

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HAYVAN BESLEME VE BESLENME
HASTALIKLARI ANABİLİM DALI



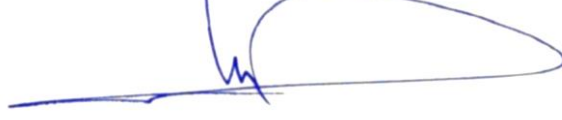
YÜKSEK YAĞLI
DİYET/STREPTOZOTOSİN İLE
İNDÜKLENEN DİYABETİK RATLARDA
MANGO GİNGER EKSTRAKTININ GSK-
3 β /Fyn/Nrf2 SİNYAL YOLAĞI ÜZERİNE
ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EMRAH YAZICI

2018

ONAY SAYFASI



Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.



Prof. Dr. Talar GÜLER

Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.


Doç. Dr. Cemal ORHAN



Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ



Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ



Doç. Dr. Cemal ORHAN





ETİK BEYAN

Kendime ait çalışmalar ile bu tez çalışmasını gerçekleştirdiğimi, çalışmaların planlanmasından, bulgularının elde edilmesine ve yazım aşamasına kadar tüm aşamalarında etiğe aykırı davranışım olmadığını, bu tezdeki tüm bilgileri ve verileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması içinde yer alan ancak bu tez çalışmasının bulguları arasında yer almayan verilere, bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

Veteriner Hekim Emrah YAZICI
02/08/2018

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Emrah Yazici".

Doç. Dr. Cemal ORHAN
Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı
02/08/2018

ELAZIĞ

TEŞEKKÜR

Öncelikle doktora öğrenimim süresince danışmanlığımı üstlenen ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Cemal ORHAN ve her konuda yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Kazım ŞAHİN ve Prof. Dr. Nurhan ŞAHİN hocalarıma teşekkürü bir borç bilirim. Bu çalışmadaki yardımlarından dolayı hocalarım; Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Dr. Öğr. Üyesi Mehmet TUZCU, Doktorant Füsun ERTEN, Hafize TELÇEKEN, Beşir ER ile Arş. Gör. Emre ŞAHİN'e teşekkür ederim. Ayrıca, FÜBAP–VF.17.20 nolu proje ile sağladığı maddi destekten dolayı Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Projeler Birimi ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Eğitimim süresince her türlü maddi ve manevi destekleriyle bana güç veren aileme şükranlarımı sunarım. Hayat arkadaşım sevgili eşim Ayfer AKALIN YAZICI'ya teşekkür ederim. Ayrıca tüm sevdiklerime teşekkürlerimi sunarım.

Emrah YAZICI

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI.....	ii
ETİK BEYAN.....	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLO LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
KISALTMALAR LİSTESİ.....	xi
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
3.1. Diabetes Mellitus	6
3.1.1. Tip 1 Diabetes Mellitus	8
3.1.2. Tip 2 Diabetes Mellitus	8
3.1.3. Gestasyonel Diabetes Mellitus.....	10
3.2. Deneysel Diabetes Mellitus Modeli	13
3.3. Obezite, Metabolik Sendrom ve Diabetes Mellitus	16
3.4. Diabetes Mellitusta Tedavi Yöntemleri.....	17

3.5. GSK3β / Fyn / Nrf2 Sinyal Yolağı	20
3.6. Mango Ginger	22
3.6.1. Mango Gingerin Antioksidan Aktivitesi	23
3.6.2. Mango Gingerin Antibakteriyel Aktivitesi	23
3.6.3. Mango Gingerin Lipitler, Trigliseritler ve Kolesterol Üzerine Etkisi..	23
3.7. Amaç	24
4. GEREÇ VE YÖNTEM	26
4.1. Gereç	26
4.1.1. Hayvan Materyali	26
4.1.2. Yem materyali	26
4.1.3. Kimyasallar ve Ayıraçlar	28
4.2. Yöntem	29
4.2.1. Deneme Düzeni	29
4.2.2. Sıçanlarda Diyabetin Streptozotosin ve Yüksek Yağlı Diyet ile İndüklenmesi	30
4.2.3. Canlı Ağırlıkların Belirlenmesi.....	32
4.2.4. Yem Tüketiminin Belirlenmesi	32
4.2.5. Örneklerin Alınması	33
4.2.5. Laboratuvar Analizleri	33

4.2.5.1. Biyokimyasal Parametrelerin Belirlenmesi	34
4.2.5.2. Serum İnsülin Seviyesinin Belirlenmesi	34
4.2.5.3. Serum Total Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesi	35
4.2.5.4. Serum ve Karaciğer Malondialdehit Seviyelerinin Belirlenmesi.....	35
4.2.5.5. GSK-3β, Fyn, Nrf2, Keap-1 ve HO-1 Protein Düzeylerinin Belirlenmesi	37
4.2.5.6. Histopatolojik İnceleme	40
4.2.6. İstatiksel Analizler	40
5. BULGULAR	41
6. TARTIŞMA	60
7. KAYNAKLAR	69
8. ÖZGEÇMİŞ.....	81

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Diabetes Mellitusun sınıflandırılması.	12
Tablo 2. Antidiyabetik özelliği olan çeşitli bitkiler ve aktif bileşenleri	19
Tablo 3. Sıçanlara verilen kontrol (bazal) ve yüksek yağlı diyetlerin bileşimi....	27
Tablo 4. Deneme Düzeni.....	30
Tablo 5. Mango Ginger ekstraktının yüksek yağlı diyet / streptozotosin ile indüklenen diyabetik sıçanlarda canlı ağırlık ve biyokimyasal parametreler üzerine etkisi.	42
Tablo 6. Mango Ginger ekstraktının yüksek yağlı diyet / streptozotosin ile indüklenen diyabetik sıçanlarda serum ve karaciğer malondialdehit ile total antioksidan kapasite üzerine etkisi.....	48

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Diabetes mellitusun patofizyolojisi	7
Şekil 2. DM2'nin Patogenezi.....	9
Şekil 3. DM2'de çoklu dokular arasındaki etkileşimlerin sadeleştirilmiş genel görünümü.	14
Şekil 4. Yüksek yağlı diyet ve streptozotosin uygulamasının etkileri	15
Şekil 5. Diabetes Mellitus ve GSK3 β /Fyn/Nrf2 sinyal yolağı arasındaki ilişki ..	21
Şekil 6. MG'nin kısımları.	22
Şekil 7. Mango Ginger ekstraktının yüksek yağlı diyet / streptozotosin ile indüklenen diyabetik sıçanlarda çalışma sonu canlı ağırlıkları üzerine etkisi.	43
Şekil 8. Mango Ginger ekstraktının yüksek yağlı diyet / streptozotosin ile indüklenen diyabetik sıçanlarda kan glikoz düzeyi üzerine etkisi.	44
Şekil 9. Mango Ginger ekstraktının yüksek yağlı diyet / streptozotosin ile indüklenen diyabetik sıçanlarda serum insülin düzeyi üzerine etkisi.	45
Şekil 10. Mango Ginger ekstraktının yüksek yağlı diyet / streptozotosin ile indüklenen diyabetik sıçanlarda serum malondialdehit üzerine etkisi.....	49
Şekil 11. Mango Ginger ekstraktının yüksek yağlı diyet / streptozotosin ile indüklenen diyabetik sıçanlarda karaciğer malondialdehit üzerine etkisi.....	50
Şekil 12. Mango Ginger ekstraktının yüksek yağlı diyet / streptozotosin ile indüklenen diyabetik sıçanlarda serum total antioksidan kapasitesi üzerine etkisi.	51

Şekil 13. Mango Ginger ekstraktının yüksek yağlı diyet / streptozotosin ile indüklenen diyabetik sıçanlarda glikojen sentaz kinaz 3 beta protein düzeyi üzerine etkisi.	52
Şekil 14. Mango Ginger ekstraktının yüksek yağlı diyet / streptozotosin ile indüklenen diyabetik sıçanlarda C-syn proto onkogen protein düzeyi üzerine etkisi.	53
Şekil 15. Mango Ginger ekstraktının yüksek yağlı diyet / streptozotosin ile indüklenen diyabetik sıçanlarda nükleer faktör eritroid 2 ilişkili faktör 2 protein düzeyi üzerine etkisi.	55
Şekil 16. Mango Ginger ekstraktının yüksek yağlı diyet / streptozotosin ile indüklenen diyabetik sıçanlarda Kelch benzeri ECH ilişkili protein 1 protein düzeyi üzerine etkisi.	56
Şekil 17. Mango Ginger ekstraktının yüksek yağlı diyet / streptozotosin ile indüklenen diyabetik sıçanlarda hem oksijenaz 1 protein düzeyi üzerine etkisi. Veriler kontrolün yüzdesi olarak, ortalama ve standart sapma olarak sunulmuştur.	58
Şekil 18. Mango Ginger ekstraktının yüksek yağlı diyet / streptozotosin ile indüklenen diyabetik sıçanlarda, karaciğer dokusu histopatolojik değişiklikleri üzerine etkisi.	59

KISALTMALAR LİSTESİ

ALT	:	Alanin Aminotransferaz
ANOVA	:	Varyans Analizi
APS	:	Amonyum Persülfat
AST	:	Aspartat Aminotransferaz
BSA	:	Sığır Serum Albümini
CFRD	:	Kistik Fbrozise Bağlı Diyabet
DAB	:	Diaminobenzidin
DM	:	Diabetes Mellitus
DM1	:	Tip 1 Diabetes Mellitus
DM2	:	Tip 2 Diabetes Mellitus
DPPH	:	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
ELISA	:	Enzim Bağlı İmmün Assay
GLUT2	:	Glikoz Transport Proteini 2
GS	:	Glikojen Sentaz
GSK-3	:	Glikojen Sentaz Kinaz-3
HDL	:	Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
HO-1	:	Hem Oksijenaz 1
HPL	:	İnsan Plasental Laktojen Hormonu
HPLC	:	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IA	:	Ada Hücresi Antijeni

IBDM	:	İnsülin Sentezine Bağımlı Diabetes Mellitus
IBODM	:	İnsülin Sentezine Bağımlı Olmayan Diabetes Mellitus
IRS	:	İnsülin Reseptör Substratı
Keap-1	:	Kelch benzeri ECH-ilişkili Protein- 1
LDL	:	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
MDA	:	Malondialdehit
MG	:	Mango Ginger
Nrf2	:	Nükleer Faktör Eritroid 2-İlişkili Faktör 2
PI3K	:	Fosfatidilinositol-3 Kinaz
PKB	:	Protein Kinaz B
PMSF	:	Fenil Metil Sülfonil Florid
SDS	:	Sodyum Dodesilsülfat
SF	:	Serum Fizyolojik
STZ	:	Streptozotosin
SYA	:	Serbest Yağ Asitleri
TAK	:	Total Antioksidan Kapasite
TCF7L2	:	Transkripsiyon faktörü 7-benzeri-2
TEMED	:	N, N, N', N', -tetrametil-ethylendiamin
UV	:	Ultraviyole
VLDL	:	Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
YYD	:	Yüksek Yağlı Diyet
ZnT	:	Çinko Taşıyıcı Protein

1. ÖZET

Dünya genelinde insidansı hızla artan diyabet ile mücadelede yeni stratejilerin araştırılması için sıklıkla hayvan modelleri kullanılmaktadır. Rodentlerde yüksek yağlı diyet (YYD) ve STZ uygulanması insan tip 2 diyabeti (DM2) için uygun bir modeldir. DM2 ve komplikasyonlarına karşı çeşitli fitokimyasalların koruyucu veya tedavi edici etkileri araştırılmaktadır. *Curcuma amada Roxb* (Mango Ginger, MG) tıbbi bitkiler alanında antioksidan ve antiinflamatuvar gibi farmakolojik ve biyolojik etkileri ile dikkat çekmektedir. Bu çalışmanın amacı; yüksek yağlı diyet (YYD) ve streptozotosinle (STZ) indüklenmiş diyabetik sıçanlarda, diyabetin olumsuz etkilerine karşı potansiyel koruyucu etkisi olabilecek MG ekstraktının etkilerinin belirlenmesi ile GSK-3 beta/Fyn/Nrf2 sinyal yolları üzerine MG ekstraktının nasıl etki edeceğinin ortaya konmasıdır. Çalışmada 28 adet erkek Wistar albino sıçan rastgele dört gruba ayrıldı; i) Kontrol Grubu; standart diyetle beslenen ratlar; ii) MG grubu: standart diyet+ MG (50 mg/kg/gün) uygulanan ratlar; iii) YYD grubu: YYD ile beslenen ve STZ, (40 mg/kg i.p.) uygulanan ratlar; iv) YYD+STZ+MG. Çalışma, 12 hafta süreyle devam ettirilmiştir. Diyabetik ratlarda glikoz, insülin ve bazı biyokimyasal değerler artış gösterirken ($P<0.01$), MG uygulaması bu durumu hafifletmiştir ($P<0.001$). Diyabetik sıçanlarda, serum ve karaciğer malondialdehit (MDA) artarken ($P<0.001$), total antioksidan kapasite (TAK) azalmıştır ($P<0.001$). YYD+STZ grubunda GSK-3 β , Fyn ve Keap-1 protein düzeyleri artarken Nrf2 ve HO-1 protein düzeyleri azalmış buna karşın MG uygulaması, diyabetik sıçanlarda tersine bir etki göstermiştir

(P<0.05). Diyabetik sıçanlarda MG uygulamasının biyokimyasal parametreleri iyileştirdiği ve GSK-3 beta/Fyn/Nrf2 sinyal yolaklarını regüle ederek antioksidan savunma mekanizmalarını iyileştirdiği ve böylece diyabet tedavisinde destekleyici ve komplikasyonları hafifletici özellik gösterdiği söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Mango ginger, yüksek yağlı diyet, streptozotosin, diyabet, sinyal yolakları

2. ABSTRACT

The Effect of Mango Ginger Extract on GSK-3 beta/Fyn/Nrf2 Signaling Pathway in High-Fat Diet/Streptozotocin-Induced Diabetic Rats

The animal models are often used to investigate new strategies against diabetes, which is a rapidly increasing ailment worldwide. High-fat diet (HFD) and streptozotocin (STZ) administration in rodents is a suitable model of human type 2 diabetes (DM2). The protective or therapeutic effects of various phytochemicals have been investigated against DM2 and its complications. *Curcuma amada* Roxb (Mango Ginger, MG) is well-known for its pharmacological and biological effects such as antioxidant and anti-inflammatory etc., in the field of medicinal plants. The aim of this study is; assessing the effects of MG extract which may have potent protective effects against the adverse effects of diabetes in high fat diet (HFD) and streptozotocin (STZ) induced diabetic rats, and it is exhibited how MG effects GSK-3 beta/Fyn /Nrf2 signaling pathways. A total of twenty-eight Wistar albino rats divided into four groups; i) Control group (non-diabetic rats) fed a regular diet; ii) MG group rats fed regular diet and administrated with MG (50 mg/kg BW per day); iii) HFD+STZ group rats fed an HFD and then injected STZ (40 mg/kg, i.p.); Group IV rats fed a HFD and administrated with MG (50 mg/kg BW); and iv) HFD+STZ+MG Group rats fed HFD and then injected STZ administrated with MG. The study conducted for 12 weeks. Blood glucose, insulin, and some biochemical values increased in diabetic rats ($P < 0.01$), however, MG administration alleviated this condition ($P < 0.001$). Serum and liver

malondialdehyde (MDA) increased ($P<0.001$) and total antioxidant capacity (TAK) decreased in diabetic rats ($P<0.001$). In the YYD + STZ group, GSK-3 β , Fyn, and Keap-1 protein levels increased while Nrf2 and HO-1 protein levels decreased, whereas MG administration had an adverse effect in diabetic rats ($P<0.05$). In diabetic rats, MG treatment improves biochemical parameters and regulates the GSK-3 beta / Fyn / Nrf2 signaling pathways, thereby improving the antioxidant defense mechanisms and thus alleviating supportive and complications in the treatment of diabetes.

Keywords: Mango ginger, high-fat diet, streptozotocin, diabetes, signaling pathways

3. GİRİŞ

Beslenme rejimlerinin bozulması ve hatalı beslenme gibi durumlar, birçok kronik hastalığın ortaya çıkma riskini artırmaktadır. Aşırı ve kontrolsüz tüketilen diyetler, özellikle yağ içeriği yüksek diyetler ve bunun yanında yetersiz fiziksel aktivite; insülin direnci, hiperlipidemi ve oksidatif stres gibi önde gelen bir obezite ve obeziteye bağlı diyabet ve birçok komplikasyona neden olabilmektedir (1, 2). Kronik olarak yağ içeriği yüksek beslenme rejimi obezite, diyabet ve metabolik sendroma neden olur (3). Epidemiyolojik çalışmalarda, obezite, dislipidemi, glikoz intoleransı ve hipertansiyon arasında bir ilişki gözlenmektedir (4). Deney hayvanlarında yüksek yağlı diyetle (YYD) besleme visceral obezite, insülin direnci, hiperlipidemi, hipertrigliseridemi, hiperinsülinemi ve glikoz intoleransı endotel disfonksiyonu ve hipertansiyon gibi metabolik değişikliklerle doğrudan ilişkilidir (1, 5).

Diabetes mellitus (DM), kronik komplikasyonlara neden olan mikrovasküler patoloji ile karakterize bir hastalıktır. Diyabet vakalarının yaklaşık %90'ı Tip 2 diyabettir (DM2) ve en önemli belirtisi de çoğunlukla obezite ve lipit bozukluklarıyla seyreden insülin direnci ve hiperglisemi tablosudur (6, 7).

Deneysel olarak oluşturulan diyabet modellerinde, çeşitli fitokimyasalların anti-diyabetik aktivite gösterdiği bildirilmektedir (7-9). Diyabet ve komplikasyonlarına karşı koruyucu veya tedavi edici fitokimyasalları konu alan birçok çalışma (10-13) yapılmakla beraber bu etkilerini nasıl ve hangi hücrel mekanizmalarla ortaya koyduğunun araştırılması gerekmektedir (14, 15).

Antioksidan özelliği bulunan Mango gingerin (MG) diyabet hastalığı ve komplikasyonlarına karşı hangi yolları nasıl etkilediğinin ortaya konması ve koruyucu veya tedavi edici stratejilerin geliştirilmesi önem arz etmektedir.

3.1. Diabetes Mellitus

İnsülin, başta glikoz olmak üzere sülfonilüreler ve arginin gibi uyarıcılara cevap olarak pankreasın β -hücrelerinden sentezlenen bir hormondur (16). DM dünya çapında yaklaşık 400 milyon insanı etkileyen (17), hiperglisemi ve pankreasta insülin üretiminin ve/veya insülinin hücreler üzerine etkisinin yetersizliği sonucu ortaya çıkan anormal protein, karbonhidrat ve lipid metabolizması ile devam eden bir grup metabolik bozukluktur (18). Özellikle kan damarları, gözler, böbrek, kalp, sinirler gibi çeşitli organ ve sistemler bu bozukluk sonucunda zarar görebilmektedirler (19, 20). Diyabette, hipergliseminin yanında ortaya çıkan hiperlipidemi ve oksidatif stres gibi faktörler de farklı komplikasyonlara yol açarak diyabetin patogenezinde rol oynamaktadır (21).

Fizyolojik koşullar altında gıda alımından sonra kan glikoz seviyesi artar ve pankreastan insülin sentezi uyarılarak glikozun hücre içine alınması sağlanır. İnsülin aynı zamanda glukagon adı verilen hormonun sentezini inhibe etmekte ve kan serumundaki yağ asit miktarını düşürerek karaciğerdeki glikoz üretiminde azalmaya sebep olmaktadır (21). Yetersiz insülin ya da insülin direnci dokuların yetersiz glikoz almasına neden olarak hücre içi hipoglisemi ve hücre dışı

hiperglisemi ile sonuçlanmaktadır. Bu durum DM'nin patofizyolojisinin temelini oluşturmaktadır (Şekil 1; 22).



Şekil 1. Diabetes mellitusun patofizyolojisi (22).

DM, insülin sentezine bağımlı (IBDM) yani tip 1 diabetes mellitus (DM1), insülin sentezine bağımlı olmayan (IBODM, DM2) ve gebelik sırasında görülebilen gestasyonel DM olmak üzere başlıca üç tipte sınıflandırılmaktadır (23, 24). Buna karşın diyabet sınıflandırılmasında, monogenik diyabet sendromu, kistik fibrozise bağlı diyabet, posttransplantasyon diyabet ve ilaç ve/veya kimyasal kullanımına bağlı diyabet gibi türleri içeren diğer/özel diyabet türleri olarak yeni bir sınıflandırma da bildirilmektedir (23).

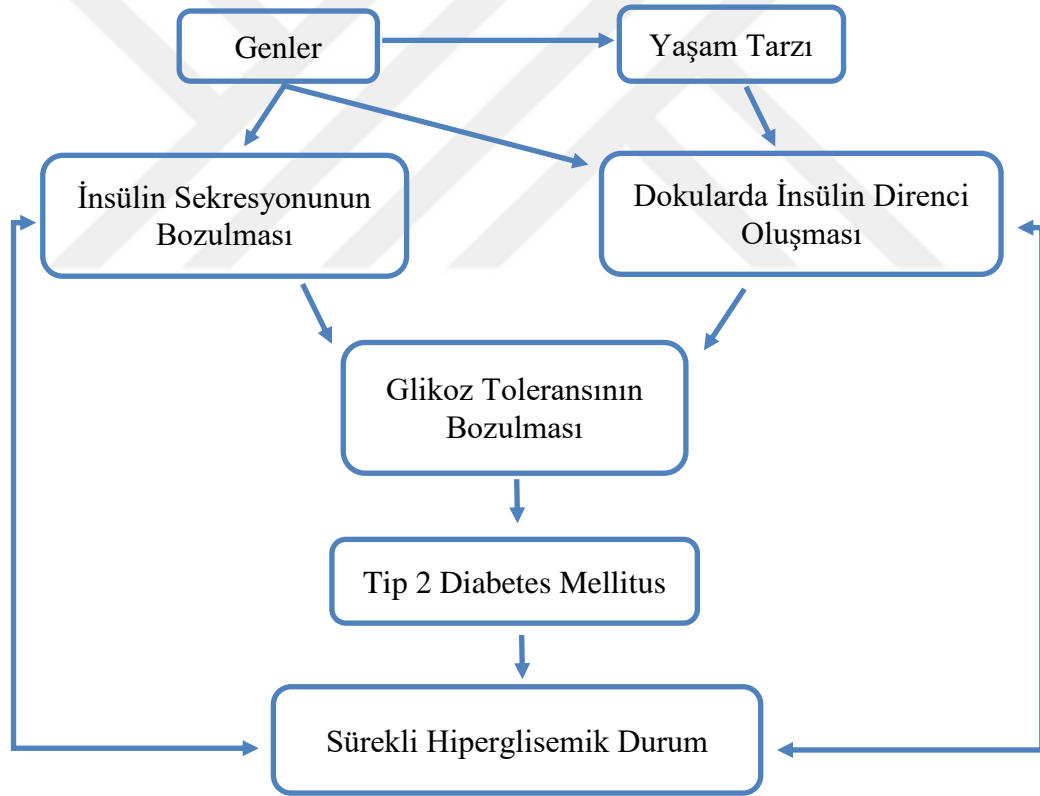
3.1.1. Tip 1 Diabetes Mellitus

Pankreasın β hücrelerinin fonksiyonunu yerine getirememesi ile meydana gelen insülin yetersizliği sonucu oluşan bu diyabet türü (25) çoğunlukla çocuklarda ve ergenlik dönemindeki bireylerde görülmektedir (24). DM1, esas olarak T-hücresi aracılı inflamatuvar yanıt (insülitis) ve aynı zamanda humoral (B-hücresi) yanıt yolu ile pankreasın β hücrelerinin oto-immün yıkımından kaynaklanmaktadır (22, 26). DM1'de pankreasın langerhans adacıklarındaki hücrelere karşı otoantikolar ortaya çıkmaktadır. Otoantikolar arasında adacık hücresi otoantikoları, insülin otoantikoları, glutamik asit dekarboksilaz, tirozin fosfataz IA-2 (ada hücresi antijeni), tirozin fosfataz IA-2 β ve çinko taşıyıcı protein (ZnT) otoantikoları bulunur (27). Bu pankreatik otoantikolar, DM1'in karakteristiğidir ve bu hastaların serumunda, hastalığın başlangıcından aylar veya yıllar önce saptanabilir (24, 28). Çoğunlukla genetik yatkınlık sonucu oluşan bu tip DM etiyojisinde virüsler, vitamin D yetersizliği, anne karnında kimyasal ajanlara maruz kalma, hijyen yetersizliği, obezite gibi bazı çevresel faktörler de yer alabilmektedir (17).

3.1.2. Tip 2 Diabetes Mellitus

Bu tip dünyada en yaygın DM tipidir ve görülme sıklığı giderek artmaktadır. DM2 insülin sekresyonunun bozulması, dokularda insülin direncinin oluşması ile ilgili genetik faktörlerin yanında obezite, aşırı beslenme, egzersiz

eksikliği, stres ve yaşlanma gibi çevresel faktörlerin birleşiminden kaynaklanan heterojen bir bozukluktur (29). Otoimmün bir bozukluk olmamasının yanında sorumlu genlerin karmaşıklığından dolayı çoğu hastada bu tipe yatkınlık gösteren duyarlı genler tanımlanmamış (22) olsa da Transkripsiyon faktörü 7-benzeri-2 (TCF7L2) geni türevlerinin bu diyabete yatkınlığı arttırdığı bildirilmektedir (30). DM2'nin genetik ilişkisi DM1'den daha karmaşıktır. DM2'nin patogenezi insülin sekresyonunun bozulması ve insülin direnci oluşması ile karakterizedir (Şekil 2; 22).



Şekil 2. DM2'nin Patogenezi (22, 23)

DM2’de hiperglisemi oluşumu yıllar içerisinde yavaşca gerçekleşip hastalarda şiddetli klasik diyabet semptomları gözlenmediğinden teşhisinin erken aşamada gerçekleştirilmesi zordur. DM2’li hastalar normal veya yükselmiş görünen insülin seviyelerine sahip olabilirken, yüksek kan şekeri düzeyinin daha yüksek insülin değerlerine yol açması β -hücre fonksiyonlarının normal olmasından kaynaklanmaktadır. Bu nedenle insülin sekresyonu kusurlu hale gelir ve insülin direncini telafi etmek için yeterli olmayabilir (23).

İnsülin direnci oluşmasının ardından pankreasta insülin üretiminin azalması ile hiperglisemi meydana gelir. Obezlik ve egzersizden yoksun yaşam tarzı insülin direncinin ortaya çıkmasının ana sebeplerindedir. DM2 genellikle genç yaşlarda görülmemektedir ancak yaşam tarzı, yanlış ve fazla beslenme, sağlıksız çevre koşulları gibi değişkenler obeziteye neden olarak erken yaşlarda DM2’nin görülme sıklığını arttırmış bulunmaktadır (23, 31).

3.1.3. Gestasyonel Diabetes Mellitus

Bu tip DM, gebelik esnasında kendini ilk kez gösteren bir glikoz tolerans bozukluğu olarak tanımlanabilir (32). Genellikle gebeliğin son 1/3’lük kısmında insan plasental laktojen hormonunun (HPL) insülinin dokulardaki etkisini inhibe etmesi ile ortaya çıkmaktadır (33). Gestasyonel diyabetin etkisi doğumdan sonra düzelmektedir. Ancak sonraki gebeliklerde de ortaya çıkabilmekte ve ilerleyen yaşlarda DM2’ye neden olabilmektedir (34).

3.1.4. Diğer/Özel Diyabet Türleri

Diğer/özel nedenlere bağlı spesifik tipler: Monojenik diyabet sendromları, ekzokrin pankreas hastalıkları, organ nakli sonrası, ilaç ve kimyasal maddelere bağlı diyabet gibi özel türler ve diğer diyabet türleri tablo 1’de sunulmuştur.

Monojenik diyabet sendromları, neonatal diyabet 6 aylık yaşın altındaki yeni doğanlarda ortaya çıkarken, DM1’in 6 aylık yaştan önce ortaya çıkması nadirdir. Bu diyabet türü geçici ya da kalıcı olabilmektedir (23). Gençlerde görülen Erişkin Tipi Diyabet genellikle 25 yaşın altında görülen erken yaşta hipergliseminin başlaması ile karakterizedir. Bu diyabette insülin sekresyonu bozulmakta ancak salınan insülinin etki yeteneğinde bir kayıp görülmemektedir (23).

Kistik fibrozise bağlı diyabet (CFRD), kistik fibrozisli ergenlerin yaklaşık %20’sinde ve yetişkinlerin %40-50’sinde meydana gelen en yaygın hastalıktır. DM1 ve DM2 ile karşılaştırıldığında CFRD hastaları daha kötü beslenme durumuna, daha şiddetli yangısal akciğer hastalığına ve yüksek mortaliteye sahiptirler (23).

Posttransplantasyon diyabet, organ transplantasyonundan sonra başlangıç zamanına bakılmaksızın ortaya çıkan diyabeti tanımlar. Böbrek transplantasyonu sonrasında alıcıların %90’ında hiperglisemi görülmektedir (35). Transplantasyon sonrası kullanılan bağışıklık baskılayıcı ajanlar hiperglisemiye neden olabilmektedir (23, 36).

Tablo 1. Diabetes Mellitusun sınıflandırılması (37).

I. Tip 1 Diyabetes Mellitus

- A. İmmun aracılıklı
- B. İdiyopatik

II. Tip 2 Diyabetes Mellitus

III. Gestasyonel Diabetes Mellitus

IV. Diğer/Özel Diyabet Türleri

A. Monogenik diyabet formları

- 2. Kromozom, KLF11 (MODY7)
- 2. Kromozom, NeuroD1 (MODY6)
- 7. Kromozom, Glukokinaz (MODY2)
- 7. Kromozom, PAX4 (MODY9)
- 8. Kromozom, BLK (MODY11)
- 9. Kromozom, CEL (MODY8)
- 11. Kromozom, INS (MODY10)
- 11. Kromozom, Neonatal DM (Kir6.2, ABCC8, KCNJ11 mutasyonu)
- 12. Kromozom, HNF-1a (MODY3)
- 13. Kromozom, IPF-1 (MODY4)
- 17. Kromozom, HNF-1b (MODY5)
- 20. Kromozom, HNF-4a (MODY1)
- Mitokondriyal DNA

B. İnsülinin etkisindeki genetik defektler

- Leprechaunizm
- Rabson-Mendenhall sendromu
- Lipoatrofik diyabet
- Tip A insülin direnci
- Diğer

C. Pankreasın ekzokrin doku hastalıkları

- Fibrokalkülöz
- Hemokromatoz
- Kistik fibroz
- Neoplazi
- Pankreatit
- pankreatopati
- Travma/pankreatektomi
- Diğer

D. Endokrinopatiler

- Akromegali
- Aldosteronoma
- Cushing sendromu
- Feokromositoma
- Glukagonoma
- Hipertiroidi
- Somatostatinoma
- Diğer

E. İlaç veya kimyasal ajanlar

- a -İnterferon
- Anti-viral ilaçlar
- Atipik anti-psikotikler
- b-adrenerjik agonistler
- Diazoksid
- Doku ve organ naklinde rejeksiyonunu önlemek için kullanılan ilaçlar
- Fenitoin
- Glukokortikoidler
- Nikotinik asit
- Pentamidin
- Proteaz inhibitörleri
- Statinler
- Tiroid hormonu
- Tiyazid grubu diüretikler
- Vacor
- Diğer

F. İmmun aracılıklı nadir diyabet formları

- Anti insülin-reseptör antikolları
- “Stiff-man” sendromu
- Diğer

G. Diyabetle ilişkili genetik sendromlar

- Alström sendromu
- Down sendromu
- Friedreich tipi ataksi
- Huntington korea
- Klinefelter sendromu
- Laurence-Moon-Biedl sendromu
- Miyotonik distrofi
- Porfiria
- Prader-Willi sendromu
- Turner sendromu
- Wolfram (DIDMOAD) sendromu

H. Enfeksiyonlar

- Koksaki
- Konjenital rubella
- Sitomegalovirus
- Diğerleri (adenovirüs, kabakulak)

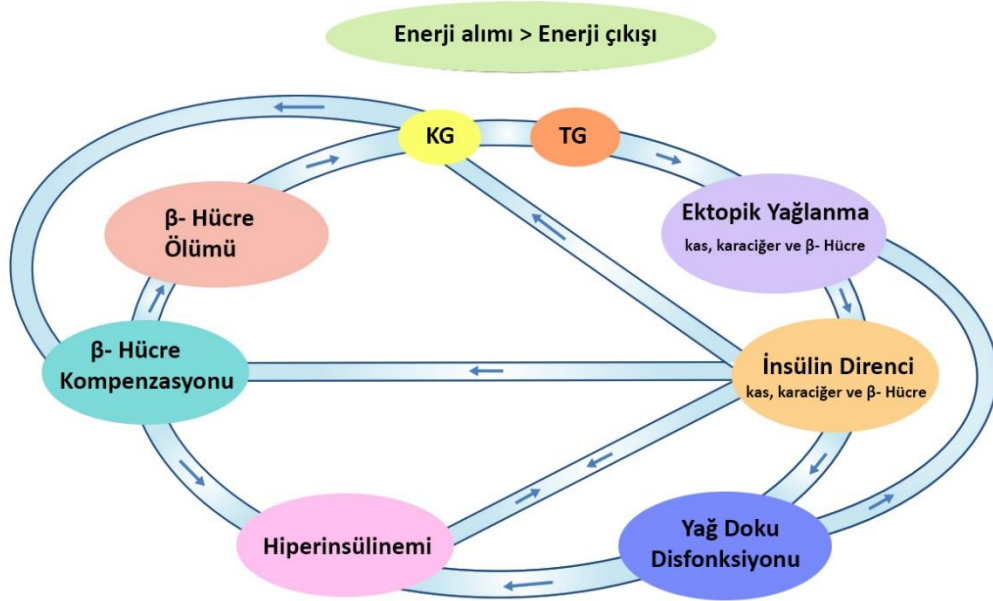
3.2. Deneysel Diabetes Mellitus Modeli

Deneysel diyabet modelleri sıçan, hamster, fare, kobay, tavşan, kedi ve köpek gibi deney hayvanları kullanılarak oluşturulabilmektedir (11, 38-40). DM modeli oluşturmak amacıyla streptozotosin (STZ) ve alloksan kullanılmakta olup fare ve sıçan en çok tercih edilen deney hayvanlarıdır. Kullanılan kimyasal ajanlar pankreasın langerhans adacıklarındaki β hücrelerinde hasara neden olarak ve insülin salınımını sekteye uğratmaktadır (40, 41).

Bir bakteri olan *Streptomyces achromogenes*'ten izole edilen STZ diyabet oluşturabilen dar spektruma sahip bir antibiyotiktir (40, 42). STZ, glikoz molekülü içeren zararlı bir glikoz analogudur ve glikoza benzer şekilde glikoz transport proteini 2 (GLUT2) aracılığı ile pankreasın β hücrelerine alınır (40, 43). STZ, pankreasın β hücrelerinin DNA'larının parçalanmasına ve sonrasında hücrelerin nekrozuna neden olarak insülin salınımını azaltmaktadır (40, 44, 45).

Yüksek doz STZ uygulaması, DM2'deki gibi insülin sekresyonunu ciddi şekilde bozar, aynı zamanda keton cisimcikleri oluşmasına neden olarak onların idrarda görülmesine de yol açabilir (46). Diğer yandan düşük doz STZ, DM2'nin son aşamasındaki gibi insülin sekresyonunda hafif bozulmaya neden olmaktadır (47, 48). Ancak düşük doz STZ DM2'deki gibi tipik insülin direnci aksisini oluşturamamaktadır (49). Bazı çalışmalar, YYD ile aşırı beslenen hayvanların insülin direnci geliştirdiklerini göstermiştir. Bu nedenle, periferik insülin direncini indüklemek için YYD ve ardından pankreas β -hücrelerini hedefleyen düşük dozda STZ'nin uygulandığı bir model, sadece fenotipi değil aynı zamanda insan

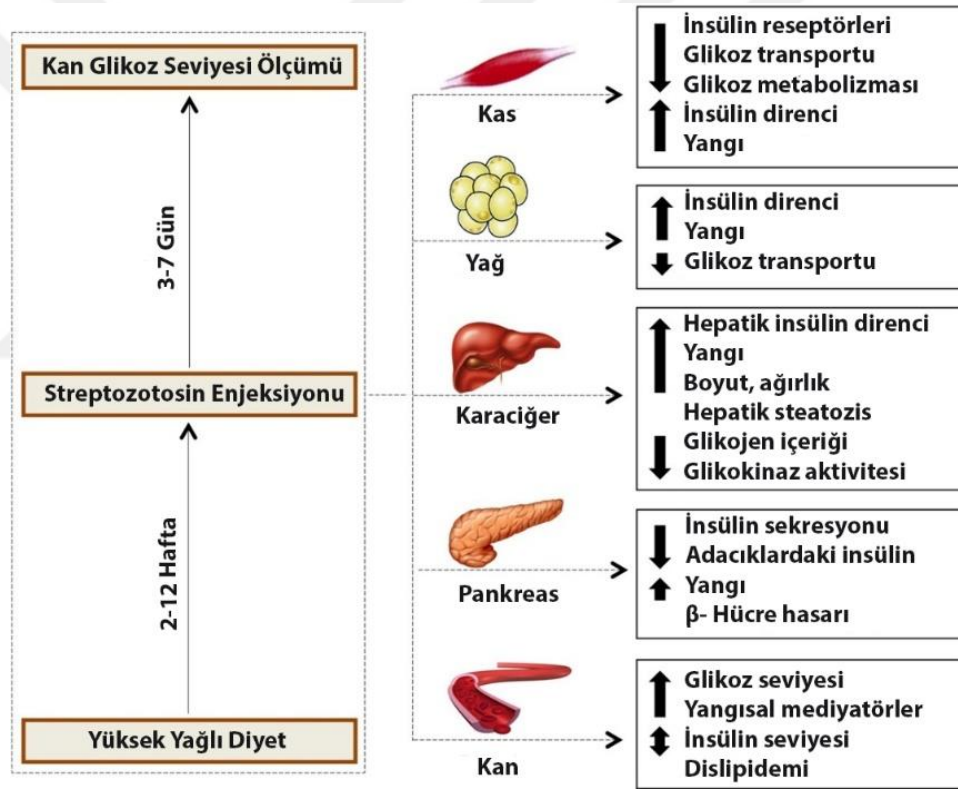
DM2'sinin patogenezi de taklit edebilmektedir (47, 48). Uzun vadede obeziteye yol açan aşırı beslenme, karaciğerin yanı sıra iskelet kasındaki insülin direncini de hızla uyarabilir. Yağ dokusunun şiddetli genişlemesi, disfonksiyonel adipositleri temsil eden yağ doku yangısı ile sıkı bir şekilde ilişkilidir. Yağ doku disfonksiyonu karaciğer, kas ve β -hücreleri gibi yağdoku dışındaki yerlerde ektojik yağlanmaya neden olmaktadır (50, Şekil 3). İnsüline dirençli kaslar daha düşük seviyede glikojen sentezleme kapasitesine sahip olduklarından kendine gelen glikozu tekrar karaciğere gönderir ve karaciğerdeki de novo lipogenez sonucu lipid birikimi meydana gelir. Karaciğerdeki yağ birikimi insülin direncini indükler, glikojen sentezini azaltır ve glikoneogenezisi artırır (50, 51).



Şekil 3. DM2'de çoklu dokular arasındaki etkileşimlerin sadeleştirilmiş genel görünümü. KG; Kan glikozu, TG; Trigliserid (50).

YYD ile beslenme belli bir süre uygulandıktan sonra insülin direncini meydana getirmekte ve diyabetin indüksiyonunu başlatabilmektedir (47, 52). Yapılan çalışmaların çoğunda en az 2 haftalık YYD uygulamasından sonra düşük dozda STZ enjeksiyonunu takip eden ilk 3-7 gün içerisinde kandaki glikoz seviyesi artmaktadır (53-56). STZ, YYD uygulamasından 8 hafta (57) veya 12 hafta (58) sonra da uygulanabilmektedir.

YYD ve STZ uygulamasının meydana getirdiği metabolik değişiklikler Şekil 4’te gösterilmektedir (5).



Şekil 4. Yüksek yağlı diyet ve streptozotocin uygulamasının etkileri (5).

3.3. Obezite, Metabolik Sendrom ve Diabetes Mellitus

Obezite, vücuda alınan enerjinin harcanan enerjiden fazla olması sonucu vücutta fizyolojik sınırın üzerinde yağ birikmesi olarak adlandırılabilen kronik bir hastalıktır (59, 60). Obezitenin aşırı olması durumunda kardiyovasküler hastalıklar, solunum sistemi hastalıkları, kanser ve diyabet gibi hastalıklar ortaya çıkabilmektedir (61). İnsanlar ve sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalar diyet ile tüketilen fazla yağın obezitenin ana sebeplerinden olduğunu doğrulamaktadır (62, 63). Özellikle hayvan iç yağı bulunan YYD ile beslenen sıçanlarda hiperglisemi, visceral yağlanma, hiperinsülinemi ve karaciğer yağlanması gibi bozukluklar gelişebilmektedir. Diyetle serbest yağ asitleri ve doymuş yağların fazla olması aynı zamanda metabolik hastalıklara ve yangısal cevabın kronik bir şekilde aktivasyonuna sebep olur (63, 64).

Obezite kalp hastalıklarını ve DM2 riskini arttıran metabolik sendrom ile ilişkilidir (31, 65). DM2'li ve DM riski bulunanlarda bazı önemli belirtiler görülebilir. Elma tipi vücut (santral obezite), yüksek tansiyon, dislipidemi, pıhtılaşma bozuklukları, endotelial fonksiyon bozukluğu ve kardiyovasküler morbidite bu belirtilerin en önemlileridir. Ana sebebinin insülin direnci olduğu kabul edilen bu belirtilerin hepsine birden metabolik sendrom denir (66).

İnsülin direnci, obezlerde diyabet oluşmasına neden olan önemli bir belirteç olarak kabul görmektedir (67). Obezlerde kas, karaciğer ve özellikle pankreasta oluşan yağlanma bu organların işlevlerinde azalmaya neden olmakta ve pankreasın β -hücrelerinden insülin salınımını azaltmaktadır. Obezite,

dokularda reseptör düzeyinde insülin direnci oluşturmasının yanında dolaşımdaki insülin seviyesini de düşürdüğü için glikoz intoleransı ve DM2 oluşumuna neden olmaktadır (68, 69).

3.4. Diabetes Mellitusta Tedavi Yöntemleri

DM tedavisi kan glikoz seviyesinin fizyolojik sınırlar içerisinde tutmak, hastalık sonucu ortaya çıkabilecek komplikasyonları önlemek ya da azaltmak için beslenme, spor ve çeşitli ilaçlar ile hastanın yaşam kalitesini arttırmaya yönelik yapılan uygulamaları kapsamaktadır (70). Medikal tedavide, insülin salgılatıcı (sülfonilüreler, glinidler) ve insülin duyarlılığını arttırıcı (biguanidler, tializolinedion) antidiyabetik ajanlar ile farklı etki süreleri olan sentetik insülinler kullanılabilir (71).

Beslenme rejiminin düzenlenmesi ile yapılan tedavi, hastanın daha sağlıklı bir şekilde beslenmesini sağlayıp kan şekeri seviyesini uygun seviyede tutarak, DM'nin komplikasyonlarını önler veya geciktirir ve böylece hastanın yaşam kalitesi arttırılmış olur (72).

DM'de alternatif tedavi çok önemli bir yere sahiptir. Konvansiyonel tedavi yanında kullanılan bitkisel ilaçlar IBODM durumlarında hipoglisemik etki oluşturarak tedaviye yardımcı olmaktadır (10, 73). Çeşitli fitokimyasalların antidiyabetik aktivite mekanizmaları gösterdiği (Tablo 2; 7-9, 13) ve komplikasyonlarına karşı etkili olduğu birçok çalışma ile gösterilmiştir (14, 15).

STZ ile diyabet oluşturulan sıçanlarda resveratrolün, oksidatif stresi baskılayarak, karaciğer dışı dokularda glikoz alım potansiyelini artırabildiği ve DM'nin komplikasyonlarını azaltabileceği bildirilmiştir (7).

Qiu ve ark. (74) sıçanlarda STZ ile oluşturulan DM'de siyah soya tohumu ve siyah soya tohumunun polifenolik ekstraktının pankreasın β hücrelerinden insülin salınımını arttırarak böbrekteki fonksiyon bozukluğunda potansiyel bir koruma sağladığını bildirmişlerdir.

Karlowicz-Bodalska ve ark. (12) ginger ailesinin bir üyesi olan zerdeçalın belirgin bir antioksidan ve antiinflamatuvar etki gösterdiğini, bazı sinyal moleküllerini baskılayarak DM'nin komplikasyonlarını azalttığını bildirmişlerdir. Sharma ve ark. (75) diyabet oluşturulan farelerde MG ekstraktı uygulanmasının glikoz toleransını iyileştirmekle birlikte anti-hiperglisemik ve orta düzeyde hipoglisemik etki gösterdiğini söylemişlerdir. MG ekstraktının sıçanlarda kullanımının hipotrigliseridemik (76) ve anti-hiperkolesterolemik etki gösterdiği bildirilmiştir (77).

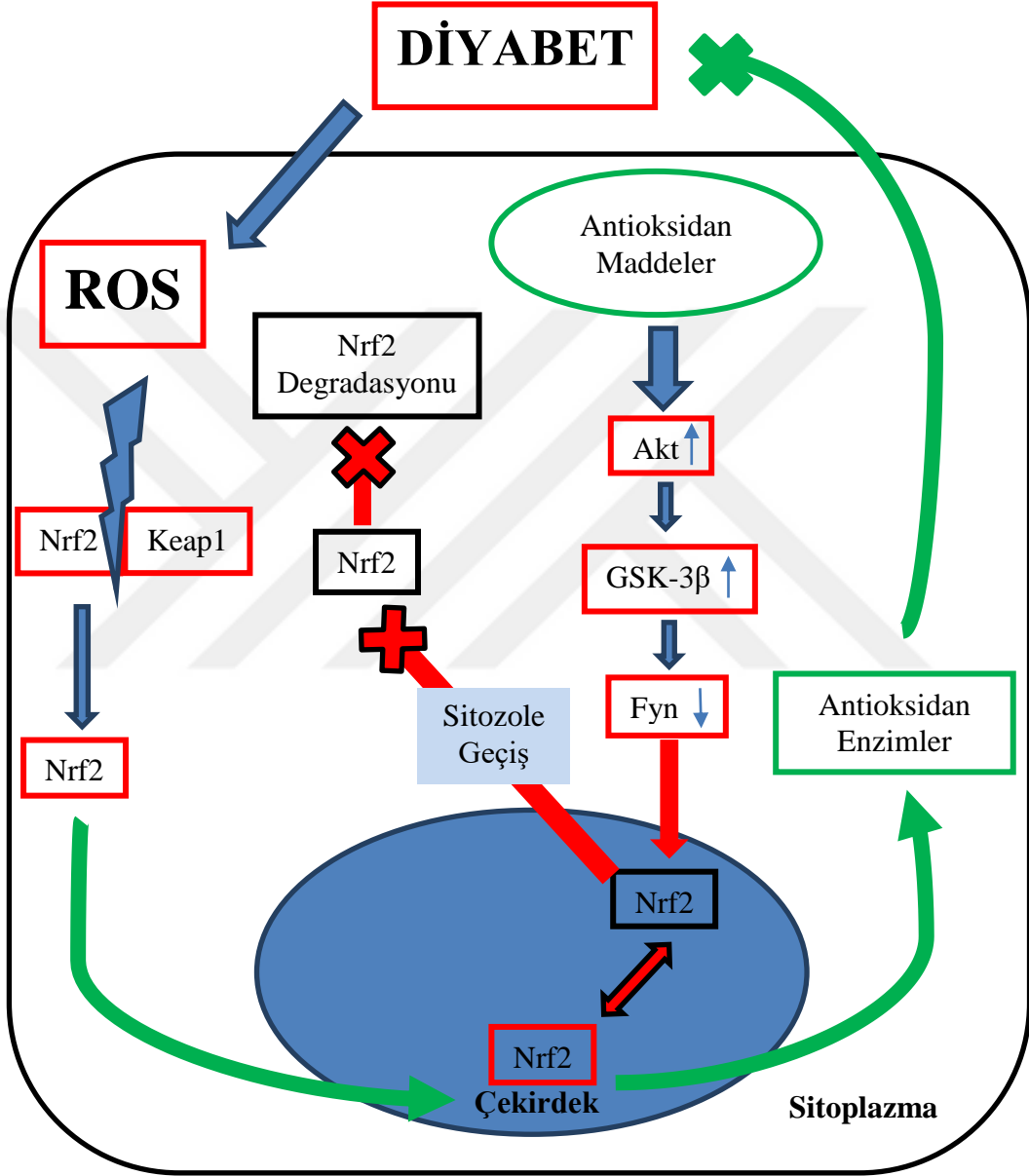
Tablo 2. Anti-diyabetik özelliği olan çeşitli bitkiler ve aktif bileşenleri (13).

Botanik Adı	Kullanılan Kısım	Ana Aktif Bileşen
<i>Allium sativum</i>	Soğanı	Allil propil disülfür, allisin
<i>Annona squamosa</i>	Meyve	Liriodenin, moupinamide
<i>Areca catechu</i>	Tohum	Arecaine ve iscoline
<i>Artemisia pallens</i>	Yaprakları ve çiçekleri	Germacranolide
<i>Azadirachta indica</i>	Yaprak, çiçek ve tohum	Azadirachtin ve nimbin
<i>Bauhinia forficata</i>	Yaprak	Astragalin, kaempferitrin
<i>Beta vulgaris</i>	Kök	Fenolikler, beta-siyaniler
<i>Boerhavia diffusa</i>	Bütün bitki	Punarnavine ve ursolic asit
<i>Camellia sinensis</i>	Yapraklar	Kafein ve kateşinler
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Kabuk	Cinnamaldehyde, eugenol
<i>Combretum micranthum</i>	Yapraklar	Polifenoller
<i>Gynandropsis gynandra</i>	Kök	N, N-dietiltolüamid
<i>Lantana camara</i>	Yapraklar	Lantoside, lantanon
<i>Momordica charantia</i>	Yapraklar	Charantin, sterol
<i>Ocimum sanctum</i>	Bütün bitki	Eugenol
<i>Panax quinquefolius</i>	Kök	Ginsenosides
<i>Parinari excelsa</i>	Kabuk	Myricetin, quercetin
<i>Phyllanthus amarus</i>	Bütün bitki	Phyllanthin
<i>Prunus amygdalus</i>	Tohumlar	Amigdalın
<i>Pterocarpus marsupium</i>	Bütün bitki	Kenotannik asit, piroatekin
<i>Punica granatum</i>	Meyve	Punicalagin, punicalin
<i>Ricinus communis</i>	Kök	Risinolik asit
<i>Salacia oblonga wall</i>	Kök kabuğu	Salacinol
<i>Sarcopoterium spinosum</i>	Kök	Kateşin ve epikateşin
<i>Tinospora cordifolia</i>	Kök	Tinosporon, tinosporik asit

3.5. GSK3 β / Fyn / Nrf2 Sinyal Yolağı

Nrf2, oksidatif ve elektrofilik stres karşısında bir sensör vazifesi gören, oksijen türevi serbest radikallere karşı hücre sel direnç üreten bir düzenleyicidir (78). Kelch benzeri ECH-ilişkili Protein- 1 (Keap-1) Nrf2'nin transkripsiyonel aktivasyonu ile ilişkilidir (79). Bu iki transkripsiyon faktörünün birlikte buldukları sinyal yolağı Diyabet hastalığına karşı dirençte büyük öneme sahiptir. Diyabette Nrf2'nin bozulmuş aktivasyonu oksidatif strese karşı metabolik savunmanın düşmesi ile ilişkilidir ve Nrf2/Keap1 sinyal yolağının modülasyonu diyabet ve ilişkili hastalıkların tedavisinde önemli bir potansiyel arz etmektedir (80). Yapısal olarak aktif bir kinaz olan GSK-3, glikojen sentaz (GS) ve diğer substratların fosforilasyonu ile vücut metabolizmasını düzenleyen bir kinazdır. Yapılan çalışmalar, GSK-3'ün Alzheimer hastalığı ve DM2'nin altta yatan yaygın patolojisinde yer aldığını göstermektedir (81). Tirozin kinazların Src ailesinin bir üyesi olan Fyn, çeşitli hücre tiplerinde hücre iskelet sisteminin yeniden modellenmesinde kilit bir düzenleyicidir (82). Fyn, Nrf2'nin negatif bir düzenleyicisidir ve sitoplazmaya Nrf2'yi vermek için çekirdeklere girer. Yang ve ark. (83) diyabet kaynaklı nefropatiye karşı çinko takviyesi yaparak çinkonun, Akt fosforilasyonu ve GSK-3 β fosforilasyonunu arttırırken Fyn nükleer translokasyonunda bir azalma ile birlikte Nrf2'nin de sitoplazmaya aktarılmasının gerçekteştiğini bildirmişlerdir. Nrf2, bir Nrf2 negatif düzenleyicisi olan Fyn'in aktivasyonu için GSK-3 β tarafından hedeflenmektedir ve diyabet oluşturulan ratlarda biyoaktif bir bileşen olan sülforafan uygulanması sayesinde,

GSK3 β /Fyn/Nrf2 sinyal yolağı (Şekil 5) aracılığı ile diyabet komplikasyonlarında kısmi bir iyileşme gösterilmiştir (84).



Şekil 5. Diabetes Mellitus ve GSK3 β /Fyn/Nrf2 sinyal yolağı arasındaki ilişki (84-87).

3.6. Mango Ginger

MG (*Curcuma amada Roxb.*) karakteristik ham mango aroması nedeniyle MG olarak bilinen ve tıbbi bitkiler alanında incelenen önemli bir türdür (Şekil 6). MG fitokimyasal, farmakolojik ve etnobotanik çalışmaları ile öne çıkmaktadır. MG, biyomedikal önemi olan 130'dan fazla kimyasal bileşeni içermekte ve antibakteriyel, insektisit, antifungal ve antioksidan özellikleri araştırılmaktadır. Bu maddenin farklı potansiyel biyolojik özelliklerini öğrenmek, gelecekteki çalışmaları planlamak ve MG'nin sürdürülebilir kullanımını teşvik etmek için bir temel oluşturacak yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (88, 89).



Şekil 6. MG'nin kısımları. (A) Bitkisi, (B) Kökleri, C; Kökün yatay kesiti (90).

3.6.1. Mango Gingerin Antioksidan Aktivitesi

MG'nin farklı ekstraktlarının DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radikal temizleme aktivitesi, süperoksit radikali temizleme aktivitesi, metal şelatlama aktivitesi ve lipit peroksidasyon aktivitesi gibi farklı antioksidan aktivite analizleri ile antioksidan özelliği olduğu gösterilmiştir (91).

3.6.2. Mango Gingerin Antibakteriyel Aktivitesi

MG'den izole edilen yeni ve doğal bir antibakteriyel bileşik (difurocumenonol), gram-negatif ve gram-pozitif bakteriler dahil olmak üzere bakterilere karşı antibakteriyel aktivite göstermektedir (91). MG'nin tek başına ve zerdeçal ile birlikte, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı antibakteriyel aktivitesi gösterilmiştir (92).

3.6.3. Mango Gingerin Lipitler, Trigliseritler ve Kolesterol Üzerine Etkisi

MG'nin kloroform ekstraktı, hipertrigliseridemi diyetindeki sıçanlarda karaciğer ve serum trigliseridleri, karaciğer toplam lipitlerinin düşüşüne, normal diyetle beslenen sıçanlarda serbest yağ asitleri ve karaciğerdeki toplam lipitler ile serum total lipitlerinde önemli düşüslere neden olmaktadır (76). Yapılan bir çalışmada 4 hafta boyunca normal diyetle beslenen yetişkin dişi wistar

sıçanlarında MG (%10) karaciğer ve serum trigliseritlerini düşürmüştür (93). Alloksan aracılığı ile diyabet oluşturulan farelerde MG'nin metanol ekstraktı kullanılarak yapılan bir çalışmada bu ekstraktın pankreastan insülin salınımını uyardığı, glikoz toleransının iyileştiği, antihiperglisemik ve antihiperkolestrolemik etki gösterdiği görülmüştür (75).

3.7. Amaç

Dünya genelinde insidansı hızla artan diyabet ile mücadelede yeni stratejilerin araştırılması için sıklıkla hayvan modelleri kullanılmaktadır. Rodentlerde insülin direncini indüklemek için yüksek yağlı diyet (YYD) ve ardından pankreas β -hücrelerini hedefleyen STZ uygulanması modeli, sadece fenotipi değil aynı zamanda insan tip2 diyabetinin (DM2) patogenezi de taklit edebilmektedir (5, 23). DM2 diyabete ve komplikasyonlarına karşı çeşitli fitokimyasalların koruyucu veya tedavi edici etkileri araştırılmaktadır (15, 23, 41). Mango ginger (*Curcuma amada Roxb.*) tıbbi bitkiler alanında antioksidan, antibakteriyel, antifungal ve antiinflamatuvar gibi farmakolojik ve biyolojik etkileri ile dikkat çekmektedir (88, 90). MG'nin potansiyel biyolojik özelliklerini öğrenmek, gelecekteki çalışmaları planlamak ve MG'nin sürdürülebilir kullanımını teşvik etmek için bir temel oluşturacak yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmanın amacı; yüksek yağlı diyet (YYD) ve streptozotosinle (STZ) indüklenmiş diyabetik sıçanlarda, diyabetin olumsuz etkilerine ve bazı komplikasyonlarına karşı potansiyel koruyucu etkisi olabilecek

Mango ginger (MG) ekstraktının etkilerinin belirlenmesi ve bu etkilerin gerçekleşmesinde diyabet ve antioksidan savunma mekanizmalarında rol oynayan GSK-3 beta/Fyn/Nrf2 sinyal yolaklarının üzerine mango ginger ekstraktının nasıl etki edeceğinin ortaya konmasıdır.



4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Gereç

4.1.1. Hayvan Materyali

Araştırmada, Fırat Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi (FÜDHAM) aracılığı ile temin edilen sekiz haftalık yaşta 193.9 ± 13.4 g ağırlığında 28 adet Wistar Albino ırkı erkek sıçan kullanıldı. Araştırmada kullanılacak hayvan materyali için Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun (FÜHADEK) 28.07.2017 tarihli, 2017/89 protokol numaralı ve 169 numaralı kararı ile etik kurul izni alındı. Sıçanlara 12 saat aydınlık/12 saat karanlık aydınlatma periyodu uygulandı. Sıçanlar ortamın sıcaklığı 22 ± 2 °C, nispi nemi 55 ± 5 olacak şekilde ayarlanan, kontrollü havalandırma sistemi olan bir ortamda özel olarak barındırıldı ve gün aşırı altları temizlenerek kafeslerde beslendi. Sıçanlar, uygulamadan önce 10 gün süre ile standart şartlara adapte edildi.

4.1.2. Yem materyali

Araştırmada kullanılan ve bileşimi tablo 3'te verilen kontrol (bazal) ve YYD Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı Laboratuvarlarında saf hammaddeler kullanılarak literatürde belirtilen oranlarda (9, 94, 95) hazırlandı. Kontrol diyeti için kalorinin %12'si yağdan sağlanırken, YYD için kalorinin %42'si yağdan sağlandı.

Tablo 3. Sıçanlara verilen kontrol (bazal) ve yüksek yağlı diyetlerin bileşimi

Hammadde, %	Kontrol (Bazal) Diyet	Yüksek Yağlı Diyet (YYD)
Kazein	20.00	20.00
Mısır Nişastası	57.95	15.00
Sükroz	5.00	14.95
Soya Yağı	7.00	-
Sığır Don Yağı (İç yağı)	-	40.00
Seluloz	5.00	5.00
Vitamin-mineral karışımı*	4.50	4.50
L-sistein	0.30	0.30
Kolin bitartarat	0.25	0.25

*Vitamin-mineral karışımının kilogramı; 1.8 mg tüm-trans retinil asetat (A vitamini), 0.025 mg kolekalsiferol (D Vitamini), 12.5 mg tüm rac-alfa-tokoferol asetat (E vitamini), 1.1 mg menadion sodyum bisulfid (K3 Vitamini), 1.1 mg tiyamin (Vitamin B1), 4.4 mg ribolavin (Vitamin B2), 35 mg niasin (Vitamin B3), 10 mg kalsiyum pantotenat (B5 vitamini), 2.2 mg Vitamin B6, 0.02 Vitamin B12, 0.55 mg folik asit, 0.1 mg d-biyotin, 40 mg Mn (MnO), 12.5 mg Fe (FeSO₄), 25 mg Zn (ZnO), 3.5 mg Cu (CuSO₄), 0.3 mg I (KI), 0.15 mg Se (Na₂SeO₃), 175 mg kolin klorit (C₅H₁₄ClNO).

4.1.3. Kimyasallar ve Ayıraçlar

Mango Ginger ekstraktı (Mango Ginger Ekstract, OmniActive Health Technologies Ltd. Thane, Hindistan)

Streptozotosin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Amerika)

Sitrik Asit ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$, Sigma-Aldrich, Steinheim, Almanya)

Disodyum hidrojen fosfat ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, Merck, Darmstadt, Almanya)

Perklorik asit ($HClO_4$, Riedel-de Haen, Seelze, Almanya)

Butil hidroksi tolüen ($C_{15}H_{24}O$, Merck, Darmstadt, Almanya)

1,1,3,3-tetraetoksi-prooan, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Almanya)

Potasyum dihidrojen fosfor (KH_2PO_4 , Merck, Darmstadt, Almanya)

Methanol (CH_4O , Sigma-Aldrich, Steinheim, Almanya)

Nonidet-P40 ($(C_2H_4O)_n C_{14}H_{22}O$, Sigma-Aldrich, Steinheim, Almanya)

HEPES ($C_8H_{18}N_2O_4S$, Sigma-Aldrich, Steinheim, Almanya)

Potasyum klorit (KCl , Merck, Darmstadt, Almanya)

Magnezyum klorür ($MgCl_2$, Merck, Darmstadt, Almanya)

EDTA (Titriplex, $C_{10}H_{16}N_2O_8$, Merck, Darmstadt, Almanya)

PMSF (Fenilmetilsülfonil-florür, $C_7H_7FO_2S$, Merck, Darmstadt, Almanya)

Sodyum klorit ($NaCl$, Sigma-Aldrich, Steinheim, Almanya)

Akrilamid (C_3H_5NO , Merck, Hohenbrunn, Almanya)

Bis-akrilamid (C_3H_5NO , Merck, Hohenbrunn, Almanya)

Albümin fraksiyonu (Albumin fraction V, Merck, Darmstadt, Almanya)

Tween-20 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Almanya)

Diaminobenzidin (Amresco DAB tablets, LLC, Ohio, Amerika)

Tris ($H_2NC(CH_2OH)_3$, Merck, Darmstadt, Almanya)

Glisin ($C_2H_5NO_2$, Bioshop, Burlington, Kanada)

Sodyum Hidroksit ($NaOH$, Merck, Darmstadt, Almanya)

4.2. Yöntem

4.2.1. Deneme Düzeni

Toplam 28 adet Wistar Albino ırkı erkek sıçan her gruptaki hayvan sayısı yedi olacak şekilde rastgele dört gruba ayrıldı (Tablo 3). Gruplar;

- i) Kontrol (n=7): Kalorinin %12'sinin yağdan sağlandığı standart diyet ile beslenen ve serum fizyolojik (SF) (1ml/kg sıçan) verilen sıçanlar,
- ii) MG (n=7): Kalorinin %12'sinin yağdan sağlandığı standart diyet ile beslenen ve 50 mg/kg/gün dozunda oral gavaj ile MG ekstraktı verilen sıçanlar,
- iii) YYD+STZ (n=7): Kalorinin %42'sinin yağdan sağlandığı YYD ile beslenen ve 40 mg/kg intraperitoneal (i.p., periton-içi) dozunda streptozotosin enjeksiyonu yapılan sıçanlar,
- iv) YYD+STZ+MG (n=7): YYD ile beslenen, STZ enjeksiyonu yapılan ve gavaj yolu ile MG verilen sıçanlar şeklinde olarak düzenlendi.

Çalışmada kullanılan MG ekstraktı ticari bir firmadan temin edildi. MG ekstraktı 50 mg/kg dozunda içme suyunda çözdürülerek hazırlandı ve oral gavaj ile uygulandı. Gavaj uygulamasında hacim hayvan başına 1ml miktarını geçmeyecek şekilde ayarlandı. Çalışmada kullanılan YYD ve düşük doz STZ (40 mg/kg i.p.) uygulaması ile sıçanlarda diyabetin indüklenmesi sağlandı (6, 96-98). Ayrıca, kontrol gruplarına (kontrol ve MG grupları) STZ uygulamasına plasebo olarak hayvan başına 1 ml i.p. pH 4.5 citrat tamponundan uygulama yapıldı.

Benzer şekilde MG ekstraktı verilmeyen gruplara (Kontrol ve STZ+YYD grupları) plasebo olarak oral gavaj ile hayvan başına 1 ml içme suyu verildi. Sıçanlara kontrol ve deneme diyetleri ile su *ad libitum* olarak verildi.

Tablo 4. Deneme Düzeni.

No	Grup Adı	Diyet	STZ uygulaması	MG uygulaması
1	Kontrol	Bazal	-	-
2	MG	Bazal	-	+ (50 mg/kg oral gavaj)
3	YYD+STZ	YYD	+ (40 mg/kg i.p.)	-
4	YYD+STZ+MG	YYD	+ (40 mg/kg i.p.)	+ (50 mg/kg oral gavaj)

MG: Mango Ginger; YYD: Yüksek yağlı diyet; STZ: Streptozotosin; i.p.: intraperitoneal (periton-içi).

4.2.2. Sıçanlarda Diyabetin Streptozotosin ve Yüksek Yağlı Diyet ile İndüklenmesi

İnsan DM2 modeli için hayvan modelleri mükemmel olmasa da, sıçanlarda YYD ve STZ modeli; uygun maliyeti, kolay ulaşılabilir olması, uygulama

kolaylığı, stabil ve uzun süreli hiperglisemi ve benzeri semptom ile komplikasyonları meydana getirmesi nedeniyle tercih nedenidir (5).

Sıçanlarda diyabetin indüklenmesi 12 hafta süre ile YYD (Tablo 2) beslemesi ardından tek ve düşük doz STZ (40 mg/kg i.p.) uygulaması yapılarak sağlandı (96-98). Hayvanlar 15 gün YYD ile beslendikten sonra STZ uygulaması yapıldı. STZ uygulamasından 72 saat sonra açlık kan glikoz değeri 200 mg/dL üzerinde olan sıçanlar diyabetli kabul edildi (5, 23, 99). Açlık kan şekeri yükselmeyen sıçanlar için tekrar STZ uygulaması yapıldı. Streptozotosin pH seviyesi 4,5 olan 0.1 M sodyum sitrat tamponu içinde çözülerek hazırlandı. STZ hazırlanırken; 1.05g sitrik asit, SF ile son hacim 50 ml olacak şekilde çözdürüldü (A solüsyonu). Disodyum hidrojen fosfattan 3.6 g alınarak son hacim 40 ml olacak şekilde SF ile çözdürüldü. Ortalama canlı ağırlığı 200 g kabul edilen sıçanlar için 40 mg/kg dozu üzerinden hayvan başına 8 mg/ml/rat olacak şekilde STZ, pH:4.5 olacak şekilde 45 ml (25 ml Solüsyon A+ 20 ml Solüsyon B) çözücüde hazırlandı. Optimum STZ dozu uygulaması için hayvanlara bireysel işaretleme yapılarak her sıçanın canlı ağırlığına göre STZ uygulama miktarı ayarlandı. Örnek olarak; STZ 200 g ağırlığındaki bir sıçan için 1 ml olarak uygulanırken, 190 g ağırlığındaki bir sıçana 0.95 ml enjekte edildi. STZ uygulamaları günlük taze hazırlanan solüsyondan intraperitoneal (i.p., periton-içi) olarak uygulandı. STZ enjeksiyonundan önce sıçanların kuyruk veninden açlık kan glikoz seviyeleri ölçüldü. STZ enjeksiyonundan 72 saat sonra açlık kan şekerleri 200 mg/dl seviyesini aşan sıçanlar diyabetik olarak kabul edildi (5, 23,

99). Kandaki glikoz konsantrasyonu şeker ölçüm cihazı (Glukometre, Accu-Check Active, Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) kullanılarak ölçüldü. Açlık kan şekeri ölçümleri için hayvanlar bir gece öncesinden aç bırakılırken içme suyu *ad libitum* uygulandı. Çalışma süresince (12 hafta) ilgili gruplarda yer alan sıçanlar (YYD+STZ ve YYD+STZ+MG grupları) *ad libitum* olarak YYD ile beslendi.

4.2.3. Canlı Ağırlıkların Belirlenmesi

Hayvanların canlı ağırlıkları bireysel kuyruk işaretlemesi yapılarak, 1 g hassasiyetteki terazi (Denver DL-3, Amerika) yardımıyla belirlendi. Canlı ağırlıklar çalışma başlangıcı, STZ uygulamaları öncesi, kontrolleri ve çalışma sonunda bir gece aç bırakılan hayvanlarda günün aynı saatlerinde ve aynı terazi ile kaydedildi.

4.2.4. Yem Tüketiminin Belirlenmesi

Hayvanların yem tüketimleri haftalık olarak tespit edildi. Buna göre; her hafta yemliklerde kalan yem miktarı o hafta verilen toplam yem miktarından çıkartılarak belirlendi. Hayvan başına günlük ortalama yem tüketimleri, grubun her hafta tükettiği yem miktarının, gün sayısı (yedi) ile o gruba ait hayvan sayısına bölünmesi şeklinde hesaplandı.

4.2.5. Örneklerin Alınması

Sıçandan 12 haftalık çalışma sonunda, dekapitasyon ile kan ve doku örnekleri alındı. Kan örnekleri jelli biyokimya tüplerine (Standardplus & Medical Co., Ltd., Almanya) alınarak soğutmalı santrifüjde (Universal 320R, Hettich, Almanya) 5000 rpm devirde 10 dakika santrifüj edilerek hayvanlara ait serum örnekleri elde edildi. Elde edilen serumlar mikro santrifüj tüplerine (Eppendorf, Hamburg, Almanya) bölünerek analizler için ayrıldı. Ayrıca sıçanların karaciğer dokuları hızlı bir şekilde çıkarılarak bir kısmı protein analizleri için buz içerisine plastik kilitli poşetlere alındı, karaciğer dokusu için bir kısım da histopatolojik incelemeler için %10'luk formol içerisine alındı. Serum ve doku (histopatolojik örnekler hariç) örnekleri analiz edilinceye kadar derin dondurucuda (Hettich Fereezer, Almanya) -80 °C'de muhafaza edildi.

4.2.5. Laboratuvar Analizleri

Laboratuvar analizleri, Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalında bulunan Yem Analizi laboratuvarları, Moleküler Analiz laboratuvarı, HPLC Ünitesi ile Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında yer alan mikroskop laboratuvarında gerçekleştirildi.

Laboratuvar analizlerinde, distile su (GFL 2004, Burgwedel Almanya) ve ultra saf su sistemi (Human Power I Scholar-UV, Kore) ile üretilen 18.3 MΩ kalitede ultra saf su kullanıldı.

4.2.5.1. Biyokimyasal Parametrelerin Belirlenmesi

Serum örneklerinde biyokimyasal parametrelerden glikoz, alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), kolesterol, trigiliserid, kreatin ve üre konsantrasyonları ticari çoklu test kartuşları ile çalışan otoanalizör cihazı (Samsung Labgeo PT10, Suwon, Güney Kore) kullanılarak belirlendi (94).

4.2.5.2. Serum İnsülin Seviyesinin Belirlenmesi

Sıçanlarda serum insülin seviyesi enzim bağlı immün assay (ELISA, Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) yöntemi ile sıçan uyumlu ticari ELISA kiti yardımıyla (Elabscience, Wuhan, Çin) belirlendi Serum örneklerinde insülin düzeyi ticari kitte belirtilen yöntemle, ELISA sisteminde (ELx800; BioTek ELISA Okuyucu ve ELx50 Yıkayıcı Sistem BioTek, VT, Amerika) çalışıldı ve sonuçlar KCjunior paket programı (KCjunior software 1,3 BioTek VT, Amerika) yardımıyla hesaplandı. ELISA TAC ölçümü için çalışma içi ve çalışmalar arası varyasyon katsayısı (intra- ve inter assay CV) oranları <%10 olarak verildi ve sonuçlar, mIU/L olarak hesaplandı.

4.2.5.3. Serum Total Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesi

Sıçanlarda serum total antioksidan kapasite (TAK) değeri ticari ELISA kiti yardımıyla (Rel Assay Diagnostics, Mega Tıp Sanayi ve Ticaret Limited Şirketi, Gaziantep, Türkiye) belirlendi (100, 101). TAK yöntemi, serumdaki antioksidanlar ile koyu mavi-yeşil renkli 2,2'-azino-bis (3-etilbenz-tiyazolin-6-sülfonik asit) ABTS radikalinin karakteristik renginin ağartılmasına dayanmaktadır (100). Serum örneklerinde TAK düzeyi ticari kitte belirtilen yöntemle, ELISA sisteminde (ELx800; BioTek ELISA Okuyucu ve ELx50 Yıkayıcı Sistem BioTek, VT, Amerika) çalışıldı ve sonuçlar KCjunior paket programı (KCjunior software 1,3 BioTek VT, Amerika) yardımıyla hesaplandı. ELISA TAK ölçümü için çalışma içi varyasyon katsayısı (intra-assay CV) %2.8 ve çalışmalar arası varyasyon katsayısı (inter assay CV) %3.3 olarak verildi ve sonuçlar, mmol/L Trolox eşdeğerinde ifade edildi.

4.2.5.4. Serum ve Karaciğer Malondialdehit Seviyelerinin Belirlenmesi

Serum ve karaciğer örneklerinin malondialdehit düzeyleri yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High Performance Liquid chromatography, HPLC) ile belirlendi (8, 102).

Serum örneklerinin ekstraksiyonu için, 1.5 ml hacimli mikrosantrifüj tüplerine 400 µl serum alındı. Örneklerin üzerine proteinleri çöktürmek için 300 µl 0.5 M perklorik asit (HClO₄, %60) eklenerek vorteksle karıştırıldıktan 5000 rpm devirde 4 C°'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant dikkatlice viallere alınarak serumların ekstraksiyon işlemi tamamlandı. Karaciğer doku örneklerinin ekstraksiyon işlemi için; karaciğer dokusundan 0.5 g alınarak buz üzerinde iyice kıyıldı, daha sonra 1 ml ultra saf su, 100 µl butil hidroksi tolüen (500 µg/ml; 2,6-di t-butil-p-kresol, BHT) ve 1 ml 0.5 M perklorik asit ile cam homojenizatör (Sartorius, Goettingen, Almanya) yardımıyla buz içerisinde homojenize edildi. Örnekler kapaklı polipropilen santrifüj tüplerine alındı ve vorteksle iyice karıştırıldıktan santrifüj edildi. Süpernatant dikkatlice viallere alınarak dokularda ekstraksiyon işlemi tamamlandı. Tüm ekstraksiyon ve analiz işlemlerinde ısı ve ışık oksidasyonundan sakınıldı.

Kalibrasyon grafiği oluşturulmak ve hesaplamalarda kullanmak üzere MDA (1,1,3,3-tetraethoksi-propan) standartları hazırlandı. MDA standardı için tetraethoksi-propandan 10 µl hacimde alınarak 10 ml'lik kapaklı bir cam tüpe alındı. Hacim 0.1 M hidroklorik asit (HCl, %37) ile 10 ml hacme tamamlandı. Benmaride (Mommert, Almanya) 100 C°'de 5 dk kapak kapalı şekilde muamele edildikten sonra soğutuldu ve ultra saf su ile 100 ml hacme tamamlandı.

Serum ve karaciğer MDA analizleri, kolon fırını (CTO-10ASVP) sıcaklığı 30 C°, hareketli faz akış hızı 1 ml/dk olan pompa (LC-20AD), enjeksiyon hacmi 30 µl olan otosampler (SIL-20A), dalga boyu 250 nm – 254 nm ultraviyole (UV)

dedektör (SPD-20A) ile C18 kolonda (ODS-3, 5 µm, 4.6 x 250 mm, Inertsil, GL Sciences, Japonya), hareketli faz olarak ise pH: 3.6 olarak ayarlanan 30 mM potasyum dihidrojen fosfat (KH₂PO₄) – metanol (CH₄O) karışımı (%82.5–17.5; v/v) ile 8 dk analiz süresinde HPLC cihazında (Shimadzu, Kyoto, Japonya) ölçüldü. Standart ve örneklerin MDA düzeyleri LC Solution (LabSolution, LCsolution Release 1.21, Shimadzu, Kyoto, Japonya) paket programı kullanılarak hesaplandı. Serum ve karaciğer MDA düzeyleri µmol/L ve nmol/g olarak verildi.

4.2.5.5. GSK-3β, Fyn, Nrf2, Keap-1 ve HO-1 Protein Düzeylerinin Belirlenmesi

Western blot yöntemi kullanılarak sıçanların karaciğer dokularında glikojen sentaz kinaz 3 beta (GSK-3β), C-syn proto onkogen (Fyn), nükleer faktör eritroid 2 ilişkili faktör 2 (Nrf2), kelch benzeri ECH ilişkili protein 1 (Keap-1), hem oksijenaz 1 (HO-1) ve protein düzeyleri sıçan spesifik antikorlar kullanılarak önceki çalışmalarda belirtilen şekilde tespit edildi (103, 104). Bu amaçla; çalışma sonunda dekapite edilen sıçanlardan karaciğer dokuları çıkarılarak plastik kilitli poşetlere alındı ve analiz edilinceye kadar -80°C’de derin dondurucuda (HS4486 Hettich Freezer, Almanya) muhafaza edildi. Karaciğer örnekleri ayrı olarak homojenizasyon tamponu (A+B) ile proteinleri ayırma amacıyla homojenize edildi. Protein ekstraksiyonu için: Numuneler 1 ml buz soğukluğunda hipotonik tampon A [(10 mM HEPES (pH 7,8), 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM fenilmetilsülfonil- florür (PMSF)] içerisinde cam

homojenizatörle homojenize edildi. Homojenatlara %10 Nonidet P-40 (NP-40) çözeltisinden 80 µl ilave edildi ve karışım 14.800 g'de +4°C'de 45 dk süreyle santrifüjlendi. Süpernatant, GSK-3β, Fyn, Nrf2, Keap-1 ve HO-1 protein analizi için sitosolik fraksiyon olarak toplandı. Çöken nükleuslar bir kez 500 µl hipotonik tampon+40 µl %10'luk Nonidet P-40 ile yıkandı, santrifüjlendi, 200 µl tampon B (50 mM HEPES (pH 7.8), 50 mM KCl, 300 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF,%20 gliserol) içinde yeniden süspansiyon haline getirildi ve 14.800 g'de +4°C'de 45 dk santrifüjlendi. Böylece nükleer proteinleri de içeren süpernatant toplandı (103). Örneklerin, protein yoğunlukları Lowry metodu (Sigma-Aldrich, Missouri, Amerika) ve nano spektrofotometre yardımı ile (MN-913, MaestroGen Inc., Tayvan) belirlenerek eşit düzeyde protein içeren çalışma numuneleri her bir grup için SDS-PAGE yöntemi ile %12'lik akrilamid içeren jelde koşuruldu (Bio-Rad Mini-PROTEAN Tetra Cell, CA, Amerika). Jeldeki proteinlerin nitroselüloz membrana transferi için poliakrilamid jel ile nitroselüloz membran (Schleicher and Schuell, Inc., Amerika) aralarında boşluk kalmayacak şekilde birleştirildikten sonra filtre kağıtları, süngerler ve kaset aparatları ile sıkıştırıldı. Ardından hazırlanan kasetler blotlama düzeneğine koyuldu ve blotlama solüsyonu ile doyuruldu. Blotlama ortamının soğuk kalması için buz aküleri ve manyetik karıştırıcılar kullanıldı. Blotlama tankı güç kaynağına bağlandı ve 90 dakika boyunca 250 mA akım verilecek şekilde ayarlanarak proteinler nitroselüloz membrana aktarıldı.

Blotlama işleminden sonra membranlar PBS tampon çözeltisi [$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.025 M), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (0.075 M), NaCl (1.45 M)] ile 5 kez yıkandı ve bloklama işlemine geçildi. Ticari toz albümin fraksiyonundan (Albumin fraction V) 5 g, PBS ile 100 ml hacime tamamlanarak bovine serum albümini (BSA) hazırlandı. Nitroselüloz membranlar BSA ile 37°C sıcaklıkta 90 dakika boyunca bloklama işlemine tabi tutularak spesifik olmayan proteinlerin kapatılması sağlandı. Primer antikor olarak poliklonal özellikteki anti-GSK-3 beta antikor (ab131356: Abcam, Cambridge, İngiltere), anti-Fyn antikor (ab137382: Abcam, Cambridge, İngiltere) ve anti-Nrf2 antikor (ab92946: Abcam, Cambridge, İngiltere) anti-Keap-1 antikor (ab139729: Abcam, Cambridge, İngiltere) ve anti-HO-1 antikor (ab13243: Abcam, Cambridge, İngiltere) kullanıldı. Sekonder antikor olarak tüm primerler ile uyumlu bir antikor kullanıldı (ab7090: Abcam, Cambridge, İngiltere). Primer ve sekonder antikorlar %0.05 Tween-20 bulunan tampon çözeltisi kullanılarak %0.1 oranında seyreltildi ve +4 °C'da yaklaşık olarak 16 saat boyunca inkübe edildi. Ardından nitroselüloz membranlar her seferde 5 dakika olacak şekilde 5 kere tampon solüsyonu ile yıkandı. Bu işlemden sonra membranlar %0.05 Tween-20 bulunan tampon kullanılarak %0.1 oranında dilüe edilen, peroksidazla konjugasyonu sağlanmış sekonder antikor kullanılarak 37 C° de 90 dakika boyunca inkübe edildi. Membranlar yine tampon çözeltisi ile yıkandı ve görüntüleme aşamasına geçildi. Bantların görüntülenmesi için diaminobenzidin (DAB) 7.4 pH'ya sahip 1 M Tris tamponunda %0.03-0.05 oranında seyreltilerek kullanıldı. DAB nitroselüloz membran üzerindeki bantlarla etkileşime girerek onları görünür hale getirdi.

Nitroselüloz membranlar görüntüleme işleminden sonra distile su ile yıkandı ve ardından kurumaya bırakıldı. Kuruyan membranların üzerindeki bantların rölatif yoğunlukları Image J analyses system (Image J National Institute of Health Bethesda, Amerika) programı kullanılarak belirlendi. Hesaplanan GSK-3 β , Fyn, Nrf2, Keap-1 ve HO-1 için bant yoğunlukları kontrolün yüzdesi olarak ifade edildi.

4.2.5.6. Histopatolojik İnceleme

Çalışma sonunda sıçanlardan alınan karaciğer doku örnekleri %10 luk formol tespitinden sonra rutin takibe alındı. Takip sonrası dokular parafine gömülerek elde edilen parafin bloklarından 4 μ m kalınlığında kesitler alındı ve hemotoksilen eozin ile boyandı. Histopatolojik incelemeler her bir numunenin geldiği gruba kör olan aynı patoloji uzmanı tarafından ışık mikroskopunda (Olympus BX51, Tokyo, Japonya) 200 kat büyütme ile incelendi (105-107).

4.2.6. İstatistiksel Analizler

Elde edilen veriler, SPSS (IBM SPSS versiyon 21). paket programı yardımıyla istatistiksel olarak değerlendirildi (108). Gruplar arası farklılıkları belirlemek için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) prosedürü kullanıldı. Parametreler için grupların ikili karşılaştırmalarında *post hoc* analizi olarak Tukey testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık $P < 0.05$ olarak kabul edildi. Veriler aritmetik ortalama ve standart sapma olarak sunuldu.

5. BULGULAR

Yüksek yağlı diyet (YYD) / streptozotosin (STZ) uygulaması ile diyabet oluşturulan sıçanlarda, mango Ginger (MG) ekstraktı uygulamasının, 12 haftalık çalışma sonunda canlı ağırlık değişimi, yem tüketimleri ve serum biyokimyasal parametreleri üzerine etkileri tablo 5’de sunulmuştur.

Sıçanların çalışma sonu canlı ağırlıkları arasında istatistiki bir farklılık belirlenmiştir (Şekil 7; $P<0.001$). YYD+STZ ile diyabet oluşturulan sıçanlarda canlı ağırlık değeri kontrol grubuna göre yaklaşık %20.1’lik bir oranda azalırken ($P<0.001$), YYD+STZ grubuna göre diyabetik sıçanlara uygulanan MG (YYD+STZ+MG) canlı ağırlık düzeyini yaklaşık %11.3 oranında artırmıştır ($P<0.01$). Çalışma sonu canlı ağırlık değerleri açısından kontrol ve sadece MG uygulanan grup arasında istatistiki bir fark bulunmazken (269 ve 277; $P>0.05$), YYD+STZ+MG grubuna ait canlı ağırlık değeri kontrol grubuna göre %11.1 daha düşük bulunmuştur ($P<0.01$).

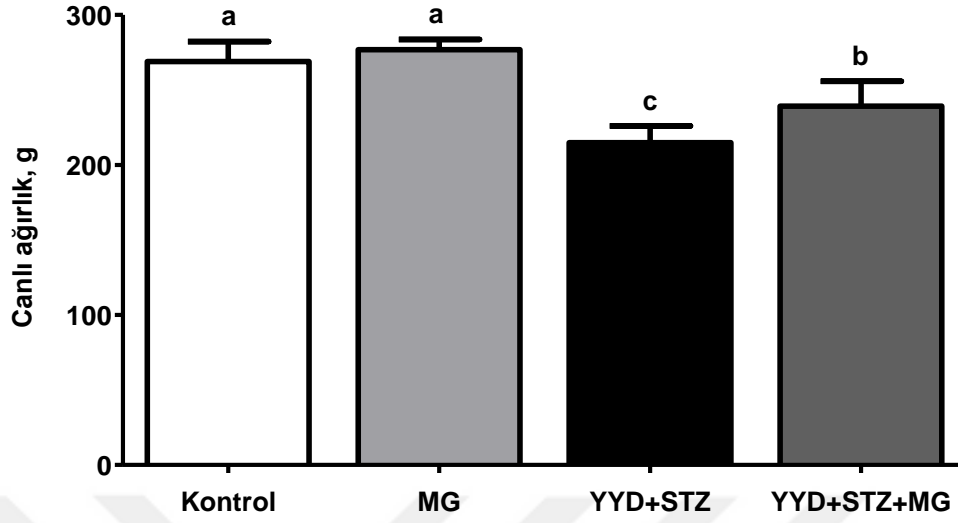
Sıçanların ortalama yem tüketimleri kontrol ve MG gruplarında ortalama 21.1 g ve 21.7 g olarak belirlenirken, YYD+STZ ve YYD+STZ+MG gruplarında 17.3 g ve 17.9 g şeklinde belirlenmiştir (Tablo 5). Yem tüketimleri bakımından kontrol grupları arasında istatistiki bir fark tespit edilmezken ($P>0.05$), YYD+STZ grubunda kontrol grubuna kıyasla yaklaşık %18 azalmıştır (Tablo 5; $P<0.001$). MG ekstraktı uygulaması hem kontrol grubunda (MG) hem de

diyabetik sıçanlarda (YYD+STZ+MG) ortalama yem tüketimini etkilememiştir (P>0.05).

Tablo 5. Mango Ginger (MG) ekstraktının yüksek yağlı diyet (YYD) / streptozotosin (STZ) ile indüklenen diyabetik sıçanlarda canlı ağırlık ve biyokimyasal parametreler üzerine etkisi.

Parametre	Gruplar			
	Kontrol	MG	YYD+STZ	YYD+STZ+MG
Canlı Ağırlık, g	269.00±13.26 ^a	276.86±6.84 ^a	214.86±11.13 ^c	239.14±16.65 ^b
Yem Tüketimi, g	21.07±2.13 ^a	21.66±1.41 ^a	17.30±1.18 ^b	17.94±0.79 ^b
Glikoz, mg/dL	78.86±3.98 ^c	79.71±3.55 ^c	345.43±4.58 ^a	203.43±14.39 ^b
İnsülin, mIU/L	10.63±1.08 ^c	11.63±1.23 ^c	28.09±1.17 ^a	23.34±1.65 ^b
ALT, U/L	71.29±6.97 ^c	72.86±5.79 ^c	144.86±6.72 ^a	119.86±5.61 ^b
AST, U/L	143.43±5.06 ^c	140.71±6.34 ^c	266.71±10.59 ^a	172.00±6.30 ^b
Kolesterol, mg/dL	59.43±3.64 ^c	61.00±2.38 ^c	164.86±5.64 ^a	131.29±5.28 ^b
Trigilserid, mg/dL	49.86±3.85 ^c	50.14±5.30 ^c	151.43±7.61 ^a	109.14±4.02 ^b
SYA, mM	1.07±0.04 ^c	1.09±0.04 ^c	4.00±0.29 ^a	2.25±0.18 ^b
Kreatin, mg/dL	0.34±0.05 ^c	0.31±0.04 ^c	0.65±0.05 ^a	0.44±0.06 ^b
Üre, mg/dL	29.43±3.69 ^b	26.71±3.73 ^b	42.71±3.25 ^a	31.14±4.63 ^b

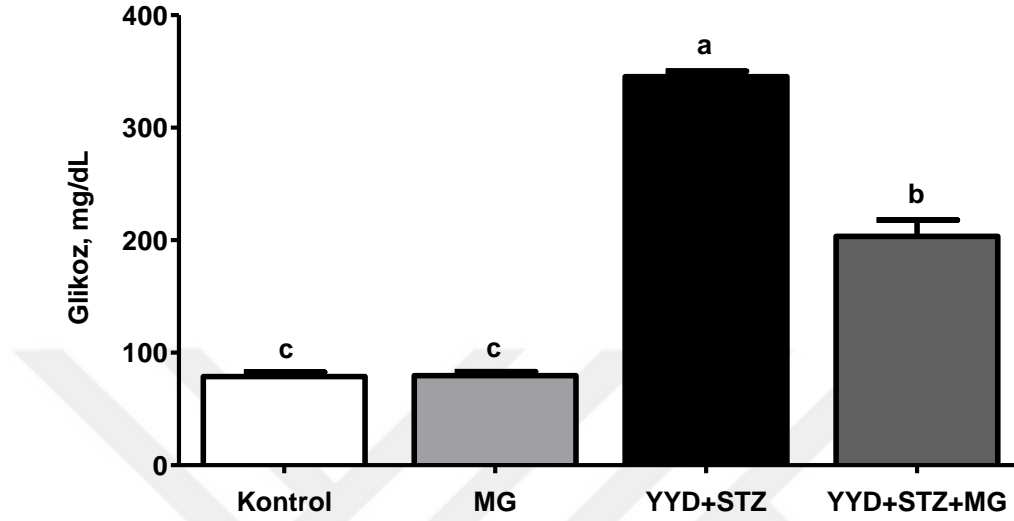
ALT: Alanin aminotransferaz; AST: Aspartat aminotransferaz; SYA: Serbest yağ asidi. a-c: Aynı satırda farklı harfi taşıyan gruplar için fark istatistiki olarak anlamlıdır (Turkey's post hoc test, P<0.05).



Şekil 7. Mango Ginger (MG) ekstraktının yüksek yağlı diyet (YYD) / streptozotosin (STZ) ile indüklenen diyabetik sıçanlarda çalışma sonu canlı ağırlıkları üzerine etkisi. a-c: Barlarda farklı harfi taşıyan değerler için fark istatistiki olarak anlamlıdır (Turkey's post-hoc test, $P<0.05$).

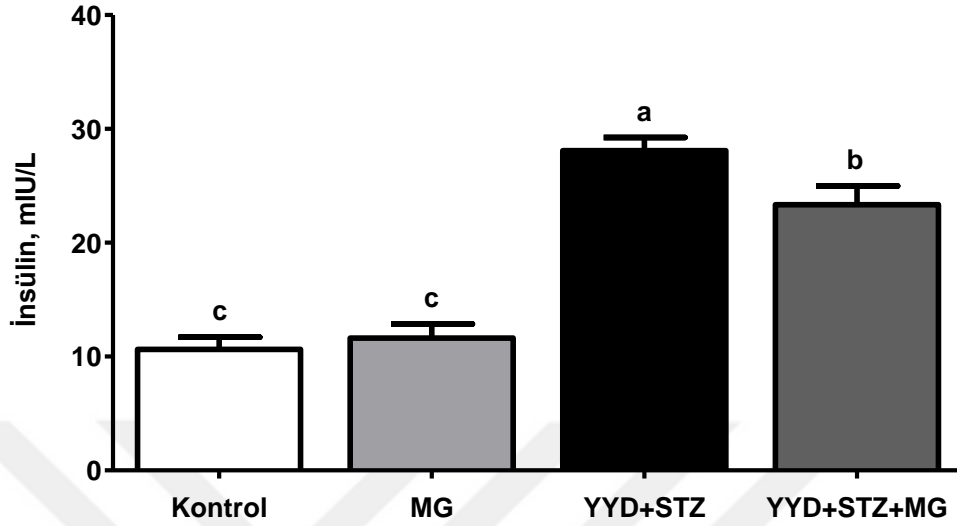
Diyabetik sıçanlarda, MG uygulaması ile serum glikoz değeri değişmiştir (Şekil 8; $P<0.001$). YYD+STZ ile diyabet oluşturulan sıçanlarda serum glikoz değeri kontrol grubuna göre yaklaşık 4.4 kat artış göstermiştir ($P<0.001$). YYD+STZ grubuna göre YYD+STZ+MG grubunda serum glikoz değeri yaklaşık %41.1 oranında artırmıştır ($P<0.001$). YYD+STZ+MG grubunda, sıçanların serum glikoz değeri kontrol grubuna göre yaklaşık 2.6 kat yüksek olarak tespit

edilmiştir ($P<0.001$). Kontrol grubu ile sadece MG uygulanan grup arasında serum glikoz değeri bakımından istatistiki bir fark bulunmamıştır ($P>0.05$).



Şekil 8. Mango Ginger (MG) ekstraktının yüksek yağlı diyet (YYD) / streptozotosin (STZ) ile indüklenen diyabetik sıçanlarda kan glikoz düzeyi üzerine etkisi. a-c: Barlarda farklı harfi taşıyan değerler için fark istatistiki olarak anlamlıdır (Turkey's post-hoc test, $P<0.05$).

YYD ve STZ uygulaması ile diyabet oluşturulan sıçanlarda, MG ekstraktı uygulaması serum insülin konsantrasyonunu, Kontrol ve MG grubu sıçanlarda değiştirmezken (Şekil 9; $P>0.05$), serum insülin konsantrasyonu YYD+STZ ve YYD+STZ+MG grubu sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla sırasıyla yaklaşık 2.6 ve 2.2 katlık bir artış göstermiştir ($P<0.001$). Diyabet oluşturulan gruplarda serum insülin konsantrasyonu MG uygulaması ile yaklaşık %16.9 oranında azalmıştır ($P<0.001$).



Şekil 9. Mango Ginger (MG) ekstraktının yüksek yağlı diyet (YYD) / streptozotosin (STZ) ile indüklenen diyabetik sıçanlarda serum insülin düzeyi üzerine etkisi. a-c: Barlarda farklı harfi taşıyan değerler için fark istatistiki olarak anlamlıdır (Turkey's post-hoc test, $P < 0.05$).

YYD ve STZ uygulaması ile diyabet oluşturulan sıçanlarda, serum alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) seviyeleri Kontrol sıçanlarına oranla sırasıyla %103.2 ve %86.0 oranında artmıştır (Tablo 5; $P < 0.001$). Serum ALT ve AST düzeylerindeki bu artış MG uygulaması (YYD+STZ+MG) ile sırasıyla %17.3 ve %35.5 oranında iyileşme göstermesine ($P < 0.001$) karşın, kontrol grubuna göre YYD+STZ+MG grubu sıçanlarda serum ALT ve AST değerleri %68.1 ve %19.9 oranında daha yüksek bulunmuştur

($P < 0.001$). Serum ALT ve AST değerleri Kontrol ve MG grupları arasında farklılık göstermemiştir ($P > 0.05$).

Sıçanlarda, YYD ve STZ ile oluşturulan diyabet modelinde MG uygulamasının lipit profil üzerine etkileri tablo 5’de gösterilmiştir. YYD+STZ grubunda, kolesterol, trigliserid ve serbest yağ asitleri (free fatty acids, SYA) düzeyi, kontrol grubuna göre sırasıyla yaklaşık 2.8, 3.0 ve 3.7 kat artmıştır ($P < 0.001$). YYD+STZ+MG grubu sıçanlarda serum kolesterol, trigliserid ve SYA düzeyi, YYD+STZ grubu sıçanlara göre sırasıyla %20.4, %27.9 ve %43.8 oranında azalmıştır ($P < 0.001$). Serum kolesterol, trigliserid ve SYA değerleri bakımından Kontrol ve MG grupları arasında istatistiki bir fark tespit edilmemiştir ($P > 0.05$).

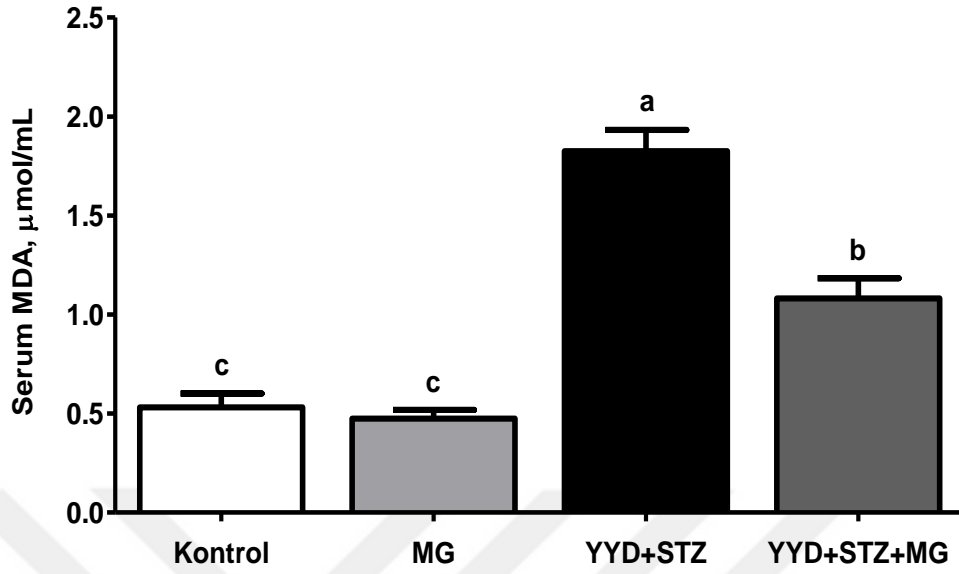
Sıçanlarda serum kreatin ve üre konsantrasyonları, YYD ve STZ ile indüklenen diyabet modelinde değişkenlik göstermiştir (Tablo 5). Serum kreatin ve üre konsantrasyonları YYD+STZ grubu sıçanlarda kontrol grubu sıçanlara göre %90.3 ve %45.1 oranında artış göstermiştir ($P < 0.001$). YYD+STZ grubuna göre YYD+STZ+MG grubu sıçanlarda serum kreatin konsantrasyonu %32.5 oranında azalırken ($P < 0.001$), serum üre konsantrasyonu %27.1 oranında azalma göstermiştir ($P < 0.001$). Diyabet oluşturulan sıçanlarda, MG uygulaması (YYD+STZ+MG) ile serum kreatin konsantrasyonu açısından kontrol grubuna göre %28.6’lık bir fark varken ($P < 0.01$), serum üre konsantrasyonu için istatistiki bir fark tespit edilmemiştir ($P > 0.05$). Serum kreatin ve üre konsantrasyonlarında kontrol ve MG grubu sıçanlar arasında önemli bir fark bulunmamıştır ($P > 0.05$).

YYD ve STZ uygulaması ile diyabet oluşturulan sıçanlarda, MG ekstraktı uygulaması serum ve karaciğer MDA değeri ile serum total antioksidan kapasite verilerini anlamlı şekilde değiştirmiştir (Tablo 6; $P<0.001$). Serum ve karaciğer MDA değerleri, YYD ve STZ ile diyabet oluşturulan sıçanlarda, kontrol grubu sıçanlara göre, 3.4 ve 3.0 kat artış göstermiştir (Şekil 10 ve 11; $P<0.001$). YYD+STZ+MG grubu sıçanlarda, YYD+STZ grubu sıçanlara göre serum MDA değeri %40.8 oranında bir iyileşme gösterirken (Şekil 10; $P<0.001$), bu oran karaciğer MDA değerleri için %43.7 olarak tespit edilmiştir (Şekil 11; $P<0.001$). Kontrol grubu sıçanlar ile sadece MG uygulanan sıçanlar için serum MDA değerleri (0.53 $\mu\text{mol/L}$ ve 0.47 $\mu\text{mol/L}$) arasında istatistiki bir fark tespit edilmemiştir ($P>0.05$). Serum MDA değeri diyabetik sıçanlara göre YYD+STZ+MG grubu sıçanlarda daha düşük olmasına karşın, kontrol grubu sıçanlara oranla yaklaşık 2 kat daha yüksek bulunmuştur ($P<0.001$). Benzer şekilde, karaciğer MDA değeri için kontrol ve MG grubu arasında istatistiki fark bulunmazken ($P>0.05$), YYD+STZ+MG grubu sıçanlarda bu değer kontrolden, 1.7 kat daha yüksek bulunmuştur ($P<0.001$). Serum TAK değeri için YYD+STZ grubu sıçanlarda kontrol grubuna göre %81.9 oranında azalma tespit edilmiştir (Şekil 12; $P<0.001$). YYD+STZ+MG grubunda serum TAK değeri YYD+STZ grubuna göre 2.6 kat daha yüksek bulunurken, kontrol grubuna göre 2.2 kat daha düşük bulunmuştur ($P<0.001$). Serum TAK değeri MG grubunda kontrole göre %10.3'lük bir artış göstermiştir (Şekil 12; $P<0.001$).

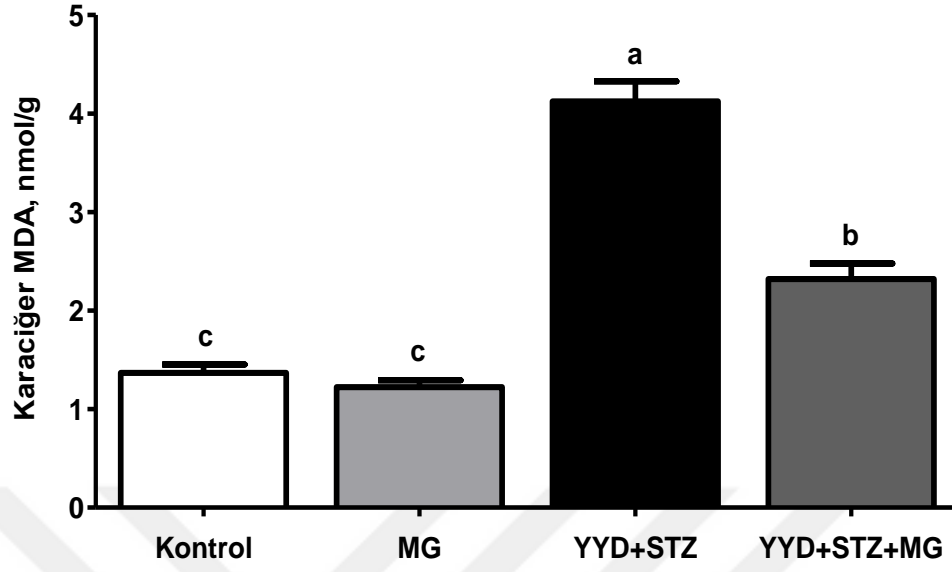
Tablo 6. Mango Ginger (MG) ekstraktının yüksek yağlı diyet (YYD) / streptozotosin (STZ) ile indüklenen diyabetik sıçanlarda serum ve karaciğer malondialdehit (MDA) ile total antioksidan kapasite (TAK) üzerine etkisi.

Parametre	Gruplar			
	Kontrol	MG	YYD+STZ	YYD+STZ+MG
Serum MDA, µmol/mL	0.53±0.07 ^c	0.47±0.04 ^c	1.83±0.11 ^a	1.08±0.10 ^b
Karaciğer MDA, nmol/g	1.37±0.09 ^c	1.22±0.07 ^c	4.12±0.20 ^a	2.32±0.16 ^b
Serum TAK, U/mL	1.40±0.11 ^b	1.55±0.07 ^a	0.25±0.05 ^d	0.65±0.08 ^c

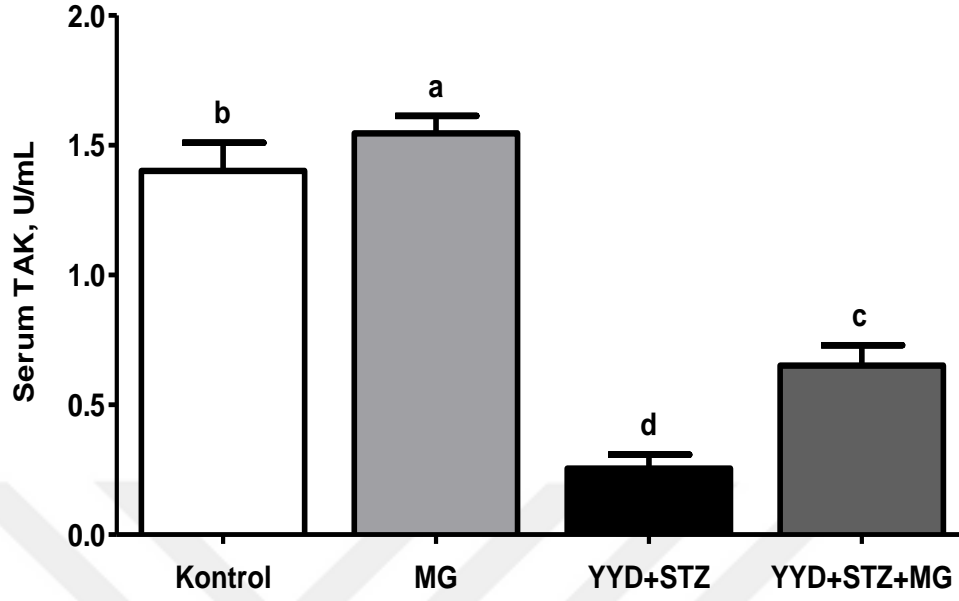
a-d: Aynı satırda farklı harfi taşıyan gruplar için fark istatistiki olarak anlamlıdır (Turkey's post hoc test, P<0.05).



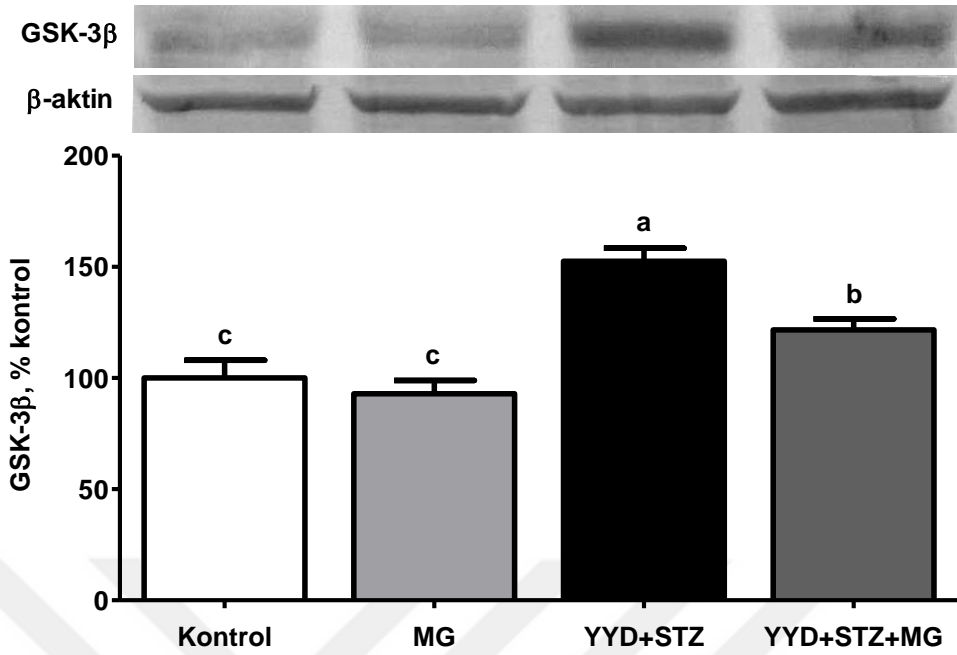
Şekil 10. Mango Ginger (MG) ekstraktının yüksek yağlı diyet (YYD) / streptozotosin (STZ) ile indüklenen diyabetik sıçanlarda serum malondialdehit (MDA) üzerine etkisi. a-c: Barlarda farklı harfi taşıyan değerler için fark istatistiki olarak anlamlıdır (Turkey's post-hoc test, $P < 0.05$).



Şekil 11. Mango Ginger (MG) ekstraktının yüksek yağlı diyet (YYD) / streptozotosin (STZ) ile indüklenen diyabetik sıçanlarda karaciğer malondialdehit (MDA) üzerine etkisi. a-c: Barlarda farklı harfi taşıyan değerler için fark istatistiki olarak anlamlıdır (Turkey's post-hoc test, $P < 0.05$).



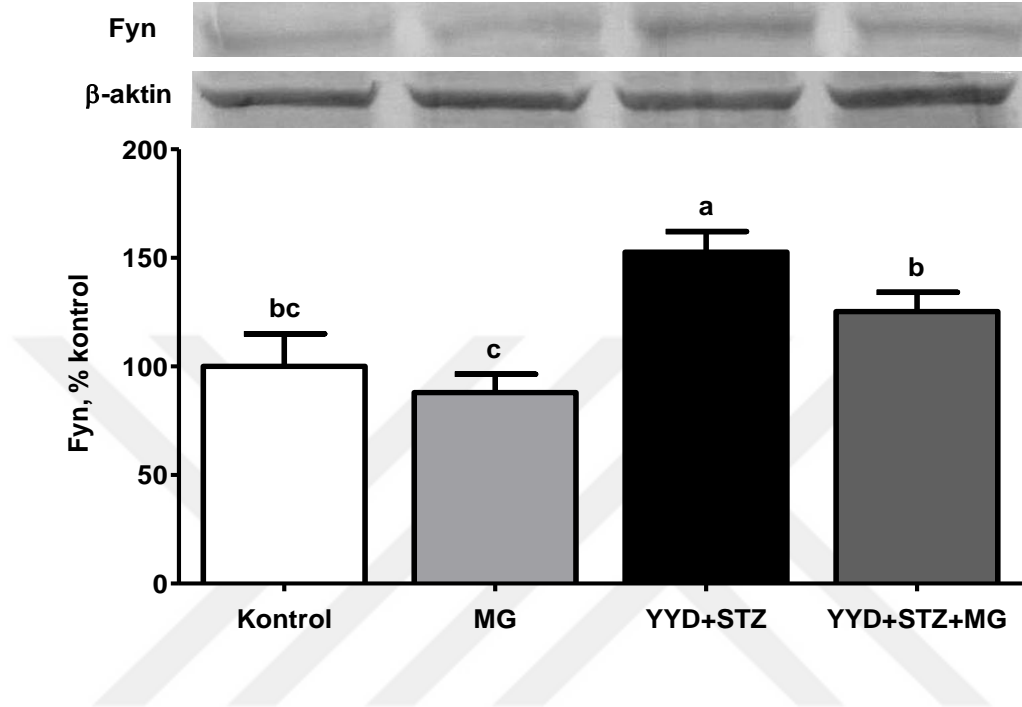
Şekil 12. Mango Ginger (MG) ekstraktının yüksek yağlı diyet (YYD) / streptozotosin (STZ) ile indüklenen diyabetik sıçanlarda serum total antioksidan kapasitesi (TAK) üzerine etkisi. a-d: Barlarda farklı harfi taşıyan değerler için fark istatistiki olarak anlamlıdır (Turkey's post-hoc test, $P < 0.05$).



Şekil 13. Mango Ginger (MG) ekstraktının yüksek yağlı diyet (YYD) / streptozotosin (STZ) ile indüklenen diyabetik sıçanlarda glikojen sentaz kinaz 3 beta (GSK-3 β) protein düzeyi üzerine etkisi. Veriler kontrolün yüzdesi olarak, ortalama ve standart sapma olarak sunulmuştur. Western blot tekniği ile ölçülen parametre için blotlar en az 3 kez tekrarlandı, eşit protein yüklemesini sağlamak için β -aktin ile analiz yapıldı. a-c: Barlarda farklı harfi taşıyan değerler için fark istatistiki olarak anlamlıdır (Turkey's post-hoc test, $P < 0.05$).

Karaciğer glikojen sentaz kinaz 3 beta (GSK-3 β) protein düzeyi, kontrol ve MG grubu sıçanlarda değişmezken ($P > 0.05$), diyabetli grupta (YYD+STZ) %52.6 oranında artış göstermiştir (Şekil 13; $P < 0.001$). YYD+STZ+MG grubu sıçanlarda YYD+STZ grubuna göre %20.3 oranında bir azalma gözlenirken ($P < 0.01$), GSK-3 β protein düzeyi kontrol grubu sıçanlara göre %21.6 daha yüksek

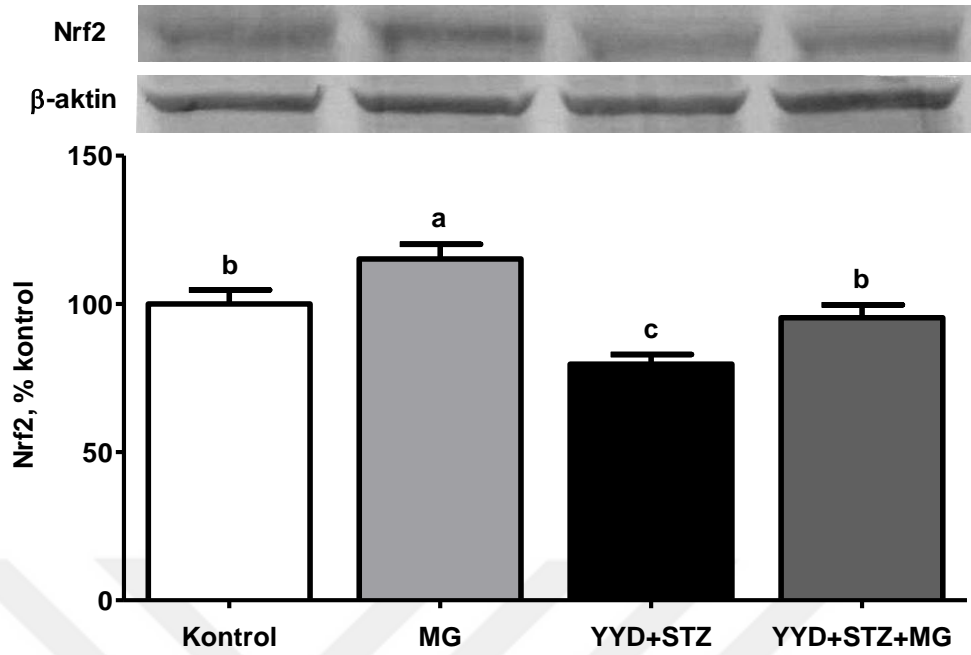
bulunmuştur (Şekil 13; $P<0.05$). Karaciğer GSK-3 β protein düzeyi en düşük, %92.9 değeri ile MG grubunda tespit edilmiştir (Şekil 13; $P<0.001$).



Şekil 14. Mango Ginger (MG) ekstraktının yüksek yağlı diyet (YYD) / streptozotosin (STZ) ile indüklenen diyabetik sıçanlarda C-syn proto onkogen (Fyn) protein düzeyi üzerine etkisi. Veriler kontrolün yüzdesi olarak, ortalama ve standart sapma olarak sunulmuştur. Western blot tekniği ile ölçülen parametre için blotlar en az 3 kez tekrarlandı, eşit protein yüklemesini sağlamak için β -aktin ile analiz yapıldı. a-c: Barlarda farklı harfi taşıyan değerler için fark istatistiksel olarak anlamlıdır (Turkey's post-hoc test, $P<0.05$).

Karaciğer C-syn proto onkogen (Fyn) protein düzeyi, kontrol ile MG ve kontrol ile YYD+STZ+MG grubu sıçanlar arasında istatistiki olarak değişmezken ($P>0.05$), diyabetli (YYD+STZ) sıçanlarda kontrol grubu sıçanlara göre yaklaşık 1.5 kat artış göstermiştir (Şekil 14; $P<0.01$). YYD+STZ+MG grubu sıçanlarda, YYD+STZ grubuna göre %18.0 oranında bir azalma gözlenirken ($P<0.05$), MG grubuna göre Fyn protein düzeyi %42.4 daha yüksek bulunmuştur (Şekil 14; $P<0.05$). Karaciğer Fyn protein düzeyi en düşük MG (%87.9) grubunda tespit edilmiştir.

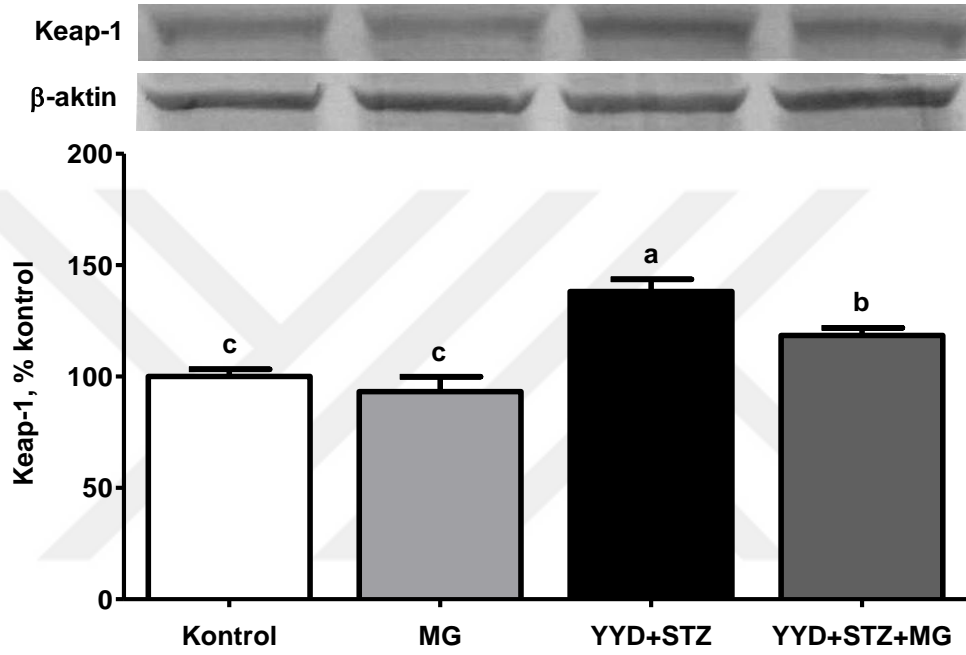
YYD ve STZ ile indüklenen diyabetik sıçanlarda karaciğer nükleer faktör eritroid 2 ilişkili faktör 2 (Nrf2) protein düzeyi, kontrol grubuna göre %20.3 oranında azalırken (Şekil 15; $P<0.01$), bu azalma MG uygulaması ile (YYD+STZ+MG) geriye çevrilmiştir ($P<0.05$). MG grubu sıçanlarda Nrf2 protein düzeyi, kontrol grubuna göre %15.2 oranında artış gösterirken ($P<0.05$), YYD+STZ ve YYD+STZ+MG grubu sıçanlarda Nrf2 protein düzeyi MG grubuna göre %17.3 ve %30.8 daha düşük tespit edilmiştir (Şekil 15; $P<0.01$ ve $P<0.001$).



Şekil 15. Mango Ginger (MG) ekstraktının yüksek yağlı diyet (YYD) / streptozotosin (STZ) ile indüklenen diyabetik sıçanlarda nükleer faktör eritroid 2 ilişkili faktör 2 (Nrf2) protein düzeyi üzerine etkisi. Veriler kontrolün yüzdesi olarak, ortalama ve standart sapma olarak sunulmuştur. Western blot tekniği ile ölçülen parametre için blotlar en az 3 kez tekrarlandı, eşit protein yüklemesini sağlamak için β -aktin ile analiz yapıldı. a-c: Barlarda farklı harfi taşıyan değerler için fark istatistiksel olarak anlamlıdır (Turkey's post-hoc test, $P < 0.05$).

Karaciğer Kelch benzeri ECH ilişkili protein 1 (Keap-1) protein düzeyi Kontrol ve MG grubu sıçanlarda değişmezken ($P > 0.05$), YYD+STZ ve YYD+STZ+MG grubu sıçanlarda kontrol grubuna göre sırasıyla %38.1 ve %18.4

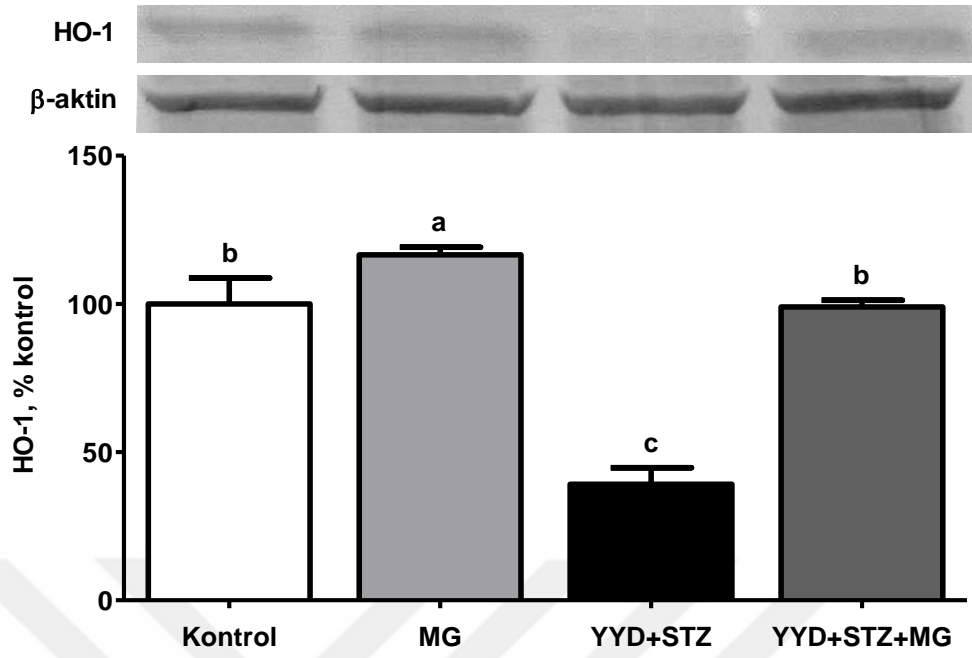
oranlarında artmıştır (Şekil 16; $P<0.001$ ve $P<0.01$). Diyabetik sıçanlarda MG uygulaması Keap-1 protein düzeyini %14.3 oranında düşürmüştür ($P<0.01$). Karaciğer Keap-1 protein düzeyi en düşük MG (%93.3) grubunda, en yüksek YYD+STZ (%138.1) grubunda tespit edilmiştir (Şekil 16).



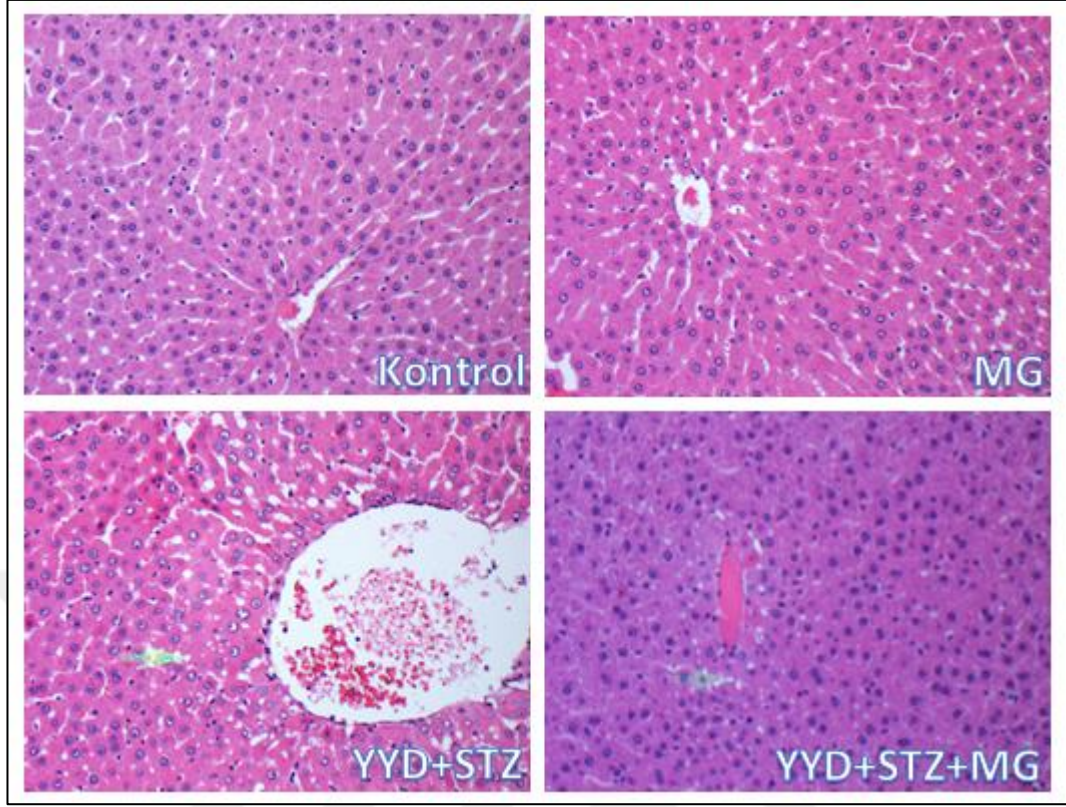
Şekil 16. Mango Ginger (MG) ekstraktının yüksek yağlı diyet (YYD) / streptozotosin (STZ) ile indüklenen diyabetik sıçanlarda Kelch benzeri ECH ilişkili protein 1 (Keap-1) protein düzeyi üzerine etkisi. Veriler kontrolün yüzdesi olarak, ortalama ve standart sapma olarak sunulmuştur. Western blot tekniği ile ölçülen parametre için blotlar en az 3 kez tekrarlandı, eşit protein yüklemesini sağlamak için β -aktin ile analiz yapıldı. a-c: Barlarda farklı harfi taşıyan değerler için fark istatistiksel olarak anlamlıdır (Turkey's post-hoc test, $P<0.05$).

Diyabetik sıçanların karaciğerinde tespit edilen hem oksijenaz 1 (HO-1) protein düzeyleri, kontrol grubuna ve MG grubuna göre sırasıyla %60.8 ve %66.4 oranlarında azalmıştır (Şekil 17; $P<0.001$). YYD+STZ+MG grubu sıçanlarda HO-1 protein düzeyi diyabetik sıçanlara (YYD+STZ) göre yaklaşık 2.5 kat artış göstererek kontrol grubu sıçanlara yaklaşmıştır ($P<0.001$). MG grubu sıçanlarda HO-1 protein düzeyi, kontrol ve YYD+STZ+MG grubu sıçanlara göre %14.2 ve %15.1 daha yüksek tespit edilmiştir (Şekil 17; $P<0.05$).





Şekil 17. Mango Ginger (MG) ekstraktının yüksek yağlı diyet (YYD) / streptozotosin (STZ) ile indüklenen diyabetik sıçanlarda hem oksijenaz 1 (HO-1) protein düzeyi üzerine etkisi. Veriler kontrolün yüzdesi olarak, ortalama ve standart sapma olarak sunulmuştur. Western blot tekniği ile ölçülen parametre için blotlar en az 3 kez tekrarlandı, eşit protein yüklemesini sağlamak için β-aktin ile analiz yapıldı. a-c: Barlarda farklı harfi taşıyan değerler için fark istatistiki olarak anlamlıdır (Turkey's post-hoc test, $P < 0.05$).



Şekil 18. Mango Ginger (MG) ekstraktının yüksek yağlı diyet (YYD) / streptozotosin (STZ) ile indüklenen diyabetik sıçanlarda, karaciğer dokusu histopatolojik değişiklikleri üzerine etkisi. Grupların karaciğer histopatolojik görünümleri (H&E, x200).

YYD ve STZ ile indüklenen diyabetik sıçanlarda karaciğer dokusu incelendiğinde; Kontrol ve MG grubunda normal histolojiye sahip bulunmuştur. YYD+STZ grubu sıçanların karaciğer dokusunda yağlanma gözlenirken, YYD+STZ+MG grubu sıçanların karaciğerlerinde yağlanma odakları kısmen azalmış ve hidrobik dejenerasyonlar tespit edilmiştir (Şekil 18).

6. TARTIŞMA

DM2, erişkinlerde ortaya çıkan insüline bağımlı olmayan ve diyabet hastalarının %90-95'nde görülen tiptir. DM2 temel olarak lipit metabolizmasında, insülin direncinde ve pankreatik β -hücre disfonksiyonundaki değişikliklerle karakterize olan karmaşık bir metabolik bozukluktur (109). Obezite serum trigliserit miktarını, hipertansiyonu ve insülin direncini artırarak DM2 oluşumuna neden olan en önemli risk faktörüdür (110). Terapötik alanda pek çok gelişme olmasına rağmen, DM2 için mevcut etkin bir tedavi yoktur (111). Dolayısıyla DM2 ile mücadele etmek için yeni, önleyici ve / veya terapötik stratejiler geliştirmeye ihtiyaç duyulmaktadır (5, 53).

Diyabet tedavisinde veya önlenmesinde destekleyici olarak kullanılabilir alternatif yöntemlerin sayısı giderek artmakla birlikte bitkiler, bitki ekstraktları ve bitki aktif maddeleri bunların başında gelmektedir (30, 112-116). Bu çalışmada diyabet tedavisinde kullanılabilmesi amacı ile antihiperglisemik ve antihiperkolestroleşik (75) özelliği bildirilen MG kullanıldı.

Diyabetin indüklenmesi ve insülin direncinin başlatılması için hayvanlar belirli bir süre boyunca YYD tüketmelidir (47, 52). Çoğu deneyde 2 haftalık diyet uygulamasının ardından düşük dozda STZ enjeksiyonu yapılması 3-7 gün içinde kan glikoz seviyesinin artmasına neden olmaktadır (53, 54-56). Bu çalışmada sıçanlar 2 hafta YYD ile beslendikten sonra düşük doz STZ enjeksiyonu yapıp 12 hafta boyunca YYD verilerek DM2 indüklenmiştir.

YYD ile beslenen kemirgenler obez olma eğilimindedirler. Bununla birlikte YYD tüketimini takiben canlı ağırlıkta belirgin bir artış olduğu ve bunun STZ uygulamasından sonra azaldığı kabul edilir (47, 117, 118). YYD beslenmesi sırasında vücut ağırlığı artışı 2 haftalık diyet manipulasyonundan sonra kademeli olarak görülebilir Srinivasan ve ark(47, 54). YYD'nin kilo alımına yol açtığını ve STZ enjeksiyonunun (35 mg/kg) vücut ağırlığında geçici bir azalmaya neden olduğunu, diyabetik hayvanların son ağırlıklarının önemli ölçüde arttığını ve kontrollerden daha yüksek olduğunu bildirilmiştir (47). Wang ve ark. (119) YYD'yi takiben kilo alımında herhangi bir değişiklik olmadığını, ancak STZ uygulamasından (30 mg/kg) sonra vücut ağırlığında belirgin bir azalma olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada YYD+STZ grubundaki sıçanlarda STZ uygulamasına bağlı olarak canlı ağırlık değerleri kontrol grubuna göre azaldı. STZ kaslarda protein sentezinin azalması ya da proteolizin (120) artmasına bağlı olarak kas atrofisine neden olmaktadır (121). Swanston-Flatt ve ark. (122) tarafından STZ ile indüklenmiş diyabetik sıçanlarda antidiyabetik bitkiler kullanılarak yapılan bir çalışmada diyabet oluşturulmamış normal sıçanların canlı ağırlıklarında, plazma glikoz ve insülin seviyelerinde bir değişikliğin olmadığı görülmüştür. Bunun aksine diyabet oluşturulmuş sıçanlarda kullanılan sarımsak, ardıç, yonca, ökaliptüs ve kişnişin canlı ağırlık kaybını azalttığı söylenmiştir (122). Yine antidiyabetik özelliği olan curcumin ile yapılan bir çalışmada STZ ile indüklenmiş diyabetik sıçanlara 2 hafta boyunca 30 mg/kg dozda curcumin verilmiştir. Çalışma sonunda curcumin verilen diyabetik sıçanların curcumin verilmeyen diyabetik sıçanlara göre daha fazla canlı ağırlığa sahip oldukları

bildirilmiştir (123). Benzer bir şekilde bu çalışmada da kontrol ve sadece MG uygulanan grup arasında istatistiki bir fark bulunmazken, YYD+STZ grubuna göre diyabetik sıçanlara uygulanan MG (YYD+STZ+MG) canlı ağırlık düzeyini arttırdı.

Diyabet indüksiyonunu belirlemek için kullanılan kan şekeri düzeyleri 126 ile 400 mg/dL arasında değişmektedir (5, 53). Ancak hayvan modellerinde DM2'yi tanımlamak için standartlaşmış bir glikoz seviyesi olmamakla birlikte STZ uygulanan hayvanlarda > 150 mg / dL'lik açlık glikoz seviyesi ve > 200 mg / dL'lik tokluk glikoz seviyesi olması tavsiye edilmektedir (124). YYD ve STZ uygulaması ile diyabet oluşturulan gruplardaki artan serum glikoz seviyesi DM2 için spesifik hiperglisemi tablosunu göstermektedir. YYD+STZ+MG grubundaki glikoz seviyesi YYD+STZ grubuna göre daha düşük bulunması MG'nin antihiperglisemik ve hipoglisemik özelliklerinden kaynaklanabilmektedir (75).

Yapılan farklı çalışmalarda YYD ve STZ ile indüklenmiş diyabetik sıçanlarda kan insülin seviyelerinin artabildiği (98, 125, 126), azalabildiği (107, 127) veya değişmediği bildirilmektedir (5, 53). Çalışmada diyabetik ratlarda serum insülin seviyesinin arttığı ve diyabetik sıçanlara MG uygulamasının serum insülin seviyesini azalttığı görüldü.

Serum AST ve ALT seviyelerinin YYD ve STZ ile indüklenmiş diyabetik sıçanlarda kontrol gruplarına kıyasla arttığı daha önce yapılan çalışmalarda gözlemlenmiştir (107, 128, 129). Hücrelerde, mitokondri gibi organellerin zarar görmesi (130) , hücre hasarı ve hücre membranının bütünlüğünün bozulması gibi durumlarda AST ve ALT enzimlerinin salınımı artmaktadır (131). YYD+STZ

grubu sıçanlarda serum AST ve ALT seviyeleri kontrol grubuna göre daha yüksek bulunurken, YYD+STZ+MG grubu YYD+STZ grubu ile karşılaştırıldığında AST ve ALT seviyesinin daha düşük olması; MG'nin hücre hasarını önleyici antioksidan aktivite göstermesi (91) ve antienflamatuar (132) etkileri ile açıklanabilir.

Kan lipitlerindeki düzensizlik başta dolaşımdaki SYA'lar olmak üzere insülin direnci ile birlikte DM2'nin karakteristiğidir. Yağ metabolizmasındaki bozukluk sonucu yağ dokudan başta karaciğer olmak üzere diğer dokulara SYA akışı meydana getirerek çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL) sentezi ve salgılanmasını arttırmaktadır. Artan VLDL seviyesi düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) reseptörünü regüle ederken (133), LDL kolesterol partiküllerini (134) ve yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) kolesterol seviyesini azaltarak periferik TG konsantrasyonunun artmasına neden olmaktadır (135). SYA'lar ve TG bakımından zengin lipoproteinlerin kalıntıları hepatositlerdeki yağ asiti havuzunu arttırarak kısır bir döngü oluşturur ve VLDL üretimini daha da artırır. Bizim çalışmamızda da aynı şekilde YYD+STZ grubunda kolesterol, TG ve SYA düzeyi kontrol grubuna göre arttığı görüldü. Yapılan çalışmalarda triton ile indüklenen hiperlipidemik sıçanlarda MG ekstraktının hipotrigliseridemik aktivite gösterdiği ve ayrıca hem karaciğer sentezinde hem de kan temizliğinde etkili olduğu gösterilmiştir (76, 93). Gerçekleştirilen çalışmada MG uygulanan diyabetik sıçanların serum kolesterol, trigliserid ve SYA düzeylerinin MG uygulanmayan diyabetik sıçanlara göre düşük olduğu ve bir iyileşme sağladığı görüldü.

Diyabette hiperglisemi, doku hasarının başlangıç nedenidir (19, 136). Hiperglisemi her ne kadar tüm dokuların tüm hücrelerini etkilese de, diyabet durumunda retinadaki kılcallardaki endotelial hücreler, böbrek glomerulusundaki mezenşimal hücrelere ve nöronlar gibi hücrelere seçici olarak zarar verir (19). Hücreler hiperglisemiye maruz kaldığında membrandan glikoz taşınmasını sınırlandırarak sabit iç glikoz konsantrasyonlarını koruyabilirken, endotelial ve mezenşimal hücreler gibi bazı hücreler hiperglisemi durumunda bunu yapamazlar (136). Hiperglisemi, protein katabolizmasını ve böbrek fonksiyon bozukluğunun önemli belirteçleri olarak kabul edilen serum üre ve kreatinin düzeylerinde yükselmeye neden olabilir. Üre, vücutta protein katabolizmasının en önemli son ürünüdür. Diyabetik durumda, hem hepatik hem de plazma proteinlerinin belirgin bir şekilde azalması, sistemik dolaşımdaki üre birikiminin atılımından daha fazla olmasına yol açabilmektedir. Diyabette yüksek konsantrasyonda kan glikozu böbrek fonksiyonlarında bozulmaya neden olur ve bu durum dolaşımda azotlu atıkların birikmesi ile sonuçlanabilir (137). Yapılan çalışmada serum kreatin ve üre konsantrasyonları YYD+STZ grubu sıçanlarda kontrol grubu sıçanlara göre artış gösterdi. YYD+STZ+MG grubu sıçanlarda ise YYD+STZ grubuna göre serum üre ve kreatin seviyelerinde bir azalma olduğu görülürken üre seviyesi bakımından kontrol ve MG grupları ile arasında bir fark gözlemlenmedi. MG'nin diyabetik gruplardaki serum üre ve kreatin seviyeleri üzerine iyileştirici etkisi antihiperglisemik ve hipoglisemik (75, 90) özelliklerinden dolayı olabilir.

Diyabette katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz gibi antioksidan enzimlerin aktiviteleri azalır ve dokularda oksidatif

hasar meydana gelebilir (19, 138). Diyabetin ilerlemesinde serbest radikaller, kan şekeri ve lipid peroksidasyonu artışı arasında yakın bir ilişki olduğu bilinmektedir (139). Diyabet durumunda, kronik hiperglisemiye bağlı yüksek oksidatif stres gösterdikleri için antioksidatif savunma sisteminin aktivitesini azalır ve serbest radikallerin oluşumu artar (140). Lipid peroksidasyonunun bir yan ürünü olan MDA, vücuttaki oksidasyon derecesini yansıtır (141). Tuzcu ve ark. (142) YYD ile beslemede antioksidan enzimlerin azalması ile birlikte TAK'ın azalması ve retinal MDA düzeyinde artışının oluştuğunu gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada diyabetik sıçanlarda ki MDA değerleri artarken TAK değerleri düştü. YYD+STZ+MG grubu sıçanlarda, YYD+STZ grubu sıçanlara göre MDA değerlerinde bir iyileşme ve TAK değerlerinde artış gözlemlendi.

İnsülinin reseptörüne bağlanması, insülin reseptör substratlarını (IRS) fosforile eden insülin reseptör tirozin kinaz alanını aktive eder (143) Fosforlanmış IRS proteinleri daha sonra bir adaptör protein olarak işlev görür ve özellikle fosfatidilinositol-3 kinaz (PI3K) olmak üzere çok sayıda sinyalleme partneri için bağlanma alanları sağlarlar (144). Fosfatidilinositol-3 kinaz daha sonra Akt olarak da bilinen protein kinaz B'yi (PKB) aktive eden fosfatidilinositol 3,4,5 -tifosfat üretmek için fosfatidilinositol 4,5 -bisfosfatı fosforile eder (143, 144). Aktive Akt / PKB rapamisin protein kompleksinin memeli hedefinin aktivasyonu (145) aracılığı ile GSK3'ün (146) inhibisyonu sonucu birçok pro-apoptotik ajanın inhibe edilmesi ve hücre sağkalımı yolu ile glikojen sentezini indükler (147).

Yüksek yağlı diyetler, reseptör yetmezliği olmaksızın toplam insülin reseptör sayısının azalmasına neden olabilir (5, 148). Ek olarak, yağ açısından

zenginleştirilmiş diyetler insülin reseptörünün otoposforilasyonunu, IRS-1 fosforilasyonunu ayrıca PI3K ve Akt fosforilasyonu ve aktivitesini azaltmaktadır. YYD, PI3K / AKT yolunun bozulması ve hedef dokularda insülin etkisinin değiştirilmesi ile insülin direncine neden olarak DM2'yi indükler (149-151). YYD ile beslenen hayvanlarda hem insülin reseptörünün hem de IRS'nin insülin ile uyarılmış tirozin fosforilasyonu azalır (152).

Çalışma bulgularında literatür bilgilerine benzer bir şekilde karaciğerdeki GSK-3 β protein düzeyi diyabetli sıçanlarda yüksek olarak bulundu. GSK-3 β proteini seviyesi MG uygulanan diyabetik sıçanlarda MG uygulanmayan diyabetik sıçanlara göre anlamlı bir şekilde azaldı.

Nrf2'nin negatif düzenleyicisi olan Fyn'nin diyabetik farelerdeki nükleer birikiminin belirgin bir şekilde arttığı bildirilmiştir (153). Dolayısı ile Fyn'nin çekirdekteki birikiminin azaltılması antioksidant bir faktör olan Nrf2'nin aktivasyonunun önüne geçmeyeceği için diyabet tedavisinde umut verici bir hedef olabileceği söylenmektedir (84, 153).

GSK-3 β 'in fosforilasyon durumu onun aktivitesini düzenler. Serin 9 kalıntısından fosforlanmış GSK-3 β inaktiftir ve aktivasyon tirozin 216 kalıntısında fosforilasyon ve / veya serin 9'un defosforilasyonu ile olmaktadır (87, 154). Aktif GSK-3 β , Fyn'nin treonin kalıntılarını aktive ederek nükleer birikimine aracılık eder (155) ve fosforlanmış Fyn Nrf2'nin tirozin 568 kalıntılarını fosforlayarak Nrf2'nin ubiquinasyona uğraması sonucu çekirdek dışına çıkması ile yıkımlanmasına neden olmaktadır (156). Elde edilen verilerde, karaciğer Fyn protein düzeyi diyabetli (YYD+STZ) sıçanlarda kontrol grubu sıçanlara göre arttı

ve diyabetli sıçanlara uygulanan MG Fyn protein düzeyini YYD+STZ grubuna göre azalttı. Yine literatür ile benzer şekilde karaciğerdeki Nrf2 proteini düzeyi diyabetli sıçanlarda azaldı ve MG uygulaması bu azalışı iyileştirdi. Buna ek olarak sadece MG uygulanan sıçanlarda da Nrf2 seviyesinde belirgin bir artış görüldü.

Keap-1 Nrf2'nin transkripsiyonel aktivasyonu ile ilişkilidir (157). Fizyolojik koşullarda yüksek seviyede Nrf2 gerekmediği zaman Nrf2 sitoplazmadaki baskılayıcısı olan Keap1'e bağlı olarak bulunmaktadır (157). Oksidatif stres altındayken Keap1 uyarılır ve Nrf2 sitoplazmada serbest kalarak çekirdeğe geçebilecek hale gelir. Çekirdeğe geçen Nrf2 antioksidan yanıtı tetikler (157). Bitar ve Al-Mulla (158) genetik olarak diyabetli sıçanlarda fibroblast ve deri yaralarında Keap1'in belirgin bir şekilde yükseldiğini söylemişlerdir. Hiperglisemi aracılı oksidatif stres sırasında, Nrf2 eşliğinde glutamil-sistein ligaz, glutatyon s-transferaz ve HO-1 gibi oksidatif stresi düzenleyici enzimler, diyabetik sıçanların renal dokularında önemli ölçüde azalmaktadır (159). Bu çalışmada da karaciğerdeki Keap-1 YYD+STZ ve YYD+STZ+MG grubu sıçanlarda kontrol grubuna göre artarken diyabetik sıçanlarda MG uygulaması Keap-1 protein düzeyini diyabetik sıçanlara göre düşürdü. Bu bulgulara ve literatür bilgisine benzer şekilde karaciğerdeki HO-1 proteini, diyabetik sıçanlarda düşerken MG uygulanan gruplarda belirgin bir artış göstererek diyabetin oksidatif stres üzerindeki olumsuz etkisini iyileştirdiği görüldü.

Diyabetik durumda yağ metabolizmasındaki bozukluk sonucu yağ dokudan başta karaciğer olmak üzere diğer dokulara yağ birikimi meydana geldiği bildirilmiştir (133). Das ve ark. (160) diyabet oluşturulan sıçanların

karaciğerlerinde yağlanma olduğunu gözlemlemişlerdir. Elde edilen histopatolojik bulgulara göre diyabetik sıçanların karaciğerlerinde yağlanma tespit edilirken, bu sıçanlara MG uygulanması karaciğerdeki yağlanma odaklarını azalttı.

Sonuç olarak diyabetik sıçanlarda MG uygulamasının biyokimyasal parametreleri iyileştirdiği ve GSK-3 beta/Fyn/Nrf2 sinyal yollarını regüle ederek antioksidan savunma mekanizmalarını iyileştirdiği ve böylece diyabet tedavisinde destekleyici ve komplikasyonları hafifletici özellik gösterdiği söylenebilir. MG ekstraktı gibi fitokimyasalların daha doğru ve bilinçli kullanım imkânlarının ortaya konması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. MG ekstraktının etki mekanizmalarının ortaya konması birçok hastalığın veya bu hastalıkların komplikasyonlarının hafifletilmesi için uygun stratejiler geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Roberts DH, Lepore JJ, Maroo A, Semigran MJ, Ginns LC. Oxygen therapy improves cardiac index and pulmonary vascular resistance in patients with pulmonary hypertension. *Chest*. 2001;120(5):1547-55.
2. Shearn CT, Mercer KE, Orlicky DJ, et al. Short term feeding of a high fat diet exerts an additive effect on hepatocellular damage and steatosis in liver-specific PTEN knockout mice. *PloS one*. 2014;9(5):e96553.
3. Park M, Wu D, Park T, et al. APPL1 transgenic mice are protected from high-fat diet-induced cardiac dysfunction. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013;305(7):E795-E804.
4. Ferrannini E, Galvan AQ, Santoro D, Natali A. Potassium as a link between insulin and the renin-angiotensin-aldosterone system. *J Hypertens Suppl: official journal of the International Society of Hypertension*. 1992;10(1):S5-10.
5. Gheibi S, Kashfi K, Ghasemi A. A practical guide for induction of type-2 diabetes in rat: Incorporating a high-fat diet and streptozotocin. *Biomed Pharmacother*. 2017;95:605-13.
6. Selcuk MY, Aygen B, Dogukan A, et al. Chromium picolinate and chromium histidinate protects against renal dysfunction by modulation of NF- κ B pathway in high-fat diet fed and Streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutr Metab (Lond)*. 2012;9(1):30.
7. Gencoglu H, Tuzcu M, Hayirli A, Sahin K. Protective effects of resveratrol against streptozotocin-induced diabetes in rats by modulation of visfatin/sirtuin-1 pathway and glucose transporters. *Int J Food Sci Nutr*. 2015;66(3):314-20.
8. Sahin K, Orhan C, Akdemir F, et al. β -Cryptoxanthin ameliorates metabolic risk factors by regulating NF- κ B and Nrf2 pathways in insulin resistance induced by high-fat diet in rodents. *Food Chem Toxicol*. 2017;107:270-9.
9. Tuzcu Z, Orhan C, Sahin N, Juturu V, Sahin K. Cinnamon polyphenol extract inhibits hyperlipidemia and inflammation by modulation of transcription factors in high-fat diet-fed rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017.
10. Bailey CJ, Day C. Traditional plant medicines as treatments for diabetes. *Diabetes care*. 1989;12(8):553-64.
11. Pari L, Umamaheswari J. Antihyperglycaemic activity of *Musa sapientum* flowers: effect on lipid peroxidation in alloxan diabetic rats. *Phytother Res: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*. 2000;14(2):136-8.
12. Karlowicz-Bodalska K, Han S, Freier J, Smolenski M, Bodalska A. Curcuma Longa As Medicinal Herb In The Treatment of Diabetic Complications. *Acta Pol Pharm*. 2017;74(2):605-10.

13. Rao MU, Sreenivasulu M, Chengaiah B, Reddy KJ, Chetty CM. Herbal medicines for diabetes mellitus: a review. *Int J PharmTech Res.* 2010;2(3):1883-92.
14. Kaulmann A, Bohn T. Carotenoids, inflammation, and oxidative stress—implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention. *Nutr Res.* 2014;34(11):907-29.
15. Ota A, Ulrich NP. An overview of herbal products and secondary metabolites used for management of type two diabetes. *Front Pharmacol.* 2017;8:436.
16. Joshi SR, Parikh RM, Das A. Insulin-history, biochemistry, physiology and pharmacology. *J Assoc Physicians India.* 2007;55(L):19.
17. Kharroubi AT, Darwish HM. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World J Diabetes.* 2015;6(6):850.
18. Maritim A, Sanders a, Watkins J, 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol.* 2003;17(1):24-38.
19. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes.* 2005;54(6):1615-25.
20. Ismail MYM. Clinical evaluation of antidiabetic activity of *Trigonella* seeds and *Aegle marmelos* leaves. *World Appl Sci J.* 2009;7(10):1231-4.
21. Kangralkar V, Patil SD, Bandivadekar R. Oxidative stress and diabetes: a review. *Int J Pharm Appl.* 2010;1(1):38-45.
22. Ozougwu J, Obimba K, Belonwu C, Unakalamba C. The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *J Physiol Pathophysiol.* 2013;4(4):46-57.
23. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care.* 2018;41:13-27.
24. Craig ME, Hattersley A, Donaghue KC. Definition, epidemiology and classification of diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes.* 2009;10(s12):3-12.
25. Daneman D. Type 1 diabetes. *Lancet.* 2006;367(9513):847-58.
26. Devendra D, Liu E, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: recent developments. *BMJ.* 2004;328(7442):750.
27. Vermeulen I, Weets I, Asanghanwa M, et al. Contribution of antibodies against IA-2 β and zinc transporter 8 to classification of diabetes diagnosed under 40 years of age. *Diabetes Care.* 2011;34(8):1760-5.
28. Couper J, Donaghue KC. Phases of diabetes in children and adolescents. *Pediatr diabetes.* 2009;10(s12):13-6.

29. Kohei K. Pathophysiology of type 2 diabetes and its treatment policy. *JMAJ*. 2010;53(1):41-6.
30. Paramanick D, Sharma N. A Review on Herbs which are Used in Diabetes Mellitus. *Int J Drug Dev Res*. 2017;9(3).
31. TEMD Türk Endokrin ve Metabolizma Derneği "Diabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Klavuzu". http://temd.org.tr/admin/uploads/tbl_kilavuz/DIYABET2017_web.pdf 23.05.2018
32. Blumer I, Hadar E, Hadden DR, et al. Diabetes and pregnancy: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(11):4227-49.
33. Al-Noaemi MC, Shalayel MHF. Pathophysiology of gestational diabetes mellitus: the past, the present and the future. *Gestational Diabetes: InTech*; 2011.
34. Kim C, Newton KM, Knopp RH. Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetes care*. 2002;25(10):1862-8.
35. Sharif A, Hecking M, De Vries A, et al. Proceedings from an international consensus meeting on posttransplantation diabetes mellitus: recommendations and future directions. *Am J Transplant*. 2014;14(9):1992-2000.
36. Thomas MC, Moran J, Mathew TH, Russ GR, Rao MM. Early peri-operative hyperglycaemia and renal allograft rejection in patients without diabetes. *BMC nephrology*. 2000;1(1):1.
37. Uygur MM, Gogas Yavuz D. Diabetes mellitus klinik bulguları ve tanısı. *Turkiye Klinikleri J Med Sci*. 2017;3(3):120-9.
38. Van de Maele I, Rogier N, Daminet S. Retrospective study of owners' perception on home monitoring of blood glucose in diabetic dogs and cats. *Can Vet J*. 2005;46(8):718.
39. Ciechanowski, Kedzierska, Golembiewska, et al. The influence of oxidative stress on permeability of capillary vessels in the cheek pouch of hamsters with alloxan-induced diabetes. *Vasa*. 2004;33(4):211-4.
40. McNeill JH. *Experimental models of diabetes*. 1 st Edition, New York: Routledge, 2018.
41. Bell RH, Hye RJ. Animal models of diabetes mellitus: physiology and pathology. *J Surg Res*. 1983;35(5):433-60.
42. Goud BJ, Dwarakanath V, Chikka B. Streptozotocin-a diabetogenic agent in animal models. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2015;3(1):253-69.
43. Lenzen S. The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 2008;51(2):216-26.
44. Yamamoto H, Uchigata Y, Okamoto H. Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly (ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature*. 1981;294(5838):284.

45. Nukatsuka M, Yoshimura Y, Nishida M, Kawada J. Importance of the concentration of ATP in rat pancreatic β cells in the mechanism of streptozotocin-induced cytotoxicity. *J Endocrinol.* 1990;127(1):161-5.
46. Kashfi K, Cagen L, Cook GA. Diabetes and proteolysis: Effects on carnitine palmitoyltransferase-I and malonyl-CoA binding. *Lipids.* 1995;30(5):383-8.
47. Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul C, Ramarao P. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res.* 2005;52(4):313-20.
48. Reed M, Meszaros K, Entes L, et al. A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat. *Metabolism.* 2000;49(11):1390-4.
49. Zhang M, Lv X-Y, Li J, Xu Z-G, Chen L. The characterization of high-fat diet and multiple low-dose streptozotocin induced type 2 diabetes rat model. *Exp Diabetes Res.* 2009;2008.
50. Skovsø S. Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. *J Diabetes Investig.* 2014;5(4):349-58.
51. Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell.* 2012;148(5):852-71.
52. Asrafuzzaman M, Cao Y, Afroz R, et al. Animal models for assessing the impact of natural products on the aetiology and metabolic pathophysiology of Type 2 diabetes. *Biomed Pharmacother.* 2017;89:1242-51.
53. Gheibi S, Bakhtiarzadeh F, Jeddi S, et al. Nitrite increases glucose-stimulated insulin secretion and islet insulin content in obese type 2 diabetic male rats. *Nitric Oxide.* 2017;64:39-51.
54. Atanasovska E, Tasic V, Slaninka-Miceska M, et al. Six week follow-up of metabolic effects induced by a high-fat diet and streptozotocin in a rodent model of type 2 diabetes mellitus. *Contributions Sec Med Sci.* 2014;35(1):169-79.
55. Chaudhari HS, Bhandari U, Khanna G. Embelia ribes extract reduces high fat diet and low dose streptozotocin-induced diabetic nephrotoxicity in rats. *EXCLI journal.* 2013;12:858.
56. Saliu JA, Oboh G, Omojokun OS, et al. Effect of dietary supplementation of Padauk (*Pterocarpus soyauxii*) leaf on high fat diet/streptozotocin induced diabetes in rats' brain and platelets. *Biomed Pharmacother.* 2016;84:1194-201.
57. Hou L, Lian K, Yao M, et al. Reduction of n-3 PUFAs, specifically DHA and EPA, and enhancement of peroxisomal beta-oxidation in type 2 diabetic rat heart. *Cardiovasc Diabetol.* 2012;11(1):126.
58. Hu S-H, Jiang T, Yang S-S, Yang Y. Pioglitazone ameliorates intracerebral insulin resistance and tau-protein hyperphosphorylation in rats with type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2013;121(04):220-4.

59. Tüzün M. Tanım, sıklık, tanı, sınıflandırma, tipleri, dereceleri ve komplikasyonları. Obezite, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd İstanbul. 1995:1-36.
60. Dedeoğlu Ö. Obezlerde Vücut Yağ Dağılımı ve Epikardiyal Yağ İle Vitamin D, Osteokalsin ve Pentraksin 3 Arasındaki İlişki. Tıpta Uzmanlık Tezi, Denizli: Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, 2016.
61. Björntorp P, Rosmond R. Neuroendocrine abnormalities in visceral obesity. *Int J Obes.* 2000;24(S2):S80.
62. Hill JO, Melanson EL, Wyatt HT. Dietary fat intake and regulation of energy balance: implications for obesity. *J Nutr.* 2000;130(2):284S-8S.
63. Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity.* 2007;15(4):798-808.
64. Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, D'Alessio D, Tso P. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J Nutr.* 2003;133(4):1081-7.
65. Lee M, Martin H, Firpo MA, Demerath EW. Inverse association between adiposity and telomere length: The Fels Longitudinal Study. *Am J Hum Biol.* 2011;23(1):100-6.
66. Atmaca A. Diabetes mellitusun tanı ve izlem kriterleri. *J Clin Exp Med* 2012;29(1s):2-6.
67. Zimmet P, Dowse G, Bennett P. Hyperinsulinaemia is a predictor of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabete Metab.* 1991;17(1 Pt 2):101-8.
68. Bonzón-Kulichenko E, Moltó E, Pintado C, et al. Changes in visceral adipose tissue plasma membrane lipid composition in old rats are associated with adipocyte hypertrophy with aging. *J Gerontol. Series A.* 2018.
69. Acosta-Montaño P, García-González V. Effects of Dietary Fatty Acids in Pancreatic Beta Cell Metabolism, Implications in Homeostasis. *Nutrients.* 2018;10(4):393.
70. Dinççağ N. Diabetes mellitus tanı ve tedavisinde güncel durum. *İç Hastalıkları Dergisi.* 2011;18(4):181-223.
71. Eray E, Balcı M. Tip 2 diyabet tedavisi. *Dahili Tıp Bilimleri Dergisi.* 2005;12(2):66-71.
72. Alphan E. Diabetes Mellitus ve Beslenme Tedavisi. In: Alphan E, Baş M, Baysal A, Kızıltan G, Pekcan P, Özenoğlu A, et al., (Editors). *Hastalıklarda Beslenme Tedavisi.* Ankara: Hatiboğlu Yayınları 2013: 415-508.
73. Khalaf AJ, Whitford DL. The use of complementary and alternative medicine by patients with diabetes mellitus in Bahrain: a cross-sectional study. *BMC Complement Altern Med.* 2010;10(1):35.

74. Qiu J, Zhu H, Liu P, Wang J, Lu L. Protective effects of dietary polyphenols from black soybean seed coats on islet and renal function in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Sci Food Agric.* 2018;98(6):2350-9.
75. Syiem D, Monsang SW, Sharma R. Hypoglycemic and anti-hyperglycemic activity of curcuma amada roxb. In normal and alloxan-induced diabetic mice. *Pharmacologyonline.* 2010; 3: 364-372.
76. Srinivasan M, Chandrasekhara N. Effect of mango ginger (*Curcuma amada roxb.*) on lipid status in normal and hypertriglyceridemic rats. *JFST.* 1992;29(2):130-2.
77. Srinivasan M, Chandrasekhara N, Srinivasan K. Cholesterol lowering activity of mango ginger (*Curcuma amada Roxb.*) in induced hypercholesterolemic rats. *Eur Food Res Technol.* 2008;227(4):1159.
78. Ma Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2013;53:401-26.
79. Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Kensler TW. The role of Keap1 in cellular protective responses. *Chem Res Toxicol.* 2005;18(12):1779-91.
80. Abdel-Magid AF. Therapeutic Potential for Modulation of Nrf2-Keap-1 Signaling Pathway as Treatment for Diabetes and Other Disorders. *ACS Med Chem Lett.* 2016;7(7): 660–661
81. Gao C, Hölscher C, Liu Y, Li L. GSK3: a key target for the development of novel treatments for type 2 diabetes mellitus and Alzheimer disease. *Rev Neuroscienc.* 2012;23(1):1-11.
82. Lv Z, Hu M, Ren X, et al. Fyn mediates high glucose-induced actin cytoskeleton reorganization of podocytes via promoting ROCK activation in vitro. *J Diabetes Res.* 2016;2016.
83. Yang F, Li B, Dong X, Cui W, Luo P. The beneficial effects of zinc on diabetes-induced kidney damage in murine rodent model of type 1 diabetes mellitus. *J Trace Elem Med Biol.* 2017;42:1-10.
84. Shang G, Tang X, Gao P, et al. Sulforaphane attenuation of experimental diabetic nephropathy involves GSK-3 beta/Fyn/Nrf2 signaling pathway. *J Nutr Biochem.* 2015;26(6):596-606.
85. Mathur A, Rizvi F, Kakkar P. PHLPP2 down regulation influences nuclear Nrf2 stability via Akt-1/Gsk3β/Fyn kinase axis in acetaminophen induced oxidative renal toxicity: Protection accorded by morin. *Food Chem Toxicol.* 2016;89:19-31.
86. Liu B, Jiang H, Lu J, et al. Grape seed procyanidin extract ameliorates lead-induced liver injury via miRNA153 and AKT/GSK-3β/Fyn-mediated Nrf2 activation. *J Nutr Biochem.* 2018;52:115-23.
87. Jain AK, Jaiswal AK. GSK-3β acts upstream of Fyn kinase in regulation of nuclear export and degradation of NF-E2 related factor 2. *J Biol Chem.* 2007;282(22):16502-10.

88. Jatoi SA, Kikuchi A, Gilani SA, Watanabe KN. Phytochemical, pharmacological and ethnobotanical studies in mango ginger (*Curcuma amada* Roxb.; Zingiberaceae). *Phytother Res.* 2007;21(6):507-16.
89. Ramachandran C, Portalatin GM, Prado AM, et al. In Vivo Antitumor Effect of Supercritical CO₂ Extract of Mango Ginger (*Curcuma amada* Roxb) in U-87MG Human Glioblastoma Nude Mice Xenografts. *J Evid Based Complementary Altern Med.* 2017;22(2):260-7.
90. Policegoudra R, Aradhya S, Singh L. Mango ginger (*Curcuma amada* Roxb.)—A promising spice for phytochemicals and biological activities. *J Biosci.* 2011;36(4):739-48.
91. Policegoudra R, Divakar S, Aradhya S. Identification of difurocumenonol, a new antimicrobial compound from mango ginger (*Curcuma amada* Roxb.) rhizome. *J Appl Microbiol.* 2007;102(6):1594-602.
92. Chandarana H, Baluja S, Chanda S. Comparison of antibacterial activities of selected species of Zingiberaceae family and some synthetic compounds. *Turk. J. Biol.* 2005;29(2):83-97.
93. Srinivasan M, Chandrasekhara N. Effect of mango ginger [*Curcuma amada* Roxb.] on triton WR-1339 induced-hyperlipidemia and plasma lipases activity in the rat. *Nutr Res.* 1993;13(10):1183-90.
94. Orhan C, Şahin N, Tuzcu Z, Komorowski JR, Şahin K. Combined oral supplementation of chromium picolinate, docosahexaenoic acid, and boron enhances neuroprotection in rats fed a high-fat diet. *Turk J Med Sci.* 2017;47(5):1616-25.
95. Sahin K, Orhan C, Akdemir F, Tuzcu M, Sahin N, Yilmaz I, Ali S, Deshpande J, Juturu V. Mesozeaxanthin protects the liver and reduces cardio-metabolic risk factors in an insulin resistant rodent model. *Food Nutr Res.* 2017;61(1):1353360.
96. Dogukan A, Tuzcu M, Juturu V, Cikim G, Ozercan I, Komorowski J, Sahin K. Effects of chromium histidinate on renal function, oxidative stress, and heat-shock proteins in fat-fed and streptozotocin-treated rats. *J Ren Nutr.* 2010;20(2):112-20.
97. Sharma S, Pathak S, Gupta G, et al. Pharmacological evaluation of aqueous extract of *syzigium cumini* for its antihyperglycemic and antidiyslipidemic properties in diabetic rats fed a high cholesterol diet-Role of PPAR γ and PPAR α . *Biomed Pharmacother.* 2017;89:447-53.
98. Stephen Irudayaraj S, Christudas S, Antony S, et al. Protective effects of *Ficus carica* leaves on glucose and lipids levels, carbohydrate metabolism enzymes and β -cells in type 2 diabetic rats. *Pharm Biol.* 2017;55(1):1074-81.
99. Pournaghi P, Sadrkhanlou RA, Hasanzadeh S, Foroughi A. An investigation on body weights, blood glucose levels and pituitary-gonadal axis hormones in diabetic and metformin-treated diabetic female rats. *Vet Res Forum.* 2012;3:79-84.
100. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.* 2005; 38(12):1103-11.

101. Yağan A, Kesim S, Liman N. Effect of low-dose doxycycline on serum oxidative status, gingival antioxidant levels, and alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol.* 2014;85:478-89.
102. Barim O, Karatepe M. The effects of pollution on the vitamins A, E, C, beta-carotene contents and oxidative stress of the freshwater crayfish, *Astacus leptodactylus*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2010;73(2):138-42.
103. Tuzcu M, Sahin N, Orhan C, et al. Impact of chromium histidinate on high fat diet induced obesity in rats. *Nutr Metab (Lond).* 2011;8:28.
104. Sahin K, Orhan C, Tuzcu M, Sahin N, Ozdemir O, Juturu V. Ingested capsaicinoids can prevent low-fat-high-carbohydrate diet and high-fat diet-induced obesity by regulating the NADPH oxidase and Nrf2 pathways. *J Inflamm Res.* 2017;10:161-8.
105. Luna LG. *Manual of Histologic Staining Methods of The Armed Forces Institute of Pathology. Chapter 4: Routine Staining Procedures.* USA: The Blakiston Division, McGraw-Hill Book Company: 1968: 32-46.
106. Ross MH, Reith EJ, Romrell LJ. *Histology. A Text and Atlas (Kimberly Kist), 2nd edition.* Baltimore, MD USA: Williams and Wilkins 1989.
107. Sahin K, Tuzcu M, Orhan C, et al. Anti-diabetic activity of chromium picolinate and biotin in rats with type 2 diabetes induced by high-fat diet and streptozotocin. *Br J Nutr.* 2013;110(2):197-205.
108. IBM SPSS, IBM Corp. Released 2012. *IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0.* Armonk, NY: USA.
109. Podell BK, Ackart DF, Richardson MA, et al. A model of type 2 diabetes in the guinea pig using sequential diet-induced glucose intolerance and streptozotocin treatment. *Dis Model Mech.* 2017;10(2):151-62.
110. Ghasemi A, Jeddi S. Anti-obesity and anti-diabetic effects of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide.* 2017; 70: 9-24.
111. Srinivasan K, Ramarao P. Animal models in type 2 diabetes research: an overview. *Indian Journal of Medical Research.* 2007;125(3):451.
112. Ebel F, Strain G, Doyle R. *Dietary Therapy of Diabetes Mellitus.* In: Poretzky L. (Editor). *Principles of Diabetes Mellitus.* Boston: Springer International Publishing 2017: 677-686.
113. Migdal AL, Herzlinger S, Abrahamson MJ. *Treating Type 2 Diabetes Mellitus.* In: Poretzky L. (editor). *Principles of Diabetes Mellitus.* Boston: Springer International Publishing 2017:905-27.
114. Ryan E, Pick M, Marceau C. Use of alternative medicines in diabetes mellitus. *Diabet Med.* 2001;18(3):242-5.
115. Yeh GY, Eisenberg DM, Davis RB, Phillips RS. Use of complementary and alternative medicine among persons with diabetes mellitus: results of a national survey. *Am J Public Health.* 2002;92(10):1648-52.

116. Medagama AB, Bandara R. The use of Complementary and Alternative Medicines (CAMs) in the treatment of diabetes mellitus: is continued use safe and effective?. *Nutr J*. 2014;13(1):102.
117. Danda RS, Habiba NM, Rincon-Choles H, et al. Kidney involvement in a nongenetic rat model of type 2 diabetes. *Kidney Int*. 2005;68(6):2562-71.
118. Zhang F, Ye C, Li G, et al. The rat model of type 2 diabetic mellitus and its glycometabolism characters. *Exp Anim*. 2003;52(5):401-7.
119. Wang H-J, Jin Y-X, Shen W, et al. Low dose streptozotocin (STZ) combined with high energy intake can effectively induce type 2 diabetes through altering the related gene expression. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2007;16(S1):412-7.
120. Glass DJ. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37(10):1974-84.
121. Kelleher AR, Fairchild TJ, Keslacy S. STZ-induced skeletal muscle atrophy is associated with increased p65 content and downregulation of insulin pathway without NF- κ B canonical cascade activation. *Acta Diabetol*. 2010;47(4):315-23.
122. Swanston-Flatt S, Day C, Bailey C, Flatt P. Traditional plant treatments for diabetes. Studies in normal and streptozotocin diabetic mice. *Diabetologia*. 1990;33(8):462-4.
123. Sharma S, Kulkarni SK, Chopra K. Curcumin, the active principle of turmeric (*Curcuma longa*), ameliorates diabetic nephropathy in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2006;33(10):940-5.
124. Furman BL. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Curr Protoc Pharmacol*. 2015;5.47. 1-5.. 20.
125. Gandhi GR, Stalin A, Balakrishna K, et al. Insulin sensitization via partial agonism of PPAR γ and glucose uptake through translocation and activation of GLUT4 in PI3K/p-Akt signaling pathway by embelin in type 2 diabetic rats. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(1):2243-55.
126. Li Y, Zhang T, Zhang X, et al. Cinepazide maleate improves cognitive function and protects hippocampal neurons in diabetic rats with chronic cerebral hypoperfusion. *Biol Pharm Bull*. 2017;40(3):249-55.
127. Kongkachuichai R, Prangthip P, Surasiang R, et al. Effect of Riceberry oil (deep purple oil; *Oryza sativa Indica*) supplementation on hyperglycemia and change in lipid profile in Streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats fed a high fat diet. *IFRJ*. 2013;20(2).
128. Sendrayaperumal V, Pillai SI, Subramanian S. Design, synthesis and characterization of zinc–morin, a metal flavonol complex and evaluation of its antidiabetic potential in HFD–STZ induced type 2 diabetes in rats. *Chem Biol Interact*. 2014;219:9-17.
129. Sahin K, Onderci M, Tuzcu M, et al. Effect of chromium on carbohydrate and lipid metabolism in a rat model of type 2 diabetes mellitus: the fat-fed, streptozotocin-treated rat. *Metabolism*. 2007;56(9):1233-40.

130. Rajagopal SK, Manickam P, Periyasamy V, Namasivayam N. Activity of *Cassia auriculata* leaf extract in rats with alcoholic liver injury. *J Nutr Biochem*. 2003;14(8):452-8.
131. Rajesh M, Latha M. Preliminary evaluation of the antihepatotoxic activity of Kamilari, a polyherbal formulation. *J Ethnopharmacol*. 2004;91(1):99-104.
132. Mujumdar A, Naik D, Dandge C, Puntambekar H. Antiinflammatory activity of *Curcuma amada* Roxb. in albino rats. *Indian J Pharmacol*. 2000;32(6):375-7.
133. Rask-Madsen C, Kahn CR. Tissue-specific insulin signaling, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(9):2052-9.
134. Chatrath H, Vuppalanchi R, Chalasani N, editors. Dyslipidemia in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis*. 2012; 33(4): 380–388..
135. Kotronen A, Westerbacka J, Bergholm R, Pietiläinen KH, Yki-Järvinen H. Liver fat in the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(9):3490-7.
136. Kaiser N, Sasson S, Feener EP, et al. Differential regulation of glucose transport and transporters by glucose in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Diabetes*. 1993;42(1):80-9.
137. Almdal T, Vilstrup H. Exogenous hyperglucagonaemia in insulin controlled diabetic rats increases urea excretion and nitrogen loss from organs. *Diabetologia*. 1988;31(11):836-41.
138. Dewanjee S, Das AK, Sahu R, Gangopadhyay M. Antidiabetic activity of *Diospyros peregrina* fruit: effect on hyperglycemia, hyperlipidemia and augmented oxidative stress in experimental type 2 diabetes. *Food Chem Toxicol*. 2009;47(10):2679-85.
139. Reddy SV, Tiwari AK, Kumar US, Rao RJ, Rao JM. Free radical scavenging, enzyme inhibitory constituents from antidiabetic Ayurvedic medicinal plant *Hydnocarpus wightiana* Blume. *Phytother Res*. 2005;19(4):277-81.
140. Kamalakkannan N, Prince PSM. Antihyperglycaemic and antioxidant effect of rutin, a polyphenolic flavonoid, in streptozotocin-induced diabetic wistar rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2006;98(1):97-103.
141. Palsamy P, Subramanian S. Ameliorative potential of resveratrol on proinflammatory cytokines, hyperglycemia mediated oxidative stress, and pancreatic β -cell dysfunction in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. *J Cell Physiol*. 2010;224(2):423-32.
142. Tuzcu M, Orhan C, Muz OE, et al. Lutein and zeaxanthin isomers modulates lipid metabolism and the inflammatory state of retina in obesity-induced high-fat diet rodent model. *BMC Ophthalmol*. 2017;17(1):129.
143. Bevan P. Insulin signalling. *J Cell Sci*. 2001;114(8):1429-30.
144. Mora A, Komander D, van Aalten DM, Alessi DR. PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. *Semin Cell Dev Biol*. 2004;15(2):161-170.

145. Harrington LS, Findlay GM, Lamb RF. Restraining PI3K: mTOR signalling goes back to the membrane. *Trends Biochem Sci.* 2005;30(1):35-42.
146. Sakamoto K, Holman GD. Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic. *Am J Physiol Endocrinol.* 2008;295(1):E29-E37.
147. Kitamura T, Kitamura Y, Kuroda S, et al. Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B by the serine-threonine kinase Akt. *Mol Cell Biol.* 1999;19(9):6286-96.
148. Grundleger ML, Thenen SW. Decreased insulin binding, glucose transport, and glucose metabolism in soleus muscle of rats fed a high fat diet. *Diabetes.* 1982;31(3):232-7.
149. Youngren JF, Paik J, Barnard RJ. Impaired insulin-receptor autophosphorylation is an early defect in fat-fed, insulin-resistant rats. *J Appl Physiol.* 2001;91(5):2240-7.
150. Zierath JR, Houseknecht KL, Gnudi L, Kahn BB. High-fat feeding impairs insulin-stimulated GLUT4 recruitment via an early insulin-signaling defect. *Diabetes.* 1997;46(2):215-23.
151. Kim J-Y, Hickner RC, Cortright RL, Dohm GL, Houmard JA. Lipid oxidation is reduced in obese human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000;279(5):E1039-E44.
152. Hansen PA, Han DH, Marshall BA, et al. A high fat diet impairs stimulation of glucose transport in muscle functional evaluation of potential mechanisms. *J Biol Chem.* 1998;273(40):26157-63.
153. Zhang C, Lu X, Tan Y, et al. Diabetes-induced hepatic pathogenic damage, inflammation, oxidative stress, and insulin resistance was exacerbated in zinc deficient mouse model. *PLoS One.* 2012;7(12):e49257.
154. Grimes CA, Jope RS. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 β in cellular signaling. *Prog Neurobiol.* 2001;65(4):391-426.
155. Jain AK, Jaiswal AK. Phosphorylation of tyrosine 568 controls nuclear export of Nrf2. *J Biol Chem.* 2006;281(17):12132-42.
156. Salazar M, Rojo AI, Velasco D, de Sagarra RM, Cuadrado A. Glycogen synthase kinase-3 β inhibits the xenobiotic and antioxidant cell response by direct phosphorylation and nuclear exclusion of the transcription factor Nrf2. *J Biol Chem.* 2006;281(21):14841-51.
157. Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Cole RN, et al. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc Natl Acad Sci.* 2002;99(18):11908-13.
158. Bitar MS, Al-Mulla F. A defect in Nrf2 signaling constitutes a mechanism for cellular stress hypersensitivity in a genetic rat model of type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011;301(6):E1119-E29.

159. Palsamy P, Subramanian S. Resveratrol protects diabetic kidney by attenuating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammatory cytokines via Nrf2–Keap1 signaling. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1812(7):719-31.
160. Das S, Roy P, Pal R, et al. Engineered silybin nanoparticles educe efficient control in experimental diabetes. *PloS one*. 2014;9(7):e101818.



8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Emrah YAZICI
Doğum Yeri: K1ğı / Bingöl
Doğum Tarihi: 1986
Yazışma Adresi: Bingöl İl Tarım ve Orman Müdürlüğü 12000, Bingöl /
Türkiye
Medeni Hali: Evli
Yabancı Dil: İngilizce
Telefon: 0 426 611 22 40
Faks: 0 426 611 22 91
e-posta: emrah.yazici@tarim.gov.tr

EĞİTİM DURUMU

Mezuniyet Yılı	Derece	Kurum	Öğrenim Alanı
2011	Lisans	İstanbul Üniversitesi	Veteriner Hekimliği

Kongre Katılım ve Sertifikalar

- Gıda Kontrol Görevlisi Sertifikası 2016
- KHVHD Sürekli Eğitim Kongresi 2009
- Bingöl Arıcılık Çalıştayı 2016