inflammatory activities of berberine in the treatment of diabetes mellitus. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 289-264.

- Liu, C. and Bosch, X. (2012). Progranulin: A Growth Factor, A novel TNFR Ligand and a Drug Target. *Pharmacology and Therapeutics*, 133(1), 124-32.
- MacEwan, D. (2002). TNF Receptor Subtype signalling: Differences and Cellular Consequences. *Cellular Signaling*, 14(6), 477-92.
- Mana, S., Mukhopadhyay, A. and Aggarwal, B. (2000). Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF-kappa B, activator protein -1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *The Journal of Immunology*, 164(12), 6509-19.
- Maritim, A., Sanders, R. and Watkins, J. (2003). 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 17(1), 24-38.
- Martinez, J. and Moreno, J. (2000). Effect of Resveratrol, A Natural Polyphenolic Compound, On Reactive Oxygen Species and Prostaglandin Production. *Biochemical Pharmacology*, 59(7), 865-70.
- Martinson, F., Mayor, A. and Tschopp, J. (2009). The inflammasomes: guardians of the body. *Annual review of immunology*, 27, 229-265.
- Matzinger, P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science*, 296(5566), 301-305.
- McFall-Ngai, M. (2007). Adaptive immunity: care for the community. *Nature*, 445(7124), 153-165.
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428-435.
- Micheau, O. and Tschopp, J. (2003). Induction of TNF Receptor I-Mediated Apoptosis via Two Sequential Signaling Complexes. *Cell*, 114(2), 181-90.
- Montane, J., Cadavez, L. and Novials, A. (2014). Stress and the inflammatory process- a major cause of pancreatic cell death in type 2 diabetes. Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity. *Targets and Therapy*, 7, 25-34
- Newton R. (2000). Molecular Mechanism of Glucocorticoid Action: What is Important? *Thorax*, 55(7), 603-13.
- Newton, R, Kuitert, LM, Bergmann, M., Adcock, I.M. and Barnes, P.J. (1997). Evidence for involvement of NF- $\kappa$ B in the transcriptional control of COX-2 gene expression by IL-1 $\beta$ . *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 237(1), 28-32.
- Nathan, C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature*, 420(6917), 846-852.
- Nazaraki, M., Yasukawa, K., Saito, T., Ohsugi, Y., Fukui, H. and Koishihara, Y. (1993). Soluble Forms of the Interleukin-6 Signal-Transducing Receptor Component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membrane-anchored gp130. *Blood*, 82(4), 1120-6.

- Newton, R., Kuitert, L., Bergmann, M., Adcock, I. and Barnes, P. (1997). Evidence for Involvement of NF- $\kappa$ B in the Transcriptional Control of COX-2 Gene Expression by IL-1 $\beta$ . *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 237(1), 28-32.
- Okuda, T. and Yokotsuka, K. (1996). Trans-Resveratrol Concentrations in Berry Skins and Wines From Grapes in Japan. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47(1), 93-99.
- Oregon-Romero, E. and Vazquez-Del Mercado, M. (2006). Tumor Necrosis Factor Receptor 2 M196R Polymorphism in Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis: Relationship with sTNFR2 Levels and Clinical Features. *Rheumatology International*, 27(1), 53-9.
- Özlem, Y. ve Turgay, N. (2009). Sitokin ilişkili Hücre içi Sinyal İletimi ve Paraziter Enfeksiyonlardaki Önemi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 33, 301-305.
- Öztürk, Y., Altan, V. and Yıldızoğlu-Arı, N. (1996). Effects of experimental diabetes and insulin on smooth muscle functions. *Pharmacological Reviews*, 48(1), 69-112.
- Palsamy, P. and Subramanian, S. (2011). Resveratrol protects diabetic kidney by attenuating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammatory cytokines via Nrf2-Keap1 signaling. *Biochimica et Biophysica Acta*, 18(12), 719-731.
- Pektaş, M., Sadi, G., Koca, H., Yüksel, Y., Vurmaz, A. and Koca, T. (2016). Resveratrol Ameliorates the Components of Hepatic Inflammation and Apoptosis in a Rat Model of Streptozotocin-Induced Diabetes. *Drug Development Research*, 77(1), 12-19.
- Pfaffl, M. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), 45.
- Poree, B., Kypriotou, M., Chadjichristos, C., Beauchef, G., Renard, E. and Legendre, F. (2008). Interleukin-6 (IL-6) and/or soluble IL-6 receptor down-regulation of human type II collagen gene expression in articular chondrocytes requires a decrease of Sp1·Sp3 ratio and of the binding activity of both factors to the COL2A1 promoter. *Journal of Biological Chemistry*, 283(8), 4850-65
- Rakesh, K. and Agrawal, D. (2005). Controlling Cytokine Signaling By Constitutive Inhibitors. *Biochemical Pharmacology*, 70(5), 649-57.
- Crofford, L.J. (1997). COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *Journal of Rheumatology Supplement*, 49, 15-19.
- Robertson, R. and Harmon, J. (2006). Diabetes, glucose toxicity, and oxidative stress: A case of double jeopardy for the pancreatic islet beta cell. *Free Radical Biology and Medicine*, 41(2), 177-184.
- Rothe, M., Pan, M., Henzel, W., Ayres, T. and Goeddel, D. (1995). The TNFR2-TRAF Signaling Complex Contains Two Novel Proteins Related to Baculoviral Inhibitor of Apoptosis Proteins. *Cell*, 83(7), 1243-52.

- Rowley, A. (1996). The evolution of inflammatory mediators. *Mediators of Inflammation* , 5(1), 3-13.
- Sağlık Bakanlığı. (2006). Tip 2 diabetes mellituslu renal disfonksiyonu olmayan nefropatili hastalarda albuminüri ile serum sistatin C ilişkisi. *Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi 1. İç Hastalıkları Kliniği Uzmanlık Tezi* .
- Saha, S. and Ghosh, M. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory effect of conjugated linolenic acid isomers against streptozotocin-induced diabetes. *British Journal of Nutrition*, 108(6), 974-83
- Sakao, K., Takahashi, Y., Arai, M., Saito, M., Honjo, K. and Hiraoka, N. (2009). Osteoblasts derived from osteophytes produce interleukin-6, interleukin-8, and matrix metalloproteinase-13 in osteoarthritis. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 27(4), 412-23.
- Saklatvala, J. (1986). Tumour Necrosis Factor a Stimulates Resorption and Inhibits Synthesis of Proteoglycan in Cartilage. *Nature*, 322(6079), 547-9.
- Satman, I. (2001). Diabetes Mellitus Epidemiyolojisi. M. Yenigün, ve Y. Altuntaş içinde, *Her yönüyle diabetes mellitus* (2. b.). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi.
- Satman, I., Ömer, B., Tütüncü, Y., Kalaca, S., Gedik, S. and Dinççağ, N. (2013). Twelve-year trends in the prevalence and risk factors of diabetes and prediabetes in Turkish adults. *European Journal of Epidemiology*, 28 (2), 169-180.
- Satman, I., Yılmaz, T., Bastar, I., Şengül, A., Sargın, M. ve Salman, F. (1998). Diabetes Epidemiology Study in Turkey first Step Data Results. *Diabetes*, 47(1), 384-1480.
- Satman, I., Yılmaz, T., Şengül, A., S, S., Salman, F. ve Uygur, S. (2002). Population-based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: results of the Turkish diabetes epidemiology study (TURDEP). *Diabetes Care* , 25(9), 1551-6.
- Sbaghi, M. (1994). *Physiological and Biochemical Aspects of The Interaction Between Grapevines and Botrytis Cinerea*. University of Bourgogne.
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D. and Rose-John, S. (2011). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1813(5), 878-88.
- Shahidi, F., Janitha, P. and Wanasundara, P. (1992). Phenolic Antioxidants. *Critical Review Food Science Nutrition*, 32(1), 67-103.
- Soufi, F., Mohammed-Nejad, D. and Ahmedieh, H. (2012). Resveratrol improves diabetic retinopathy possibly through oxidative stress - nuclear factor  $\kappa$ B - apoptosis pathway. *Pharmacological Reports*, 64(6), 1505-1514.
- Steeve, K., Marc, P., Sandrine, T., Dominique, H. and Yannick, F. (2004). IL-6, RANKL, TNF-Alpha/IL-1: Interrelations in Bone Resorption Pathophysiology. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 15(1), 49-60.

- Sui, Y., Lee, J., DiMicco, M., Vanderploeg, E., Blake, S. and Hung, H. (2009). Mechanical injury potentiates proteoglycan catabolism induced by interleukin-6 with soluble interleukin-6 receptor and tumor necrosis factor  $\alpha$  in immature bovine and adult human articular cartilage. *Arthritis and Rheumatism*, 60(10), 2985-96
- Sun, Z. and Andersson, R. (2002). NF- $\kappa$ B activation and inhibition: A Review. *Shock*, 18(2), 99-106.
- Suzuki, Y. (1999). Genes, Cells and Cytokines in Resistance Against Development of Toxoplasmic Encephalitis. *Immunobiology*, 201(2), 255-71.
- Szewczuk, L., Forti, L., Stivala, L. and Penning, T. (2004). Resveratrol is a Peroxidiase-Mediated Inactivator of COX-1 but not COX-2. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(21), 22727-37.
- Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological Research*, 50 (6), 537-46.
- Szkudelski, T. and Szkudelska, K. (2011). Anti-diabetic effects of resveratrol. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 12 (15), 34-39.
- Szylberg, L., Janiczek, M., Popiel, A. and Marszalek, A. (2016). Expression of COX-2, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-4 in epithelium of serrated adenoma, adenoma and hyperplastic polyp. *Archives of Medical Science*, 12(1), 172-8
- Takaoka, M. (1940). Of The Phenolic Substances of White Hellebore. *Journal of Faculty Science*, 4(3), 146-158.
- Van Antwerp, D., Martin, S., Kafri, T., Green, D. and Verma, I. (1996). Suppression of TNF- $\alpha$ -induced apoptosis by NF- $\kappa$ B. *Science*, 274(5288), 787-9.
- Van de Loo, F., Kuiper, S., Enkevort, F., Arntz, O. and Van den Berg, W. (1997). Interleukin-6 Reduces Cartilage Destruction During Experimental Arthritis: A Study in Interleukin-6-Deficient Mice. *American Journal of Pathology*, 151(1), 177-91.
- Viviani, B., Bartesaghi, S., Corsini, E., Galli, C. and Marinovich, M. (2004). Cytokines Role in Neurodegenerative Events. *Toxicology Letters*, 149(1-3), 85-9.
- Wadsworth, T. and Koop, D. (1999). Effects of the Wine Polyphenolics Quercetin and Resveratrol on Pro-Inflammatory Cytokine Expression in RAW 264.7 Macrophages. *Biochemical Pharmacology*, 57(8), 941-9.
- Walker, N. (2002). A technique whose time has come. *Science*, 296(5567), 557-9.
- Wang, P., Zhu, F. and Konstantopoulos, K. (2010). Rostaglandin E2 induces interleukin-6 expression in human chondrocytes via cAMP/protein kinase A- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent NF- $\kappa$ B activation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 298(6), 1445-56.
- Webb, G., Westacott, C. and Elson, C. (1998). Osteoarthritic synovial fluid and synovium supernatants up-regulate tumor necrosis factor receptors on human articular chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage*, 6(3), 167-76.



- Williams, L., Burdock, G., Edwards, J., Beck, M. and Bausch, J. (2009). Safety studies conducted on high-purity trans-resveratrol in experimental animals. *Food and Chemical Toxicology*, 47(9), 2170-82.
- Wright, E. J., Scism-Bacon, J. and Glass, L. (2006). Oxidative stress in type 2 diabetes: the role of fasting and postprandial glycaemia. *International Journal of Clinical Practice*, 60(3), 308-14.
- Yang, Q., Graham, T. E., Mody, N., Preitner, F., Peroni, O. D. and Zabolotny, J. M. (2005). Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature*, 436(7049), 356-62.
- Yar, A. S. (2008). Streptozotocin ile oluşturulmuş diyabetli sıçanlarda resveratrol kullanımını sonucunda siklooksijenaz-1 (COX-1) ve siklooksijenaz-2 (COX-2) genlerinin ekspresyonlarının araştırılması. *Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Yüksek Lisans Tez Çalışması*.
- Yar, A., Menevşe, S., Alp, E., Helvacıoğlu, F. and Take, G. (2009). The effects of resveratrol on COX-1 and COX-2 mRNA and protein levels in diabetic rat kidneys. *Molecular Biology Reports*, 37(5), 2323-31.
- Yılmaz, Ö., Taşkıran, D. and Aydar, S. (2004). Cytotoxicity in Cytokine Stimulated Astrocyte Cultures: Role of IL-6 and Nitric Oxide. *Neuroscience Research Communications*, 34(2), 82-91.
- Youn, J., Lee, J., Na, H., Kundu, J. and Surh, Y. (2009). Resveratrol and piceatannol inhibit iNOS expression and NF- $\kappa$ B activation in dextran sulfate sodium-induced mouse colitis. *Nutrition and Cancer*, 61(6), 847-54.
- Zamora, R., Vodovotz, Y. and Billiar, T. (2000). Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Molecular Medicine*, 6(5), 347-373.
- Zheng, X., Zhu, S., Chang, S., Cao, Y., Dong, J. and Li, J. (2013). Protective effects of chronic resveratrol treatment on vascular inflammatory injury in streptozotocin induced type 2 diabetic rats role of nf-kappa b signaling. *European Journal of Pharmacology*, 720(1-3), 147-157.
- Zhong, M., Cheng, G., Wang, W., Guo, Y., Zhu, X. and Zhang, J. (1999). Inhibitory effect of resveratrol on interleukin 6 release by stimulated peritoneal macrophages of mice. *Phytomedicine*, 6(2), 79-84.





## EK-1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararları



T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
REKTÖRLÜĞÜ  
Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı

12.12.2006

SAYI : B.30.2.GÜN.0.EU.00.00/17-17826  
KONU:

Sayın

Prof.Dr.Sevda MENEVŞE  
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji ve Genetik  
Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

G.Ü.ET-06.073 kod numaralı ve “*Streptozotocin ile oluşturulmuş diyabetli sıçanlarda Resveratrol kullanımı sonucunda Cyclooxygenase-1 (COX-1) ve Cyclooxygenase-2 (COX-2) genlerinin ekspresyonlarının araştırılması*” başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-06.073 and entitled “*The expression profile of Cyclooxygenase-1 (COX-1) ve Cyclooxygenase-2 (COX-2) genes after Resveratrol treatment in Streptozotocin induced-diabetic rats*” is in compliance with Gazi University Ethical Council regulations.

With my best regards.

Prof.Dr.Gökhan ALPAŞLAN  
Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanı  
Chairman  
Gazi University Experimental Animals Ethical Council

Prof.Dr.Engin ÇALGÜNER

Prof.Dr.Nedret KILIÇ

Prof.Dr.Sevil PEHLİVAN

Prof.Dr.Deniz ERDOĞAN

Prof.Dr.Deniz ERBAŞ

Prof.Dr.Fatma AKAR

Prof.Dr.Altan DOĞAN

Doç.Dr.Nesrin COBANOĞLU

Uz.Vet.Hek.Şeyda DİKER

EK-1. (devam) Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararları

23.03.2011

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ**  
**DENEY HAYVANLARI YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI'NA**

Gazi Üniversitesi Etik Kurul Başkanlığından 12.12.2006 tarihi ve G.Ü.ET-06.073 kod numaralı "Streptozotocin ile oluşturulmuş diyabetli sıçanlarda Resveratrol kullanımı sonucunda Cyclooxygenase-1 ( COX-1 ) ve Cyclooxygenase-2 ( COX-2 ) genlerinin ekspresyonlarının araştırılması" başlıklı projemin ötenazi işlemi sırasında böbrek dışında göz, beyin, kalp, aort, karaciğer, akciğer, pankreas organları da alınmıştır. Yapılan literatür taramaları sonucunda, Resveratrol kullanımının bu organlar üzerinde de etkili olabileceği görülmüştür. Bu nedenle göz, beyin, kalp, aort, karaciğer, akciğer, pankreas organları ile çalışılması için gerekli izinin verilmesini saygılarımla arz ederim.



**Prof. Dr. E. Sevdâ MENEVŞE**

## EK-1. (devam) Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararları



T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
REKTÖRLÜĞÜ  
Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı

SAYI : B.30.2.GÜN.0.EU.00.00/ 92-18851  
KONU :

14. /11. / 2007

Sayın

Prof.Dr.Sevda MENEVŞE  
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı  
Öğretim Üyesi

Daha önce onay alan, G.Ü.ET-06.073 kod numaralı "*Streptozotocin ile oluşturulmuş diyabetli sıçanlarda Resveratrol kullanımı sonucunda Cyclooxygenase-1 (COX-1) ve Cyclooxygenase-2 (COX-2) genlerinin ekspresyonlarının araştırılması*" adlı çalışmanız hakkında vermiş olduğunuz 30.10.2007 tarihli dilekçeniz incelenmiş olup, Başkanlığımızca uygun görülmüştür.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

  
Prof.Dr.Gökman ALPASLAN  
Gazi Üniversitesi  
Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanı

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : YURTERİ, Buket  
 Uyuğu : T.C.  
 Doğum tarihi ve yeri : 28.02.1984, Heilbornn  
 Medeni hali : Bekar  
 Telefon : 0 (312) 326 00 10 / 1426  
 Faks : 0 (312) 326 00 87  
 e-mail : yurterib@gmail.com



### Eğitim

#### Derece

Yüksek Lisans

Lisans

Lise

#### Eğitim Birimi

Gazi Üniversitesi/S.B.E

Hacettepe Üniversitesi/Biyoloji

Yeşilyurt Lisesi

#### Mezuniyet Tari

Devam Ediyor

2006

2001

### İş Deneyimi

#### Yıl

2006-2009

2009-2011

2012-2014

2014-

#### Yer

Hacettepe Üniversitesi

HRS Hastanesi

Genoks A.Ş.

Dışkapı Hastanesi

#### Görev

Biyolog

Lab. Sorumlusu

Ar-ge müdürü

Biyolog

### Yabancı Dil

İngilizce

### Hobiler

Su sporları



*GAZİ GELECEKTİR..*