

T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TİP II DİYABET OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA MELATONİN VE
L-CARNİTİN TEDAVİSİNİN OKSİDATİF STRES VE DAMAR YANITLARI
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

DERYA SELCEN SALMANOĞLU

DANIŞMAN

DOÇ. DR. TUĞBA GÜRPINAR ÇAVUŞOĞLU

MANİSA 2013

T.C
YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
ULUSAL TEZ MERKEZİ

TEZ VERİ GİRİŞİ VE YAYIMLAMA İZİN FORMU

Referans No	10004704
Yazar Adı / Soyadı	DERYA SELCEN SALMANOĞLU
Uyruğu / T.C.Kimlik No	TÜRKİYE / 21211852158
Telefon	5413280198
E-Posta	selcenderya@gmail.com
Tezin Dili	Türkçe
Tezin Özgün Adı	TİP II DİYABET OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA MELATONİN VE L-CARNİTİN TEDAVİSİNİN OKSİDATİF STRES VE DAMAR YANITLARI ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ
Tezin Tercümesi	THE INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF MELATONIN AND L-CARNITINE ON OXIDATIVE STRESS AND VASCULAR RESPONSES IN TYPE 2 DIABETIC RAT MODEL
Konu	Eczacılık ve Farmakoloji
Üniversite	Celal Bayar Üniversitesi
Enstitü / Hastane	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Bölüm	Dahili Tıp Bilimleri Bölümü
Anabilim Dalı	Farmakoloji Anabilim Dalı
Bilim Dalı	Farmakoloji Bilim Dalı
Tez Türü	Yüksek Lisans
Yılı	2013
Sayfa	88
Tez Danışmanları	DOÇ. DR. TUĞBA ÇAVUŞOĞLU 45253202474
Dizin Terimleri	
Önerilen Dizin Terimleri	Diyabet, Oksidatif Stres, Melatonin, L-karnitin, Sıçan
Kısıtlama	Yok

Yukarıda başlığı yazılı olan tezinin, ilgilenenlerin incelemesine sunulmak üzere Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi tarafından arşivlenmesi, kağıt, mikroform veya elektronik formatta, internet dahil olmak üzere her türlü ortamda çoğaltılması, ödünç verilmesi, dağıtımı ve yayımı için, tezimize ilgili fikri mülkiyet haklarımız saklı kalmak üzere hiçbir ücret (royalty) ve erteleme talep etmeksizin izin verdiğimi beyan ederim.

03.07.2013

İmza:.....

YÜKSEK LİSANS TEZ SINAVI TUTANAĞI

Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Farmakoloji** Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi **Derya Selcen SALMANOĞLU** Yüksek Lisans tezi olarak hazırladığı “**Tip II diyabet oluşturulmuş sıçanlarda Melatonin ve L-carnitin tedavisinin oksidatif stres ve damar yanıtları üzerine etkilerinin incelenmesi**” başlıklı bu çalışma, jürimizce Lisansüstü Eğitim Öğretim Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek “**KABUL**” kararı verilmiştir. 24/06/2013

Jüri Üyesi:

İmza

Doç. Dr. Tuğba G. ÇAVUŞOĞLU (Tez Danışmanı)

.....

Prof. Dr. Ercüment ÖLMEZ (Farmakoloji A.B.D. Bölüm Başkanı)

.....

Prof. Dr. Murat DEMET (Psikiyatri A.B.D. Öğretim Üyesi)

.....

Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. İbrahim TUĞLU
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

“Tip II diyabet oluşturulmuş sıçanlarda Melatonin ve L-carnitin tedavisinin oksidatif stres ve damar yanıtları üzerine etkilerinin incelenmesi” başlıklı tez konumun belirlenmesinde ve tüm hazırlık aşamalarında ve ayrıca eğitimim süresince tecrübelerinden yararlandığım telkin ve yönlendirmeleriyle sonuca ulaşmamı sağlayan değerli danışman hocam Doç. Dr. Tuğba Çavuşoğlu’na,

Yüksek lisans eğitimim süresince bana emek veren ve yönlendiren Farmakoloji Anabilim Dalındaki tüm hocalarıma, tez çalışmamda değerli yardımlarını esirgemeyen, Doç. Dr. Kamil Vural ile çalışmamdaki biyokimyasal analizlerdeki katkılarından dolayı Prof. Dr. Ahmet Var’a,

Eğitimim süresince ilgi ve yardımlarıyla yanımda olan Farmakoloji Anabilim Dalındaki tüm arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Varlıklarıyla, her an her yerde mutluluk duyduğum aileme desteklerinden dolayı teşekkürü bir borç bilirim.

Saygı ve Sevgilerimle...

Derya Selcen SALMANOğLU

ÖZET

Tip 2 diyabet çok yaygın görülen bir sağlık sorunudur. Vasküler disfonksiyon diyabetik kardiyovasküler hastalıkların patogeneğinde major rol oynar. Hiperglisemi, oksidatif stres ve dislipidemi gibi bir çok önemli faktörün vasküler disfonksiyona neden olduğu düşünülmektedir. Antioksidan parametrelerdeki azalma ve serbest radikal oluşumunda artma oksidatif strese neden olur ve bu durum diyabetik komplikasyonların gelişmesine katkıda bulunur.

L- karnitin melatonin kadar güçlü bir antioksidan özelliğine sahip olduğu görülmüştür. Melatonin triptofandan derivate edilen bir lipofilik indolamindir, esas olarak pineal bezden üretilir ve en güçlü antioksidan ajanlardan biri olarak kabul edilir. Daha önce melatonin streptozosin ile indüklenen diyabetik ratlarda bozulmuş oksidatif durumu etkili bir şekilde normaleştirebildiği gösterilmiştir. L- Karnitin küçük bir suda eriyen kuaterner amin olup, lipid metabolizmasında çok önemli rol oynar. Diyabette plazma karnitin düzeylerinde belirgin bir azalma gösterilmiştir bu da diyabetik komplikasyonların patofizyolojisinde L- karnitin önemli bir rol oynayabileceğini akla getirmektedir.

Bu çalışmada düşük multipl doz intraperitoneal STZ enjeksiyonu (2 kez, 30 mg/kg/ i.p) ve 8 haftalık yüksek yağlı diyet ile diyabet indüklenmiştir. Daha sonra diyabetik hayvanlar ; Kontrol (K), yüksek yağlı diyet (HFD) ve STZ ile indüklenen diyabetik grup (HFD + STZ), melatonin (10mg/kg/g i.p) tedavisi alacak diyabetik grup (HFD+STZ+MLT), L- karnitin (0.6 g/kg i.p) tedavisi alacak diyabetik grup (HFD+STZ +LC) ve glibenklamid (5mg/kg/g oral) tedavisi alacak diyabetik grup (HFD+STZ+GB) olmak üzere rastgele gruplara ayrılmıştır. Serumda açlık kan şekeri, insülin ,total kolesterol, HDL- kolesterol, LDL kolesterol, trigliserit ve malodialdehid (MDA) seviyeleri ölçüldü. Aortadaki endotel fonksiyonunun belirlenmesinde, endotel bağlı gevşeme için asetilkolin , endotelden bağımsız gevşeme için ise sodyum nitroprusid ile indüklenen yanıtlara bakıldı. Ayrıca sıçan karaciğer örneklerinde, glutatyon peroksidaz, süperoksid dismutaz ve nitrik oksit aktivitelere bakıldı.

Sonuçlarımıza göre melatonin ve L- karnitin tedavisi kan şekeri, total kolesterol ve LDL düzeylerini belirgin olarak arttırdı. MDA düzeyleri melatonin tedavisi ile anlamlı olarak azalırken SOD düzeyleri gruplar arasında değişiklik göstermedi. Sonuçlara göre özellikle melatoninin diyabette damar yanıtları ve endotel disfonksiyonu üzerine olumlu etkileri gösterildi.

Anahtar kelimeler: Diyabet, Oksidatif Stres, Melatonin, L-karnitin, Sıçan

SUMMARY

Tip 2 diabetes mellitus is a very common health disorder. Vascular dysfunction may play a major role in the pathogenesis of diabetic cardiovascular diseases. Mechanisms underlying the vascular dysfunction are multifactorial; hyperglycaemia, oxidative stress and dyslipidaemia are thought to be the important factors. Reduction in the antioxidant parameters and increased free radical formation contribute to the development of oxidative stress in diabetes and responsible in the development of diabetic complications.

L-carnitine as well as melatonin were shown to possess strong antioxidant properties. Melatonin is a lipophilic indolamine derived from tryptophan, mainly produced from pineal gland and is considered to be the one of the most potent antioxidative agent. It has been shown that melatonin reduces streptozotocin (STZ) -induced oxidative stress in diabetic rats. L-Carnitine is a small water-soluble quaternary amine that plays an important role in lipid metabolism. In the diabetes a significant reduction in plasma carnitine levels has been shown, which suggests that L-carnitine may play an important role in the pathophysiology of diabetic complications.

Diabetes induced with high fat diet (for 8 weeks) and multipl low doses intraperitoneal injection of STZ (twice, 30 mg/kg/ i.p). The diabetic animals were randomly assigned to one of the experimental groups as follows: Control group high fat diet (HFD) and STZ-induced diabetic group (HFD + STZ) , HFD + STZ diabetic group received L-carnitine (0.6 g/kg i.p), HFD + STZ diabetic group received melatonin (10mg/kg/g i.p) and HFD + STZ diabetic group received glibenclamide (5mg/kg/g oral). The serum fasting blood glucose, insulin, total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL- cholesterol, triglyceride and malondialdehyde (MDA) level were tested. Acetylcholine-induced endothelium-dependent relaxation and sodium nitroprusside induced endothelium-independent relaxation were measured in aortas for estimating endothelial function. Also, glutathione peroxidase (GSH- Px), superoxide dismutase (SOD) and nitric oxide (NO) levels activities were determined in rat liver.

According to our results. melatonin and L carnitin treatment significantly increased fasting blood glucose, total colesterol, and LDL levels. MDA levels significantly decreased with the melatonin treatment whereas SOD levels were not significantly changed between the groups. The results showed that especially melatonin restores the vascular responses and endothelial dysfunction in diabetes.

Key words: Diabetes, HFD, Oxidative stress, Melatonin, L-carnitin, Rat

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

DM	: Diyabetes mellitus
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
IDF	: Uluslararası Diyabet Federasyonu
TURDEP	: Türk Diyabet Epidemiyoloji Çalışma Grubu
IDDM	: İnsülin Bağımlı Diyabet
NIDDM	: İnsülin Bağımsız Diyabet
ADA	: Amerikan Diyabet Derneği
GDM	: Gestasyonel Diyabetes Mellitus
STZ	: Streptozotosin
HFD	: Yüksek yağ içerikli diyet
NO	: Nitrik oksit
eNOs	: Endotelial nitrik oksit sentetaz enzimi
cGMP	: Siklik 3'5' guanozin monofosfat
L-NMMA	: NG-monometil-L-arjinin
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
CRP	: C- reaktif proteini
ADMA	: Asimetrik dimetil arjinin
LDL	: Düşük dansiteli lipoprotein
ROS	: Reaktif oksijen türleri
HBA1C	: Plazma glikozile alfa hemoglobin
DAG	: Diasilgliserol
AGE	: Glikasyon son ürünleri
MDA	: Malondialdehid
O₂⁻	: Süperoksit anyonu
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HO[·]	: Hidroksil radikali
SOD	: Süperoksit dismutaz
GPX	: Glutasyon peroksidaz
PKC	: Protein kinaz C
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotit
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
SCN	: Suprachiasmatic nükleus
PVN	: Periventriküler nükleus
NAT	: N-asetil transferaz
L-NAME	: N ^G -nitro-L-arjinin metil ester
HDL	: Yüksek dansiteli lipoprotein
TG	: Trigliserit
TK	: Total Kolesterol

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
ÖZET	II
SUMMARY	III
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	IV
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Diyabetes Mellitus Tanımı ve Tarihiçesi.....	3
2.2. Diyabetes Mellitus'un Epidemiyolojisi	5
2.3. Diyabetes Mellitus'un Sınıflandırılması.....	6
2.4. Diyabetes Mellitus'un Komplikasyonları.....	8
2.5. Deneysel Diyabet Modelleri.....	9
2.6. Diyabet ve Endotel Disfonksiyonu	13
2.7. Serbest Radikaller.....	21
2.8. Diyabet ve Oksidatif Stres	25
2.9. L-Karnitin	30
2.10. Melatonin.....	33
3. GEREÇ-YÖNTEM.....	38
3.1. Ratlarda Deneysel Diyabet Modelinin Oluşturulması ve Tedavi Uygulaması:	38
3.2. Damar Yanıtlarının İncelenmesi	39
3.3. Kan ve Karaciğer Örneklerinin Ölçüme Hazır Hale Getirilmesi ve Saklanması.....	40
3.4. Kanda Açlık Kan Şekeri, Total Kolesterol, Trigliserid, HDL-Kolesterol, LDL-Kolesterol Seviyelerinin Ölçümü	41
3.5 Serum Örneklerinde MDA Ölçümü	42
3.6 İnsülin Seviyelerinin Ölçümü:.....	42
3.7 Serum NO Seviyelerinin Ölçümü:.....	43
3.8 Süperoksid Dismutaz Aktivitesi Ölçümü:	44
3.9 Glutatyon Peroksidaz Aktivitesi Ölçümü:	45
3.10 İstatiksel Analizler:	45
4. BULGULAR.....	46
4.1 Deney Hayvanlarının Genel Bulguları:.....	46
4.2 Damar Kasılma ve Gevşeme Yanıtlarına Ait Bulgular:.....	48
4.3. Deney Hayvanlarının Lipid Profiline Ait Bulgular:	53
4.4. Deney Hayvanlarının İnsülin ve NO Seviyelerine Ait Bulgular:	54
4.5. Deney Hayvanlarının MDA Seviyelerine Ait Bulgular:.....	55

İÇİNDEKİLER (Devam)

4.6. Deney Hayvanlarının Süperoksid Dismutaz ve Glutasyon Peroksidaz Seviyelerine Ait Bulgular:	56
5. TARTIŞMA	57
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	62
7. KAYNAKLAR	63



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3. 1 İnsülin Seviyelerinin Ölçüm Prensibi.....	43
Şekil 3. 2 NO Seviyelerinin Ölçüm Prensibi	43
Şekil 3. 3 SOD Seviyelerinin Ölçüm Prensibi.....	44
Şekil 3. 4 GPx Seviyelerinin Ölçüm Prensibi.....	45
Şekil 4. 1 Damar Şeritlerinde Fenilefrinle Elde Edilen Kasılma Yanıtları.....	49
Şekil 4. 2 Damar Şeritlerinde Fenilefrinle Elde Edilen Total Kasılma	50
Şekil 4. 3 Damar Şeritlerinde Asetilkolinle Elde Edilen Gevşeme Yanıtları.....	51
Şekil 4. 4 Damar Şeritlerinde Sodyum Nitroprussidle Elde Edilen Gevşeme Yanıtları.....	52
Şekil 4. 5 Damar Şeritlerinde L-NAME İle Elde Edilen Kasılma Yanıtları.....	52
Şekil 4. 6 Serum İnsülin Seviyeleri	54
Şekil 4. 7 Serum NO Seviyeleri.....	55
Şekil 4. 8 Serum MDA Seviyeleri	55
Şekil 4. 9 Karaciğer SOD Seviyeleri	56
Şekil 4. 10 Karaciğer Gpx Seviyeleri	56

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2. 1 Diyabetin Etiyolojik Sınıflaması	6
Tablo 2. 2 Deneysel Diyabet Modelleri	10
Tablo 2. 3 Endotelden Salgılanan Mediyatörler	15
Tablo 2. 4 Poliol Ve Diaçilgliserol Yollarının Birbirleriyle İlişkisi	29
Tablo 4. 1 Deney Hayvanlarının Vücut Ağırlığı Değerleri	47
Tablo 4. 2 Deney Hayvanlarının Açlık Kan Şekeri Değerleri	48
Tablo 4. 3 Fenilefrinin EC ₅₀ Değerleri.....	49
Tablo 4. 4 Kan Örneklerinden Elde Edilen Lipid Değerleri	53



1. GİRİŞ

Diabetes mellitus (DM), günümüz insanının yaşam şartlarından dolayı tüm dünyada hızla yayılan, yüksek mortalite ve morbidite riski taşıyan bir hastalıktır. DM; insülinin salgılanmasındaki ve etkisindeki defektlerden ya da ikisinin kombinasyonundan kaynaklanan karbonhidrat, yağ ve protein metabolizma bozukluğuyla birlikte kronik hiperglisemi ile kendini gösteren, birden çok sayıda etiyolojiye sahip, metabolik bir hastalıktır. Tip I veya insüline bağımlı DM ve tip II veya insüline bağımlı olmayan DM olmak üzere iki farklı DM türü tanımlanmaktadır.

Tip 2 diyabetes mellitus dünya popülasyonunun yaklaşık % 5'ini etkileyen, tüm diyabetlilerin ise %80-90 'ını oluşturan ciddi bir sağlık sorunudur. Tip 2 diyabet, insülinin duyarlı dokulardaki etkisinin yetersizliği ve bozulmuş insülin sekresyonu sonucunda yükselmiş kan glukoz konsantrasyonu ile karakterize metabolik bir hastalıktır.

Diyabet, kronik hiperglisemi sonucu gözlerde, böbreklerde, sinirlerde, kalpte ve kan damar sisteminde kronik komplikasyonlara yol açarak bu organların fonksiyonlarını bozar. Diyabetik popülasyonda kardiyovasküler komplikasyonlara bağlı mortalite genel popülasyona göre 3-5 kat daha yüksektir (1). Diyabette hiperglisemi, insülin direnci, dislipidemi ve hipertansiyon ile indüklenen oksidatif stres gibi çeşitli risk faktörleri endotel fonksiyonunu bozabilir. Endotel disfonksiyonu aterosklerotik sürecin ilk basamağı olarak kabul edilir. Özellikle son yıllarda yapılan çalışmalar non-invaziv metodlarla ortaya konan endotel disfonksiyonunun kardiyovasküler hastalıklarla direkt ilişkili olduğunu ve prognostik bir faktör olarak kullanılabileceğini göstermiştir (2). Bu nedenle diyabette kardiyovasküler komplikasyonların öngörülmesinde ve takibinde endotel fonksiyonlarının değerlendirilmesi büyük önem taşımaktadır.

Diyabet aynı zamanda artmış bir oksidatif stres durumudur. Diyabette artmış serbest radikaller lipidler, proteinler ve nükleik asitlerle etkileşerek membran bütünlüğünün kaybına, proteinlerde yapısal veya fonksiyonel değişikliklere ve genetik mutasyonlara yol açmaktadır. Organizma bu zararlı radikallerin etkisiyle başa

çıkabilmek için bazı enzimatik ve non enzimatik antioksidan defans sistemlerine sahiptir (3-7).

Ayrıca diyabette eksojen antioksidanlar verilerek serbest radikallerin etkileriyle başa çıkılabilir (3). Oksidatif stres serbest radikaller ve antioksidanlar arasındaki dengenin serbest radikaller lehine bozulmasıdır. Bunun da diyabetin makro ve mikrovasküler komplikasyonlarına neden olduğu pek çok araştırmacı tarafından vurgulanmaktadır (3-7).

L-Karnitin (β -hidroksi-trimetilaminobütirik asit) küçük, suda çözünebilir, kuaterner amindir ve lipid metabolizmasında oldukça önemli bir rol oynar. Uzun zincirli yağ asitlerinin sitoplazmik kısımdan mitokondri zarını geçerek iç mitokondriyal alana geçebilmeleri için esansiyel bir kofaktör olarak rol oynar. Bu yüzden yeterli karnitin düzeyleri normal yağ asidi metabolizmasının devamı için ve karbonhidrat mekanizmasının regülasyonu için muhakkak gereklidir (8,9).

Diyabetik insanlarda ve ratlarda plazma karnitin düzeylerinde önemli oranda bir düşüş gözlenmiştir. Karnitin düzeylerinde gözlenen bu düşüş L-karnitin diyabetik komplikasyonlarda önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir (10,11). Tedavide yapılan karnitin düzenlemesinin retinopati, nöropati ve kardiyomiyopati gibi diyabetik komplikasyonlarda bazı düzeltici etkilerinin olduğu gösterilmiştir (10,12,13).

Melatoninin serbest radikalleri temizlemede ve doku hasarını önlemede güçlü bir kapasitesi vardır (14-16). Aynı zamanda hidroksil (OH \cdot) ve peroksil (ROO \cdot) radikal oluşumunu engelleyerek başka antioksidan aktivitelere sebep olur (17-20).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, pankreas adacık hücrelerinde (21) melatonin reseptörlerinin bulunduğunu ve hipergliseminin zararlı sonuçlarına karşı koruyabileceğini göstermektedir (22). Ayrıca melatonin streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş ratlarda oksidatif stresi azalttığı tespit edilmiştir (23-25).

Biz de bütün bu bilgiler ışığında deneysel olarak oluşturulan diyabet modelinde güçlü antioksidan etkileri olan L-karnitin ve melatoninin diyabetik aortanın fonksiyonlarındaki iyileştirici etkilerini ve oksidatif strese karşı koruyuculuğunu araştırdık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diyabetes Mellitus Tanımı ve Tarihçesi

Diyabetes mellitus (DM), insülin salınımında, insülinin dokulardaki etkilerinde veya her ikisinde defekt sonucunda oluşan ve hiperglisemi ile karakterize bir grup metabolik ve endokrinolojik bozukluktur. Oluşan bozukluklar karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmalarının tümünü ilgilendirmektedir. Diyabet, kronik hiperglisemi sonucu çeşitli organların fonksiyonları ve yapıları üzerinde toksik etkilere yol açarak zamanla nöropati, retinopati, nefropati ve vasküler komplikasyonlara neden olur.(26-28).

DM'da; insülinin azlığı veya yokluğu, ya da hedef hücrelerin insüline yanıtızsızlığı nedeniyle dokularda insülin açlığı söz konusudur. Diyabetteki patolojik olaylar, insülin eksikliğine bağlı üç major etki sonucu oluşur:

1. 300 ile 1200mg/dl aralığında değişen kan glukoz düzeyi yüksekliği ile birlikte, vücut hücrelerinin glukozdan yararlanımlarının düşmesi
2. Yağ depolarından, yağ mobilizasyonunun belirgin olarak artması ve bunun sonucunda atheroskleroza sebebiyet veren vasküler duvarlarda lipidlerin depolanması ile karakterize anormal yağ metabolizması
3. Dokulardan protein yıkımı (29).

Diyabet antik çağlardan beri ciddi bir sağlık problemi olarak fark edilmiştir. DM ile ilgili en eski kayıtlar Milattan önce 1550 yılında Eski Mısır'da yazılmış bir papirüste bulunmuştur. Hindular da Ayur Veda'da; böcek, sinek ve karıncaların bazı insanların idrarının yapıldığı yere toplandığını kaydetmişlerdir (30,31). M.Ö. 400'lu yıllarda yaşamış olan Dhanvantari' nin kitabında "tatlı idrar hastalığı" olarak geçmektedir (30).

Diyabetes ve Mellitus kelimeleri Yunanca akıp gitmek anlamına gelen diyabetes ve bal kadar tatlı anlamına gelen mellitus kelimelerinden türetilmiştir.

M.S. 2. yüzyılda Areatus tarafından “Diyabetes” kelimesi ilk kez kullanılmıştır. Areatus DM’u, idrar miktarında artma, aşırı susama ve kilo kaybının olduğu bir hastalık olarak tanımlamıştır (30,31).

DM’lu hastaların idrarının tatlı, bal gibi olduğu ve bu nedenle karıncaların, sineklerin ve diğer böceklerin bu idrara uşuştuğunu Susruta ve diğer Hintli doktorlar M.S. 5-6. Yüzyılda fark ederek açıklamışlar, bu hastalığın iki formu olduğunu yazmışlardır. Bir formunda hastalar zayıf ve çok uzun yaşamadan kısa surede olmekte, diğer grupta ise hastalar şişman ve daha yaşlı olarak belirtilmiştir. Bu günümüzün modern sınıflamasında belirtilen Tip 1 ve Tip 2 diabetes mellitus sınıflamasına çok benziyor.

DM hastalarının idrarının tatlı olduğu 17. yüzyılda bir İngiliz doktor olan Thomas Willis tarafından tekrar keşfedilmiştir. Willis şekersiz şeker hastalığı denilen ve vücudumuzun su dengesini ayarlayan bir hormon olan antidiüretik hormon eksikliği sonucu ortaya çıkan diabetes insipidus ile Diabetes Mellitus'un ayırımını yapmıştır.

18. yüzyılda William Cullen, “diyabetes” kelimesinin yanına tatlı anlamında kullanılan “mellitus” u eklemiştir. Paul Langerhans (1847-1888) pankreas bezi içindeki küçük hücre topluluklarını (Langerhans Adacıkları) göstermiştir. Kanada Toronto Üniversitesi'nden Frederick G. Banting (1891-1941), Charles H. Best (1899-1978), James B. Collip (1892-1965) ve J. J. R. Macleod’ın (1876-1935) insülin'i 1921 yılında izole etmeleri ile önemli bir mucize gerçekleşmiştir. Collip elde edilen insülini ilk kez 1 Ocak 1922 tarihinde diyabetik bir hasta olan Leonard Thompson üzerinde denemiş ve başarılı sonuç elde etmiştir. Diyabet tedavisinde oral ilaç kullanımı için ilk çalışmayı İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Erich Frank 1926 yılında yapmıştır. Frederick Sanger 1955 yılında insülinin iki amino asit zinciri yapısında olduğunu bulmuş ve bu çalışması ile 1955 yılında Nobel ödülünü almıştır. İnsülin geni 1980 yılında Prof. G. Bell tarafından saptanmıştır. İnsülini keşfeden Frederic Banting’in doğum günü olan 14 Kasım, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF) tarafından 1992’den beri Diyabet günü olarak kabul edilmiştir.

2.2. Diyabetes Mellitus'un Epidemiyolojisi

Diyabet prevalansı, nüfus artış hızı ve ortalama yaşam süresinin uzaması sonucunda yaşlanmaya ve kentleşmenin getirdiği yaşam tarzı değişimi sonucunda obezite ve fiziksel aktivitenin azalmasına bağlı olarak artmaktadır.

Diyabet prevalansı dünya genelinde giderek artmaktadır. WHO tarafından yapılan global hesaplamalara göre, 2025 yılında 300 milyon insan diyabet olacaktır (32,33).

Dünyada tüm yaş gruplarında 2000 yılında DM prevalansı %2.8, 2030 yılında %4.4 olarak hesap edilmiştir. 2000 yılında; dünyada toplam 171 milyon olan diyabetli hasta sayısının 2030 yılında 366 milyon kişiye ulaşması beklenmektedir.

Diyabet prevalansı ırka bağlı olarak anlamlı farklılıklar göstermektedir. Papua Yeni Gine'deki kabilelerde, Eskimolar arasında veya Çin'de % 1 olan prevalans, Avustralya yerlilerinde, Mikronezya'daki Nauru'lularda veya Arizona'daki Pima Kızılderililerinde % 20-45'e kadar çıkabilmektedir. Gelişmiş ülkelerde diyabetli hasta popülasyonunu genelde 65 yaş üstü insanlar oluşturmaktadır. Obezitenin prevalansındaki artış da diyabet prevalansını etkilemektedir (34).

Türkiye'de diyabet taramaları ile ilgili veriler ilk kez 1960'lı yılların başında Türk Diyabet Cemiyeti'nin başlattığı taramalarla bildirilmeye başlanmıştır. O dönemde 18 yaş üstünde ortalama %1,5-2 aralığında bir prevalans bildirilmiştir. Türkiye'de geniş çaplı ilk diyabet taraması 1999-2000 yıllarında Türk Diyabet Epidemiyoloji Çalışma Grubu (TURDEP) tarafından yapılmış ve diyabetin prevalansı erişkin yaş nüfusunda %7,2 ve bozulmuş glukoz toleransı (BGT) prevalansı %6,7 olarak bildirilmiştir. IDF Diyabet Atlasına göre, 2010 itibarı ile Türkiye erişkin (20-79 yaş) nüfusta diyabet prevalansı %7,4'tur (35). Dünya nüfus dağılımına göre standardize diyabet prevalansı %8,0 olarak hesaplanmıştır. Türkiye'de diyabetin artış hızı dünya ve Avrupa genelinin üzerindedir. Bunun başlıca nedeni Türkiye genelinde yaşlı nüfusun artmaya başlamış olması başta beslenme ve fiziksel aktivite olmak üzere yaşam tarzında meydana gelen değişikliklerdir.

2.3. Diyabetes Mellitus'un Sınıflandırılması

Diyabetes Mellitus'un tüm tiplerinde ana bulgu hiperglisemi olmakla birlikte, hiperglisemiye neden olan mekanizma farklıdır ve genel olarak Tip I ve Tip II olmak üzere 2 alt gruba ayrılabilir (36). Tip 1 Diyabet (İnsüline bağımlı DM), beta adacık hücrelerinin kitlesinde bir azalma ile insülinin ciddi ve mutlak kaybından kaynaklanır. Genelde çocuklukta gelişir ve pubertede ortaya çıkarak giderek ciddileşir. Adacık hücre destrüksiyonundan, genetik eğilim, otoimmünite ve çevresel faktörler sorumludur. Tip 1 diyabetliler tüm diyabetlilerin yaklaşık %5-10'unu oluşturmaktadır.

Tip 2 Diyabet (insüline bağımlı olmayan DM), glukoz yüküne göre gecikmiş ya da yetersizlik şeklinde bozuk insülin sekresyonu ve periferik dokularda insüline cevabın yetersizliği (insülin direnci) sonucu oluşur. Tip 2 diyabette genetik faktörler, Tip 1 diyabettekinden daha önemlidir (37). Eskiden yapılan klinik klasifikasyonda hastalığın başlama yaşı değerlendirilmiş ve gençlerde görülene "genç tipi=jüvenil tip", erişkinlerde görülene "erişkin tip=adult tip" diyabet adı verilmiştir. Daha sonra terapötik sınıflama geliştirilmiş ve insülin bağımlı=insülin dependent (IDDM) ve insülin bağımsız=non insülin dependent diyabet DM (NIDDM) terminolojisi kullanılmıştır. Daha sonra hastalığın etiyopatogenezi ile ilgili bilgiler arttıkça etiyolojik klasifikasyona geçilmiştir (38). Diyabetes mellitusun en son kabul edilen teşhis kriterleri ve sınıflandırması Amerikan Diyabet Derneği (ADA)'nın 2000 yılında yayınlanan raporlarına göre yapılmaktadır (39,40). (Tablo 2.1)

Tablo 2. 1 Diyabetin Etiyolojik Sınıflaması

I. Tip 1 Diyabetes Mellitus (β hücre yıkımı, genellikle mutlak insülin yetersizliğine yol açar.)

- **İmmün Aracılıklı Diyabet:** Tüm diyabetiklerin %5-10'unu oluşturan diyabet tipidir. Daha önce insüline bağımlı diyabet olarak adlandırılmış olan bu diyabet

şekli, pankreas beta hücrelerinin otoimmün olay sonucu harabiyetinden ortaya çıkmaktadır.

- **İdiopatik Tip Diyabet:** Tip 1 diyabet tanısı konan olguların bir kısmında hiçbir etyoloji tanımlanamaz ve otoimmün belirteçler negatiftir.

II. Tip 2 Diyabetes Mellitus (göreceli insülin yetersizliği ile birlikte olan ağırlıklı insülin rezistansından, insülin rezistansı ile birlikte olan ağırlıklı insülin sekresyon kusuruna kadar değişebilir.)

III. Diğer Spesifik Tipler

A. β hücre fonksiyonunu genetik defektleri: Bu tip diyabetiklerde hiperglisemi genellikle oldukça erken yaşta (25 yaş altı) ortaya çıkmaktadır ve esas bozukluk insülin salgısındadır. İnsülin etkisindeki bozukluk ya çok azdır, ya da genellikle bulunmamaktadır. Bu tip diyabet MODY olarak adlandırılmaktadır (Maturity Onset Diabetes of the Young/ Gencin erişkin tipte başlayan diyabeti).

B. İnsülin etkisinde genetik defektler: Tip A insülin rezistansı, Leprechaunism, Lipoatrofik diyabet, Rabson-Mendenhall Sendromu vs.

C. Ekzokrin pankreas hastalıkları:

Akut ve kronik pankreatitler, pankreatektomi, travma, pankreas kanseri, kistik fibrozis, hemakromatozis vs. diyabete yol açabilir.

D. Endokrinopatiler:

İnsülin etkisine zıt olarak iş gören büyüme hormonu, glukagon, kortizon, katekolaminlerin aşırı miktarları diyabetin ortaya çıkmasına neden olabilir. Akromegali, Cushing sendromu, glukagonoma, feokromasitoma bu yolla diyabet oluşumuna neden olabilir.

E. İlaç ve kimyasal maddelere bağlı olarak ortaya çıkan diyabet:

Alfa interferon, diazoksid, beta blokerler, pentamidin, vakor gibi ilaçların bazıları direkt beta hücre fonksiyonunu etkilerler. Nikotinic asid, tiazidler, glukokortikoidler ise insülin etkisini bozabilirler.

F. Enfeksiyonlar:

Konjenital rubella, koksakivirüs B, sitomegalovirüs enfeksiyonları sırasında diyabet ortaya çıkabilir.

G. Diyabetin immün aracılıklı nadir formları:

Bu tipte nadir olarak görülen diyabet iki şekilde görülebilir. ‘Stiffman’ sendromu, Anti insülin reseptör antikoru. Stiffman sendromu merkezi sinir sistemini ilgilendiren ve kaslarda sertlik ve ağrılı spazmlarla seyreden otoimmün bir bozukluktur. Anti insülin reseptör antikolar sistemik lupus eritematosusun seyrinde ve diğer otoimmün hastalıklar sırasında görülebilir.

H. Diğer genetik sendromlar:

Down sendromu, Klinefelter sendromu, Wolfram sendromu, Friedrich ataksisi, Turner sendromu vs.

Diğerleri

IV. Gestasyonel diyabetes mellitus (GDM)

‘Gestasyonel Diyabet terimi’ ilk kez 1950’lerde ortaya atılmış olup, gebelik sırasında ortaya çıkan, yüksek fetal anomali ve mortaliteye sebep olan ve gebelik sonlanınca da düzelen geçici glukoz metabolizması bozukluğunu tanımlamak için kullanılmıştır. GDM çoğunlukla gebelikle ilişkili insülin antagonisti hormonların en üst düzeye ulaştığı ikinci veya üçüncü trimesterde ortaya çıkar. Doğumdan sonra her zaman olmamakla birlikte genellikle, glukoz toleransı normale döner. Ancak 5-10 yıl içerisinde gestasyonel diyabetli kadınların yaklaşık yarısında tip 2 diyabet gelişir; bazen gebelik Tip 1 diyabeti de hızlandırabilir.

2.4. Diyabetes Mellitus’un Komplikasyonları

Diyabetin Komplikasyonları, akut (metabolik) ve kronik komplikasyonlar adı altında iki ana başlık halinde incelenebilir:

1-) Akut Metabolik Komplikasyonlar:

- Diyabetik Ketoasidoz
- Non-ketotik Hiperosmolar Koma
- Laktik Asidoz Koması
- Hipoglisemi Koması

2-) Kronik (Dejeneratif) Komplikasyonlar:

a) Makrovasküler Komplikasyonlar

- Kardiyovasküler Hastalıklar
- Serebrovasküler Hastalıklar
- Periferik Arter Hastalığı

b) Mikrovasküler Komplikasyonlar

- Diyabetik Nefropati
- Diyabetik Retinopati
- Diyabetik Nöropati

2.5. Deneysel Diyabet Modelleri

Deneysel hayvan modelleri, deneysel değişkenlerin kontrol altında tutulmasına, araştırılan patolojiye genetik olarak uygun türlerin, hatta alt türlerin seçilebilmesine; istatistiksel değerlendirmeye yetecek sayıda örnekle birden fazla risk ve patolojinin çalışılabilmesine; henüz denenmemiş tanı koydurucu, koruyucu veya terapötik yaklaşımların denenmesine olanak vermektedir.

Diyabet hastalığının ve komplikasyonlarının patogenezi aydınlatmak ve yeni tedavi stratejileri keşfetmek amacıyla yapılan araştırmalarda, hayvanlarda deneysel diyabet modellerinin kullanılması araştırmacıya birçok avantaj sağlamaktadır. Kimyasal ajanların kullanımı sonucu veya diyet ile elde edilen diyabetik modeller, cerrahi

uygulamalar ve bunların kombinasyonları veya genetik modifikasyonla elde edilen diyabet tabloları deneysel diyabet modelleri arasında sayılabilen metodlardan bazılarıdır. Beta hücrelerine spesifik toksik glukoz analogları olan alloksan ve streptozotosin (STZ), kimyasal metodla deneysel diyabet oluşturmak amacıyla sıklıkla kullanılan toksinlerdendir ve uzun zamandır hayvanlarda deneysel diyabet oluşturmak amacıyla kullanılmaktadır.

Hayvanlarda deneysel diyabet oluşturmak için fare, sıçan, tavşan, kobay, hamster, maymun, domuz, köpek ve kedi gibi deney hayvanları kullanılabilir (41-47). Bununla birlikte tanımlanmış birçok hayvan diyabet modeli bulunmakla beraber, bu modellerden hiçbiri insan diyabetine tam olarak eşdeğer tutulamaz (48). (Tablo 2.2)

Tablo 2. 2 Deneysel Diyabet Modelleri

I. Tip-1 Diyabet Modelleri

1. Kimyasal Olarak Oluşturulan Tip 1 Diyabet Modelleri: Alloksan, streptozotosin, çinko şelatörleri (dithizone, 8-hidroksikinolin), Rodentisid-Vacor, diet nitrozaminleri vb.

2. Spontan Tip 1 Diyabet Modelleri: BB (Bio- Breeding) sıçan, NOD (non-obese diabetic) fare ve diğerleri (Macaca nigra maymunu, Keeshand köpeği, Çin hamsteri, kobay Yeni Zelanda beyaz tavşanı, KDP (Komodo Diabetes Prone) sıçan

3. Virüsle Oluşturulan Modeller: Hayvanlarda diyabete neden olan virüslerden üzerinde en çok çalışılmış olanlar; EMC (ensefalomiyokardit) virüsünün M varyantı ve Kilham Rat Virus (KRV) Diğer virüsler; Cocksachie B, Rubella, Reovirus, Sitomegalovirüs (CMV) ve "Venezuelan Equine Ensefalit" virüsleri

4. Transgenik Tip 1 Diyabet Modelleri: Transgenik fare \square çalışmaları Tip-1 diyabet patogenezinin anlaşılmasında \square çok yararlı olmaktadır. Transgenik fare, fertilize fare yumurtasının pronükleusuna yabancı bir DNA'nın aşılması ile oluşturulur (48).

Transgenik modeller, transgenik genlerin beta hücrelerinde eksprese edilmesi yoluyla bu moleküllere ait diyabetojenik özellikleri belirlemede kullanılmaktadır. Bu şekilde eksprese edilen transgenler; MHC antijenleri (I-E alfa, I-A antijenleri gibi), sitokinler (interferon-gama, IL-2 ve IL-10 gibi) ve viral proteinler (LCMV antijeni, influenza virüs hemagglütinini ve başka viral glikoproteinler

II. Tip-2 Diyabet Modelleri

1. Spontan Tip 2 Diyabet Modelleri:

- Ağır hiperglisemili modeller (db/ db fare, Rhesus maymunu, çöl kemirgenleri)
- Orta hiperglisemili modeller (ob/ ob fare)
- İlimli hiperglisemili modeller (Cohen diyabetik faresi, GK (Goto-kakizaki) sıçan, wistar WBN/Kob (erkek) sıçan)

2. Eksperimental Tip 2 Diyabet Modelleri:

- **Kimyasal modeller (Streptozotosin, Alloksan):** Streptozotosin ve alloksanın yüksek dozları Tip-1 diyabete sebep olurken, daha düşük dozları β hücre kitlesinin kısmen azalmasına sebep olur ve ketozise eğilimli olmayan orta derecede bir insülin eksikliği oluşur. β hücre toksisitesi daha spesifik olduğu için streptozotosin tercih edilen ajandır.
- **Cerrahi modeller (Parsiyel pankreatektomi, Hipotalamik lezyon):** Pankreatektomi; Orta derecede stabil bir glisemi artışı için pankreasın %90'nın çıkarılması gerekir. Teknik olarak zor bir yöntemdir. Hayvanın öldürücü insülinopeniden korunması gerekir.

- **Diyet ve Erken Malnütrisyon:** Doymuş yağlar ve basit şekerlerden (sükroz gibi) zengin diyet insülin konsantrasyonlarını yükseltebilir; yağ dokusunda depolanmayı artırıp, insülin duyarlılığını azaltıp glukoz toleransını bozabilir.
- **Hormonal Olarak İndüklenmiş Hiperglisemi:** Glukagon ve glukokortikoidler gibi karşıt düzenleyici hormonlar endokrinopatilere benzer hiperglisemik durumlar oluşturur.

3. **Transgenik Tip 2 Diyabet Modelleri:** İnsan insülin reseptörü, insan GLUT-4 glukoz taşıyıcısı ve insan adacık hücre amiloid polipeptidi (IAPP) gibi transgenleri içeren fareler üzerinde çalışılır.

III.BOZULMUŞ GLUKOZ TOLERANSI (BGT) MODELLERİ:

1. **Şişman Zucker fa/fa Sıçan**

2. **BHE Sıçan**

Genetik yatkınlık, yaşlanma, obezite ve sedanter yaşam tarzı Tip 2 diyabet gelişimindeki major risk faktörleridir. Yapılan çalışmalarda Tip 2 diyabet tanısı alan bireylerin çoğunun obez olduğu gösterilmiştir (49-50). Obezite ve diyabet, tüm dünyada gittikçe artan önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Obezite, Tip 2 diyabet için önemli bir risk faktörü olup Tip 2 diyabetiklerin % 90'ı obezdir.

Tip 2 diyabet tedavisine yönelik yeni yaklaşımlar geliştirmek ve daha iyi yöntemler bulmak için araştırmalar sürmektedir. Tip 2 diyabete bağlı komplikasyonların, önlenmesi için deneysel çalışmalar yapılmakta ve bu yolla vasküler ve nöronal lezyonların patogenezi, terapötik ajanların etki mekanizmaları aydınlatılmaya çalışılmaktadır. Bu konuda çeşitli hayvan çalışma modelleri de bulunmasına rağmen (51-54), genellikle bunlar Tip 2 diyabetin seyri ve insandaki kliniğiyle çok uyum sağlamamaktadır. Bu nedenle araştırmacılar Tip 2 diyabet için yeni

hayvan modelleri ya da kombine modeller oluşturmaya çalışmaktadırlar. HFD (high fat diet- yüksek yağ içerikli diyet) ile beslenmenin, Tip 2 diyabetin önemli bir özelliği olan insülin direnci oluşturulmasında oldukça iyi bir yol olduğu düşünülmektedir. Çeşitli çalışmalar sıçanlarda HFD ile beslenmenin net olarak hiperglisemi ya da diyabet oluşturmaya da insülin direnci oluşturduğunu bildirmektedir (54- 57).

Streptozotosin, deneysel DM oluşturmak üzere hayvanlarda en çok kullanılan ajan olup, pankreas β hücrelerinde ölüme neden olur. STZ yüksek dozlarda insülin salınımı şiddetli olarak bozar ve Tip 1 DM'e benzer bir tablo oluşturur. STZ'in düşük dozlarının ise insülin salınımında ılımlı bir bozulmaya neden olduğu bilinmektedir ve bu da Tip 2 DM' nin geç dönemiyle benzerlik göstermektedir (51, 52).

Bu verilerden yola çıkılarak, HFD ve bunu izleyen düşük doz STZ uygulamasına yönelik, Tip 2 DM'in metabolik karakteristikleri ile hastalığın doğal seyrine uygun yeni bir sıçan modeli oluşturmaya çalışılmıştır. (51,52,54). Başarılı bir model ucuz, kolay uygulanabilir olmalı ve Tip 2 diyabet tedavisine yönelik, pratik olarak kolay test edilebilir parametreleri içermelidir.

Bu kombinasyonun dışında multipl düşük doz STZ uygulamasının da yapılabileceğini bildiren çalışmalar da vardır. Diyabet oluşturulmak üzere çalışılan sıçanlarda, tek yüksek doz STZ uygulaması yerine multipl düşük doz STZ uygulamasının β hücrelerinde kademeli ve otoimmün bir destrüksiyona yol açıyor olabileceği bildirilmiştir. (58-63).

2.6. Diyabet ve Endotel Disfonksiyonu

Diyabet metabolik olduğu kadar vasküler bir hastalıktır. Diyabette vasküler endotel disfonksiyonu, diyabetik mikro-makro anjiopatinin patogeneğinde önemli bir faktördür (64). Retinal mikroanjiopati diyabetik retinopatide, renal mikroanjiopati diyabetik nefropatide, vaso nervorumların mikroanjiopatisi ise diyabetik nöropatide önemli rol oynar. Diyabetik hastalardaki makroanjiopati aterosklerozun ileri bir şekli

olup, koroner, karotis ve periferik arterleri etkileyerek miyokard enfarktüsü riskini artırır, inme ve diyabetik ayak gelişimine neden olur (65-68).

Diyabetik hastalarda, hızlanmış ateroskleroz makrovasküler komplikasyon gelişiminde en önemli etkidir (69,70).

Karakteristik olarak diyabetik hastalarda trigliserit değerleri yükselmekte, HDL düşmekte ve aterojenik küçük ve dens LDL kolesterol partikülleri artmaktadır. Küçük LDL partikülleri daha kolay ve daha güçlü olarak arteriyal duvarlara penetre olabilmekte ve daha fazla oksidatif hasar kapasitesine sahip olmaktadır.

Diyabetik hastalarda makrovasküler komplikasyonların yanısıra mikrovasküler komplikasyonların oluşumu da hızlanmıştır. Bu komplikasyonların oluşumunda hızlanmış ateroskleroza ek olarak farklı fizyopatolojik süreçlerden de söz edilmektedir.

Mikrosirkülasyon hem lokal hem de merkezi yollarla düzenlenir. Merkezi düzenleme sempatik ve parasempatik sinir sisteminin koordinasyonu ile gerçekleşir. Lokal düzenleme ise endotel hücrelerden salgılanan maddelerle sağlanır. Lokal salgılanan maddelerle mikrovasküler yapılarda vasodilatatör ve vazokonstriktör yanıtlar düzenlenmektedir. Diyabetik hastalarda mikrovasküler yatakta nitrik oksit salınımındaki azalma ve endotelin1 salınımında artış sonucu mikrovasküler dolaşım bozulmaktadır.

Endotel, tüm damar düz kaslarında bulunan, damar duvarını kaplayan ince bir squamoz epitel tabakasıdır. Damar duvarı ve kan arasında tek sıra hücrelerden oluşmuş fonksiyonel bir bariyerdir. Endotel katmanı eskiden düşünüldüğü gibi yalnızca kan damarlarının iç yüzeyini kaplayan pasif yarı geçirgen bir tabaka değil; aksine sentezlediği ve salgıladığı mediatörler ile vasküler homeostazın sağlanmasında temel rol oynayan en küçük endokrin organdır. Endotel hücreleri fizyolojik ve patolojik uyarılara yanıt olarak çeşitli vasoaktif maddeler salgılayarak damar düz kas hücrelerinin tonusunu ayarlar ve normal kan akışını devam ettirir. Normal endotel antitrombotik, antikoagulan ve fibrinolitik özelliğe sahiptir (71). Bu genel fonksiyonlarına ek olarak endotel, akciğerlerde gaz değişimi, kalpte miyokard fonksiyonun kontrolü, karaciğer ve dalakta fagositoz gibi çeşitli organlarda farklılaşarak o organa özgü fonksiyonların yerine getirilmesinde rol alabilir.

Bir endokrin organ olan endotel hücreleri yetişkin bir insanda 5500 m² alandan daha fazla yer kaplar ve yaklaşık 1 kg ağırlığındadır (72). Total endotel hücre sayısı 1 trilyondur.

Endotelin birçok hastalığıdaki önemi 1980'de Furchgott ve Zawadzki'nin endotel kaynaklı bir vazodilatatör faktör olduğunu keşfetmesiyle anlaşılmıştır (73).

Endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) ismindeki bu faktörün daha sonraları nitrik oksit (NO) olduğu gösterildi (74). Normalde vasküler tonusun sağlanması için belli bir seviyede gevşetici ve kontrakte edici faktörler endotelden devamlı olarak salgılanır. (Tablo 2.3)

Tablo 2. 3 Endotelden Salgılanan Mediyatörler

Endotel hücrelerinden salgılanan mediyatörler (75,76):

1. Vasodilatatörler

- Nitrikoksit (NO=EDRF)
- Adrenomedüllin
- Endotelium derived hiperpolarizing faktörler
- Prostaglandin (PGI₂)
- Bradikinin, asetilkolin, serotonin, histamin, substance P

2. Vasokonstriktörler

- Angiotensin converting enzim (ACE)
- Endotelinler (ET-1, ET-2, ET-3)
- Angiotensin II
- Tromboksan A₂
- Asetil kolin, arasidonik asit, PGH₂, trombin, nikotin

3. Antitrombotik (homeostaz) maddeler

- Trombomodülin
- Doku plazminojen aktivator (t-PA)
- Plazminojen aktivator inhibitör tip I (PAI-1)

4. Büyüme modulator / mediatörleri

- Büyüme promotörleri PDGF, Basic FGF, IGF-1, IL-1, Endotelin, AII
- Büyüme inhibitörleri Heparin sülfat, TGF- β , NO, Bradikinin, Prostatiklin

5. İnflamatuvar mediatörler

- Adezyon molekülleri;
 - Endotelial Lökosit Adezyon Molekülü (ELAM)
 - İntraselüler Adezyon Molekülü (ICAM)
 - Vasküler Hücre Adezyon Molekülleri (VCAM)
 - Antijenler ;
 - Major histokompatibilite kompleks 2 (MHCII)
-

Endotelial disfonksiyon, özellikle NO olmak üzere vasodilatörlerin bioavailabilitesinde, endotel bağımlı vasodilatasyonda bozulma veya endotel kaynaklı kontraksiyon faktörlerinin artması ile karakterizedir. Geniş açıdan bakıldığında endotelial disfonksiyon, endotelial aktivasyon ile birlikte birçok proinflamatuvar ve prokoagulan değişiklikleri kapsar. Endotel disfonksiyonu ateroskleroziste belirgindir, aynı zamanda diyabet, preeklampsi, hipertansiyon, üremi ve diğer hastalıklarda da tanımlanmıştır (77).

Endotel disfonksiyonunun patofizyolojisi karmaşıktır ve çeşitli mekanizmalar yoluyla oluşabilir. Bu mekanizmalardan belki de en önemlisi endotelden NO salınımında azalmadır (78). NO amino asit argininin NO sentetaz enzimi ile NO ve L-

citruline dönüştürülmesi ile elde edilir. NO sentezleyen üç farklı NOS formu vardır. Bunlar; nöronal (nNOS), indüklenebilir (iNOS), endotelyal (eNOS)'dur. eNOS ve nNOS; asetilkolin ve bradikinin gibi hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu artıran ajanlarca aktiflenir. iNOS ise sitokinlerce uyarılır, kalsiyum ve kalmoduline bağımlı değildir ve yeni protein sentezine ihtiyaç duyar.

NO sentezinden sorumlu olan enzim hücre içinde kaveoline bağılı olarak inaktif formda bulunur. Hücre içi kalsiyum düzeyinde bir artış kalmodulin oluşumuna, bu da enzimin kaveolinden ayrılarak aktif hale gelmesine neden olur (79). Hücre içi Ca^{+2} artışı olmadan da NO üretilebilir. NO fosforilasyonu aracılığı ile "shear stress" NO düzeyini kontrol edebilir. NO serbest olarak diffüze olabilen bir gazdır ve damar lümeni yanı sıra çevreleyen düz kas ve dokularda da etkiye sahiptir. Vasküler düz kas hücrelerine giren NO guanilat siklaz aktivitesini ve sonucunda siklik 3'5' guanozin monofosfat (cGMP) seviyelerini artırır. cGMP düz kas hücresi içindeki cGMP bağımlı protein kinazı aktive eder, bunun sonucunda potasyum kanalları fosforile, Ca^{+2} kanalları hiperpolarize olur. Hücre içi Ca^{+2} miktarı azalır ve bu da düz kas hücresinde gevşemeye yol açar (80). NO cGMP yolundan başka sodyum ve potasyum kanallarını doğrudan aktive ederek de vazodilatasyona katkıda bulunur (81). NG-monometil-L-arjinin (L-NMMA) gibi arjinin analogları ile NO üretiminin tamamen bloke edilebilmesi NO etkilerinin ayrıntılı olarak çalışılabilmesine olanak sağlamıştır.

NO endotel-kaynaklı gevşetici faktörlerden en önemlisidir ve vasküler tonusun, vasodilatasyonun ayarlanmasında en önemli rolü oynar. Oluşan aterosklerozis ile koroner arterlerde endotel-bağımlı vasodilatasyonun bozulmasına ve paradoksal vasokonstriksiyona, myokardial perfüzyonun azalmasına ve myokardial iskemiye neden olur. NO vasodilatatör etkinin yanı sıra, vasküler zararlanma, inflamasyon ve trombosise karşı koruyucudur. NO lökositlerin endotele adezyonunu inhibe eder, vasküler düz kas hücrelerini nonproliferatif konumda kalmasını sağlar ve platelet agregasyonunu sınırlar (82-84).

NO düzeylerinde azalmanın endotel disfonksiyonu ile ilişkili olduğu birçok çalışmada rapor edilmiştir. Bu durum eNOS enziminin aktivitesinin azalmasından veya NO in biyolojik aktivitesinde azalmadan kaynaklanabilir. Serbest oksijen radikalleri

(SOR) ve NO arasındaki etkileşimin peroksinitrit oluşumuna neden olduğu, bu sitotoksik oksidanın da proteinlerin nitrasyonu yoluyla hücre proteinlerinin fonksiyonunu bozarak endotel disfonksiyonuna yol açtığı bilinmektedir.

Peroksinitrit, LDL nin oksidasyonuna yol açarak proaterojenik rol oynar. Aynı zamanda eNOS un kofaktörü olan tetrahidrobiopterin ile etkileşerek eNOS aktivitesini azaltır. Oksidatif stres artışı eNOS enziminin redüktaz fonksiyonunu aktif hale geçirerek daha fazla SOR oluşumuna neden olur. SOR de damar duvarında proinflamatuvar olayları başlatır. SOR adezyonu (Vasküler hücre adezyon molekülü; VCAM-1 ve interselüler adezyon molekülü; ICAM-1) ve kemotaktik molekülleri (makrofaj kemotaktik peptid; MCP-1) artırır. İnflamasyonun başlaması NO in aktivitesini azaltır. C-reaktif proteinin (CRP) de eNOS aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (78).

NO azalmasına yol açan bir diğer mekanizma eNOS enziminin endojen kompetitif inhibitörü olan asimetrik dimetil arjinin (ADMA) düzeylerindeki artıştır. ADMA protein katabolizması sırasında ortaya çıkan bir üründür, böbrekler yoluyla veya sitrülline metabolize edilerek elimine edilir. Kronik renal yetmezlikli hastalarda eNOS inhibisyonunun artmış plazma ADMA düzeyleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Hipertansiyon, diyabet ve hiperkolesterolemi gibi geleneksel kardiovasküler risk faktörleri endotelin koruyucu fonksiyonunun bozulmasına neden olur.

Hiperkolesterolemi vasküler homeostazda birçok değişikliğe yol açar. NO biyoaktivitesini azaltır, superoksit üretimini artırır ve endotelin reaktivitesini artırır (85). Ayrıca hiperkolesterolemi normal koşullarda lökositlerin sıkı adezyonuna dirençli olan endotel tabakasına kandaki lökositlerin bağlamasına neden olur (86). Okside low-density lipoprotein (LDL) endotelial aktivasyona ve NO'nun hücre içi konsantrasyonunu azaltarak biyolojik karakterinin değişmesine neden olur (87).

Kolesterolün indüklediği endotel disfonksiyonunun sadece LDL konsantrasyonuna bağlı olmayıp, esas olarak LDL oksidasyonu ile ilgili olduğu anlaşılmıştır (88).

Hipertansiyon endotel kaynaklı vazoaaktif faktörler arasındaki dengesizlik nedeniyle olabilir: vazokonstriktör maddelerde bir artışa veya vazodilatör maddelerdeki

bir azalmaya bağlıdır. Hipertansiyon ile ilişkili angiotensin II, vasokonstrüktördür ve NO'un karşıtı olarak etki gösterir. Angiotensin II reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimine, proinflamatuvar sitokinler interlökin (IL)-6 ve monosit kemeotaktan protein-1 (MCP-1) ekspresyonlarının artmasına ve endotel hücrelerinde vasküler cell adesyona molekül -1 (VCAM-1) in ifadesinin artmasına neden olur (89-91).

Yeni risk faktörlerinden CRP seviyesinin artması; NO üretimini baskılayarak ve biyoaktivitesini azaltarak endotelial disfonksiyona neden olabilir (92).

Bu endotelial değişiklikler damar duvarında inflamasyona yol açarak aterosklerotik lezyonların başlaması ve ilerlemesinde bir ilk basamağı oluşturur.

Diyabette vasküler endotelde meydana gelen başlıca değişiklikler; NO salınımında azalma, NO cevabında azalma, A2 ve endotelin-1 gibi vazokonstriktörlerin salınımında artma, plateletlerin ve monositlerin vasküler endotele adezyonunda artma olarak sayılabilir (93).

Diyabetteki endotel disfonksiyonunun üç kaynağı vardır (94-97) :

1) Hiperglisemi ve onun biyokimyasal etkileri (94). Endotele ve vasküler düz kas hücrelerine glukoz transportu insüline bağımlı ve kolaylaştırılmış difüzyon ile olur. Glukoz transportu, düz kas hücrelerindeki glukoz seviyesine göre otheregülasyon yoluyla kontrol edilmektedir; endotel hücrelerinde ise böyle bir mekanizma yoktur ve kan şekeri arttığında intrasellüler glukoz ve metabolitlerinin birikimi olur. Endotel hücrelerinin in vitro yüksek glukozu maruz kaldığında; kollagen-fibronektin-prokoagulan proteinler (vWF doku faktörü) gibi ekstrasellüler matriks komponentlerinin üretimi artar; proliferasyon, migrasyon ve fibrinolitik potansiyel azalır ve apoptozis artar (98-103).

2) Yüksek glikoz, endotelial tabakanın permeabilitesini değiştirir ve diğer hücrelerde büyüme faktörü ve vazoaaktif ajanların sentezini artırarak endotel hücre fonksiyonunu indirekt olarak etkiler. 3)Metabolik sendrom komponentleri endotel fonksiyonuna etki eder (64).

Çeşitli çalışmalarda hem akut hem de kronik hiperglisemi esnasında endotel fonksiyonunun bozulduğunu gösterilmiştir. Kanıtlar, oral glikoz ile indüklenen geçici

hipergliseminin diyabetik olmayan hastalarda bile endotel kaynaklı vazodilatasyonu bozduğunu göstermiştir (104).

Anormal endotel fonksiyonu açlık kan şekeri veya plazma glikozile alfa hemoglobin (HbA1c) olarak tanımlanan hipergliseminin derecesiyle direkt olarak ilişkili bulunmuştur (105). Hiperglisemi, aldoz redüktaz yoluyla sorbitol oluşumunu da artırır. Böylece nikotinamid adenin dinükleotid fosfatın (NADPH) azalmasına neden olur. NADPH ise glutatyon, askorbat, tokoferol gibi antioksidan moleküllerin üretimi için gereklidir. Hiperglisemi glikoliz aracılığıyla glikozun diasilgliserole (DAG) metabolizasyonunu artırarak DAG artırır. DAG protein kinaz C (PKC)'in önemli bir regülatörüdür. Böylece hiperglisemi endotel hücrelerinde e NOS'da azalmaya prostanoit maddelerin üretiminde artışa neden olur ve bunun sonucunda da endotel disfonksiyona yol açar (106).

Hiperglisemi, glikasyon son ürünleri (advanced glycation end products: AGE) ve bunların endoteldeki spesifik reseptörleriyle etkileşime girerek endotel disfonksiyonuna neden olabilir. AGE, NO'ü etkisiz hale getirerek LDL'nin oksidasyona olan duyarlılığını artırır (107). AGE ve onların reseptörleri arasındaki etkileşim trombomodulinde artışa yol açar ve ayrıca interlökin-1 (IL-1), tümör nekroz faktör- α (TNF- α) ve büyüme faktörlerinin aktivitesini artırarak damar düz kas hücrelerinin artışına ve göçüne neden olur. Plazma çözülebilir VCAM-1 ve E-selektin seviyeleri Tip 2 diyabetik hastalarda hiperglisemiyle ilişkili olarak artar (108,109).

Glikoz oksidasyonu süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil gibi reaktif oksijen radikallerinin de üretimine yol açar. Süperoksit NO'ü inhibe eder ve düz kas gevşemesini azaltır (110). Diyabetik hastalarda, serbest radikallerin üretimi endotel hücrelerinde NO sekresyonunu azaltır ve aynı zamanda subendotelial yüzeyde NO'ü inaktive eder (111). Bütün bu etkiler sonucunda diyabetik hastalarda endotelial disfonksiyon ortaya çıkar.

2.7. Serbest Radikaller

Oksijen insan yaşamı için çok önemli olmasına karşın, normal metabolizma sırasında üretilen bazı reaktif oksijen türleri vücuda zarar verme potansiyeline sahiptir (112). Çoğunu serbest radikallerin oluşturduğu reaktif oksijen türleri normal oksijen molekülü ile karşılaştırıldığında, kimyasal reaktivitesi daha yüksek olan oksijen formlarıdır (113).

Yüksek oranda reaktif ve tahrip gücü yüksek moleküller olan serbest radikaller, insan sağlığı ve hastalıklarındaki rollerinden dolayı son yıllarda oldukça önemli hale gelmiştir. Serbest radikaller bir veya daha fazla eşleşmemiş (ortaklanmamış) elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküller olarak tanımlanır. Gerçekte, soluduğumuz moleküler oksijen de bir serbest radikaldir. Serbest radikaller, stabil olmayan bileşiklerdir ve stabilitelelerini sağlamak için ihtiyaç duydukları elektronu yakalamak amacıyla, diğer bileşiklerle çok hızlı bir şekilde reaksiyon verirler. Genelde, serbest radikaller, en yakınlarındaki stabil moleküle onun elektronunu çalmak üzere atak yaparlar ve atak yapılan molekül elektronunu kaybettiğinde, radikal haline döner. Oluşan bu reaktif radikaller, domino taşlarının birbirini takip etmesi gibi bir zincir reaksiyonu başlatırlar. Bu süreç, yaşayan bir hücrenin hasarı veya ölümü ile sonuçlanır.

Serbest radikaller, pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötral olabilirler. Biyolojik sistemlerde en fazla elektron transferi ile oluşurlar (114). Her ne kadar serbest radikal reaksiyonları, bağışıklık sistemi hücrelerinden nötrofil, makrofaj gibi hücrelerin savunma mekanizması için gerekli olsa da, serbest radikallerin fazla üretimi doku hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır (115).

Serbest radikaller; aktive olmuş fagositler, antineoplastik ajanlar, radyasyon, alışkanlık yapan maddeler, çevresel ajanlar ve stres, küçük moleküllerin otooksidasyonu, enzimler ve proteinler, mitokondrial elektron transport sistemleri, peroksizomlar, plazma membranı ve oksidatif stres yapıcı durumlardan kaynaklanabilir (114,116-121).

Serbest radikaller nötralize edilmezlerse vücutta ciddi hasarlara neden olabilirler:

- Hücre membranı proteinlerini yıkararak hücreleri öldürmek,
- Membran lipid ve proteinlerini yok ederek hücre membranını sertleştirip hücre fonksiyonunu engellemek,
- Nüklear membranı yararak nükleustaki genetik materyale etki edip DNA'yı kırılma ve mutasyonlara açık hale getirmek,
- Bağışıklık sistemindeki hücreleri yok ederek bağışıklık sistemini zorlamak.

Bu etkiler oksidatif stres olarak bilinen DNA mutasyonları, hücre ölümleri ve hastalıkları gibi hasarlara neden olur.

Glukoz gibi maddeler ROS'ları oluşturacak şekilde proteinlerle reaksiyona girerler; bu ise diyabetik hastaların seneler boyunca yüksek kan glukozuna maruz kalması nedeniyle hipergliseminin yan etkilerini kolaylaştırıcı oksidatif stres oluşumuyla sonuçlanır.

Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA, karbohidratlar gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler ve de yapılarının bozulmalarına neden olurlar. Lipidler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Serbest oksijen radikallerinin membran lipidleri ile etkileşmesi zincirleme reaksiyonlarla devam eden lipid peroksidasyonunu başlatarak; membran yapısının bozulmasına, permeabilite artışına hücrenin iyon gradientinin sürdürülememesine ve doku hasarına yol açabilir (122-124).

Lipid peroksidasyonu, lipidlerin dışında reseptör ve enzimleri de hasara uğratabilir (125). Lipid peroksidasyonu özellikle hidroksil radikali gibi serbest radikallerin hücre membranlarındaki poliansatüre yağ asitlerinden, lipoproteinlerin ve serbest yağ asitlerinin polialkil zincirlerindeki metilen karbonundan bir hidrojen atomu koparmasıyla başlamaktadır. Ortamda metallerinde bulunmasıyla peroksil radikalleri oluşmaktadır. Böylece zincirleme reaksiyonlar meydana gelerek ortamda fazla miktarda lipid hidroperoksidler oluşmaktadır (126). Lipid hidroperoksidlerinin yıkılması MDA

(Malondialdehid)'yı da içine alan çok sayıda yıkılım ürünlerini oluşturur (127,128). Bu nedenle malondialdehit düzeyi oksidatif poliansatüre yağ asitleri hasarının bir göstergesi olarak kabul edilir (129-135).

Diyabetteki oksidatif strese rol oynayan serbest radikaller; süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) hidroksil radikali ($HO\cdot$), $NO\cdot$ ve geçiş metallere aittir.

O_2 (Süperoksit):

Süperoksit radikali moleküler oksijenin indirgenmesinde ara basamaktır ve oluştuğu yerden fazla uzağa diffüze olamaz. Doğal oksijen molekülünün başka bir molekülden elektron almış hali olan O_2^- mitokondriyal elektron transfer zincirinde redükte nikotinamid adenin dinükleotid (NADH)'ın okside nikotinamid adenin dinükleotid (NAD)'a okside olması ile üretilir. Ayrıca pek çok oksidaz tarafından da üretilir. Süperoksit, bir serbest radikal olmakla birlikte, kendisi direkt olarak fazla zarar vermez. Asıl önemli olan, H_2O_2 kaynağı ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Süperoksit, nötrofillerin bakterisidal aktivitesi, apoptozis, inflamasyon ve vasküler fonksiyonların regülasyonu gibi yararlı etkilere sahiptir. Azalmış süperoksit düzeyleri, bakteriyel enfeksiyonlara artmış bir yatkınlığa yol açabilir. Artmış süperoksit düzeyleri ise süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile H_2O_2 ve oksijene dönüştürülerek azaltılır. Süperoksidin aşırı üretimi hücresel metabolizmanın aşırı yükselmiş glukoz tarafından bozulduğu durumlarda gerçekleşir. Bu da diyabetin komplikasyonlarına neden olur. ATP sentezi inhibe edilir ve elektron transport zinciri yavaşlar (3,4,6,7,122,136).

H_2O_2 (Hidrojen Peroksit):

Doğal oksijen molekülü başka bir molekülden iki elektron almışsa peroksit oluşur. Peroksit molekülü iki H molekülü ile birleşirse H_2O_2 oluşur. H_2O_2 süperoksidin SOD ile dismutasyonu sonucu veya spontan olarak ta üretilebilmektedir. H_2O_2 aslında radikal değildir. Ancak üretildiği bölgede kalan süperoksidin aksine membranları geçen, sitozole diffüze olan ve uzun ömürlü bir oksidan olarak bilinir. Bu nedenle süperoksidin ulaşamadığı membranla korunan yapılara kolaylıkla ulaşabilir. Burada süperoksidle reaksiyona girerek en reaktif ve zarar verici radikal olan hidroksil radikali oluşturmak

üzere kolaylıkla yıkılabilir. Hidrojen peroksit başka bir şekilde de serbest Fe⁺² ile reaksiyona girerse demir okside olurken hidroksil radikali oluşur. Bu da doku hipoksisi ve endotel hasarına yol açabilen vazodilatasyon kaybına neden olur.

HO[•] (Hidroksil Radikali):

Hidroksil, bilinen en reaktif radikaldir. Amino asitler, nükleik asitler, organik asitler, fosfolipidler ve şekerler gibi biyokimyasal maddelerin bir çoğuyla reaksiyona girebilir. Tek atom halinde ve bir elektronu eksik olan oksijen ile H⁺ 'in birleşmesinden oluşur. Gamma radyasyona maruz kalan dokularda da hidroksil radikali oluşabilir. Alınan enerji hücre suyu tarafından absorbe edilir ve sudaki oksijen-hidrojen kovalent bağının parçalanmasına neden olur. Böylece hidrojen ve oksijen üzerinde dış orbitalde tek elektron kalır ve 2 radikal oluşur. Hidroksilin yarılanma ömrü çok kısadır ve pek çok molekülden H atomu çıkarılmasını sağlar (3,6,122,136).

NO (Nitrik Oksid):

NO, nitrik oksid sentaz (NOS) olarak bilinen sitozolik bir enzimin aktivitesi ile oluşur. Serbest radikal olan NO'nin yarılanma ömrü kısa olup, hızla nitrit ve nitrate dönüşür. Vasküler tonun regülasyonunda guanilat siklazı aktive eden NO major rol oynar. NO bir adet çiftlenmemiş elektrona sahiptir ve bu nedenle ROS olarak kabul edilebilir.

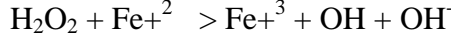
NO bazı durumlarda bir antioksidan gibi davranır ve lipid peroksidasyonundan korur. Bununla birlikte süperoksit düzeylerinin arttığı durumlarda süperoksitle reaksiyona girer ve bir prooksidan olan peroksinitrit oluşturur (3,137).

Diyabette görülen endotel fonksiyon bozukluklarından endoteldeki nitrik oksid üretiminin azalması sorumlu tutulmaktadır. (5,137-140). Ancak diyabette NO'nin artmış olduğunu rapor eden araştırmacılar da vardır (141).

Geçiş Metalleri:

Demir ve bakır gibi geçiş metal iyonları da canlı sistemde serbest radikal oluşturan güçlü birer oksidatif katalist olarak görev yapmaktadırlar. Metal iyonları lipid peroksidasyonu esnasında rol oynarlar. Oluşmuş lipid hidroperoksitlerin parçalanmalarını ve lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonunu katalize eder. Böylece

daha az zararlı olan radikalleri daha zararlı hale getirirler. *Fenton reaksiyonu* olarak bilinen reaksiyonda Fe^{+2} iyonlarının H_2O_2 'i indirgeyip $OH\cdot$ oluşturabildikleri bilinmektedir (4,7,122,142).



2.8. Diyabet ve Oksidatif Stres

Katarakt, ateroskleroz, diyabet gibi patolojik koşullar altında metal iyonlarının serbest ve zararlı formlarda bulunduğu dair güçlü kanıtlar bulunmaktadır (143).

ROS'ların oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta bazı savunma mekanizmaları geliştirilmiştir. Bunlar “antioksidanlar” olarak bilinirler. Antioksidan moleküller oluşan oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı hem hücre içi hem de hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirilirler. Antioksidanlar peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler. Antioksidanlar endojen kaynaklı ve eksojen kaynaklı olmak üzere iki gruba ayrılabilir gibi serbest radikal oluşumunu önleyenler ve mevcut olanı etkisiz hale getirenler şeklinde de ikiye ayrılabilirler (144,145).

Ayrıca enzim ve enzim olmayanlar şeklinde de sınıflandırılırlar. Enzimatik antioksidanlar süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz gibi enzimlerdir. Enzimatik olmayanlar ise tokoferol, β karoten, askorbik asit, urat, sistein, seruloplasmin, transferrin ve albumindir (146-148).

Normal sağlıklı kişilerde serbest radikaller/antioksidanlar denge halindedir. Diyabette ise bu denge serbest radikaller lehine bozulmuştur(4,7). Bu da diyabetin komplikasyonlarına neden olmaktadır. İşte bu antioksidan mekanizmaları daha aktif hale veya bozulmuş bu dengeyi antioksidanlar lehine artırabilirsek diyabetin komplikasyonlarıyla başa çıkabiliriz. Antioksidanlar etki mekanizmalarını serbest radikalleri tutarak veya daha zayıf yeni bir moleküle çevirerek, serbest radikalle etkileşip aktivitelerini azaltarak, serbest radikalleri kendilerine bağlayıp reaksiyon zincirini kırarak ya da onarım yaparak gösterirler (144,145,147,148).

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme bu dengenin bozulmasına neden olur. 'Oksidatif stres' olarak adlandırılan bu durum doku hasarına yol açar (149).

Diyabette reaktif oksijen türlerinin rolü 1980'li yıllardan beri geniş çapta tartışılan bir konu olmuştur (150). Diyabet ve diyabet komplikasyonlarının reaktif oksijen türleri ile olan ilişkisini gösteren çalışmalarda, nonenzimatik glikasyon, enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stres, sorbitol yol aktivitesi, hipoksi ve iskemi-reperfüzyon sonucu oluşan doku hasarının serbest radikal üretimini arttırdığı (151) ve antioksidan savunma sistemini değiştirdiği vurgulanmaktadır (152-156).

Süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonlarının ve antioksidan kapasitenin pankreas adacık hücrelerinde, karaciğer, böbrek, iskelet kası ve adipoz doku gibi diğer dokularla kıyaslandığında en düşük düzeyde olduğu bilinmektedir (157,158).

Oksidatif strese en duyarlı yapılardan biride pankreas beta hücreleridir. Beta hücrelerinde gözlenen hasarın, hipergliseminin toksik etkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (159). Serbest radikal oluşumunun hipergliseminin direkt sonucu olduğunu destekleyen çalışmalar bulunmaktadır (160). Bunun yanı sıra endotel ve düz kas hücreleri yüksek konsantrasyonda glukoz içeren ortamda inkube edildiğinde de serbest radikal oluşumunun başladığı gözlenmiştir (161,162). Hiperglisemi ile oksidatif stres arasında yakın ilişki olduğu görüşü in vivo çalışmalar ile de desteklenmiştir (163). Deneysel hayvan çalışmalarında insanlardakine benzer diyabet oluşturmak için kullanılan streptozotosin (164), oksidan maddeler meydana getirerek langerhans adacıklarını selektif olarak tahrip etmekte ve NO yanıtlarını bozarak diyabeti başlattığına dair kanıtlar vardır (165,166).

Hidrojen peroksidin, yüksek reaktiviteye sahip bir ROS ürünü olan OH⁻ radikaline dönüşmesi sonrası insülin reseptör sinyal sistemi üzerinde etkili olduğu ve

insülin tarafından reseptör aracılığı ile düzenlenen sinyal transdüksiyon yollarında anahtar bir rol oynayabileceği görüşü araştırmacıların savları arasında bulunmaktadır (167). Glikasyon aracılı serbest radikal üretiminin insülinin gen transkripsiyonunu azalttığını ve beta hücre apoptozuna yol açtığını gösteren çalışmaların bulguları bu görüşü destekler niteliktedir (167,168).

Diyabetik komplikasyonlar ve lipid peroksidasyonu arasındaki ilişki pek çok çalışmayla desteklenmiştir(3-7,134). Mitokondri ve endoplazmik retikulum membranları ve plazmada bulunan lipidler, peroksidasyonun ve ROS saldırılarının ana hedefidir.

Diyabetik olguların plazma lipoproteinlerinde, eritrosit membran lipitlerinde ve çeşitli dokularında lipid peroksidasyonunun arttığı, yapılan çalışmalar sonucu görülmüştür. Bu artışın daha fazla enzimatik (araşidonik asit yolu) ya da nonenzimatik lipid peroksidasyonundan mı kaynaklandığı bilinmemektedir. Lipid peroksidasyonu, hem yaygın vasküler inflamasyon sonucu aktifleşen lipooksijenaz yolu ile prostoglandinlerden, hem de serbest radikaller ve geçiş metallerinin etkisi ile endotelial ve fagositik hücrelerin membranlarında bulunan lipidlerden, nonenzimatik yolla oluşmaktadır. Daha sonra her iki yola ait ürünlerin, karşılıklı olarak birbirlerini aktive ederek, lipid peroksidasyonunu artırdıkları bildirilmiştir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar, plazma lipid peroksidlerindeki artışın, diyabetten çok, vasküler hastalığın kendisi ve hipertrigliseridemi ile ilişkili olduğunu göstermektedir (165,169,170). Diyabetik olgularda, lipidlerin yanı sıra protein oksidasyonu da artmaktadır. Özellikle kollajen, elastin ve myelin kılıfındaki ekstrasellüler proteinlerin oksidasyonu sonucu; lens, damar, bazal membran gibi dokularda katarakt, mikroanjyopati, ateroskleroz ve nefropati gibi diyabetik komplikasyonların geliştiği düşünülmektedir (165,171,172).

Hipergliseminin diyabetik komplikasyonlar üzerine etkisi birkaç ana mekanizmayla irdelenmektedir. Hiperglisemi aracılı ROS üretimi başlıca üç mekanizma ile açıklanmaktadır;

1. Glukozun oto-oksidasyonu ve süperoksit üretimi.
2. Proteinlerin glikasyonu ve ilerlemiş glikasyon son ürünleri oluşumu.
3. Polioll yolu.

Bir geçiş elementinin varlığında glukoz, reaktif ketoaldehitlere dönüşürken reaksiyon sırasında süperoksit anyonu üretilir. Süperoksit radikali hidrojen peroksit üzerinden son derece reaktif olan hidroksil radikaline dönüşür. Hücre içi glukoz oksidasyonu ile açığa çıkan NADH, solunum zincirinde oksidatif fosforilasyon yolu ile ATP üretimi için gerekli enerjiyi sağlamak üzere kullanılır. Hücre içi glukoz derişimi yükseldiğinde bu yolla da süperoksit radikal üretimi artar. Mitokondri solunum zinciri başlıca hücre içi ROS üretim kaynağıdır.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, diyabetteki patolojilerin birçoğunun artmış mitokondriyal ROS üretimi ile ilintili olduğunu göstermektedir (94,173,174).

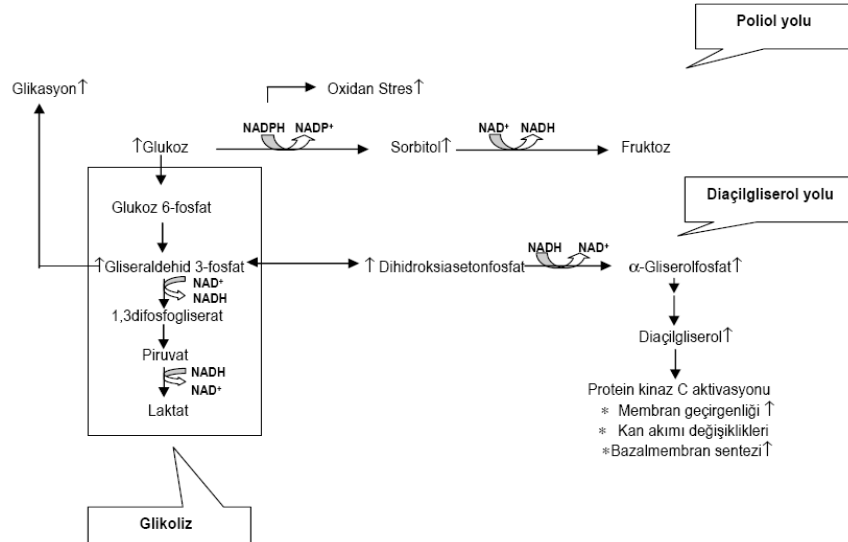
Hücre içi glukoz konsantrasyonu arttığında, glukoz bir enzim aracılığına gereksinim duymadan proteine bağlanarak kontrolsüz glikasyona sebep olur. Glikasyona uğramış protein, serbest oksijen radikali oluşturmaya çok meyillidir. Glukoz ve proteinlerin amino grupları arasında kendiliğinden gelişen enzimatik olmayan glikasyon reaksiyonları yoluyla önce Schiff bazları, sonrasında daha stabil olan Amadori ürünleri oluşur. Amadori ürünlerinin oluşumundan sonra ileri glikasyon son ürünleri meydana gelir. AGE'lerin, endotelin-1 aracılığıyla vazokonstriksiyonu arttırarak endotel hasarına yol açması kompleks biyokimyasal mekanizmalarla serbest radikal üretebilmesi, proteinlerin yapılarını ve fonksiyonlarını değiştirebilmeleri toksik etkileri arasında sayılmaktadır. Ayrıca araştırmalar artmış serbest radikallerin de hücre içi AGE oluşumunu arttırdığını göstermektedir (175).

Proteinlerin büyüklüğünü, şeklini, elektriksel yüklerini, viskozitesini, çözünürlüğünü değiştiren glikasyon, ısı ve enzimlere dayanıklılığı ve membran reseptörüne bağlanmayı etkilemektedir. Ayrıca SOD ve katalaz gibi antioksidan enzimler glikasyonla inaktive olmaktadır. Diyabette koagülasyona eğilimi artıran AGE bileşikleri koagulan/antikoagulan dengesini koagulanlar lehine bozmaktadır (138,139,176,177).

Yine araştırmacıların bulguları hücre içi AGE oluşumu ile lipid peroksidasyonu arasında sıkı bir ilişki olduğunu, lipid peroksidasyonunun önlenmesi ile AGE oluşumunun da önlendiğini göstermiştir (178). Yapılan çalışmalarda AGE ve serbest radikallerin, protein kinaz C (PKC)'yi aktive ettiği gösterilmiştir. Aktive olan PKC'nin,

vasküler kan akımını, damar permeabilitesini, hücre dışı matriks bileşenlerini ve hücre büyümesini etkileyerek vasküler komplikasyonların patogenezinde rol aldığı öne sürülmektedir (179-181).

Yüksek glukoz konsantrasyonu, poliol yolu ile sorbitol üretimine neden olur. Glukoz, aldoz redüktaz enzimi yardımıyla sorbitole dönüşür. Sorbitol ise sorbitol dehidrogenaz yardımıyla fruktoza dönüşür ve enerji kaynağı olarak kullanılır.(Tablo 2.4) Glukoz sorbitole dönüşürken, NADPH tüketilir. Fazla miktarda glukoz alındığında NADPH fazla miktarda tüketilir. Ayrıca aşırı miktarda sorbitol ortaya çıkar. NADPH'nin aşırı tüketimi ve sorbitol birikimi, sorbitol dehidrogenazı etkisizleştirerek früktoza dönüşüm engellenir. Bunun sonucunda sorbitol birikimi ve NADPH tüketimi artar. Okside glutasyonun redükte forma çevrilebilmesi ve NO sentezi için NADPH gereklidir. Bu nedenle sorbitol yolunun aktif olması ve sonuçta NADPH'ın yokluğu hücrenin antioksidan kapasitesinin sınırlanması anlamına gelmektedir (182). Redükte glutasyonun ve vazodilatasyonda görev yapan NO sentezinin azalması diyabetin vasküler komplikasyonlarının ortaya çıkışında rol oynar (165).



Tablo 2. 4 Poliol Ve Diaçilgliserol Yollarının Birbirleriyle İlişkisi (134).

2.9. L-Karnitin

L-Karnitin (3-hidroksi-4-N-trimetilamino-butirat) canlı organizmada farklı dokularda fizyolojik olarak sentezlenen ve sitoplazmadan mitokondri matriksine transfer edilecek uzun zincirli yağ asitlerinin iç mitokondrial membrandan geçişinde görev alan amino asit benzeri bir maddedir (183-185).

L-karnitin 1905 yılında Gulewitsch ve Krimberg adlı iki Rus bilim adamı tarafından kas dokudan izole edilen bir bileşik olarak keşfedilmiştir ve bu keşiften sonra, latince et anlamına gelen “*carinis*” ismi verilmiştir (186). 1927 yılında L-karnitin kimyasal yapısı onaylanmıştır. 1935 yılında, Leipzig Üniversitesi’nden Prof. Dr. Strack L-karnitin hakkında ilk makaleyi yayımlamış ve yıllarca süren L-karnitin fizyolojik fonksiyonları ile ilgili araştırmaların temelini oluşturmuştur. 1952 yılında Carter ve ark. tarafından ise *Tenebrio molitor* adlı un kurtçuklarının büyümesi için şart olan bir yapı olduğunu ortaya koymuşlar ve bu vitamin benzeri etkiden dolayı vitamin BT olarak da isimlendirilmiştir (187). 1958 yılında Fritz, L-karnitin mitokondride yağların yakılmasını arttırdığını ve yağ asitleri oksidasyonunda önemli bir rol oynadığını saptamıştır (188).

L-karnitin’in kimyasal formülü β -hidroksi- γ -trimetilaminobutirat’tır (189). Yapısındaki karbon zincirleri ve nitrojeni L-lisinden, metil grupları ise metioninden gelmektedir. L-karnitin insanlarda serbest ve esterleşmiş halde bulunur. Serbest karnitin (L-karnitin) toplam karnitin miktarının % 80’ ini oluşturur (190).

Dokularda sadece L formu sentezlenir ve sadece bu formu metabolik olarak aktiftir. L-karnitin’in diğer kimyasal formları ise asetil-L-karnitin ve propionil-L-karnitin’dir (191). L-karnitin vücuda eksojen ve endojen olmak üzere iki kaynaktan sağlanır. Vücutta en fazla karaciğer, böbrek ve beyinde sentezlenir. Karnitin sentezi yapmayan organlar ise ihtiyaçlarını kana verilen karnitinden karşılarlar. L-karnitin sentezi için lizin ve metiyonin zorunlu aminoasitlerinin yanı sıra C vitamini, demir (Fe^{2+}), B6 vitamini ve nikotinamid adenin dinukleotit (NAD) yapısında niasine gereksinim vardır. Ayrıca metiyonin sentezi için gerekli olan B12 vitamini eksikliğinde de L-karnitin’in işlevi bozulur (186). Bu nedenle L-karnitin vitamin benzeri bir madde

olarak tanımlanmaktadır (192). Bunun yanı sıra diyet ile alınabilen karnitin vücutta da sentez edildiğinden, tam anlamıyla bir vitamin olarak kabul edilmemektedir (193,194).

İnsanlarda lisin ve metionin aminoasitlerinden endojen L-karnitin sentezi bir reaksiyon zinciri ile gerçekleşir. Biyosentez toplam beş basamakta şekillenir. Sentezin ilk basamağı proteine bağlı lisinin metilasyonudur. İkinci basamakta 3-hidroksitrimetillizin, üçüncü basamakta deoksikarnitinaldehid, dördüncü basamakta ise deoksikarnitin oluşmaktadır. Beşinci ve son basamakta etken katalizör enzim olan deoksikarnitin hidroksilazın (gama-butirotetain hidroksilaz) etkisiyle karnitin meydana gelir. Deoksikarnitin karnitine hidroksilasyonu karaciğer, beyin ve böbreklerde meydana gelirken diğer dokularda (iskelet kasları, kalp kası vb.) enzim aktivitesi olmadığından karnitin sentezi yapılamamaktadır (195-197).

L-karnitin'in insanlardaki biyosentezinin düzeyi 0,16 mg/ kg ile 0,48 mg/ kg vücut ağırlığı/ gün arasında değişmektedir. 70 kg olan bir insanda günde 11-34 mg L-karnitin sentezlenebilir (198).

Eksojen olarak diyet ile alınan L-karnitin'in en zengin kaynakları başta kırmızı et olmak üzere balık, tavuk ve süt ürünleridir. Diğer meyve, sebze ve tahıllar ise bu ürünlere oranla çok daha az L-karnitin içeriğine sahiptir (199,200). Besinlerle organizmaya alınan ve endojen sentezlenen toplam karnitin primer filtrata geçerek %95'ten fazlası reabsorbe edilir. Normal beslenme şartlarında bu geri emilim mekanizmasında herhangi bir bozukluk olmadığı takdirde karnitin yetersizliği ortaya çıkmaz. (187,201). Yani tubuluslarda şekillenen bu geri emilme, besinlerle alınan karnitin miktarına, organizmanın karnitin gereksinimine ve de plazma karnitin düzeylerine göre düzenlenir (202).

Organizmada karnitin %98 i kalp ve iskelet kasında depo edilir. Çünkü sözü edilen bu dokular karnitin bağımlıdır (203). Kalan %2'lik kısmı ise karaciğer, böbrek ve beyin gibi organlarda depo edilir. Plazma ve eritrositlerdeki kısım %1'in altındadır (%0,6).

L-karnitin lipid metabolizması için oldukça önemlidir. Yağ asidi β -oksidasyonu için düzenleyici kofaktör gibi rol oynar. Uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondriyal

membrandan açıl karnitin esterleri olarak geçişine yardımcı olarak bir mekik görevi görmektedir. Mitokondri içine yağ asidi taşınmasında bir azalma olduğunda sitozolik trigliserid birikimi olur. Yağ asitlerinin katobolizması aktivasyon, mitokondriye taşınma ve β -oksidasyon olmak üzere üç ana basamakta gerçekleşir. Aktivasyon aşamasında uzun zincirli yağ asidi açıl-CoA sentetaz tarafından uzun zincir açıl-CoA'ya dönüştürülerek aktive edilir. İkinci aşamada mitokondriyal dış membranda bulunan karnitin: palmitoilaçıltransferaz-I (CPT-I) enzimi tarafından aktive yağ asidi karnitine aktarılarak uzun zincir açıl-CoA açilkarnitine dönüştürülür. Üçüncü aşamada açilkarnitin mitokondriyal karnitin: açıl karnitin translokaz (CAT) aracılığı ile mitokondriyal iç membrandan geçer. CAT bir kotransporterdir; açıl-karnitin ve serbest karnitini aynı anda zıt yönlere taşır. Açıl karnitini sitozolden mitokondri matriksine taşırken serbest karnitini mitokondri matriksinden sitozole taşır. İç mitokondri membranının iç yüzeyinde bulunan karnitin: palmitoilaçıltransferaz-II (CPT-II) açıl karnitindeki uzun zincirli yağ asidini koenzim A'ya aktarır ve açıl-CoA oluşur. Açıl-CoA β -oksidasyona uğrar, oluşan asetil-CoA sitrik asit döngüsüne dahil olur. β -oksidasyonda ve asetil-CoA'ların sitrik asit döngüsünde kullanılması reaksiyonlarında açığa çıkan indirgenmiş nikotinamid dinükleotid (NADH) ve indirgenmiş flavinamid dinükleotid (FADH₂)'ler elektron transport zinciri ve oksidatif fosforilasyonda kullanılarak ATP oluşur.

L- karnitin lipit metabolizmasına etkilerinin yanı sıra hücre membranlarının korunması ve ayarlanması, serbest KoA için gerekli ortamın sağlanması, ATP'nin elde edilmesini optimize etmek, amonyak toleransını arttırma, immün sistemin desteklenmesi gibietkileri de vardır.

Karnitinin etki mekanizması ile ilgili iki hipotez vardır:

Metabolik hipotez; mitokondriyal enerji üretiminde mitokondri membranında uzun zincirli yağ asitlerinin β oksidasyon için membrandan karşı tarafa transferinde en çok karaciğer ve kasta bulunan esansiyel taşıyıcıdır ve bunun yanında fazla organik asitlerin detoksifikasyonunu sağlar (204).

Serbest radikal hipotezi: L ve D propiyonil karnitin fenton sisteminde hidroksil radikal üretimini durdurur (205). Myokardiyum, endotel ve eritrositleri peroksidatif

hasarlanmadan korur. Aynı zamanda hasarlanmış hücre membranını stabilize eder. Diyabet ile bozulmuş eritrosit membran fosfolipid yağ asit turnoverini düzeltebilmektedir (206).

Diyabetik deney hayvanlarında diyabetin hem erken hemde ileri dönemlerinde pankreasta karnitin düzeyi düştüğü idrarla karnitin çıkarılmasının arttığı görülmüştür (207). Karnitin'in, kalp kasında lipid esterlerinin birikimi ve lipid peroksidasyon ürünü MDA yapımını önleyerek ATP sentezini artırdığı düşünülmektedir (11). Ayrıca, ROS sentezini hızlandıran Fe^{++} le kompleksler oluşturarak lipid peroksidasyonunu azaltmaktadır (208).

L-karnitin antioksidan kapasiteyi artırarak doku bozulmasını azaltabilir. Gençlere oranla yaşlı ratlardaki lipid peroksidasyonun artması ve antioksidan etkiye sahip olan SOD, glutatyon ve katalaz, C ve E vitaminlerinin azalması ve karnitin ilaveleri ile artış gösterebilmeleri bu görüşü desteklemektedir (209,210).

Genellikle diyabet, siroz ve kronik böbrek yetmezliği gibi kronik hastalıklarda L-karnitin eksikliği sık görülür (211,212). Diyabetik hastalarda L-karnitin eksikliği, retinopati, nöropati gibi diyabetik komplikasyonları olanlarda daha sıktır. Bu durum L-karnitin eksikliğinin bu komplikasyonların gelişmesinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Zira L-karnitin insülin duyarlılığını ve glikozun periferik dokular tarafından kullanımını arttırır (213,214).

L-karnitin eksikliğinde endotel disfonksiyonu gelişebilmektedir. Hipertansif ve normotansif ratlarda yapılan çalışmalarda L-karnitin endotel bağımlı relaksasyonu, nitrik oksit üretimini arttırarak indüklediği gösterilmiştir (215).

2.10. Melatonin

Melatonin, karanlıkta pineal bezden salgılanan, uyku, üreme, sirkadiyen ritim ve immünite gibi pek çok biyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde rol oynayan bir hormondur. Pineal bez, yaklaşık üç yüz yıl önce Fransız filozof Deskartes tarafından “ruhun tahtı” olarak tanımlamıştır. Ancak melatoninin pineal bezden ilk olarak keşfi

dermatolog Lerner ve arkadaşları tarafından 1958’de gerçekleştirilmiştir (216). Melatoninin bu dönemde tanımı “*melanophorecontracting hormon*” olarak yapılmış, gerek kurbağa derisindeki melanoforların beyaz görünüşüne neden olduğu için ve gerekse serotonininden türediği için bu isim verilmiştir (217). Melatoninin sentez edilip dolaşma salındığı yer olan pineal bez insanda 120-150 mg, sıçanda 0,9-1,56 mg ağırlığındadır. İnsanlarda üçüncü ventrikülün arkasında yer alan pineal bez (epifiz bezi), böbrekten sonra vücudun en çok kan akımına sahip ikinci organıdır. Pineal bezde, pinealositler ve nöroglia hücreleri bulunmaktadır. Dominant olan ve melatonin sentezinin yapıldığı yer pinealositlerdir. Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin) sentezinde birinci basamak triptofanın pinealositler içine alınmasıdır. Triptofan, esansiyel bir aminoasit olup, besinlerle dışarıdan alınması gerekmektedir. Dışarıdan triptofan verilmesi, dolaşımdaki melatonin düzeyini artırır. Triptofan, pinealositlerde, triptofan hidroksilaz enzimi ile 5-hidroksitriptofan'a hidrokssillenir. 5-hidroksitriptofan, aromatik-L-aminoasit dekarboksilaz ile 5-hidroksitriptamin (serotonin)'e dekarboksillenir. Serotonin, N-asetil transferaz (NAT) enzimi ile N-asetil serotonin'e ve bu da, hidroksiindol-o-metil transferaz etkisi ile melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin)'e dönüşür (218). Melatonin sentezi için gerekli enzimlerin, pinealositler dışında, suprachiasmatic nükleus, retina ve ince barsakta da bulunduğu, immünohistokimyasal yöntemlerle gösterilmiştir. Pineal bez çıkarıldığında, dolaşımdaki melatonin tam olarak yok olmamaktadır (219). Sentezin düzenlenmesi primer olarak geceye, başka bir deyişle karanlığa bağlıdır. Sentezlenen melatonin pineal bezin endokrin hücreleri olan pinealositlerden hızla salgılanmaktadır. Salgılanma hızı 29 mg gün⁻¹ dır (220).

Sentezden sorumlu N-asetiltransferaz'ın aktivitesi dolayısıyla melatonin sentezi spesifik c-AMP-bağımlı transkripsiyon faktörleri ve fotoperiyodik şartlar tarafından düzenlenir. Işık altında, retinadan başlayan nöronal impulslar, hipotalamusta suprachiasmatic nükleus (SCN) ve diğer hipotalamik yapılara aktarılır. Uyarı SCN ve periventriküler nükleus (PVN) aracılığı ile superior servikal gangliyonuna geçer. İnsanda karanlığın başlaması ile postganglionik sempatik liflerden salıverilen noradrenalin esas olarak β_1 reseptörlere bağlanarak, depolardaki serotonin ve NAT'nin intrasellüler salıverilmesine neden olur. Nöronlarda ve pineal bezdeki biyokimyasal sinyallerin bu

döngüsü insanda melatonin anabolizmasını hızlandırır ve aynı zamanda melatoninin gün içi ritme bağlı olarak sentez ve salıverilmesini oluşturur (221).

Doğumdan itibaren 3 aya kadar çok az olan melatonin salınımı, giderek artmakta ve 1-3 yaş arası pik seviyesine ulaşmaktadır. Normal genç erişkinlerde gündüze göre, gece 3-10 kat daha yüksek olan serum melatonin konsantrasyonu, 02⁰⁰-04⁰⁰ saatleri arasında maximum seviyeye ulaşmakta ve daha sonra giderek azalmaktadır (222).

Yirmili yaşlardan sonra melatoninin sentez ve salgılanma hızı azalarak 60'lı yaşlarda en düşük seviyelere ulaşır (223). Sağlıklı kişilerde plazma melatonin düzeyi gündüz 0-20 pg/ml, gece 20-200 pg/ml (ortalama 60-70 pg/ml) dir. Bir günde yaklaşık 30 mg (%80 i gece) melatonin üretilir. Körlerde ışık algılaması "0" olan kişilerde melatonin sekresyonu 24 saat içinde serbest olarak dağılım göstermektedir. (221,224).

Suda kısmen ve lipidlerde yüksek oranda çözünen melatonin dolaşıma salıverildiğinde dokulara ve hücrelere kolaylıkla girebilmektedir. Plazmada yaklaşık %70'i albumine bağlı olarak taşınır. Çoğu karaciğer de olmak üzere, böbrekte de metabolize edilir. Karaciğerde 6-hidroksimelatonin'e dönüşür; bu da, böbrekte sülfat ve glukuronik aside bağlanarak idrarla atılır. Başlıca metaboliti, 6- sülfatoksimelatonin'dir (218). Melatonin lipid çözünürlüğünün yüksek olmasından dolayı hücrelere rahatça girebilmesi etkisinin sadece membrana yönelik olmadığını gösterir. Sulu ortamda kısmen çözünmesi de intrasellüler etkilerinin oluşmasına katkıda bulunur. Son yıllarda yapılan çalışmalar melatoninin nukleusta yüksek konsantrasyonda bulunduğunu ve melatonin için spesifik bağlanma noktalarının olduğunu göstermiştir.

Melatonin 'in farmakolojik olarak tanımlanmış ML1 ve ML2 olarak bilinen iki membran reseptörü bulunmaktadır. ML1, yüksek afiniteli (pikomolar konsantrasyonlarda) bağlanma yeri olup, a, b ve c alttipleri gösterilmiştir. ML2 ise, düşük afiniteli (nanomolar konsantrasyonlarda) bağlanma yerleri olarak tanımlanmıştır. ML1 reseptörlerinin aktivasyonu, G proteini üzerinden, adenilat siklaz'ı inhibe ederek, hedef hücrelerde cAMP düzeyini düşürür. Bu reseptörler, muhtemelen retinal fonksiyonların, sirkadiyen ritmlerin ve üremenin regülasyonunda rol oynamaktadır. ML1 reseptörleri serebellum, hipokampus dahil olmak üzere nöronal yerleşim göstermektedir. Nöronal olmayan ML1 reseptörleri ise serebral ve caudal arterlerde,

hipofizeal pars tuberaliste, ovaryum, böbrek ve ince barsaklarda bulunmuştur. ML2 reseptörlerinin aktivasyonu, fosfoinozimid hidrolizini stimüle eder, ancak bunların dağılımı henüz tanımlanmamıştır (225).

Hem in vitro, hem de in vivo çalışmalarda, melatoninin güçlü bir serbest radikal yakalayıcı ajan olduğu gösterilmiştir. Oldukça toksik olan hidroksil radikalleri başta olmak üzere, diğer serbest oksijen radikallerinin neden olduğu oksidatif hasardan özellikle de DNA gibi makromolekülleri koruyabilir. Bu etkisini, reseptörden bağımsız bir şekilde, direkt olarak oluşturur.

Melatoninin prekürsörü olan serotonin kan-beyin bariyerini çok az geçebilmesine rağmen, melatonin lipofilik özelliğinden dolayı kolaylıkla geçebilir. Güçlü bir antioksidan olan E vitamini de kan-beyin bariyerini geçirir.

Melatonin hem suda ve hem de lipide çözünebildiğinden, organizmada çok geniş alanda antioksidan etki gösterebilmektedir. Kolaylıkla kan-beyin bariyerini ve plasentayı geçebilen melatonin için, bilinen hiçbir morfofizyolojik bariyerin olmaması, Melatonin'in tüm intraselüler komponentlere rahatlıkla ulaşabilmesini sağlamaktadır. Böylece Melatonin, hücre zarını, organelleri ve çekirdeği etkin bir şekilde serbest radikal hasarından koruyabilmektedir. Hücre membranı ile temas ettiğinde, fosfolipid tabakanın dış yüzeyine tutunan Melatonin, radikallerle membrandan önce temasa geçerek onları detoksifiye eder ve membranı korur. Melatonin varlığında, mitokondriyal solunum zincirinden kaynaklanan $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 ve HO^{\cdot} gibi radikallerin üretimi de azalmaktadır.

Melatonin'in antioksidan özelliği, yapısında bulunan pirol halkasından kaynaklanmaktadır. Fizyolojik koşullarda pek çok indol melatonine benzer şekilde yıkılsa da, $O_2^{\cdot -}$ varlığında, melatoninin pirol halkasının indolamin 2,3-dioksijenaz (IDO) ile enzimatik ya da hemin ile nonenzimatik olarak yıkımı, yüksek reaktiviteye sahip, N1-asetil-N2-formil-5-metoksikinüramin (AFMK) oluşumuyla sonuçlanmaktadır (226). Melatoninin H_2O_2 varlığında da AFMK oluşturduğu ve bu metabolitin radikal tutucu aktivite gösterdiği belirlenmiştir (227).

Melatoninin serbest radikaller üzerinde dolaylı etkileri de vardır. Melatonin, hidroperoksitleri metabolize eden GSH-Px enzimini aktive ederek, $O_2^{\cdot -}$ radikalini H_2O_2 'ye kataliz eden SOD aktivitesini artırarak, oksidatif stres esnasında katalaz aktivitesindeki azalmayı önleyerek ve NO oluşumundan sorumlu NOS enzimini inhibe ederek, antioksidan etki göstermektedir (228-230).

Antioksidan savunma sistemi ile ilişkili diğer bir enzim sitokrom P450 enzimi ksenobiyotik metabolizması aracılığı ile serbest radikal oluşumunu artırır. Çalışmalarda melatonin'in P450 aktivitesini azaltarak serbest radikal oluşumunu ve dolayısı ile oksidatif hasarı azalttığı gösterilmiştir (229,230).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, pankreas adacık hücrelerinde (21) melatonin reseptörlerinin bulunduğunu ve hipergliseminin zararlı sonuçlarına karşı koruyucu olabileceğini göstermektedir (22). Melatonin ve metabolitleri (231) redox özelliklerine sahiptir çünkü bu moleküller zengin elektron sisteminin varlığından dolayı bir elektron vericisi gibi davranmaya olanak sağlar(232). Yine çalışmalarda melatoninin streptozotosin ile indüklenen diyabetik ratlarda bozulmuş oksidatif durumu etkili bir şekilde normalleştirebildiği gösterilmiştir(233). Benzer bir şekilde, diyabetik rat dokularına ve seruma uzun-dönem melatonin uygulanması, hiperlipidemi ve hiperinsulinemi azaltmakta ve çoklu doymamış yağ asitlerinin bozulmuş oranını düzeltmektedir (234).

Melatonin ve insülin arasında muhtemel bir sinyal yolağı çapraz etkileşiminin varlığı ileri sürülmüştür (234). Ayrıca streptozotosin ile indüklenen diyabetik ratların trabeküler düz kas dokularında ve aortada gevşeme ve kasılma yanıtlar belirgin olarak azaltmaktadır (235). İnsülin ve melatoninin kombine tedavisinin hiperglisemi önlediği, oksidatif hasarı engellediği, diyabetik ratların corpus kavernosumunda ve aortada endotel fonksiyonunu tamamen onardığı gösterilmiştir (235).

3. GEREÇ-YÖNTEM

3.1. Ratlarda Deneysel Diyabet Modelinin Oluşturulması ve Tedavi Uygulaması:

Çalışmaya deney hayvanı olarak yaklaşık 200-250 gr. 10- 12 haftalık erkek wistar albino türü sıçanlar alındı. Deney hayvanları her grupta en az 7 hayvan olacak şekilde kontrol (K), tedavisiz diyabet grubu (HFD+STZ), 0.6 g/kg/gün L- karnitin tedavisi alacak diyabetik grup (HFD+STZ +LC), 10mg/kg/gün melatonin tedavisi alacak diyabetik grup (HFD+STZ+MLT) ve 5mg/kg/gün glibenklamid tedavisi alacak diyabetik grup (HFD+STZ+GB) olmak üzere 5 gruba ayrıldı.

Sıçanlar sessiz, sıcaklık ve nem kontrolü olan bir ortamda 12 saat aydınlık (08:00-20:00) ve 12 saat karanlık siklusuna uyularak, her kafeste en fazla 3 hayvan olacak şekilde standart rat kafeslerinde bakıldı. Çalışma boyunca su ve yiyecek alımında bir kısıtlama yapılmadı. Ortam sıcaklığının 22±3 °C'de tutulmasına özen gösterildi.

Tüm hayvanların açlık kan şekeri düzeyleri (AKŞ) ve vücut ağırlıkları deneyin başlangıcında ve sonunda ölçüldü. Tüm açlık kan şekeri ölçümleri 12 saatlik yem kısıtlamasını takiben yapıldı.

Sıçanlar kontrol grubu, tedavisiz diyabet grubu ve 3 farklı dozda tedavili diyabet grubu olarak 5 gruba ayrıldıktan sonra Tip 2 diyabet modeli oluşturulacak sıçanlar yüksek yağ içerikli diyet (enerji yüzdeleri : %60 yağ, %20 karbonhidrat, %20 protein, Bilgen Lab. İstanbul) ile 4 hafta süreyle beslendi (236). Diğer gruplardaki sıçanlar ise, standart rat yemi ile eş zamanlı olarak beslendi. 4 haftalık diyetin ardından, diyabetik gruptaki sıçanlara 30 mg/kg streptozotosin (pH: 4.4, günlük taze hazırlanmış, 10 mM sitrat tampon içerisinde) intraperitoneal enjekte edildi, 3 gün sonra sıçanların kuyruklarından alınan kanda açlık kan şekeri bakıldı (Accu-Chek Active - glukometre). Açlık kan şekeri 7,8 mmol/L (140 mg/dl) nin altında olanlara bir doz streptozotosin (30 mg/kg) daha yapıldı. Streptozotosin enjeksiyonun ardından 4 hafta sonra açlık kan şekeri 7,8 mmol/Lnin (140 mg/dl) üzerinde olanlar diyabetik olarak kabul edildi (237).

Diyabetik gruplardaki tüm streptozotosin uygulamalarına paralel olarak kontrol grubuna intraperitoneal sitrat tampon (pH:4.4, 0,25 ml/kg) enjeksiyonu yapıldı.

Diyabet modellerinin oluşumunu takiben, melatonin intraperitoneal enjeksiyon yoluyla, günlük 10mg/kg dozunda, L-karnitin intraperitoneal enjeksiyon yoluyla günlük 0.6 g/kg dozunda, Glibenklamid ise oral gavaj yoluyla günlük 5mg/kg dozunda olacak şekilde iki hafta süreyle uygulandı (11,238,239).

3.2. Damar Yanıtlarının İncelenmesi

Deney hayvanları intraperitoneal üretan (1,2 g/kg) ile anesteziye alındı. Solunumdaki olası ani değişiklikler dikkatle gözlenerek ağırlı uyaranlara yanıt ortadan kalktığı zaman göğüs boşluğu açıldı ve torasik aorta izole edildi. Önceden hazırlanmış, %95 O₂ ve %5 CO₂ ile gazlandırılmış, soğutulmuş Krebs-Henseleit solüsyonu içerisinde (NaCl 119 mM, KCl 4,7mM, MgSO₄ 1,5 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 2,5 mM, NaHCO₃ 25 mM, Glukoz 11 mM, pH:7,4) çevre bağ dokularından dikkatlice temizlendi. Elde edilen aort şeritlerinin ilk kısımları 3-4 mm'lik bir parça halinde izole organ banyosunda çalışılmak üzere ayrıldı.

3-4 mm'lik aort halkaları, 37 °C de, sürekli %95 O₂ ve %5 CO₂ ile gazlandırılan Krebs-Henseleit solüsyonu içeren 20 ml'lik organ banyolarına alındı. Bu düzenekte aort parçaları uygun kancalar yardımıyla, doku hasarı yaratmamaya özen göstererek, izometrik transdüserlere (MAY FDT 05, COMMAT İletişim) bağlandı ve tüm kayıtlar 8 kanal transdüser veri sistemi (TDA 94, COMMAT) üzerinden naklen bilgisayara alındı.

Bazal gerilimin 1g olması sağlandıktan sonra aort halkaları 60- 90 dakika dinlenmeye bırakıldı. Dinlenme periyodunda her 10 dakikada bir organ banyosundaki solüsyon yıkanarak yenilendi. Dinlenme periyodunu takiben ilk olarak ardışık dozlarda fenilefrin (10⁻⁹ M - 10⁻⁵ M) ile kasılma yanıtları elde edildi. Damarların canlı olup olmadığını da görebildiğimiz bu yanıtlara göre damarlarda ön kasılmayı sağlayacak fenilefrin dozları (EC₈₀ ve EC₅₀) hesaplandı. Fenilefrinle kasılma yanıtlarının

alınmasının ardından organ banyosundaki solüsyon 10 dakikada bir temizlenerek düzenekteki aort halkaları 60- 90 dakika dinlenmeye bırakıldı.

Fenilefrinle kasılma yanıtlarından elde edilen veriler ışığında, fenilefrin EC₈₀ dozunda damarlarda bir ön kasılma elde edildi. Bu kasılmayı takiben organ banyosuna asetilkolin (10^{-9} M - 10^{-5} M) eklenerek gevşeme yanıtları kaydedildi. Asetilkolinle gevşeme yanıtlarının alınmasının ardından organ banyosundaki solüsyon 10 dakikada bir temizlenerek düzenekteki aort halkaları 60- 90 dakika dinlenmeye bırakıldı.

Asetilkolinle gevşeme yanıtları elde etmek için kullanılan yöntemin benzeri organ banyosuna sodyum nitroprussid (10^{-9} M - 10^{-5} M) eklenerek de uygulandı. Böylelikle elde edilen gevşeme yanıtlarının endotele bağımlı ya da endotelden bağımsız olduklarının tespit edilmesi amaçlandı. Sodyum nitroprussidle gevşeme yanıtlarının alınmasının ardından organ banyosundaki solüsyon 10 dakikada bir temizlenerek düzenekteki aort halkaları 60- 90 dakika dinlenmeye bırakıldı.

Yıkama ve dinlenme periyodunun ardından, damarlarda fenilefrin EC₅₀ dozunda bir ön kasılma oluşturularak, bir nonspesifik NOS inhibitörü olan L-NAME (N^G-nitro-L-arjinin metil ester) 10^{-2} M dozunda organ banyosuna tek defada eklendi ve damarların kasılma yanıtları kaydedildi.

3.3. Kan ve Karaciğer Örneklerinin Ölçüme Hazır Hale Getirilmesi ve Saklanması

Deney hayvanlarının 12 saat açlık sonrası, anestezi altında göğüs boşlukları açıldığı esnada alınan kanları santrifüje edildikten sonra (3500 x g, 10 dakika, 4 °C) elde edilen serumların bir kısmı açlık kan glukozu, total kolesterol, trigliserid ve yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) tayini için kullanıldı. Bir kısmı ise insülin, MDA ölçümleri için -85 °C'de dondurularak saklandı.

Deney hayvanlarından alınan karaciğer örnekleri, 1 gr yaş ağırlık olacak şekilde enzim aktivitesi tayini yapılacak güne kadar derin dondurucuda (-85°C) saklandı. Ölçüm gününde dokular soğuk haldeyken küçük parçalara ayrılıp tüpe alındıktan sonra

1 gr dokuya 10 ml tampon solüsyonu (0.15 M KCl çözeltisi, %10, w/v) olacak şekilde politronlu homogenizatörde homogenize edildi. Homojenizasyon tampon solüsyonu homojenizasyon günü taze hazırlanarak, buz içinde bekletildi.

3.4. Kanda Açlık Kan Şekeri, Total Kolesterol, Trigliserid, HDL-Kolesterol, LDL-Kolesterol Seviyelerinin Ölçümü

Deney hayvanlarından alınan kan örneklerinde açlık kan şekeri, total kolesterol, trigliserid, LDL-kolesterol, HDL-kolesterol düzeyleri Beckman Unicell DXC 800 otoanalizörü kullanılarak enzimatik olarak ölçüldü.

Açlık kan şekeri ölçümlerinde glukoz oksidaz- peroksidaz (GOD-POD) ölçüm yöntemi kullanıldı. Bu ölçüm metodunda glukoz, glukoz oksidaz (GOD) enzimi ile oksidasyona uğramaktadır ve sonuçta glukonik asit ile hidrojen peroksid oluşmaktadır. Hidrojen peroksid, fenol ve ampiron gibi maddelerle peroksidaz enzimi varlığında reaksiyona girerek renkli bir kompleks oluşturur. Metot, 300 mg/dL glukoz düzeyine kadar lineerdir (240).

Total kolesterol ölçümlerinde kolesterol oksidaz- peroksidaz (CHOD-POD) ölçüm yöntemi kullanıldı. Bu ölçüm metodunda kolesterol, enzimatik olarak kolesterol esteraz ve daha sonra kolesterol oksidaz, kolesterol peroksidaz enzimlerinin etkisiyle kırmızı renk oluşturan kinomine dönüşmektedir. Oluşan renkli bileşiğin konsantrasyonu 540 nm’de tayin edilir (240).

Trigliserid ölçümlerinde gliserol fosforik asid oksidaz- peroksidaz (GPO-POD) ölçüm yöntemi kullanıldı. Bu ölçüm metodunda trigliseridler lipoprptein lipazla gliserol ve yağ asidlerine dönüşmektedir. Daha sonra gliserol kinaz ve gliserofosfat oksidaz enzimlerinin etkisiyle renkli bir bileşik oluşturmaktadır. Oluşan bu son renkli bileşiğin konsantrasyonu 520 nm’de tayin edilir (240).

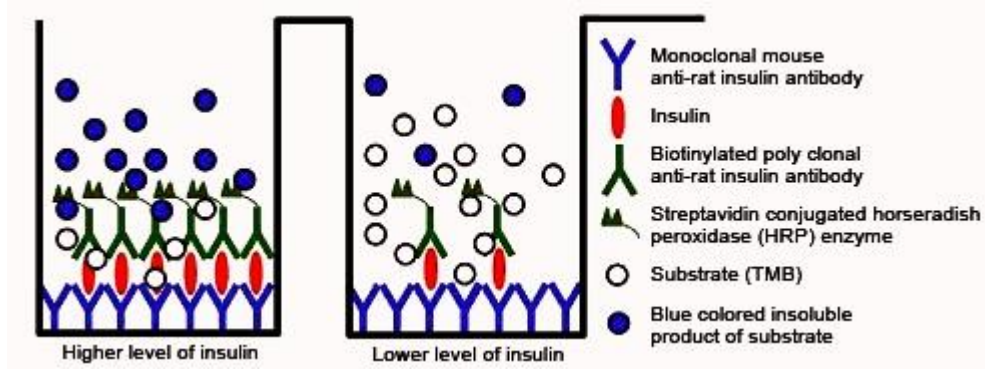
HDL-kolesterol ölçümleri magnezyum iyonlarının varlığında fosfotungustik asit ile çöktürme yöntemine göre yapılmıştır. LDL- kolesterol ölçümleri ise Friedwald formülü kullanılarak hesaplandı.

3.5 Serum Örneklerinde MDA Ölçümü

Deney hayvanlarından alınan kan örneklerinin serumlarında MDA düzeyi spektrofotometrik olarak ölçüldü. Bu amaçla 50 µl sodyum dodesil sülfat (SDS, %8.1)'a 100 µl serum eklendi ve vortekslenip oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra 375 µl asetik asit (pH 3.5, 20%) ve 375 µl tiyobarbitürik asit (0.6%) eklenip kaynar su banyosunda 60 dakika bekletildi. Örnekler oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Örnekler soğuduktan sonra 1.25 ml bütanol:piridin (15:1) eklendi, vortekslendi ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Tiyobarbitürik asit ile MDA reaksiyonundan sonra reaksiyon ürünü 532 nm'de spektrofotometrik olarak takip edildi. Sonuçlar serum için nmol/ml olarak tanımlandı.

3.6 İnsülin Seviyelerinin Ölçümü:

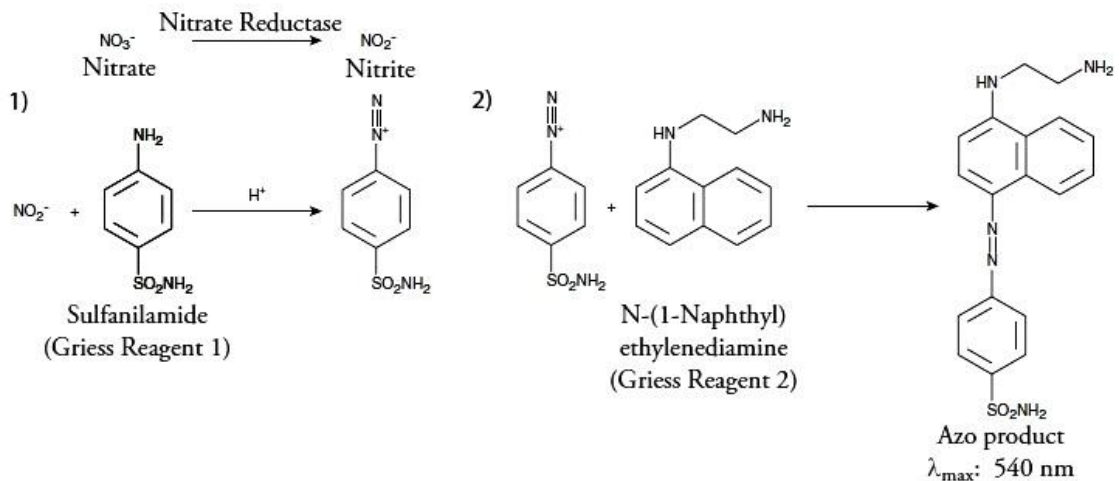
Çalışmada insülin düzeyleri ELISA yöntemiyle ticari rat insülin kiti (Millipore, Kat. No: #E6013-K) ile ölçülmüştür. Bu yöntemde sandwich ELISA tekniği kullanılmaktadır. Buna göre serum örneğindeki insülin, monoklonal anti-rat insülin antikoru ile kaplı kuyucuklara tutunur ve yakalanan insüline biyotinlenmiş poliklonal antikolar bağlanır. Yıkama işlemi ile bağlı olmayan kısım uzaklaştırılır. Böylelikle kuyucuklar içinde anti-rat insüline bağlı insülin ve insüline bağlı poliklonal antikolar kalmış olur. Streptavidin ile konjuge edilmiş horseradish peroksidaz (HRP) enzimi eklenir ve böylelikle biyotinlenmiş immobilize immunokompleks miktarı belirlenir. Bağlanmayan materyal yıkama işlemiyle uzaklaştırılır. 3,3', 5,5' tetrametilbenzidin (TMB) substrat olarak kullanılır, enzimatik parçalanma sonucu oluşan renk değişiklikleri 450- 590 nm dalga boyundaki absorbans ölçümüyle tespit edilir. Ölçülen absorbans farkı, plazma insülin konsantrasyonlarıyla doğru orantılıdır. Rat insülin standartları ile çizilen standart eğri grafiğinden çalışılan örneklerin insülin konsantrasyonları hesaplanır (241) (Şekil 3.1).



Şekil 3. 1 İnsülin Seviyelerinin Ölçüm Prensibi

3.7 Serum NO Seviyelerinin Ölçümü:

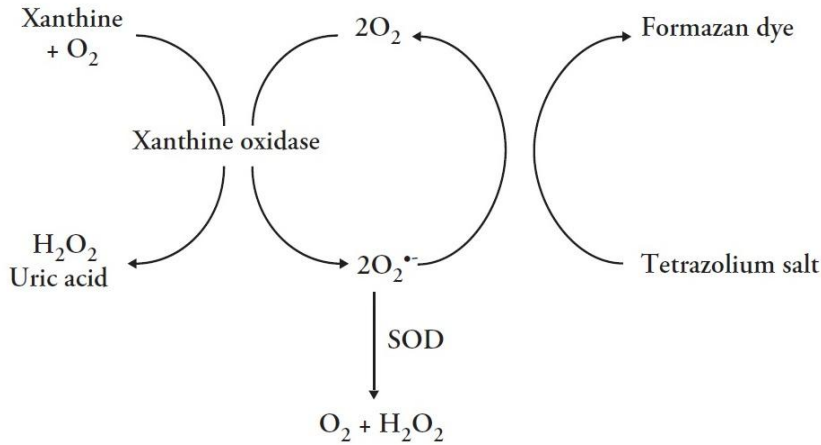
NO konsantrasyonu ölçümünde, nitrat/nitrit kolorimetrik test kiti (Cayman chemical, USA) kullanıldı. Bu test, nitratın nitrite, nitrat redüktaz ile çevrilmesini baz almaktadır. Nitrit, griess diazotizasyon reaksiyonu sonucu oluşan renkli bileşik ile tespit edildi ve miktar absorbansı 540 nm olan spektrofotometri ile ölçüldü. NO standartları kullanılarak standart bir eğri elde edildi. Elde edilen NO değerleri bu standarta göre hesaplandı (242). (Şekil 3.2)



Şekil 3. 2 NO Seviyelerinin Ölçüm Prensibi

3.8 Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Ölçümü:

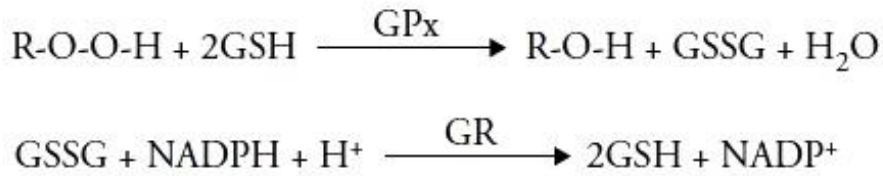
Deneyde kullanılan grupların karaciğer homojenatlarında süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ölçümü yapıldı ve bunun için süperoksit dismutaz assay kiti (Cayman Chemical, USA) kullanıldı. Bu yöntemde ksantin-ksantin oksidaz (XOD) sistemiyle süperoksit radikali üretilmekte ve oluşan süperoksit radikali, INT (Iodonitrotetrazolium) ile reaksiyon vererek viyole renkli formazon boyası oluşturmakta ve bu renk şiddeti 505 nm dalga boyunda ölçülmektedir. Ortamdaki CuZn-SOD aktivitesine bağlı olarak bu reaksiyon önlenmekte ve % inhibisyon hesaplanmaktadır. CuZn-SOD aktivitesi kanda U/g Hb olarak tanımlanırken doku için U/g protein olarak ifade edilir (146). Bu yöntemin uygulanışı kısaca şöyle; eritrosit hemolizati veya doku homojenati 10mM fosfat tamponu (pH 7.00) ile dilüe edilir. 25 µl dilüsyonlu hemolizat veya homojenat, 50 mmol/L CAPS (3-(sikloheksilaminol)-1-propansülfonik asit) ve 0.094 mmol/L EDTA (pH 10.2) içeren bir tampon solüsyonunda 0.05 mmol/L ksantin sodyum ve 0.025 mmol/L 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolium klorit (INT) içeren 850 µl substrat solüsyonu ile karıştırılır. 125µl ksantin oksidaz (80 U/ml) karışıma eklenerek absorbans artışı 505 nm'de 3 dakika izlenir.



Şekil 3. 3 SOD Seviyelerinin Ölçüm Prensipleri

3.9 Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi Ölçümü:

Deneyde kullanılan grupların karaciğer homojenatlarında glutasyon peroksidaz (GPx) akitivitesi ölçümü yapıldı ve bunun için glutasyon peroksidaz assay kiti (cayman chemical, USA) kullanıldı. H₂O₂ varlığında indirgenmiş glutasyonun (GSH) GPx tarafından okside glutatyona (GSSG) oksitlenir ve oksitlenen GSSG'nin glutasyon redüktaz enzimi aracılığıyla tekrar GSH'a dönüştürülmesi esnasında ortamda bulunan indirgenmiş NADPH kullanılır. Kullanılan bu NADPH miktarı absorbandsdaki azalış şeklinde 340 nm dalga boyunda izlenir. GPx aktivitesi kanda U/g Hb olarak tanımlanırken doku için U/g protein olarak ifade edilir (Şekil 3.4).



Şekil 3. 4 GPx Seviyelerinin Ölçüm Prensibi

Bu yöntemde 50 mmol/L TRIS tamponunda (pH 7.6) hazırlanan 1 mmol/L Na₂EDTA, 2 mmol/L indirgenmiş glutasyon, 0.2 mmol/L NADPH, 4 mmol/L sodyum azid ve 1000 U glutasyon redüktaz içeren bir karışımın 980 µl ile 20 µl doku homojenatı karıştırılır ve 37°C'de 5 dakika inkübasyona bırakılır. Reaksiyon, 8.8 mmol/L hidrojen peroksit eklenmesiyle başlatılır ve 3 dakika için 340 nm'de okunan absorbandsların azalışı kaydedilir (240).

3.10 İstatiksel Analizler:

İstatistiksel analizler, SPSS 16.00 for windows programı kullanılarak yapıldı. Veriler, n sayıdaki deneyin aritmetik ortalaması± standart hata (SH) olarak gösterildi. Değerler arası farklılık, p değerinin 0.05'den küçük olması durumunda, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. İzometrik damar yanıtlarının değerlendirilmesinde tek

yönlü varyans analizi (one way anova) ve anlamlılık çıkan verilerin karşılaştırılmasında ise post hoc tukey testi kullanıldı. Deney hayvanlarına ait normal dağılım göstermeyen diğer veriler ise nonparametrik testlere tabi tutuldu. Buna göre öncelikle Kruskal-Wallis testi yapıldı ve gruplar arası fark olması durumunda karşılaştırma için Mann-Whitney U testi uygulandı. Tekrarlayan ölçümlerdeki (açlık kan şekeri, vücut ağırlığı gibi) farklılıkları ve istatistiksel anlamlılıkları ortaya koymak için tekrarlayan ölçümlerde varyans analizi yapıldı.

4. BULGULAR

4.1 Deney Hayvanlarının Genel Bulguları:

Deneylerde çalışma protokolü gereği 4- 8 hafta yağlı yem ile beslenen ve kan şekeri yüksekliği belirlendikten sonra da 4 hafta daha beslenmeye devam eden sıçanların bu süreçte vücut ağırlığı değişimleri ve kan şekerleri kontrol edilmiştir.

Vücut ağırlığı ve kan şekeri ölçümleri deney başlangıcı, tedavi başlangıcı (5.hafta) ile deneyin bitişi olmak üzere üç ayrı zamanda ölçülerek kaydedilmiş olup bu veriler arasındaki farklılık ve istatistiksel anlamlılık Tablo 4.1 ve Tablo 4.2’de verilmiştir.

Genel olarak deney hayvanlarının vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında L-karnitin tedavisi alan diyabetik grup hariç tüm grupların deney sonu ağırlıkları başlangıç ağırlıklarına göre artmıştır. Gruplar arası kıyas yapıldığında deney sonunda tedavi almış tüm diyabetik grupların vücut ağırlıklarında 5.hafta yapılan ölçümlere göre azalma olup, bu azalma Melatonin ve L- karnitin tedavisi alan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bunun yanı sıra 4 haftalık yağlı yem diyetinin ve STZ enjeksiyonunun ardından 5. haftada yapılan ölçümler göz önüne alındığında tüm gruplarda başlangıç ağırlığına göre bir vücut ağırlığı artışı olduğu gözlemlenmiştir.

Tablo 4. 1 Deney Hayvanlarının Vücut Ağırlığı Değerleri

Vücut Ağırlığı (g)	Başlangıç	5. hafta	Bitiş (Tedavi Sonrası)
K (n=7)	214,44±6,09	240,56±9,41 ^a	281,11±15,65 ^{ab}
HFD+STZ (n=7)	228,00±5,17	251,00±13,51 ^a	250,00±15,15
HFD+STZ+MLT (n=7)	220,00±8,07	242,50±9,45 ^a	227,50±8,07 ^b
HFD+STZ+LC (n=7)	235,00±7,94	267,14±17,52	223,57±12,80 ^b
HFD+STZ+GB (n=7)	221,25±9,62	254,38±12,15 ^a	240,00±14,48

Kontrol (K), tedavisiz diyabet grubu (HFD+STZ), melatonin 10mg/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+STZ+MLT), L- karnitin 0.6 g/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+STZ +LC), ve glibenklamid 5mg/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+STZ+GB) olarak kısaltılmıştır. Grupların deney başlangıcındaki, 4 haftalık yağlı diyeti takiben streptozotosin (kontrol hariç) enjeksiyonundan bir hafta sonraki ve deney sonundaki ağırlıkları verilmiştir. Değerler ± SEM olarak verilmiş olup n= gruptaki hayvan sayısını, ^a p< 0,05 aynı grubun başlangıç değerine, ^b p< 0,05 aynı grubun 5. hafta değerine göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

Genel olarak deney hayvanlarının açlık kan şekerleri karşılaştırıldığında deney sonunda tedavi almamış diyabetik sıçanların açlık kan şekerlerinin kontrole göre anlamlı olarak yüksek olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte tedavi almış her üç grubun bitiş açlık kan şekeri, tedavi öncesi 5.hafta yapılan ölçümle kıyaslandığında anlamlı bir şekilde düşüş olduğu görülmüştür. Bunun yanı sıra 4 haftalık yağlı yem diyetinin ve STZ enjeksiyonunun ardından 5. haftada yapılan ölçümler göz önüne alındığında tüm diyabetik gruplarda başlangıçta ölçülen açlık kan şekeri değerlerine göre anlamlı bir artış olduğu gözlemlenmiştir.

Tablo 4. 2 Deney Hayvanlarının Açlık Kan Şekeri Değerleri

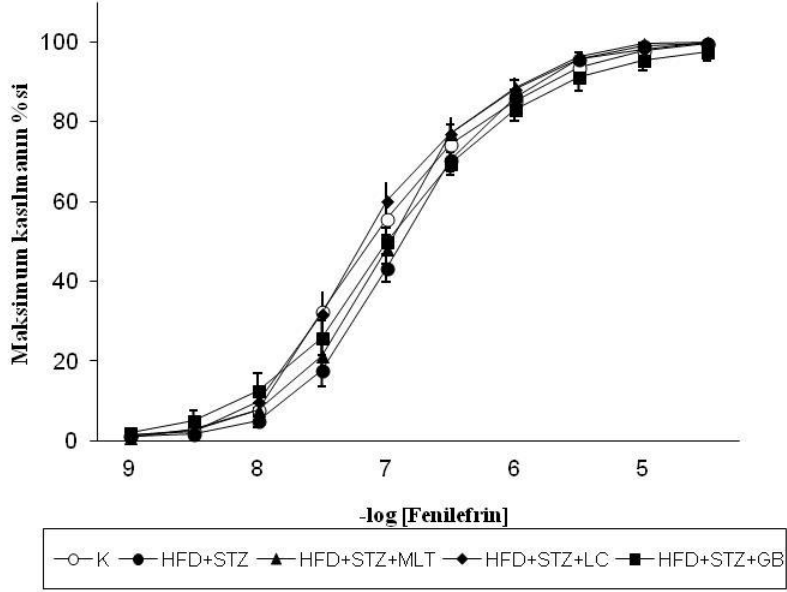
Açlık Kan Şekeri (mg/dl)	Başlangıç	5. Hafta	Bitiş (Tedavi Sonrası)
Kontrol (n=7)	107,89±3,50	103,22±3,24	105,44±3,40
HFD+STZ (n=7)	101,00±2,73	271,80±37,27 ^a	289,70±40,21 ^a
HFD+STZ+MLT (n=7)	106,25±4,05	318,00±52,53 ^a	259,63±54,59 ^{ab}
HFD+STZ+LC (n=7)	101,86±5,20	281,57±56,21 ^a	188,57±40,77 ^b
HFD+STZ+GB (n=7)	112,13±2,48	334,63±57,23 ^a	280,63±60,37 ^{ab}

Kontrol (K), tedavisiz diyabet grubu (HFD+STZ), melatonin 10mg/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+STZ+MLT), L- karnitin 0.6 g/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+STZ +LC), ve glibenklamid 5mg/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+STZ+GB) olarak kısaltılmıştır. Grupların deney başlangıcındaki, 4 haftalık yağlı diyeti takiben streptozotosin (kontrol hariç) enjeksiyonundan bir hafta sonraki ve deney sonundaki ağırlıkları verilmiştir. Değerler \pm SEM olarak verilmiş olup n= gruptaki hayvan sayısını, ^a p< 0,05 aynı grubun başlangıç değerine, ^b p< 0,05 aynı grubun 5. hafta değerine ise, ^d p< 0,05 tedavisiz diyabetik gruba göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

4.2 Damar Kasılma ve Gevşeme Yanıtlarına Ait Bulgular:

Deneye alınan hayvanlardan izole edilen torasik aorta şeritleri ile yapılan in vitro çalışmalarda damarların fenilefrinle kasılma yanıtları, fenilefrinle ön kasılmanın ardından asetilkolin ve sodyum nitroprusside verdikleri gevşeme yanıtları logaritmik doz-yanıt eğrileri çizilerek değerlendirilmiştir.

İzole edilen damar şeritlerinde fenilefrinle kasılma yanıtları logaritmik doz-yanıt eğrisinde gösterilmiş olup fenilefrinin herhangi bir dozunda gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. (Şekil 4.1)



Şekil 4. 1 Damar şeritlerinde fenilefrinle elde edilen kasılma yanıtları

Kontrol (K), tedavisiz diyabet grubu (HFD+STZ), melatonin 10mg/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+STZ+MLT), L- karnitin 0.6 g/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+STZ +LC), ve glibenklamid 5mg/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+STZ+GB) olarak kısaltılmıştır. Değerler \pm SEM olarak verilmiş olup her grupta n=7'dir.

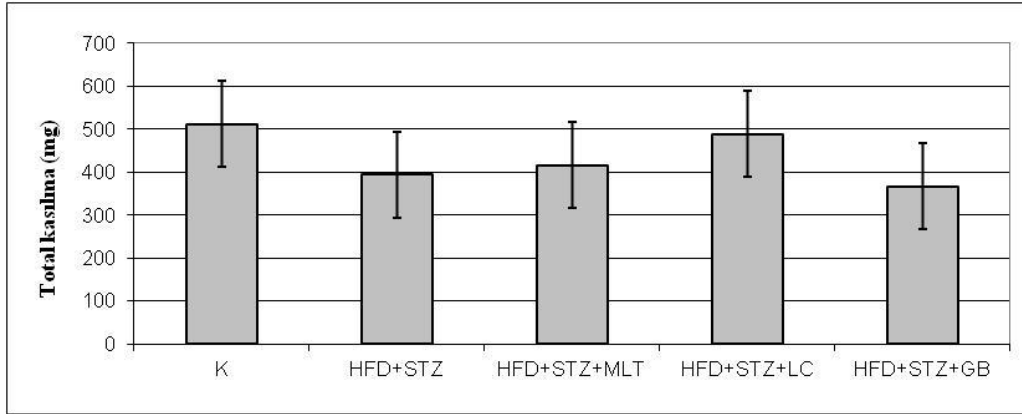
Yapılan damar çalışmalarından elde edilen verilerden hesaplanan, fenilefrine ait EC_{50} değerleri de Tablo 4.3'de verilmiştir. Diyabetik grupta fenilefrine verilen yanıt azalmıştır. Tedavi grupları bunu geri çevirmiştir.

Tablo 4. 3 Fenilefrinin EC_{50} Değerleri

GRUP	EC 50
Kontrol	0,70 \pm 0,12 x 10 ⁻⁷
HFD+STZ	1,59 \pm 0,20 x 10 ^{-7*}
HFD+STZ+MLT	1,11 \pm 0,14 x 10 ⁻⁷
HFD+STZ+LC	0,85 \pm 0,17 x 10 ⁻⁷
HFD+STZ+GB	1,09 \pm 0,18 x 10 ⁻⁷

Kontrol (K), tedavisiz diyabet grubu (HFD+STZ), melatonin 10mg/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+STZ+MLT), L- karnitin 0.6 g/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+STZ +LC), ve glibenklamid 5mg/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+STZ+GB) olarak kısaltılmıştır. Değerler \pm SEM olarak verilmiş olup her grupta n=7'dir. * p< 0,05 kontrole göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

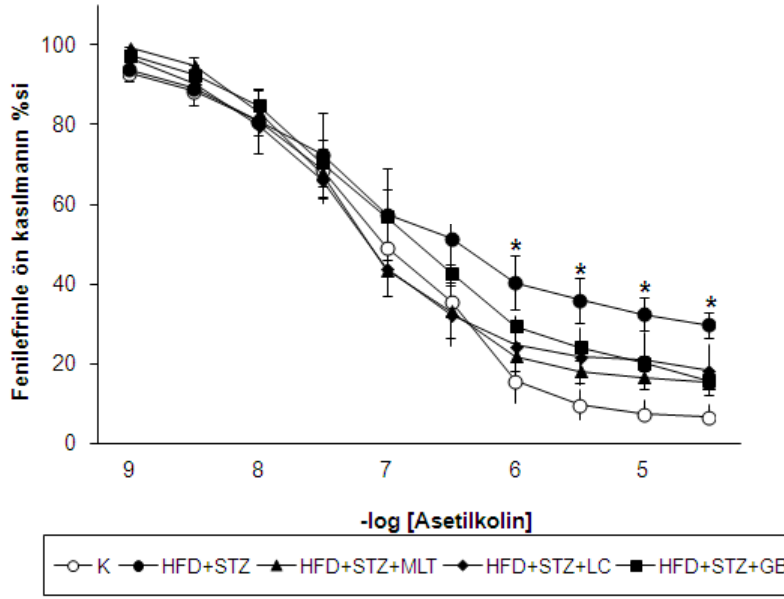
İzole edilen damar şeritlerinde fenilefrin ile total kasılma miktarları tüm gruplarda birbirine yakındır. L- karnitin tedavisi alan grup kontrol değerlerine yakın olsa da bu istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmemektedir.(Şekil 4.2)



Şekil 4. 2 Damar şeritlerinde fenilefrinle elde edilen total kasılma

Kontrol (K), tedavisiz diyabet grubu (HFD+STZ), melatonin 10mg/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+STZ+MLT), L- karnitin 0.6 g/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+STZ +LC), ve glibenklamid 5mg/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+STZ+GB) olarak kısaltılmıştır. Değerler \pm SEM olarak verilmiş olup her grupta n=7' dir.

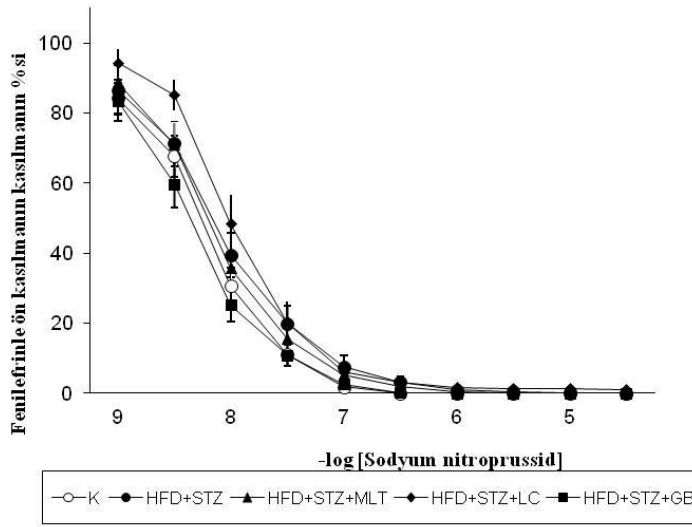
Fenilefrinin EC80 dozu ile ön kasılma sağlanmış damarlarda bakılan asetilkolinle elde edilen gevşeme yanıtları logaritmik doz-yanıt eğrisinde gösterilmiştir (Şekil 4.3). Gevşeme yanıtları genel olarak değerlendirildiğinde tedavi edilmemiş diyabetik grupta, kontrol grubuna göre, asetilkoline bağlı gevşemede bir azalma gözlenmiş olup bu istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur. Diğer bir deyişle tedavi almamış diyabetik gruptaki gevşeme yanıtındaki azalma, tedavi almış diyabetik gruplarda geri çevrilmiştir. Tedavi alan diyabetik grupların gevşeme yanıtları asetilkolinle sağlanan total gevşeme yanıtı açısından kontrolle bu gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır.



Şekil 4. 3 Damar şeritlerinde asetilkolinle elde edilen gevşeme yanıtları

Kontrol (K), tedavisiz diyabet grubu (HFD+STZ), melatonin 10mg/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+STZ+MLT), L- karnitin 0.6 g/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+STZ +LC), ve glibenklamid 5mg/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+STZ+GB) olarak kısaltılmıştır. Değerler \pm SEM olarak verilmiş olup her grupta n=7'dir. * p< 0,05 kontrole göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

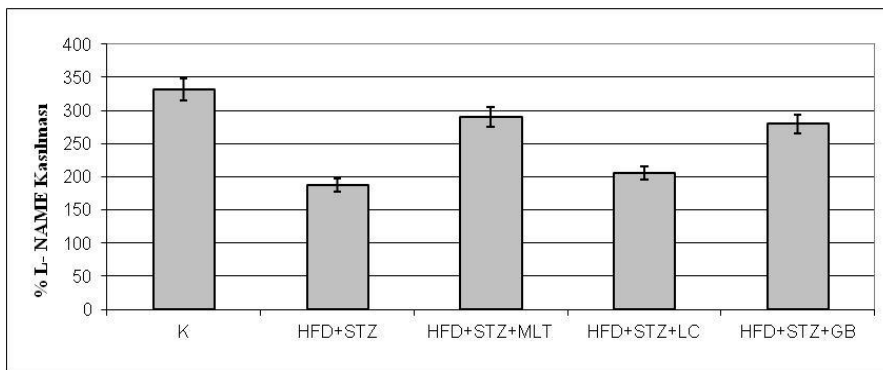
Fenilefrinin EC80 dozu ile ön kasılma sağlanmış damarlarda bakılan sodyum nitroprussidle elde edilen gevşeme yanıtları logaritmik doz-yanıt eğrisinde gösterilmiştir (Şekil 4.4). Gevşeme yanıtları karşılaştırıldığında tüm gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemektedir.



Şekil 4. 4 Damar şeritlerinde sodyum nitroprussid ile elde edilen gevşeme yanıtları

Kontrol (K), tedavisiz diyabet grubu (HFD+STZ), melatonin 10mg/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+STZ+MLT), L- karnitin 0.6 g/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+STZ +LC), ve glibenklamid 5mg/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+STZ+GB) olarak kısaltılmıştır. Değerler \pm SEM olarak verilmiş olup her grupta n=7'dir.

Fenilefrin EC50 dozuyla ön kasılma sağlanmış damar şeritlerinde, bazal nitrik oksid miktarını değerlendirmek maksadıyla yapılmış tek doz L-NAME uygulamasına kasılma yanıtları, ön kasılmanın %'si olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.5). Tedavi almış ve almamış diyabetik gruplarda L-NAME ile kasılma yanıtında anlamlı bir fark saptanmamıştır.



Şekil 4. 5 Damar şeritlerinde L-NAME ile elde edilen kasılma yanıtları

Kontrol (K), tedavisiz diyabet grubu (HFD+STZ), melatonin 10mg/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+STZ+MLT), L- karnitin 0.6 g/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+STZ +LC), ve glibenklamid 5mg/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+STZ+GB) olarak kısaltılmıştır. Değerler \pm SEM olarak verilmiş olup her grupta n=7'dir.

4.3. Deneş Hayvanlarının Lipid Profiline Ait Bulgular:

Deneş bitiminde hayvanlardan alınan kanlardan yapılan analizlerde kan lipid profili değerlendirilmiştir ve elde edilen veriler Tablo 4.4'te sunulmuştur.

Tablo 4. 4 Kan rneklerinden Elde Edilen Lipid Değerleri

Grup	Total Kolesterol (mg/dl)	Trigliserid (mg/dl)	HDL-kolesterol (mg/dl)	LDL-kolesterol (mg/dl)
Kontrol	27,71±2,62	36,43±3,45	9,00±,82	14,71±2,20
HFD+STZ	47,71±2,86 ^a	64,29±16,87	11,57±,95	20,14±2,43
HFD+STZ+MLT	37,71±5,23	58,29±13,11	10,88±2,22	15,00±3,19
HFD+STZ+LC	33,29±1,90 ^b	56,43±8,49	10,71±,48	10,57±1,76 ^b
HFD+STZ+GB	39,43±2,75	55,00±7,61	11,00±1,07	15,14±1,62

Kontrol (K), tedavisiz diyabet grubu (HFD+STZ), melatonin 10mg/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+STZ+MLT), L- karnitin 0.6 g/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+STZ +LC), ve glibenklamid 5mg/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+STZ+GB) olarak kısaltılmıştır. Değerler ± SEM olarak verilmiş olup her grupta n=7'dir. ^a p< 0,05 kontrole göre, ^b p< 0,05 tedavisiz diyabetik gruba göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

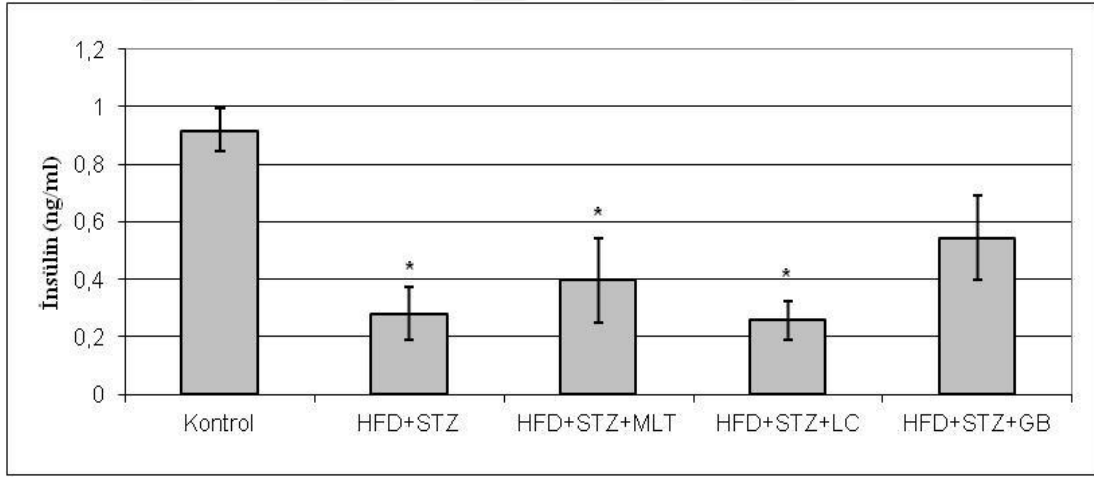
Buna göre tedavi almamış diyabetik grubun total kolesterol değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. L- karnitin tedavisi alan grup tedavisiz diyabetik gruba göre total kolesterol düzeylerini dşrmştir.

LDL-kolesterol değerleri L-karnitin tedavisi alan grupta tedavi almamış diyabetik gruba kıyasla anlamlı olarak azalmıştır. Genel olarak tedavi almamış diyabetik grubun trigliserit değerleri kontrole göre bir yükselme gösterse de tüm gruplarda trigliserit değerleri açısından anlamlı farklılık gözlenmemiştir. HDL-

kolesterol düzeyleri kontrolle kıyaslandığında, tedavi alan tüm diyabetik gruplarda artmış olsa dahi bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

4.4. Deneysel Hayvanların İnsülin ve NO Seviyelerine Ait Bulgular:

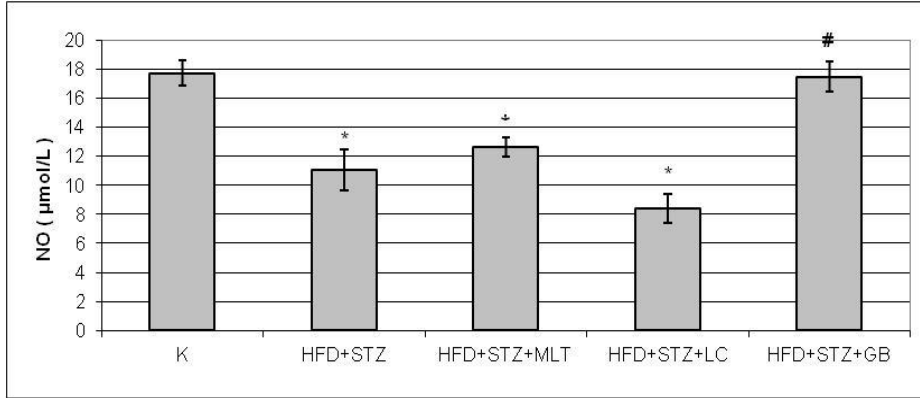
Deneysel alınan sıçanların serumlarında özel rat insülin kiti ile analiz edilen insülin değerleri şekil 4.6’da verilmiştir. Buna göre glibenklamid tedavisi almış grup hariç tedavi almış almayan diyabetik tüm grupların serum insülin değerleri kontrolle göre anlamlı olarak düşmüştür. Tedavi alan tüm diyabetik gruplar, serum insülin değerleri açısından kıyaslandığında glibenklamid tedavisi alan grupta insülin değerleri tedavisiz diyabetik gruba göre bir miktar yükselse dahi bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 4. 6 Serum insülin seviyeleri

Kontrol (K), tedavisiz diyabet grubu (HFD+STZ), melatonin 10mg/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+STZ+MLT), L- karnitin 0.6 g/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+STZ +LC), ve glibenklamid 5mg/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+STZ+GB) olarak kısaltılmıştır. Değerler \pm SEM olarak verilmiş olup her grupta n=7’dir. * p< 0,05 kontrolle göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

Deneysel alınan sıçanların serumlarında nitrit/nitrat kolorimetrik ölçüm kiti ile analiz edilen NO değerleri şekil 4.7’de verilmiştir. Buna göre tedavi almış almayan diyabetik grupların NO değerleri kontrolle karşılaştırıldığında, glibenklamid tedavisi alan grup hariç diğer diyabetik gruplarda anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Tedavi almış diyabetik gruplarda ise NO seviyeleri açısından tedavi almamış diyabetik grup ile kıyaslandığında yalnızca glibenklamid tedavisi alan gruptaki yüksek NO değerleri istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir.

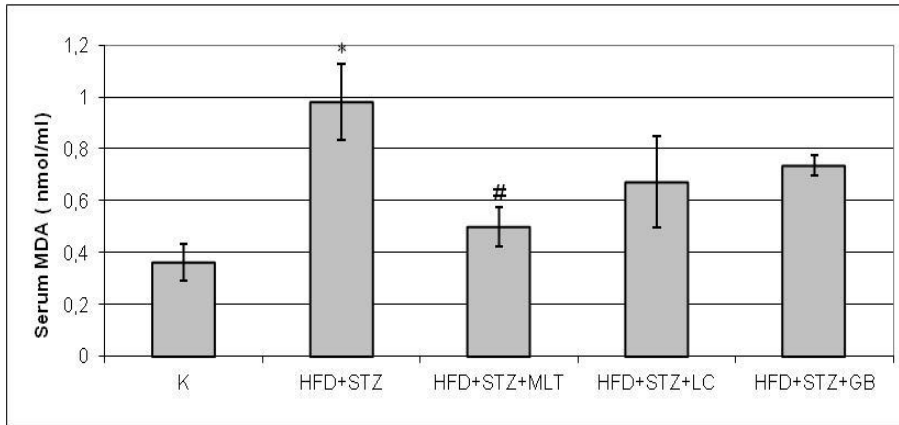


Şekil 4. 7 Serum NO seviyeleri

Kontrol (K), tedavisiz diyabet grubu (HFD+STZ), melatonin 10mg/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+STZ+MLT), L- karnitin 0.6 g/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+STZ +LC), ve glibenklamid 5mg/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+STZ+GB) olarak kısaltılmıştır. Değerler \pm SEM olarak verilmiş olup her grupta n=7'dir. * p< 0,05 kontrole göre , # p< 0,05 tedavisiz diyabetik gruba göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

4.5. Deney Hayvanlarının MDA Seviyelerine Ait Bulgular:

Deney hayvanlarının serumlarında bakılan MDA düzeyleri Şekil 4.8'de verilmiştir. Buna göre tedavi almamış diyabetik sıçanların serum MDA düzeyleri kontrole göre anlamlı olarak yüksektir. Tedavi almış diyabetik sıçanların serumlarında ölçülen MDA seviyeleri, tedavi almamış gruba göre düşük bulunmuş olsa dahi sadece melatonin tedavisi alan grupta gözlenen düşme anlamlı bulunmuştur.

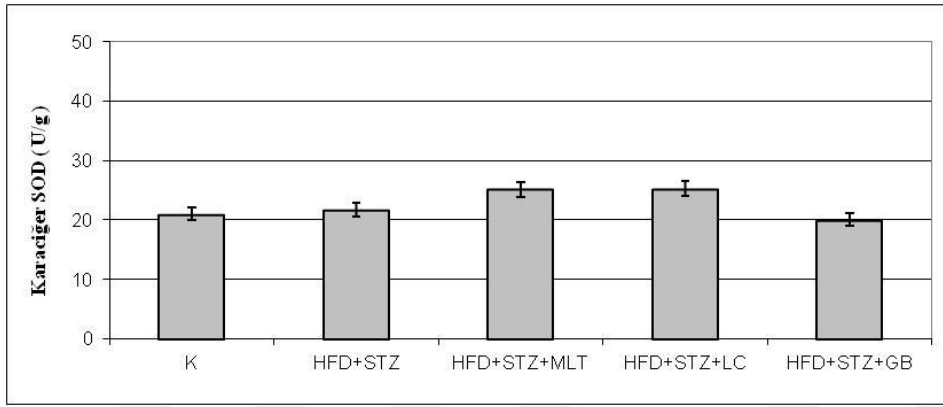


Şekil 4. 8 Serum MDA seviyeleri

Kontrol (K), tedavisiz diyabet grubu (HFD+STZ), melatonin 10mg/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+STZ+MLT), L- karnitin 0.6 g/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+STZ +LC), ve glibenklamid 5mg/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+STZ+GB) olarak kısaltılmıştır. Değerler \pm SEM olarak verilmiş olup her grupta n=7'dir. * p< 0,05 kontrole göre , # p< 0,05 tedavisiz diyabetik gruba göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

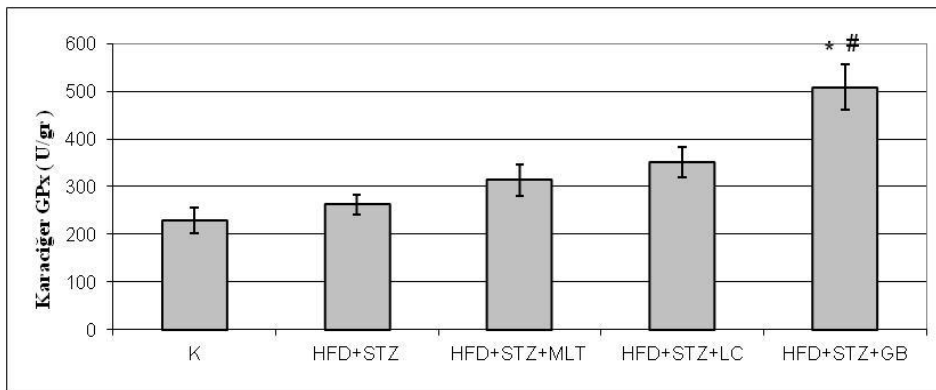
4.6. Deneysel Hayvanların Süperoksit Dismutaz ve Glutasyon Peroksidaz Seviyelerine Ait Bulgular:

Deneysel hayvanlarının karaciğer örneklerinde bakılan süperoksit dismutaz ve glutasyon peroksidaz düzeyleri Şekil 4.9, Şekil 4.10'de verilmiştir. Buna göre süperoksit dismutaz değerleri açısından gruplar arasında bir farklılık gözlenmemiştir. Karaciğer glutasyon peroksidaz seviyeleri karşılaştırıldığında ise tedavi almış almamış tüm diyabetik gruplarda kontrol grubuna göre artış gözlenmiş fakat sadece glibenklamid tedavisi almış grupta bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.



Şekil 4. 9 Karaciğer SOD seviyeleri

Kontrol (K), tedavisiz diyabet grubu (HFD+STZ), melatonin 10mg/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+STZ+MLT), L- karnitin 0.6 g/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+STZ +LC), ve glibenklamid 5mg/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+STZ+GB) olarak kısaltılmıştır. Değerler \pm SEM olarak verilmiş olup her grupta n=7'dir.



Şekil 4. 10 Karaciğer GPx seviyeleri

Kontrol (K), tedavisiz diyabet grubu (HFD+STZ), melatonin 10mg/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+STZ+MLT), L- karnitin 0.6 g/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+STZ +LC), ve glibenklamid 5mg/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+STZ+GB) olarak kısaltılmıştır. Değerler \pm SEM olarak verilmiş olup her grupta n=7'dir. * p< 0,05 kontrole göre , # p< 0,05 tedavisiz diyabetik gruba göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Bu araştırmada Tip 2 DM özelliklerine en yakın deneysel bir model oluşturmak ve bu modelde antioksidan özelliği olduğu bilinen bir madde olan melatonin ile bu konuda yeterince araştırılmamış bir madde olan L- karnitinin antioksidan özellikleri ve damar yanıtlarına etkilerini araştırmak amaçlanmıştır.

Tip 2 diyabet modelinde yüksek yağ içerikli diyet, insülin direnci oluşturmak amacıyla kullanılmıştır. Bu yöntem multipl düşük doz STZ uygulamasıyla kombine edilirse insülin direnci oluşturmak yanında insülin yetmezliği de gelişeceğinden uygun bir tip 2 diyabet hayvan modeli olacağı düşünölmektedir. Son yıllarda deneysel diyabet oluşturmak amacıyla HFD ile beslenen sıçanlarda yapılmış, STZ'nin değişik dozlarının denendiği bir çalışmanın sonuçları da multipl düşük doz STZ (30mg/kg IP haftalık, 2 hafta süreyle) uygulamasının HFD-besili sıçanlarda açık bir hiperglisemi oluşturduğunu ve başarı oranının yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Sonuç olarak HFD ile multipl düşük doz STZ 30mg/kg IP haftalık, 2 hafta süreyle) uygulaması, Tip 2 DM'in patofizyolojisini aydınlatmada daha uygun bir model olarak karşımıza çıkmaktadır.

Uyguladığımız modelde diyabetik gruba kontrol grubu arasında sıçanların ağırlıkları arasında anlamlı bir fark görölmemiştir. Gruplar arası farklılıklar açısından deney sonunda Melatonin ve L-karnitin tedavisi alan gruplarda 5.hafta ölçümleri ile kıyaslandığında vücut ağırlıklarında anlamlı bir azalma olmuştur. Yüksek doz STZ ile oluşturulan Tip I diyabet modellerinde sıçanların vücut ağırlıklarını önemli ölçüde kaybettikleri gözlemlenmiştir. Oysa Tip 2 diyabetli hastalarda kilo artışı da önemli bir sorun olmakla birlikte obezite ve Tip 2 diyabet birbirini tetikleyen iki unsurdur. HFD ve düşük doz STZ kombinasyonunun sıçanlar üzerindeki etkisinin incelendiği bir başka çalışmada tek ve düşük doz STZ uygulamasının diyabetik model oluşturacak düzeyde bir hiperglisemi yaratmamakla birlikte sıçanlarda kilo kaybına neden olmadığı gösterilmiştir. Ayrıca yağlı yemle beslenen sağlıklı sıçanların ve diyabetik sıçanların vücut ağırlıklarının arttığı da sonuçlar arasındadır (52).

Diyabetik kardiyovasköler hastalıkların patogenezinde vasköler disfonksiyon önemli bir role sahip olabilir. Vasköler disfonksiyonun altında yatan sebepler çok

faktörlüdür; hiç şüphesiz hiperglisemi en önemli rolü oynarken oksidatif stres ve dislipidemi de önemli faktörler olarak görünmektedir. Hiperglisemi; glikozun oksidasyonu ile ortaya çıkan serbest radikallerin oluşumunda artışa, oksidatif dejenerasyona ve protein glikozilasyonuna neden olur. Dislipidemi ise lipid peroksidasyonun artmasına ve böylece hücre ve dokularda hem yapısal hem de fonksiyonel bozulmalara neden olur. Diyabet hastalarında hücre savunma mekanizmaları (antioksidan enzimler ve enzimatik olmayan antioksidanlar) yetersiz kalmakta, hücreleri oksidatif hasardan korumak üzere kurulu olan oksidan stres / antioksidan savunma mekanizması dengesi bozulmaktadır. Tedavide hem lipid düşürücü ilaçların (kolestiramin, sitatinler, fibratlar gibi) ve hem de antioksidanların, bu ilaçlarla diyabetik ratlarda vasküler fonksiyonlarda düzelme sağlanması, diyabette vasküler disfonksiyon gelişmesinde oksidatif stresin ve dislipideminin rolü olduğuna işaret etmektedir.

L- karnitin diyabette antioksidan özellikleri araştırılan bir madde olup bazı araştırmalarda diyabet tedavisinde olumlu etkileri olduğunu gösterilmiştir (213). Yapılan çalışmalarda diyabetik insanlarda ve ratlarda plazma karnitin düzeylerinde önemli oranda bir düşüş gözlenmiş ve karnitin düzeylerinde gözlenen bu düşüş L- karnitin diyabetik komplikasyonlarda önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmüştür (10, 11).

Bu çalışmada gösterildiği üzere diyabetik ratlarda kan glukoz düzeyleri üzerine L-karnitin etkileri daha önceki çalışmalarla uyumludur (10,11). Çalışmamızda diyabetik ratlarda L-karnitin tedavisinin kan glukoz seviyeleri üzerine kısmi düşürücü etkisini gösterdik. Bu sonuçlar L-karnitin kan glukozu üzerindeki düşürücü etkisinin düzenlenme şekline ve tedavi süresine bağlı olduğunu göstermektedir. Diyabetik ratlarda kan glukoz seviyesine L-karnitin tedavisinin etkilerini gösteren başka bazı araştırmacıların elde ettikleri sonuçlar çelişkilidir. Bazı çalışmalarda L-karnitin tedavisi ile diyabetik ratlarda kan glukoz konsantrasyonları artmış ya da değişmemiş olarak bulunmuştur (245).

Melatonin güçlü antioksidan özelliği nedeniyle diyabetik komplikasyonlar açısından oldukça önemlidir. STZ ile indüklenen diyabette melatonin hiperglisemi ve

vücut ağırlığını normalleştiremediği gösteren çalışmalarla uyumlu olarak bizim çalışmamızda da melatonin kan glukoz seviyesini düşürmüş fakat normalleştirmemiştir (24).

Bu çalışma incelenen antioksidan parametreler açısından STZ ile diyabet oluşturulmuş ve HFD beslenen sıçanlarda tedavi almış diyabetik sıçanların serumlarında ölçülen MDA seviyeleri, tedavi almamış gruba göre düşük bulunmuş ancak sadece melatonin tedavisi alan grupta gözlenen düşme istatistiksel olarak anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

Literatürde diyabette SOD düzeylerinin arttığı, değişmediği veya azaldığı şeklinde birbiriyle çelişen çalışmalar vardır (4,141). Bizim çalışmamızda da oksidatif stres açısından önemli bir marker olan SOD düzeylerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Bir başka oksidatif stres belirteci olan glutasyon peroksidaz düzeyleri ise kontrole göre yüksek bulunmuş ancak en fazla glibenklamid tedavisinin GPx düzeylerini anlamlı derecede arttırdığı görülmüştür. Tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan bir ilaç olan glibenklamidin bu özelliği göstermesi beklenen bir sonuç olup L- karnitin ve melatonin tedavisi bu açıdan yeterince etkili bulunmamıştır.

Kan lipid düzeyleri açısından tedavi almamış diyabetik grubun total kolesterol değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. L- karnitin tedavisi alan grupta total kolesterol ve LDL-kolesterol düzeyleri anlamlı şekilde düşmüştür. İlginç olarak trigliserit düzeyleri tüm gruplarda anlamlı farklılık gözlenmemiştir. HDL-kolesterol düzeyleri ise tüm diyabetik gruplarda artmış olsa da bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Melatonin kan lipid düzeylerini önemli ölçüde etkilemediği görülmüştür ve bunu destekleyen başka araştırmalarla uyumludur (243). Öte yandan L- karnitin tedavisinin diyabette artan total kolesterol ve LDL kolesterol düzeyleri üzerinde olumlu etkileri olduğu bulgularımız arasındadır.

Yüksek doz STZ ile oluşturulmuş deneysel diyabet modelinde pankreasın büyük bir kısmının haraplanmasına bağlı insülin miktarlarında önemli düşüşler gözlenmekle beraber son yıllarda denenen bu yeni tip 2 diyabet modelinde insülin seviyelerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemektedir (236,237). HFD ve tek- düşük doz STZ'nin sıçanlar üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada ise yine düşük doz STZ

uygulamasının plazma insülin değerlerini değiştirmediği, tek başına HFD ile beslenmenin insülin seviyelerini arttırdiğı, kombine uygulamanın ise plazma insülin seviyelerini azalttığı gözlemlenmiştir (52).

Bu çalışmada ise elde edilen veriler insülin seviyelerinin tedavi almış almamış tüm diyabetik sıçanlarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir. İnsülin seviyelerindeki değişiklik, HFD ile beslenme ve multipl-düşük doz STZ ile gelişmiştirdiğimiz model oluşununun başarılı olduğunu göstermektedir. Ayrıca tedavi alan tüm diyabetik gruplar, serum insülin değerleri açısından kıyaslandığında glibenklamid tedavisi alan grupta insülin değerleri tedavisiz diyabetik gruba göre bir miktar yükselse dahi bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ayrıca STZ ile indüklenen Tip 1 diyabetik ratlarda melatonin tedavisi beta hücrelerinde kısmi rejenerasyon /proliferasyonunda ve düşük serum insülin konsatrasyonlarında bir miktar artışa sebep olduğu gösterilmiştir (246). Bizde alışmamızda melatonin tedavisi alan ratlarda, serum insülin seviyelerinin tedavisiz gruba göre bir miktar arttığını gözlemledik.

Tip 2 diyabet hayvan modelleri ve hastalarda, çeşitli damar yataklarında, asetilkolinle oluşan endotele bağlı gevşeme yanıtları bozulmuştur. Asetilkolin gevşetici etkisini NO, prostasiklin gibi endotelten kaynaklanan gevşetici faktörlerin ve endotelten kaynaklanan hiperpolarizasyon faktörünün (EDHF) salınımını sağlayarak gösterir. Büyük boy arterlerde NO, endotele bağlı gevşemede ana rolü üstlenmektedir. NO'in anormal üretimi ya da yanıtının diyabette görülen vasküler ve endotelial disfonksiyona katkıda bulunmaktadır. Streptozotosinle diyabet oluşturulmuş sıçanların torasik aortlarında benzer bir sonuç elde etmiştir (244).

Bu alışma daha önceki çalışmaların sonuçlarıyla uyumlu olarak, diyabetik ratların aortlarında ACh ile indüklenmiş endotelyum bağımlı gevşeme cevabının azaldığını fakat duyarlılıklarında herhangi bir değişme olmadığı görüldü. ACh ile indüklenmiş endotelyum bağımlı gevşeme muskarinik reseptör kontrolünde bir etkidir ve bozulmuş cevapta endotel hücrelerinde reseptör mekanizmalarından daha çok reseptör sonrası olayların daha etkili olduğunu göstermektedir. ACh ile indüklenmiş endotelyum bağımlı gevşeme cevabının azalmasının muhtemel mekanizması, diyabetik

aortada serbest radikal oluşum oranının oldukça artmasının NO'nin etkisini azaltması olabilir. Daha önceki çalışmalarda; serbest radikaller ile kısmen süperoksit ve hidroksil radikallerinin NO ile etkileşime girdikleri ve bunun sonucunda da peroksinitrit, NO₂ ve NO₃ gibi daha az potent vazodilatörlerin meydana geldiği bildirilmiştir. Bu ürünler endotelyum bağımlı gevşeme cevabındaki bozulmadan sorumlu olabilirler. Bunun yanı sıra, L-karnitin, melatonin ve glibenklamid tedavisi diyabetik aortalarda ACh'e karşı endotelyum bağımlı gevşeme cevabını kısmen normale döndürmüştür.

Yine diyabetik sıçan aortlarında L-NAME'e verilen kasılma yanıtları da anlamlı bir şekilde azalmıştır. Bu sonuçlar streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş ve yüksek yağ içerikli diyetle beslenen sıçanların aortlarındaki endotele bağlı gevşeme yanıtının bozulmasının, esas olarak NO aracılı olduğunu göstermektedir. Ayrıca bu çalışmada tedavi almış diyabetik gruplarda ise NO seviyeleri açısından tedavi almamış diyabetik grup ile kıyaslandığında yalnızca glibenklamid tedavisi alan gruptaki yüksek NO değerleri istatistiksel olarak anlamlılık göstermesi oldukça dikkat çekicidir.

Sodyum nitroprussit, guanilat siklaz aktivitesini artırmak suretiyle doğrudan vasküler düz kasa etki eder ve endotelyumdan bağımsız olarak bir gevşeme meydana getirir. Çalışmamızda da sodyum nitroprussit'e karşı görülen cevaplarda değişiklik olmadığı görülmüştür. Bu durum diyabetik aortada vasküler düz kasanın NO'e karşı cevabının değişmediğini ve diyabetin asıl zararlı etkisinin endotelyum hücresi üzerinde olduğunu göstermektedir.

Melatonin damarda asetilkolinle oluşan endotele bağlı gevşemedeki bozukluğu iyileştirmekte; ancak diyabetik sıçanlarda aortta SNP ile oluşan endotele bağlı olmayan gevşemede herhangi bir değişiklik yaratmamaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak bu arařtırmada, yüksek yağ içerikli diyetle beslenen ve dūřuk multipl doz streptozotosin uygulanarak Tip 2 diyabet modeli oluřturulan sıçanlarda, melatonin ve L- karnitin tedavisinin antioksidan parametreler ve endotelial disfonksiyon üzerindeki etkileri incelenmiřtir. Melatonin tedavisi, oksidatif stres ve diyabette artan MDA dūzeylerini dūřürmekte, azalmıř NO seviyelerini ise artırmaktadır. L- karnitin ise diyabetik ratlarda kan glukoz seviyelerini ve lipid parametrelerini kısmen dūřürmüřtür. Bu sonuçlar L- karnitin kan glukozu üzerindeki dūřürücü etkisinin dūzenlenme řekline ve tedavi sūresine baėlı olduėunu gōstermektedir. L-karnitin tedavisi hipergliseminin řiddetini kısmen azaltmıř olması ve hiperglisemideki bu dūzelme, diyabetik aortada endotelium baėımlı gevřemedeki kısmi dūzelme ile direkt iliřkili olarak gōr÷lmüřtür. Aortada ACh'e karřı verilen dūřmüř cevaptaki kısmi dūzelmenin ise en azından kısmen L- karnitin ve melatonin tarafından oluřturulmuř olabileceėini varsaymak mantıklı olacaktır.

Bu sonuçlar işığında melatonin ve L-karnitin Tip 2 diyabete bağlı komplikasyonların önlenmesi ve tedavisinde yararlı olabileceği dūř÷n÷lmektedir.

7. KAYNAKLAR

- 1) Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care* 1993; 16: 434 – 444.
- 2) Yoshida T, Kawano H, Miyamoto S, et al. Prognostic value of flow-mediated dilation of the brachial artery in patients with cardiovascular disease. *Intern Med.* 2006; 45(9): 575-9.
- 3) Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL: Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy. *Endocrine Reviews.* 2004; 25: 612-628.
- 4) Memisogullari R, Taysi S, Bakan E, Capoglu I: Antioxidant Status and Lipid Peroxidation in Type II Diabetes Mellitus. *Cell Biochem Func.* 2003; 21: 291-296.
- 5) Sacks DB: Diabetes Mellitus. In: Burtis CA, Ashwood ER, (Eds). *Tietz Textbook of clinical chemistry.* Philadelphia: WB Saunders Co: 766776, 1999.
- 6) Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci C: Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radical Biology & Medicine.* 2005; 39: 841 – 852.
- 7) Memişoğulları R, Bakan E: Levels of ceruloplasmin, transferrin, and lipid peroxidation in the serum of patients with Type 2 diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and Its Complications.* 2004; 18: 193- 197.
- 8) Tein I, Bukovac SW, Xie ZW. Characterization of human plasmalemmal carnitine transporter in cultured skin fibroblasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 1996; 329: 145±155
- 9) Lopaschuck, G. Regulation of carbohydrate metabolism in ischemia and reperfusion. *Am Heart J.* 2000; 139: s115±s119
- 10) Paulson D.J., Schmidt M.J., Traxler J.S., Ramacci M.T., Shug A.L. Improvement of myocardial function in diabetic rats after treatment with L-carnitine. *Metabolism.* 1984; 33: 358±363
- 11) Rodrigues B., Xiang H., McNeill J. H. Effect of L-carnitine treatment on lipid metabolism and cardiac performance in chronically diabetic rats. *Diabetes.* 1988; 37: 1358±1364
- 12) Lowitt S., Malone J.I., Salem A.F., Kozak W.M., Orfalian Z. Acetyl-L-carnitine corrects electroretinographic deficits in experimental diabetes. *Diabetes.* 1993; 42: 1115±1118
- 13) Cotter M.A., Cameron N.E., Keegan A., Dines K.C. Effects of acetyl- and propionyl-L- carnitine on peripheral nerve function and vascular supply in experimental diabetes. *Metabolism.* 1995; 44: 1209.
- 14) Cruz A, Padillo FJ, Tuñez I et al. Melatonin protects against renal oxidative stress after obstructive jaundice in rats. *Eur J Pharmacol* 2001; 425:135–139.
- 15) Reiter R, Tang L, Garcia JJ et al. Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sci.* 1997; 60: 2255–2271.
- 16) Padillo FJ, Cruz A, Navarrete C et al. Melatonin prevents oxidative stress and hepatocyte cell death induced by experimental cholestasis. *Free Radic Res* 2004; 38: 697–704.

- 17) Reiter R.J., Melchiorri D., Seweryneck E., et al. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J. Pineal Res.* 1995; 18: pp. 1–11.
- 18) Reiter R.J., Tan D.X. and Qi W.B. Suppression of oxygen toxicity by melatonin. *Chung Kuo Li Hsueh Pao.* 1998; 19: pp. 575–581.
- 19) Noda Y., Mori A., Liburdy R. and Packer L. Melatonin and its precursors scavenge nitric oxide. *J. Pineal Res.* 1999; 27: pp. 159–163.
- 20) Kaya H., Oral B., Ozguner F., Tahan V., Babar Y. and Delibas N. The effect of melatonin application on lipid peroxidation during cyclophosphamide therapy in female rats. *Zentralbl. Gynakol.* 1999; 121: pp. 499–502.
- 21) Peschke E., Faúteck J.D., Mushoff U., Schmidt F., Beckmann A. and Peschke D. Evidence for a melatonin receptor within pancreatic islets in neonate rats: functional, autoradiographic, and molecular investigations. *J. Pineal Res.* 2000; 28: pp. 156–164.
- 22) Abdel-Wahab M.H. and Abdel-Allah A.R. Possible protective effect of melatonin and/or desferroxamine against streptozotocin-induced hyperglycemia in mice. *Pharmacol. Res.* 2000; 41: pp. 533–537.
- 23) Donder E, Bayadas G, Sokmen S, et al. Investigation of antioxidant and glucometabolic effects of melatonin in experimental diabetes mellitus. *Biomed Res.* 1999;10: 127–32.
- 24) Vural H, Sabuncu T, Arslan SO, Aksoy N. Melatonin inhibits lipid peroxidation and stimulates the antioxidant status of diabetic rats. *J Pineal Res.* 2001; 31:193–8.
- 25) Aksoy N, Vural H, Sabuncu T, Aksoy S. Effect of melatonin on oxidative – antioxidant status of tissues in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell Biochem Funct.* 2003; 21:121–5.
- 26) Baynes YW, Thorpe R. Role of oxidative stress in diabetic complications. *Diabetes.* 1999; 48:1–9.
- 27) Wolf SP, Dean RT. Glucose auto-oxidation and protein modification. The potential role of “autoxidative glycosilation” in diabetes. *Biochem J.* 1987; 245:243–50.
- 28) Malaisse WJ. Alloxan toxicity to pancreatic B-cells. *Biochem Pharmacol.* 1982; 22: 3527–34.
- 29) Guyton AC.(Ed) *Textbook of Medical Physiology.* 7th Philadelphia: W B Saunders Company; 1986.
- 30) Hatemi H. Diabetes Mellitus Tarihcesi. *Aktuel Tıp Dergisi.* 1996 Kasım;7: 497-499.
- 31) Bağrıacık N. Dabetes Mellitus tanımı, tarihcesi, sınıflaması ve sıklığı: İ.U. Cerrahpaşa Tıp Fakultesi Surekli Tıp Eğitim Sempozyumu. 18-19 Aralık 1997, İstanbul; p: 9-18.
- 32) King H, Aubert RE, Herman WH. Global Burden of Diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates and projections. *Diabetes Care.* 1998; 21: 1414-1431.
- 33) King H, Rewers M. Global Estimates for Prevalence of Diabetes Mellitus and Impaired Glucose Tolerance in Adults: the WHO Adhoc Diabetes Reporting Group. *Diabetes Care* 1993; 16: 157-177.

- 34) Wild S., Roglic G., Green A., Sicree R., King H., Global Prevalence of Diabetes, Estimates for the year 2000 and projection for 2030. *Diabetes Care* 2004; 27: 1047-1053.
- 35) International Diabetes Federation. Diabetes Atlas, 4th Edition, Brussels, 2009.
- 36) Satman I, Yılmaz T, Bostar I et al. Diabetes Epidemiology Study in Turkey : First Step Data results. *Diabetes* 1998; 47: A384,1480.
- 37) Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Pankreas. In: Mitchell J.(Ed). *Temel Patoloji*. 5'th İstanbul: W B Saunders Company-Nobel Tıp Kitabevleri Ltd şti & Yuce Yayınları A Ş; 1994. p. 569-587.
- 38) Başkal N. Diyabetes Mellitusun Sınıflandırılması. Edit: Erdoğan G. Koloğlu *Endokrinoloji Temel ve Klinik*. 2.baskı MN Medikal&Nobel 2005: 342-349.
- 39) Braunwald E, Fauci A.S, Kasper D.L, Hauser S.L, Longo D.L, Jameson J.L, Harrison (Eds) *İç Hastalıkları Prensipleri* 15.Baskı Nobel Tıp Kitabevleri 2004: 1382- 1386, 2109-2143.
- 40) Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2004; 27: 5-10.
- 41) Pari L, Umamaheswari J. Antihyperglycaemic activity of *Musa sapientum* flowers: effect on lipid peroxidation in alloxan diabetic rats. *Phytother Res* 2000;14: 136-8.
- 42) Ahmad M, Akhtar MS, Malik T, et al. Hypoglycaemic action of the flavonoid fraction of *Cuminum nigrum* seeds. *Phytother Res*. 2000; 14:103-6.
- 43) Eqwim E. Hypoglycemic potencies of crude ethanolic extracts of cashew roots and unripe pawpaw fruits in guinea pigs and rats. *J Herb Pharmacother* 2005; 5:27-34.
- 44) Ciechanowski K, Kedzierska K, Golembiewska E, et al. The influence of oxidative stress on permeability of capillary vessels in the cheek pouch of hamsters with alloxan-induced diabetes. *Vasa* 2004; 33:211-4.
- 45) Rood PP, Bottino R, Balamurugan AN, Smetanka C, et al. Induction of diabetes in cynomolgus monkeys with high-dose streptozotocin: adverse effects and early responses. *Pancreas* 2006; 33: 287-92.
- 46) Koopmans SJ, Mroz Z, Dekker R, et al., Association of insulin resistance with hyperglycemia in streptozotocin-diabetic pigs: effects of metformin at isoenergetic feeding in a type 2-like diabetic pig model. *Metabolism* 2006; 55: 960-71.
- 47) 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: 718-23.
- 48) Pickup JC, Williams G. Textbook of Diabetes. Blackwell Science, Inc; 2002; 2nd ed. Volume 1.
- 49) Ramarao P, Kaul CL. Insulin resistance: Current therapeutic approaches. *Drugs Today* 1999; 35: 895–911.
- 50) McIntosh CHS, Pederson RA. Non insulin dependent animal models of diabetes mellitus. In: McNeil JH.(Ed) *Experimental models of diabetes*. Florida: CRC Press LLC; 1999. p. 337–98.

- 51) M. J. Reed, K. Meszaros, L. J. Entes, et al., "A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat," *Metabolism*. 2000, vol. 49, no. 11, pp. 1390–1394.
- 52) K. Srinivasan, B. Viswanad, L. Asrat, et al, "Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening," *Pharmacological Research*, 2005, vol. 52, no. 4, pp. 313–320.
- 53) F. Franconi, G. Seghieri, S. Canu, et al, "Are the available experimental models of type 2 diabetes appropriate for a gender perspective?" *Pharmacological Research*, 2008, vol. 57, no. 1, pp. 6–18.
- 54) K. Sahin, M. Onderci, M. Tuzcu, 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, vol. 56, no. 9, pp. 1233–1240.
- 55) S. Zhao, Y. Chu, C. Zhang, et al., "Diet-induced central obesity and insulin resistance in rabbits," *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 2008, vol. 92, no. 1, pp. 105–111.
- 56) S. Tanaka, T. Hayashi, T. Toyoda, et al., "High-fat diet impairs the effects of a single bout of endurance exercise on glucose transport and insulin sensitivity in rat skeletal muscle," *Metabolism*. 2007, vol. 56, no. 12, pp. 1719–1728.
- 57) Flanagan A.M., Brown J.L., Santiago C.A., et al, "High-fat diets promote insulin resistance through cytokine gene expression in growing female rats," *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2008, vol. 19, no. 8, pp. 505–513.
- 58) Y. Kannan, M. Tokunaga, M. Moriyama, et al, "Beneficial effects of troglitazone on neutrophil dysfunction in multiple low-dose streptozotocin-induced diabetic mice," *Clinical and Experimental Immunology*. 2004, vol. 137, no. 2, pp. 263–271.
- 59) C. F. Howarth, A. Qureshi, A. Shahin et al, "Effects of single high-dose and multiple low-dose streptozotocin on contraction and intracellular Ca^{2+} in ventricular myocytes from diabetes resistant and susceptible rats," *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2005, vol. 269, no. 1, pp. 103–108.
- 60) N. T. E. Friesen, A. S. Bouchau, P. Schott-Ohly, et al, "Generation of hydrogen peroxide and failure of antioxidative responses in pancreatic islets of male C57BL/6 mice are associated with diabetes induced by multiple low doses of streptozotocin," *Diabetologia*. 2004, vol. 47, no. 4, pp. 676–685.
- 61) R. Sotnikova, S. Skalska, L. Okruhlicova, et al., "Changes in the function and ultrastructure of vessels in the rat model of multiple low dose streptozotocin-induced diabetes," *General Physiology and Biophysics*. 2006, vol. 25, no. 3, pp. 289–302.
- 62) E. Kim, S. Sohn, M. Lee, et al, "Differential responses of the growth hormone axis in two rat models of streptozotocin-induced insulinopenic diabetes," *Journal of Endocrinology*. 2006, vol. 188, no. 2, pp. 263–270.
- 63) J. R. Wright Jr. and P. E. Lacy, "Synergistic effects of adjuvants, endotoxin, and fasting on induction of diabetes with multiple low doses of streptozocin in rats," *Diabetes*. 1988, vol. 37, no. 1, pp. 112–118.
- 64) Schalkwijk CG, Stehouwer CD. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clin Sci (Lond)* 2005;109:143-59.

- 65) Duby JJ, Campbell RK, Seter SM, White JR and Rasmussen KA. Diabetic neuropathy: an intensive review. *Am. J. Health Syst. Pharm.* 2004; 61: 160–173.
- 66) Goldberg RB. Cardiovascular disease in patients who have diabetes. *Cardiol. Clin.* 2003; 21: 399–413, vii.
- 67) Kikkawa R, Koya D and Haneda M. Progression of diabetic nephropathy. *Am. J. Kidney Dis.* 2003; 41: S19–S21.
- 68) Porta M and Bandello F. Diabetic retinopathy: a clinical update. *Diabetologia* 2002; 45: 1617–1634.
- 69) Summary of Revisions for the 2009 Clinical Practice Recommendations. *Diabetes Care* 2009; 32 Suppl 1: S3-5. Erratum in: *Diabetes Care* 2009; 32: 754.
- 70) Kannel WB, McGee DL. Diabetes and Cardiovascular Disease. *The Framingham Study.* JAMA 1979; 241: 2035–8.
- 71) Önder R., Barutcuoglu B. *Endotel. İyi İsler Matbaası Ocak* 2005.
- 72) Fishmann Ap. Endothelium. A distributed organ of diverse capabilities. *Ann NY Acad Sci* 1982; 401:1-8
- 73) Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980; 288:273-276.
- 74) Furchgott RF, The Discovery of Endotheliumderived relaxing factor and its importance in the identification of nitric oxide. *J Am Med Assn.* 1996; 276:1186-1188.
- 75) Dzau VJ. Tissue Angiotensin and Pathobiology of Vascular Disease. A Unifying Hypothesis. *Hypertension.* 2001; 37:1047-1052.
- 76) Inoue A, Yanagisawa M., Kimura S, et al. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86: 2863-2867.
- 77) Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 Feb 1; 23(2):168-75.
- 78) Endemenn DH, Schiffrin EL. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol.* 2004 Aug;15(8):1983-92
- 79) Venema RC, Sayegh HS, Arnal JF, Harrison DG. Role of the enzyme calmodulinebinding domain in membrane association and phospholipid inhibition of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1995; 270:14705-711
- 80) Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, et al. Role of the enzyme calmodulinebinding domain in membrane association and phospholipid inhibition of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1995; 270:14705-711.
- 81) Bolotina BM, Najibi S, Palacino JJ et al. Nitric oxide directly activates calciumdependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 1994; 368:850-3
- 82) Gauthier TW, Scalia R, Murohara T, et al. Nitric oxide protects against leukocyte-endothelium interactions in the early stages of hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:1652–1659

- 83) Cornwell TL, Arnold E, Boerth NJ, et al. Inhibition of smooth muscle cell growth by nitric oxide and activation of camp-dependent protein kinase by cGMP. *Am J Physiol.* 1994;267:C1405–C1413.
- 84) Graaf JC, Banga JD, Moncada S, et al. Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions. *Circulation.* 1992; 85: 2284– 2290.
- 85) Lerman A, Webster MWI, Chesebro JH et al. Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in hypercholesterolemic pigs. *Circulation.* 1993; 88: 2923-8.
- 86) Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation.* 2002;105:1135–1143.
- 87) Cominacini L, Rigoni A, Fratta Pasini A, et al. The binding of oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) to ox-LDL receptor-1 in endothelial cells reduces the intracellular concentration of nitric oxide through an increased production of superoxide. *J Biol Chem.* 2001; 276:13750–13755.
- 88) Anderson TJ, Meredith IT, Charbonneau F et al. Endothelium dependent coronary vasomotion relates to the susceptibility of LDL to oxidation in humans. *Circulation* 1996; 93: 1647-50.
- 89) Griendling KK, Ushio-Fukai M, Lassegue B, et al. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle cells: new concepts. *Hypertension.* 1997; 29:366– 373.
- 90) Kranzhofer R, Schmidt J, Pfeiffer CA, et al. Angiotensin induces inflammatory activation of human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19:1623–1629.
- 91) Tummala PE, Chen XL, Sundell CL, et al. Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Circulation.* 1999;100:1223–1229.
- 92) Verma S, Wang CH, Li SH, et al. A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation.* 2002;106:913–919.
- 93) Hartge M, Pharm B, Kintscher U, Unger T. Endothelial dysfunction and its role in diabetic vascular disease. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2006; 35:551-560.
- 94) Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature (London).* 2001; 414: 813–820.
- 95) Hammes H.P., Du X., Edelstein D. et al. Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nat. Med.* 2003; 9: 294–299.
- 96) Singh, R., Barden, A., Mori, T. and Beilin, L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia.* 2001; 44: 129–146
- 97) Ginsberg, H. N. Insulin resistance and cardiovascular disease. *J. Clin. Invest.* 2000; 106: 453–458.
- 98) Baumgartner-Parzer S.M., Wagner L., Pettermann M., Grillari J., Gessl A. And Waldhausl W. High-glucose-triggered apoptosis in cultured endothelial cells. *Diabetes.* 1995; 44: 1323–1327.
- 99) Cagliero E., Maiello M., Boeri D., Roy S. and Lorenzi M. Increased expression of basement membrane components in human endothelial cells cultured in high glucose. *J. Clin. Invest.* 1988; 82: 735–738.
- 100) Boeri D., Almus F.E., Maiello M., Cagliero E., Rao L.V. and Lorenzi M. Modification of tissue-factor mRNA and protein response to thrombin and

- interleukin 1 by high glucose in cultured human endothelial cells. *Diabetes*. 1989; 38: 212–218.
- 101) McGinn S., Saad S., Poronnik P. and Pollock C.A. High glucose-mediated effects on endothelial cell proliferation occur via p38 MAP kinase. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2003; 285: E708 E717.
 - 102) Graier W.F., Grubenthal I., Dittrich P., Wascher T.C. and Kostner, G.M. Intracellular mechanism of high D-glucose-induced modulation of vascular cell proliferation. *Eur. J. Pharmacol.* 1995; 294, 221–229.
 - 103) Maiello M., Boeri D., Podesta F. et al. Increased expression of tissue plasminogen activator and its inhibitor and reduced fibrinolytic potential of human endothelial cells cultured in elevated glucose. *Diabetes* 1992; 41: 1009–1015.
 - 104) Title LM, Cummings PM, Giddens K. et al. Oral glucose loading acutely attenuates endothelium-dependent vasodilatation in healthy adults without diabetes: an effect prevented by vitamins C and E. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 2185-2191.
 - 105) Shige H, Ishkiwa T, Suzukawa M, et al. Endothelium-dependent flow-mediated vasodilatation in the postprandial state in Type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 1999; 84: 1272-1274.
 - 106) Tesfamariam B, Brown ML, Cohen RA. Elevated glucose impairs endotheliumdependent relaxation by activating protein kinase C. *J Clin Invest* 1991; 87: 1643-1648.
 - 107) Bucala R, Tracey KJ, Cerami A. Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. *J Clin Invest* 1981; 87: 432-438.
 - 108) Lim SC, Caballero AE, Smakowski P, et al. Soluble intercellular adhesion molecule, vascular cell adhesion molecule, and impaired microvascular reactivity are early markers of vasculopathy in type 2 diabetic individuals without microalbuminuria. *Diabetes Care* 1999; 22: 1865-1870.
 - 109) Albertini JP, Valensi P, Lormeau B, et al. Elevated concentrations of soluble Eselectin and vascular cell adhesion molecule-1 in NIDDM. *Diabetes Care* 1998; 21: 1008-1013.
 - 110) Tesfamariam B. Free radicals in diabetic endothelial cell dysfunction. *Free Radic Biol Med* 1994; 16: 383-391.
 - 111) Tesfamariam B., Cohen RA. Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. *Am J Physiology.* 1992; 263:321-326.
 - 112) Diplock A. Healty lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. ILSI Europe concise monograph series, 59 p., Belgium. 1998.
 - 113) Nawar W.W. Lipids. In: Fennema O.R.(Ed) “*Food Chemistry*”. Marcel Dekker, New York. 1996, pp: 225-319.
 - 114) Akkuş İ.(Ed) *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri*, 1.Baskı, Mimoza Yayınları, Konya, 1995.
 - 115) Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE Free Radicals, antioxidants and human disease: Where are we now? *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine.* 1992; 119(6): 598-620.

- 116) Bulkley G.B. The role of oxygen free radicals in human disease processes. *Surgery*. 1983; 94(3): 407-411.
- 117) Defraigne J.O., Pincemail J., Franssen C., et al. In vivo free radical production after cross-clamping and reperfusion of the renal artery in the rabbit. *Cardiovasc. Surg*. 1993; 1: 343-349.
- 118) Delibaş N. ve Özcanakaya R. Serbest radikaller. *SDÜ Tıp Fak. Derg*. 1995; 2(3): 11-17.
- 119) Kehrer J.P. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical Reviews in Toxicology*. 1993; 23(1): 21-48.
- 120) Köse K. ve Doğan P. Lipid peroksidasyonu. *Erciyes Tıp Derg*. 1992; Ek-1: 340.
- 121) Wolf S.P., Garner A. and Dean R.T. 1986. Free radicals, lipids and protein degradation. *TIBS*, 11: 27
- 122) Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 2001; 54:176-186.
- 123) Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. 2002; 282(2):227-241.
- 124) Mertoğlu A. Oksitan ve antioksidan etkileşimleri. *İzmir Göğüs Hastenesi Dergisi* 1993 Ocak; Cilt VII. Sayı:1.
- 125) Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science* 1978; 201-4359,875-880.
- 126) Jandro DR, Burghard B. Cardiac membrane vitamin E and malondialdehyde levels in heart muscle of normotensive 1989; 24: 233-38.
- 127) Kalender S, Kalender Y, Ögütçü A, Uzunhisarcıklı M, Durak D, Açıkgöz F. Endosulfan-induced cardiotoxicity and free radical metabolism in rats the protective effect of vitamin E. *Toxicology* 2002; 202: 227-235.
- 128) Steinberg D, Parhasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989; 320:915-24.
- 129) Stevens, Karen M.J. Douglas, Athanasios N. Saratzis and George D. Kitas Inflammation and atherosclerosis in rheumatoid arthritis *Robert J. Expert Rev. Mol. Med*. Vol. 7, Issue 7.
- 130) Niki E. Antioxidant in relation to lipid peroxidation. *Chem. Phy. Lipids* 1987; 44: 227-253.
- 131) Placer CA, Cushman LL, Johnson BC. Estimation of product of lipid peroxidation (Malondy Dialdehyde) in biochemical systems. *Anal. Biochem*. 1990; 16: 259-264.
- 132) Porter NA. Chemistry of lipidperoxidation. *Methods Enzymol* 1984; 105: 273-283.
- 133) Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N: Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005; 338: 668-676.
- 134) Şekeroğlu MR, Şahin H, Dülger H, Algün E. The effect of dietary treatment on erythrocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and serum lipid peroxidation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Biochem* 2000; 33:669-674.

- 135) Masella R, Benedetto RD, Varı R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2005; 16: 577-586.
- 136) Sözmen EY: Yaşlanma Biyokimyası. In: Onat T, Emerk K, Sözmen EY (Eds) *İnsan Biyokimyası*. Ankara, Palme Yayıncılık 2002; pp: 665-674.
- 137) Pratic'o D: Antioxidants and endothelium protection. *Atherosclerosis*. 2005; 181: 215-224.
- 138) Alper G. Diyabet. In: Onat T, Emerk K, Sözmen EY, (Eds). *İnsan Biyokimyası*. Ankara, Palme Yayıncılık. 2002; pp: 248-257.
- 139) Ostenson C.G: The pathophysiology of type 2 diabetes mellitus: an overview. *Acta Physiologica Scandinavica*. 2001; 171: 241- 247.
- 140) Akçay F, Aksoy H, Memişoğulları R: Effect of breast-feeding on concentration of nitric oxide in breast milk. *Ann Clin Biochem*. 2002; 39: 68-69.
- 141) Abou-Seif MA, Youssef A. Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients. *Clinica Chimica Acta* 2004; 346:161-170.
- 142) Daimon M, Hama K, Susa S, et al. Hyperglycemia is a factor for an increase in serum ceruloplasmin in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 1998; 21: 1525-1528.
- 143) Lavelli V., Peri C. and Rizzola A. Antioxidant activity of tomato products as studied by model reactions using Xanthine oxidase, Myeloperoxidase, and copper-induced lipid peroxidation. *J. Agric. Food Chem*. 2000; 48(5): 1442-1448.
- 144) Burton G.W., Foster D.O., Perly B., Slater T.E., Smith I.C. and Ingold K.U. Biological antioxidants. *Philos Trans R. Soc. Lond. B. Biol. Sci*. 1985; 17: 565-578.
- 145) Durak K., Bilgen Ö.F., Kaleli T., Tuncel P., Özbek R. and Turan K. Antioxidant effect of alfa-tocopherol on fracture haematoma in rabbit. *J. Int. Med. Res*. 1996; 24: 419-424.
- 146) Liebler D.C. The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E. *Crit. Rev. Toxicol*. 1993; 23: 147-169.
- 147) Takenaka Y., Miki M., Yasuda H. and Mino M. The effect of alpha-tocopherol as an antioxidant on the oxidation of membrane protein thiols induced by free radicals generated in different sites. *Arch. Biochem. Biophys*. 1991; 285: 344-350.
- 148) Traber M.G. and Packer L. Vitamin E. Beyond antioxidant function. *Am. J. Clin. Nutr*. 1995; 62: 1501-1509.
- 149) Serafini M., Del Rio D. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool?. *Redox Report* 2004; 9(3): 145- 152.
- 150) Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991; 40(4): 405-412.
- 151) Baynes JW, Thorpe SR Role of oxidative stress in diabetic complications: A new perspective on an old paradigm. *Diabetes*. 1999; 48(1): 1-9.

- 152) Altan N., Ongun C.Ö., Hasanoğlu E., Engin A., Tuncer C., Sindel P. Effects of the Sulfonylurea Glyburide on Superoxide Dismutase Activity In Alloxan-Induced Diabetic Rat Hepatocytes. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 1994; 22(2-3): 95-98.
- 153) Altan N., Ongun C.Ö., Elmalı E., Kılıç N., Yavuz Ö., Sancak B. Effects of the Sulfonylurea Glyburide on Glutathione and Glutathione peroxidase activity in Alloxan Induced Diabetic Rat Hepatocytes. *General Pharmacology*. 1994; 25(5): 875-87.
- 154) Saxena AK, Srivastava P, Kale RK, Baquer NZ Impaired antioxidant status in diabetic rat liver. Effect of vanadate. *Biochemical Pharmacology*. 1993; 45(3): 539-542
- 155) Elmalı E., Altan N., Bukan N. Effect of sulphonylurea glibenclamide on liver and kidney antioxidant enzymes in streptozotocin- induced diabetic rats. *Drugs R.D.* 2004; 5(4): 203-8.
- 156) Kılıç N., Malhatun E., Elmalı E., Altan N. An Investigation into the Effects of the Sulfonylurea Glyburide on Glutathione peroxidase activity in Streptozotocin-Induced Diabetic Rat Muscle Tissue. *General Pharmacology*. 1988; 30(3): 399-401.
- 157) Tiedge M., Lortz S., Drinkgern J., Lenzen S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes*. 1997; 46: 1733- 1740.
- 158) Tiedge M., Lortz S., Munday R., Lenzen S. Complementary action of antioxidant enzyme in the protection of bioengineered insulin-producing RIN m5f cells against the toxicity of reactive oxygen species. *Diabetes*. 1998; 47(10): 1578-1585.
- 159) Robertson R.P., Harmon J., Tran P.O., Poitout V. β -cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes* 2004; 53(Supplement 1): 119-124.
- 160) Giugliano I., Ceriello A., Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care*. 1996; 19(3): 257-267.
- 161) Rösen P., Du X., Tschöpe D. Role of oxygen derived radicals for vascular dysfunction in the diabetic heart: prevention by α -tocopherol?. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 1998; 188(1- 2): 103-111.
- 162) Du X., Stockklauser-Farber K., Rösen P. Generation of reactive oxygen intermediates, activation of NF κ B, and induction of apoptosis in human endothelial cells by glucose: role of nitric oxide synthase? *Free Radical Biology and Medicine*. 1999; 27(7-8): 752-763.
- 163) Ceriello A. Acute hyperglycemia and oxidative stress generation. *Diabetic Medicine* 1997; 14(Supplement.3), 45-49.
- 164) Davidoff A.J., Rodgers R.L. Insulin, thyroid hormone, and heart function of diabetic spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 1990; 15(6): 633-642.
- 165) Das K, Chainy GBN Modulation of rat liver mitochondrial antioxidant defense system by thyroid hormone. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 2001; 1537(1), 1-13.
- 166) Altan N., Buğdaycı G., Tutkun-Kosova F., Sancak-Çaycı B., Nazaroğlu N.K. The Influence of the Sulfonylurea Glyburide on Nitric Oxide in

- Streptozotocin Induced Diabetic Rat. *General Pharmacology* 1998; 31(2): 319-321.
- 167) Houslay M.D. 'Crosstalks': a pivotal role for protein kinase C in modulating relationships between signal transduction pathways. *European Journal of Biochemistry* 1991; 195(1): 9-27.
- 168) Donalith MY, Gross DJ, Cesari E, Kaiser N Hyperglycemia- induced β cell apoptosis in pancreatic islets of Psammoys obesus during development of diabetes. *Diabetes*. 1999; 48(4): 738- 744.
- 169) Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ Biochemistry and Pathology of Radical-mediated Protein Oxidation. *Biochemical Journal* 1997; 324(1), 1-18.
- 170) Dillard CJ, Downey JE, Tappel AL Effect of antioxidants on lipid peroxidation in iron-loaded rats. *Lipids*. 1984; 19(2): 127-33.
- 171) Dillmann WH, Diabetes and thyroid- hormone induced changes in cardiac function and their molecular basis. *Annual Review of Medicine* 1989; 40: 373-94.
- 172) Diekman MJ, Romijn JA, Endert E, Sauerwein H, Wiersinga WM Thyroid hormones modulate serum leptin levels: observations, 1998.
- 173) Green K, Brand MD, Murphy MP Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes*. 2004; 53 (Supplement 1): 110-118.
- 174) Altan N., Yiğit Ş., Elmalı E., Malhatun E., Rota S., Kılıç N. Effects of the Sulfonylurea Glyburide on Superoxide Dismutase in Streptozotocine- Induced Diabetic Rat Muscle. *General Pharmacology*. 1997; 28(5): 795-96.
- 175) Atlan N., Dinçel A.S., Koca C. Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Türk Biyokimya Dergisi* 2006; 31 (2):51-6.
- 176) Lipinski B: Pathophysiology of oxidative stress in diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and Its Complications*. 2001; 15: 203-210
- 177) Memişoğulları R. Plazma Homosistein Düzeyleri ile Tip 2 Diyabet, Komplikasyonları, Kontrolü ve Süresi Arasındaki İlişkinin Araştırılması. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Erzurum, 2003
- 178) Giardino I, Fard AK, Hatchell DL, Brownlee M. Amino guanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation and oxidant-induced apoptosis. *Diabetes*. 1998; 47(7): 1114 1120.
- 179) Chappay O., Dosquet C., Wautier M.P., Wautier J.L. Advanced glycation end products, oxidant stress and vascular lesions. *European Journal of Clinical Investigation*. 1997; 27(2): 97-108.
- 180) Koya D., King G.L. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*. 1998; 47(6): 859-66.
- 181) Way K.J., Katai N., King G.L. Protein kinase C and the development of diabetic vascular complications. *Diabetic Medicine*. 2001;18 (12): 945-959.
- 182) Maritim AC, Sanders RA, Watkins III JB Diabetes, oxidative stress and antioxidants: Review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 2003; 17(1): 4-38.
- 183) Kopec B., Fritz I.B., Comparison of properties of carnitine palmitoyltransferase I with dose of carnitine palmitoyltransferase II, and

- preparations of antibodies to carnitine palmitoyltransferases. *The Journal of Biological Chemistry* 1973; 248, 4069-4079.
- 184) Mroczkowska J.E., Gala H.J., Nalecz M.J., Nalecz K.A., Evidence for an asymmetrical uptake of L-carnitine in the blood–brain barrier in vitro. *Biochemistry and Biophysics Research Communication* 1997; 241, 127-131.
- 185) Shug A.L., Schmidt M.J., Golden G.T., Fariello R.T., The distribution and role of carnitine in the mammalian brain. *Life Sciences* 1982; 31: 2869-2874.
- 186) Baumgartner M. and Blum L., 1997a. L-carnitine. Carnitine-Chemistry, Biological Function and Deficiencies, pp:1-8. Lonza Ltd. Muenchensteinerstrasse 38, CH-4002, Basel.
- 187) Çitil M., Veteriner hekimlikte karnitin. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2002; 8 (1): 77-82.
- 188) Anonymous, 2003b. Historical Background of L-carnitine, Lonza Ltd. (<http://www.carnipure.com/carnipure/en/what/historical.html>) 24.12.2003
- 189) Seline K., Johein H., “The determination of L-carnitine in several food samples”, *Food Chemistry*, 2007; 105: 793- 804.
- 190) Marín V.B., Azocar M., Molina M., Guerrero J.L., Ratner R. and Cano F., “Total Carnitine and Acylated Carnitine Ratio: Relationship of Free Carnitine with Lipid Parameters in Pediatric Dialysis Patients Advances in Peritoneal Dialysis”, 2006, 22.
- 191) Taşbozan O., “L-karnitin ve farklı yağ seviyeleri ile hazırlanan yemlerle beslenen çipuraların (*Sparus aurata*) büyüme performansı ve vücut kimyasal kompozisyonlarının belirlenmesi üzerine bir araştırma”, Doktora tezi, Çukurova Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı, Adana, 2005, 118s.
- 192) Zubriggen E., “L-carnitine: Historical Review, *Annals of Nutrition and Metabolism*”, 1999; 44: 79-80.
- 193) Brevetti G., Perna S., Metabolic and Clinical Effects of L-carnitine in Peripheral Vascular Disease. In: Ferrari R., DiMauro S., Sherwood G. (Eds.), *L-carnitine and Its Role in Medicine: From Function to Therapy*. Academic Press, London, 1992, pp. 359-378.
- 194) Visioli O., Pasini E., de Giuli F., Ferrari R., Molecular Mechanism of Action of L-carnitine in Treatment of Myocardial Disorders at the Experimental Levels. In: Ferrari, R., DiMauro, S., Sherwood, G., (Eds.), *L-carnitine and Its Role in Medicine: From Function to Therapy*. Academic Press, London, 1992, pp. 237-263.
- 195) Vaz F.M., Wanders R.A.J, “Carnitine biosynthesis in mammals”, *Journal of Biochemistry*, 2002; 361: 417-429.
- 196) Sharma S., Black S.M., Carnitine homeostasis, mitochondrial function and cardiovascular disease, *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 2009; 6, 1-4.
- 197) Rebouche C.J., “Carnitine function and requirements during the life cycle”, *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 1992; Vol 6: 3379-3386.

- 198) Rebouche C.J., “*Carnitine, Nutrition in Health and Disease*”, 1999; 9th edition, 505S-512S.
- 199) Heining K., Henion J., “Determination of carnitine and acylcarnitines in biological samples by capillary electrophoresis-mass spectrometry”, *Journal of Chromatography*, 1999; 735: 171-188.
- 200) Higdon J., Drake V.J., Hagen T.M., L-carnitine, Linus Pauling Institute, OregonStateUniversity, http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/othernuts/carnitine/index.html#food_source, 2007.
- 201) Rebouche C.J., Carnitine. In: Shils M.E., Olson J.A., Shike M., Ross A.C., (Eds.) *Nutrition in Health and Disease*. 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1999, pp. 505-512.
- 202) Li B.U.K., Lloyd M.L., Gudjonsson H., Shug A.L., Olsen W.A., The effect of enteral carnitine administration in humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 1992; 55: 838-845.
- 203) Engel A.G., Rebouche C.J., Carnitine metabolism and inborne errors. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 1983; 7, 38-43.
- 204) Schuldiner AR, Transgenic animals, *N Eng J Med* 1996; 334, 653- 655.
- 205) Reznick AZ, Kagan VE, Ramsey R et al, Antiradical effect in L-propionil carnitine protection of the heart against ischemia- reperfusion injury, *Arc Biochem Biophys*. 1992; 296 (2): 394- 401.
- 206) Arduini A, Dottori S, Sciarroni AF et all, Effect of propionil-L-carnitine treatment on membrane phospholipid fatty acid turnover in diabetic rat, *Mol cell Biochem* 8, 1995; 152(1): 31-37.
- 207) Montilla PL, Vargas JF, Tunez IF et all, Oxidative stress in diabetic rats induced by streptozotocin: protective effects of melatonin, *J Pineal Res* 1998; 25(2):94-100.
- 208) Arduini A., Carnitine and its acetyl esters as secondary antioxidants? *American Heart Journal* 1992; 123, 1726-1727.
- 209) Gülçin, İ., Antioxidant and antiradical activities of L-Carnitine. *Life Sciences* 2006; 78: 803-811.
- 210) Schnackenberg C.G., Wilcox C., The SOD mimetic tempol restores vasodilation in afferent arterioles of experimental diabetes. *Kidney International* 2001; 59: 1859-1864.
- 211) DiPalma JR. Carnitine deficiency. *Am Fam Physician* 1998; 38: 243-51.
- 212) Kendler BS. Carnitine: an overview of its role in preventive medicine. *Prev Med* 1986; 15: 373-90.
- 213) Tamamoğulları N., Siliğ Y., İçağasıoğlu S., Atalay A. Carnitine deficiency in diabetes mellitus complications. *J Diabetes Complications* 1999; 13: 251-3.
- 214) Mingrone G, Greco AV, Capristo E, Benedetti G, Giancaterini A, De Gaetano A, et al. L-carnitine improves glucose disposal in type 2 diabetic patients. *J Am Coll Nutr* 1999; 18: 77-82.
- 215) Herrera MD, Bueno R, De Sotomayor MA, Perez-Guerrero C, Vazquez CM, Marhuenda E. Endothelium-dependent vasorelaxation induced by L-carnitine in isolated aorta from normotensive and hypertensive rats. *J Pharm Pharmacol* 2002; 54: 1423-7.

- 216) Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Amer Chem Soc*, 1958; 80: 2587.
- 217) Hardeland R, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP. Melatonin. *Int J Biochem Cell Biol*, 2006; 38: 313-316.
- 218) Brzezinski A. Mechanisms of disease: Melatonin in humans. *N England J Med* 1997; 336 (3): 186-95.
- 219) Manev HT, Kharlamov A, Joo JY. Increased brain damage after stroke or excitotoxic seizures in melatonin deficient rats. *FASEB* 1996; 10 (13): 1546-51.
- 220) Reiter RJ, Carneiro RC, Oh C-S. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm Metab Res*, 1997; 29: 363-372.
- 221) Reiter RJ. Neuroendocrine effects of light. *Int J Biometeorol*, 1991; 35: 169-175.
- 222) Reiter RJ. Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered free radicals: a brief review. *Brazilian J Med Biol Res* 1993; 26: 1141-1155.
- 223) Waldhauser F, Frisch H, Waldhauser M, Weiszenbacher G, Zeitlhuber U, Wurtman R. Fall in nocturnal serum melatonin during prepuberty and pubescence. *Lancet*, 1984; 1: 362- 365,
- 224) Reiter RJ. Potential biological consequences of excessive light exposure: melatonin suppression, DNA damage, cancer and neurodegenerative diseases. *Neuro Endocrinol Lett*, 2002; 23 Suppl 2:9-13.
- 225) Reppert SM, Weaver DR, Godson C. Melatonin receptors step in to the light: Cloning and classification of subtypes. *Trends Pharmacol Sci*, 1996; 17: 100-102.
- 226) Hardeland R, Reiter RJ, Poeggeler B, Tan D-X. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: Antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neurosci Biobehav Rev* 1993; 17: 347-357.
- 227) Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *J Biomed Sci* 2000; 7: 444- 458.
- 228) Reiter RJ, Paredes SD, Manchester LC, Tan DX. Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2009; 44: 175-200.
- 229) Reiter RJ, Calvo JR, Karbownik M, Qi W, Tan DX. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann N Y Acad Sci*, 2000; 917: 376-386.
- 230) Reiter RJ, Tan DX, Erren TC, Fuentes-Broto L, Paredes SD. Light-mediated perturbations of circadian timing and cancer risk: a mechanistic analysis. *Integr Cancer Ther*, 2009; 8:354- 360.
- 231) Tan et al., D.X. Tan L.C. Manchester M.P. Terron L.J. Flores and R.J. Reiter, One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species?, *J. Pineal Res.* 2007;42: pp. 28–42.
- 232) Allegra M., Reiter R.J., Tan D.X., Gentile C., Tesoriere L. and Livrea M.A., The chemistry of melatonin's interaction with reactive species, *J. Pineal. Res.* 2003; 34: pp. 1–10.

- 233) Anwar M.M., Meki A.R.M., Oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats: effects of garlic oil and melatonin, *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2003; 135: pp. 539–547.
- 234) Nishida S., Metabolic effects of melatonin on oxidative stress and diabetes mellitus, *Endocrine.* 2005; 27: pp. 131–136.
- 235) Paskaloglu, Sener G. and Ayangolu-Dulger G., Melatonin treatment protects against diabetes-induced functional and biochemical changes in the rat aorta and corpus cavernosum, *Eur. J. Pharmacol.* 2004; pp. 499
- 236) Zhang, M, Lv, X.Y., Li, J., et al., The characterization of high-fat diet and multiple low-dose streptozotocin induced type 2 diabetes rat model. *Exp. Diabetes Res.* 2008; 704045.
- 237) Wang C, Li J, Lv X et al. "Ameliorative effect of berberine on endothelial dysfunction in diabetic rats induced by high fat diet and streptozotocin". *European Journal of Pharmacology* 2009 August ; 620 (1–3): 131–7.
- 238) Gürpınar T., Ekerbiçer N., Uysal N., Barut T., Tarakçı F., Tuğlu M.İ., The Histologic Evaluation of Atorvastatin and Melatonin Treatment on Oxidative Stress and Apoptosis of Diabetic Rat Pancreas. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2010; 16 (4): 547-552.
- 239) June C.C, Wen L.H., Sani H. A., et al Hypoglycemic Effects of Gynura procumbens Fractions on Streptozotocin-induced Diabetic Rats involved Phosphorylation of GSK3 β (Ser-9) in Liver. *Sains Malaysiana* 2012; 41(8): 969–975.
- 240) Halifeoğlu İ, Karataş F, Çolak R. ve ark., Tip 2 Diyabetik Hastalarda Tedavi Öncesi ve Tedavi Sonrası Oksidan ve Antioksidan Durum, *Fırat Tıp Dergisi* 2005;10(3): 117-122.
- 241) Millipore, EIA insülin rat kiti kullanım kılavuzu, 2012.
- 242) Cayman, nitrite/nitrate assay kit kullanım kılavuzu, 2012.
- 243) Kedziora-Kornatowska K., Szewczyk-Golec K., Kozakiewicz M., Melatonin improves oxidative stress parameters measured in the blood of elderly type 2 diabetic patients *J. Pineal Res.* 2009; 46:333–337
- 244) Fu, G.S., Huang, H., Chen, F., et al 2007. Carvedilol ameliorates endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.* 19 (567), 223–230.
- 245) Rodrigues, B., Seccome, D., McNeill, J. H. Lack of effect of oral L-carnitine treatment on lipid metabolism and cardiac function in chronically diabetic rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1990; 68: 1601±1608
- 246) Kanter M, Uysal H, Karaca T et al. Depression of glucose levels and partial restoration of pancreatic beta-cell damage by melatonin in streptozotocin-induced diabetic rats. *Arch Toxicol* 2006; 80: 362–369.