

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

**SELENYUMUN YÜKSEK YAĞ İÇERİKLİ DİYET VE  
STREPTOZOTOSİNLE DİYABET OLUŞTURULMUŞ  
SIÇANLARDA ENDOTEL BAĞIMLI DAMAR  
FONKSİYONLARINDAKİ ROLÜ**

UZMANLIK TEZİ  
Dr. Zeynep ÖZTÜRK

Tez Danışmanı  
Yrd. Doç. Dr. Tuğba ÇAVUŞOĞLU

Manisa, 2012

## ÖNSÖZ

Farmakoloji uzmanlığımı bitirirken merakla hazırlanıp sabırla tamamladığım bu çalışmanın insanlık ve tıp biliminin çözemediği bazı sorular adına küçük de olsa bir adım olmasını dilerim. Kısa vadede çözümler üreterek çalışan bir hekim olmak yerine, değerinin ve anlamının belki çok zaman sonra anlaşılacağı olasılığıyla, sabır göstermek ve emek vermek sözüyle girdiğim bu yolda daha nice sorulara yanıt bulabilmeyi temenni ederim. Büyük puntolarla yazılmış, defalarca alıntı yapılmış başarılar olmamalı insanın hedefi; doğru zamanda doğru yerlere kendimize ait sözcükler ve izler bırakabilmeli. Bu çalışmadaki en büyük gayem bu olmuştur.

Bu tez çalışmasına danışmanlık görevini üstlenen ve desteğini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Tuğba ÇAVUŞOĞLU'na teşekkür ederim. Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmalarımda yanımda olan Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri ve birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarıma, tez çalışmalarımın katkılarından dolayı Prof. Dr. Ahmet VAR, Doç.Dr. Mehmet KORKMAZ, Yrd. Doç. Dr. Kamil VURAL ve Uzm. Biol. Seda ÖRENAY BOYACIOĞLU'na da teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında gösterdikleri ilgi ve anlayış nedeniyle aileme teşekkürü borç bilir, bu uzun soluklu süreçte doğan ve büyüyen sevgili kızlarım Yasemin ve Elif'e 'ilk göz ağrım' niteliğindeki bu çalışmayı ithaf ederim.

Dr. Zeynep ÖZTÜRK

## İÇİNDEKİLER

### ÖNSÖZ

### İÇİNDEKİLER

|   |    |
|---|----|
| <b>I. GİRİŞ</b>   | 1  |
| <b>II. GENEL BİLGİLER</b>   | 3  |
| 2.1 Diyabetes Mellitus ve Sınıflandırılması   | 3  |
| 2.2 Deneysel Diyabet Modelleri  | 7  |
| 2.3 Diyabet ve Oksidatif Stres  | 10 |
| 2.4 Diyabet ve Endotel Disfonksiyonu  | 14 |
| 2.5 Selenyum ve Diyabet Üzerine Etkileri  | 20 |
| <b>III. GEREÇ-YÖNTEM</b>  | 22 |
| 3.1 Ratlarda Deneysel Diyabet Modelinin Oluşturulması<br>ve Tedavi Uygulaması                                     | 22 |
| 3.2 Damar Yanıtlarının İncelenmesi  | 23 |
| 3.3 Kan ve Karaciğer Örneklerinin Ölçüme Hazır<br>Hale Getirilmesi ve Saklanması                                  | 25 |
| 3.4 Kanda Açlık Kan Şekeri, Total Kolesterol, Trigliserid,<br>HDL-Kolesterol, LDL-Kolesterol Seviyelerinin Ölçümü | 25 |
| 3.5 Serum ve Karaciğer Örneklerinde MDA Ölçümü  | 26 |
| 3.6 İnsülin Seviyelerinin Ölçümü  | 26 |
| 3.7 Serum NO Seviyelerinin Ölçümü   | 27 |
| 3.8 Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Ölçümü   | 28 |
| 3.9 Katalaz Aktivitesi Ölçümü   | 29 |
| 3.10 Glutatyon Peroksidaz Aktivitesi Ölçümü   | 29 |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.11 NADPH oksidaz , Endotelyal Nitrik oksit sentaz<br>(eNOS) Genlerine Ait Ekspresyon Analizleri         | 30        |
| 3.12 İstatiksel Analizler   | 32        |
| <b>IV. BULGULAR</b>   | <b>33</b> |
| 4.1 Deney Hayvanlarının Genel Bulguları   | 33        |
| 4.2 Damar Kasılma ve Gevşeme Yanıtlarına Ait Bulgular   | 37        |
| 4.3 Deney Hayvanlarının Lipid Profiline Ait Bulgular  | 41        |
| 4.4 Deney Hayvanlarının İnsülin ve NO Seviyelerine<br>Ait Bulgular  | 43        |
| 4.5 Deney Hayvanlarının MDA Seviyelerine Ait Bulgular   | 44        |
| 4.6 Deney Hayvanlarının Süperoksid Dismutaz,<br>Katalaz ve Glutatyon Peroksidaz Seviyelerine Ait Bulgular | 46        |
| 4.7 Deney Hayvanlarının NADPH oksidaz ve eNOS<br>Gen Ekspresyonlarına Ait Bulgular                        | 48        |
| <b>V. TARTIŞMA</b>  | <b>50</b> |
| <b>VI. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>  |           |
| 57  |           |
| <b>VII. ÖZET</b>  | <b>58</b> |
| <b>VII. SUMMARY</b>   | <b>59</b> |
| <b>IX. KAYNAKLAR</b>  | <b>60</b> |

## I. GİRİŞ

Diyabetes mellitus (DM), kan şekerinin yüksekliğiyle karakterize, pankreastan insülin hormonu salgılanmasındaki veya salgılanan insülinin etkisindeki yetersizlik sonucu ortaya çıkan, karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasında bozukluklarla seyreden bir hastalıktır (1).

Diyabetes mellitus'taki morbitide ve mortalitenin temel nedeni hipertansiyon ve koroner kalp hastalıkları gibi kardiyovasküler bozukluklardır (2,3). Kardiyovasküler olay riski, diyabetik hastalarda diyabetik olmayanlara göre 2-4 kat daha fazladır (3). Vasküler komplikasyonlar makro veya mikroanjiopati şeklinde olabilir. Diyabette oluşan makroanjiopati aterosklerozun ileri bir şekli olup, koroner, karotis ve periferik arterleri etkileyerek miyokard enfarktüsü riskini artırır, inme ve diyabetik ayak gelişimine neden olur. Hastalık seyrinde retinal ve renal vasküler yapılar ile periferik sinirlerin vaso nervorumlarında gelişen mikroanjiopati, diyabetik retinopati, diyabetik nefropati ve diyabetik nöropati ile sonuçlanır (4,5,6). Kan şekeri yüksekliği diyabetik hastalarda mikrovasküler hasarda en önemli etkidir (7). Diyabette inflamatuvar bir süreç ve endotel disfonksiyonu sonucunda progresif vasküler duvar hasarı oluşur. Vasküler endotel disfonksiyonun mikro ve makroanjiopati patogenezinde anahtar rol oynamaktadır (8).

Diyabette reaktif oksijen türlerinin rolü 1980'li yıllardan beri geniş çapta tartışılan bir konu olmuştur (8,9). 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 ve antioksidan savunma sistemini değiştirdiği vurgulanmaktadır (10,11,12).

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 (12,13, 14). Oksidatif strese en duyarlı yapılardan biri olduğu da bilinen beta hücrelerinde gözlenen hasarın, hipergliseminin toksik etkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (15,16,17).

Deneysel diyabet modellerinde çok sık kullanılan bir madde olan streptozotosin (STZ), pankreatik beta (B) hücreleri için toksik olup, hücrelerde geri dönüşümsüz olarak nekroza neden olmaktadır (18,19,20). Çeşitli dokularda oluşan dejenerasyonlara karşı iyileştirici etkisi olan antioksidanlar ile ilgili pek çok çalışmaya rastlanmaktadır.

Selenyum (Se) , antioksidan özelliği nedeniyle özellikle oksidatif strese bağlı diyabet gelişimine karşı önemli olduğu düşünülen bir iz elementtir (21). STZ verilmiş diyabetik fare ve sıçanlarda selenyum uygulanmasından sonra serum glikoz ve insülin seviyelerine bakılmış ve diyabetik hayvanlarda yüksek serum glikoz seviyesinin azaldığı belirtilmiştir (22,23,24). Çalışmamızda deneysel olarak diyabet oluşturulmuş sıçanların aort endotelinde meydana gelen dejenerasyonlara karşı selenyum uygulanmasının muhtemel koruyucu ve iyileştirici etkileri araştırıldı.

## II. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Diyabetes Mellitus ve Sınıflandırılması

Diyabetes mellitus sık görülen kronik seyirli, metabolik bir hastalık olup karbonhidrat, yağ, protein ve elektrolit metabolizmasında bozukluklara yol açar (1). Kronik hiperglisemiyle seyreden, pankreastan insülin salgılanmasının eksikliği veya insülin etkisinin yetersizliği sonucu oluşan bir sendrom olarak tanımlanabilir (25).

Bugünkü bilgilerimiz ışığında çok farklı çeşitleri bulunan en yaygın metabolizma hastalığıdır. Fiziksel inaktivite ve obezite insidansının artışı, yaşlanma, şehir yaşamına geçişin ve nüfusun artmasıyla birlikte diyabetli birey sayısı da giderek artmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre tüm dünyada 2000 yılında 171 milyon diyabetli birey mevcutken bu sayının 2030 yılında 366 milyona ulaşılacağı düşünülmektedir. Buna göre dünyada tüm yaş gruplarında 2000 yılında % 2.8 olan diyabet prevalansının iken 2030 yılında % 4.4'e yükseleceği öngörülmektedir. Özellikle diyabetik popülasyonda 65 yaş üstü hasta oranının artışı dikkat çekicidir (26).

Dünya sağlık örgütünün Türkiye verilerine bakıldığında diyabetik birey sayısının 2000 yılındaki 2,9 milyon olduğu görülmekle birlikte bu sayının 2030 yıllarında 6,5 milyon olacağı tahmin edilmektedir (27). Diyabetes Mellitus'un çeşitli tiplerinin oluşmasında genetik, çevresel faktörler ve hayat tarzının rolü olduğu bilinmektedir (28).

Diyabette insülinin kana salınımında azalma, kan glukozunun kullanımında azalma ve glukoz yapımında artma gibi faktörler kan glukoz düzeyinin yüksek kalmasına neden olabilir. Diyabette dolaşımdaki kanın glukoz seviyesinin yüksek olduğu düşünülürse, kalp ve damarlar başta olmak üzere, aslında tüm organ ve sistemlerin ilgilendiren bir patoloji söz konusudur. Böbrek yetmezliğinin, erişkin körlüklerin ve travma dışı alt

ekstremitte amputasyonlarının başta gelen nedeni, gelişmiş ülkelerde yapılan çalışmalara göre Diyabetes Mellitus'tur (29).

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 (30).

Tip 1 diyabet insülin salgılanmasında eksiklikle karakterize olup pankreas B hücrelerinin viral bir hasar, toksik veya otoimmün yıkımı nedeniyle gelişmektedir. Diyabet vakaların %90 kadarını oluşturan bu tip juvenil diyabeti olarak da bilinir ve gelişme olasılığı ikinci dekatta artar (31).

Tip 2 diyabet glikoz seviyelerine oranla yetersiz insülin sekresyonu ve periferik hedef dokuların insüline olan direnci ile karakterize edilmekte ve genellikle B hücre fonksiyonunun kaybı ile gerçekleşmektedir. Hedef hücrelerdeki mevcut insülin reseptörlerinin sayısındaki bir azalma, insüline tepkinin olmamasına neden olabilir (32,33).

Diyabetin sınıflaması etiyolojisi ve patogenezinin giderek daha iyi anlaşılmasıyla, sürekli yenilenmektedir. İki ana diyabet tipinin dışında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sınıflandırmasında malnutrisyonla ilişkili diyabet, bazı koşullar ve sendromlarla beraber olan diyabet, bozulmuş glukoz toleransı ile beraber olan tip, gebelik diyabeti (gestasyonel diyabet) gibi özel diyabet tipleri de sınıflandırılmaya başlanmıştır (34). Bu özel tipler içerisinde en sık görülen gebelik diyabeti, tip 2 diyabete benzer olup bu tip diyabet de insülin direnciyle ilgilidir. Gebelerde insülin direnci gebelik hormonları nedeniyle gelişmektedir (35).

1979 yılında Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsünün (NIH) National Diabetes Data Group (NDDG) unca desteklenmiş, International Work Group tarafından "Diabetes Mellitus ve Glukoz İntoleransının Diğer Sınıfları" ilan edilmiştir. Bu sınıflama WHO tarafından da ufak bir değişiklik ile kabul edilmiştir (36). (Tablo 2.1)



**Tablo 2.1 Diyabetes Mellitus ve Glukoz İntoleransının Klinik Sınıflaması**

---

**A- Diyabetes Mellitus**

**I- Tip I. İnsüline bağımlı diyabetes mellitus (IDDM)**

- Tip Ia: klasik tip
- Tip Ib: poliglandüler otoimmün sendrom içinde Tip I diyabet

**II- Tip II. İnsüline bağımlı olmayan diyabetes mellitus (NIDDM)**

- Şişmanda NIDDM
- Şişman olmayanda NIDDM

1- MODY: gençte NDDM (otozomal dominant)

2- Erken başlangıçlı Tip II diyabet

3- Anormal insülin molekülü

4- Proinsülinin insüline inkomplet dönüşümü

**III- Malnutrisyonla ilişkili diyabetes mellitus (MRDM)**

- Protein eksikliği ile birlikte diyabet
- Fibrokalkülöz pankreatik diyabet

**IV- Diğer tipler: Diyabetes Mellitus ile birlikte olan durum ve sendromlar (eskiden bu gruba sekonder diyabet denirdi)**

- Pankreas hastalıkları (Akut ve kronik pankreatitler, hemokromatozis, pankreas kanseri, pankreatektomi)

- Endokrin sebepler ( Cushing sendromu, akromegali, feokromasitoma)
- İlaç veya şimik maddeler ( Kortikosteroidler, oral kontraseptifler, tiazid grubu diüretikler, fenitoin)
- Bazı genetik sendromlar ( Friedrich ataxia gibi)
- İnsülin reseptör anormalileri (Acanthosis nigricans)
- Diğer çeşitli durumlar (Klinefelter sendromu, Turner sendromu, porfiria vs.)

## **B- Bozuk Glukoz İntoleransı (İGT)**

- Şişmanda İGT
- Şişman olmayanda İGT
- MODY de İGT
- İGT ile birlikte olan diğer durumlar
  - 1- Pankreas hastalıkları (Akut ve kronik pankreatitler, hemokromatozis, pankreas kanseri, pankreatektomi)
  - 2- Endokrin sebepler ( Cushing sendromu, Conn sendromu, akromegali, feokromasitoma)
  - 3- İlaç veya şimik maddeler ( Kortikosteroidler, oral kontraseptifler, tiazid grubu diüretikler, fenitoin)
  - 4- Bazı genetik sendromlar ( Müsküler distrofi, ataxia telenjektazi, Friedrich ataxia)
  - 5- İnsülin reseptör anormalileri (Acanthosis nigricans)
  - 6- Diğer çeşitli durumlar (Klinefelter sendromu, Turner sendromu, porfiria, Down sendromu)

## **C- Gestasyonel Diyabet (GDM)**

Daha önceden karbonhidrat metabolizması yönünden normal olan bir kadın, gebelik esnasında bozuk glukoz toleransı gösteriyorsa bu durum gestasyonel diyabet adını alır. Gebelikten önceki durum bilinmiyorsa o zaman GDM diyebilmek için lohusalıktan sonra glukoz tolerans yanıtlarına bakılır; düzelmezse diyabetik adını alır (36).

---

Diyabetes Mellitus'lu hastalarda doku ve organlarda yapısal, biyokimyasal ve işlevsel bir çok değişiklikler oluşur. Akut komplikasyonlar hayati tehlike oluşturabilir. Uzun dönemde oluşan damar patolojileri ise organlarda işlev kaybına neden olur. Erken evrede kan glukozunun kontrol altına alınması ile, vasküler komplikasyonların ilerlemesi engellenebilir; koroner arter hastalığı, diyabetik nefropatinin önüne geçilebilir (37).

### **2.2. Deneysel Diyabet Modelleri:**

Deneysel hayvan modelleri, hastalıkların oluşum mekanizmalarının incelenmesi, hastalıktan korunma ve tedavi olanaklarının araştırılması için kullanılan yöntemlerdir. İlaç araştırmalarında in vivo deneylerin bir kısmı, mümkünse temsili hayvan modellerinde yapılır. Bazı modeller hayvanın diyetini değiştirmek veya toksik maddelerle belirli hedef organlarda lezyon yapmak suretiyle yapılır (38). Deneysel diyabet de pankreotektomi ya da pankreasın beta hücrelerinin tahrip edilmesiyle yapılabilmektedir. Hayvanlarda deneysel diyabet oluşturmak için fare, sıçan, tavşan, kobay, hamster, maymun, domuz, köpek ve kedi gibi deney hayvanları kullanılabilir (39-45). Deneysel diyabet, kimyasal ajanlarla (46,47), spontan olarak (48,49) veya virüs aracılığıyla (50) yapılabilmektedir. Günümüzde tanımlanmış pek çok deneysel hayvan modeli olmakla beraber bu modellerin hiç biri insan diyabetine tam olarak eşdeğer tutulamaz (51, 52). (tablo 2.2)

## Tablo 2.2 DENEYSEL DİYABET MODELLERİ

---

### I- TİP 1 DİYABET MODELLERİ

**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:** EMC (ensefalomiyokardit) virüsünün M varyantı, Kilham Rat Virus (KRV), Coxsachie B, Rubella, Reovirus, Sitomegalovir.s (CMV) ve "Venezuelan Equine Ensefalit" virüsleri

**4. Transgenik Tip 1 Diyabet Modelleri:** 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 hemaglutininini ve başka viral glikoproteinler

### II- TİP 2 DİYABET MODELLERİ

**1. Spontan Tip 2 Diyabet Modelleri:** Ağır düzeyde hiperglisemili modeller (db/ db fare, Rhesus maymunu, çöl kemirgenleri) ve ılımlı hiperglisemili modeller (ob/ ob fare)

**2. Eksperimental Tip 2 Diyabet Modelleri:** Kimyasal modeller (streptozotosin, alloksan), cerrahi modeller (pankreatektomi, hipotalamik lezyon), diyet (yüksek yağlı ve şekerli diyetle beslenme), hormonlar, anne karnında malnutrisyon, insülin karşıtı hormonların yüksek dozları, hiperinsülinemiye uzun süreli maruziyet ve benzerleri

**3. Transgenik Tip 2 Diyabet Modelleri:** insan insülin reseptörü, insan GLUT-4 glukoz taşıyıcısı ve insan adacık hücre amiloid polipeptidi (IAPP) gibi transgenler

### **III- BOZULMUŞ GLUKOZ TOLERANSI (BGT) MODELLERİ:**

#### **1. Şişman Zucker fa/fa Sıçan**

#### **2. BHE Sıçan**

---

Obezitenin hızla artmasıyla dünya genelinde diyabet hastalığında da önemli bir artış olmuştur ve tip 2 diyabet bunların %95'ini oluşturmaktadır. Bu nedenle tip 2 diyabet tedavisine yönelik yeni yaklaşımlar geliştirmek ve daha iyi yöntemler bulmak gerekmektedir. Tip 2 diyabete bağlı komplikasyonların, risklerin önüne geçmek için deneysel çalışmalar yapılmakta ve bu yolla vasküler ve nöronal lezyonların patogenezi, terapötik ajanların etki mekanizmalarını aydınlatılmaya çalışılmaktadır. Bu konuda çeşitli hayvan çalışma modelleri de bulunmasına rağmen (53-56), genellikle bunlar tip 2 diyabetin seyri ve insandaki kliniğiyle pek uyum sağlamamaktadır. Bu nedenle araştırmacılar tip 2 diyabet için yeni hayvan modelleri ya da kombine modeller oluşturma gayreti içerisindeyler.

Tip 2 diyabetin önemli bir özelliği olan insülin direnci oluşturulmasında HFD (high fat diet- yüksek yağ içerikli diyet)'in oldukça iyi bir yol olduğu düşünülmektedir. Çeşitli çalışmalar sıçanlarda HFD ile beslenmenin net olarak hiperglisemi ya da diyabet oluşturmasa da insülin direnci oluşturduğunu bildirmektedir (56- 59). Streptozotosin (STZ), deneysel DM oluşturmak üzere hayvanlarda en çok kullanılan ajandır. STZ, pankreas  $\beta$  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 (53, 54).

Tüm bunlardan 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. (53,54,56). Başarılı bir model ucuz, kolay uygulanabilir ve tip 2 diyabet tedavisine yönelik, pratik olarak kolay test edilebilir parametreleri içermelidir.

Bu kombinasyonun dışında multipl düşük doz STZ uygulamasının yapılabileceğini bildiren çalışmalar da vardır. Diyabet oluşturulmak üzere çalışılan sıçanlarda, tek yüksek doz STZ uygulaması yerine multipl düşük doz STZ uygulamasının  $\beta$  hücrelerinde kademeli ve otoimmün bir destrüksiyona yol açıyor olabileceği bildirilmiştir (60-65).

### **2.3. Diyabet ve Oksidatif Stres:**

İnsan hayatı için oksijen çok önemli ve gerekli olmasına karşın, eksojen ve endojen bazı reaktif oksijen türleri organizmaya zarar verme potansiyeline sahiptir (66). Pek çoğu serbest radikal olan reaktif oksijen türleri, kimyasal reaktivitesi yüksek oksijen formlarıdır (67). Oksijenin dış yörüngesine bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron eklenmesiyle serbest oksijen radikaline dönüşür. Bu bileşikler de son yörüngelerinde ortaklanmamış elektron içerdikleri için kolayca diğer moleküllerle reaksiyona girerek onları tahrip edebilen bileşikler oluştururlar ve organizmada çok etkili bir hasar meydana getirirler (68). Protein, lipid, DNA ve nükleotid koenzimler gibi birçok biyolojik materyale zarar verebilirler. Bu zararın yaşlanmayı teşvik ettiği ve ayrıca kalp

damar hastalıkları, çeşitli kanser türleri, katarakt, bağışıklık sisteminde zayıflama, sinir sistemi dejeneratif hastalıkları gibi birçok hastalığa sebep olduğuna dair bilgiler bulunmaktadır (69).

Canlı hücrelerdeki oksijen metabolizması, çevre kirleticileri, radyasyon, pestisitler gibi birçok etmen kaçınılmaz bir şekilde oksijen türevi serbest radikallerin oluşumuna yol açmaktadır. Bu radikallerin başlıcaları; tekli oksijen ( $1O_2$ ), süperoksit anyonu ( $\cdot O_2^-$ ), hidroksi ( $\cdot OH$ ), peroksi ( $ROO\cdot$ ) ve alkoksi ( $RO\cdot$ ) radikalleridir (70) (tablo 2.3). Reaktif oksijen türlerinin zararlarına karşılık vücuttaki farklı doğal savunma sistemleri serbest radikalleri kontrol altında tutmaktadır (66).

**Tablo 2.3 Oksidan Kaynaklar ve Antioksidan Savunma Sistemleri**

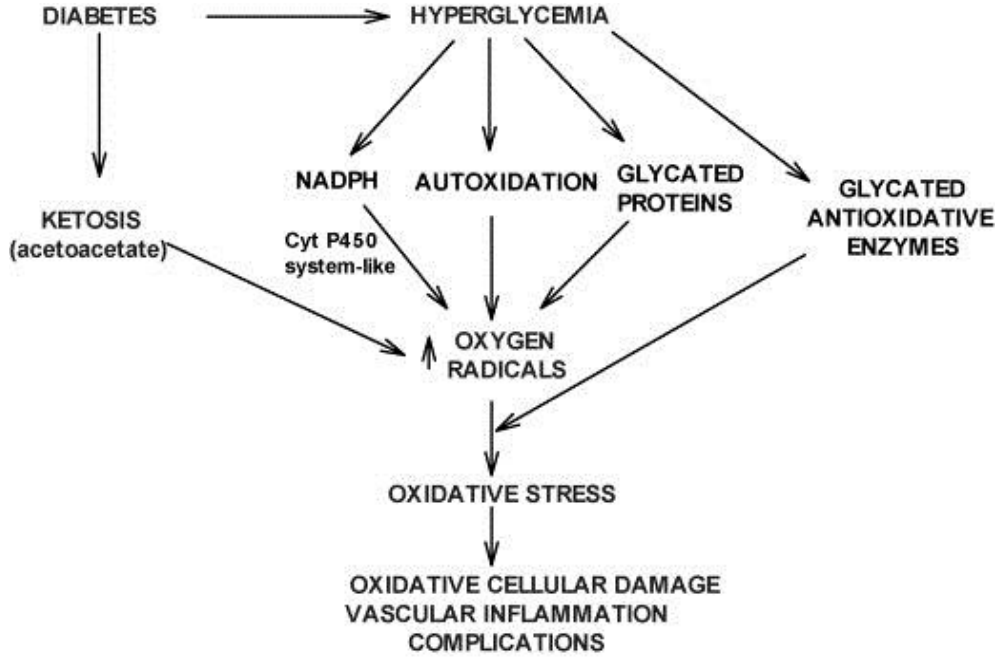
| Oksidanlar                                   | Antioksidan Savunma                      |
|--|--|
| Sigara dumanı                                | Süperoksit dismutaz                      |
| Çevre kirleticiler                           | Katalaz                                  |
| Radyasyon                                    | Glutatyon peroksidaz                     |
| Karsinojenler                                | Glutatyon                                |
| Pestisitler                                  | Selenyum                                 |
| Egzersiz                                     | E vitamini                               |
| Ateşli hastalıklar                           | C vitamini                               |
| İskemi                                       | Ubikinon                                 |
| Çoklu doymamış yağ asitlerinden zengin diyet | Ürik asit                                |
|  | $\beta$ - karoten ve diğer karotenoidler |

Serbest radikallere bağlı oluşan oksidasyon olaylarını engelleyen, serbest radikalleri stabilize etme yeteneğindeki maddeler antioksidan olarak adlandırılmaktadır (71). Antioksidanlar mekanizmalarına göre, primer ve sekonder antioksidanlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Primer antioksidanlar; radikallerle reaksiyona girerek bunların daha zararlı formlara dönüşmelerini ve yeni serbest radikal oluşumunu önleyen bileşiklerdir. Bu kategoride yer alan süperoksit dismutaz (SOD), glutasyon peroksidaz (GPx) ve katalaz gibi enzim sistemleri serbest radikalleri yok etme yeteneğindedir. Bu enzimler genel olarak serbest radikallerin DNA, proteinler ve lipidler gibi hüresel bileşenlere zarar vermesini sınırlandırmak suretiyle bir hüresel bölgeden diğerine geçişini de nleyebilmektedirler (66). Sekonder antioksidanlar ise; oksijen radikalini yakalayan ve radikal zincir reaksiyonlarını kıran E vitamini, C vitamini, bilirubin, ürik asit, ve polifenoller gibi bileşiklerdir (72).

Diyabetik komplikasyonlarının çıkmasında oksidatif stres önemli bir mekanizma olarak tarif edilmektedir (73). Serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisindedir ve bu dengeye oksidatif stabilite denir. Oksidatif stabilitenin bozulduğu durumlarda organizma, serbest radikallerden etkilenmektedir. Serbest radikallerin ortadan kaldırılma hızında bir düşme ya da oluşum hızında artma buna neden olabilir. Oksidatif stres denilen bu durum antioksidan savunma mekanizması ile serbest radikal oluşumu arasındaki önemli dengesizliği göstermekte olup doku hasarıyla sonuçlanmaktadır (69,70).

Diyabette oksidatif stresi artıran mekanizmalar, nonenzimatik glikozilasyon, otooksidatif glikozilasyon, sorbitol yolu aktivitesi, enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stres, inflamatuvar mediatörlerin düzeyleri, antioksidan savunma sistemindeki değişiklikler sonucu oluşan doku hasarıdır (74,75) (şekil 2.1).





**Şekil 2.1 Diyabet ve Oksidatif Stres** (Pathophysiology Volume 13, Issue 3 August 2006, Pages 163–170, Oxidative Stress and Metabolic diseases, Sushil K. Jain et al.)

Hiperglisemide hücre içerisinde serbest radikaller üretilmektedir. Pankreas beta hücreleri, oksidatif strese en duyarlı yapılardan biridir ve burada oluşan hasarın hipergliseminin toksik bir etkisi olduğu düşünülmektedir (76). Pankreas adacık hücrelerinde glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz, katalaz gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonları, diğer dokularla karşılaştırıldığında en düşük düzeydedir (77,78). STZ ile diabet oluşturulmuş ratlarda MDA ve GPx seviyelerinin karaciğer, böbrek ve mitokondrilerinde arttığını bildirilmiştir (79). Yapılan bir başka çalışma da ise diyabetik ratların böbreklerinde MDA seviyelerinin arttığı gösterilmiştir (80).

Hidrojen peroksit, yüksek reaktiviteye sahip bir reaktif oksijen türü ürünü olan hidroksil radikaline dönüşmektedir. Diyabetes Mellitus'ta insülin reseptör sinyal yolağında ve sinyal transdüksiyonu üzerinde hidroksil radikalinin bir etkisi olduğu düşünülmektedir (81).

Yapılan çeşitli hücre kültürü çalışmalarında, endotel ve düz kas hücreleri yüksek konsantrasyonda glukoz içeren bir ortamda inkübe edildiğinde serbest radikal oluşumu gözlenmiştir (76,77). Bu bulguyu destekleyen ve kan glukozu yüksekliğinin serbest radikal oluşumunda ana rol oynadığını savunan başka çalışmalar da vardır (80).

DeneySEL diyabet modeli oluşturmak üzere kullanılan streptozosinin de pankreası harap ederken oksidatif stres oluşturduğu ve nitrik oksid yanıtlarını bozarak diyabete yol açtığına dair kanıtlar vardır (81,82, 83).

Yalnızca kan şekeri yüksekliği değil kanda trigliserid düzeylerinin de yüksek olmasının diyabetik komplikasyonlar açısından önemli bir risk olduğu düşünülmektedir (84,85,86). Lipid peroksidasyonunun bu ilişkide önemli olduğu husunda görüş birliği vardır. Diyabetes Mellitus'ta çeşitli dokularda lipid peroksidasyonunun arttığına dair kanıtlar vardır. Lipid peroksidasyonu, enzimatik olarak lipooksijenaz yolu ile prostoglandinlerden ya da serbest radikaller etkisi ile endotelyal ve fagositik hücrelerin membranlarında bulunan lipidlerden nonenzimatik yolla oluşabilir (87,88).

Bunun yanı sıra vasküler komplikasyonları gelişmiş diyabetik vakalarda, LDL oksidasyonunda da hiperglisemiye bağlı bir artış gösterilmiştir. Bunlara ek olarak protein oksidasyonu da gösterilmiş olup özellikle myelin, elastin ve kollajende gerçekleşen oksidasyon olayları sonucunda ateroskleroz, katarakt, anjiyopati ve nefropati gibi diyabetik komplikasyonların oluştuğu düşünülmektedir (89,90).

#### **2.4. Diyabet ve Endotel Disfonksiyonu**

Kardiyovasküler hastalıklar, diyabetik hastalarda en önemli morbidite ve mortalite nedenidir. Diyabetik hastalarda kardiyovasküler olay riski, diyabetik olmayanlara göre 2-4 kat daha fazla vardır (3). Diyabetes Mellitus'a bağlı damarlarda meydana gelen bu değişimler, tutulan damarın büyüklüğüne göre, mikro veya makroanjiyopati olarak adlandırılır. Böbrek damarlarının tutulumuna renal mikroanjiyopati denir ve diyabetik nefropatide önemli rol oynar. Aynı şekilde retinal mikroanjiyopatiye de diyabetik retinopatiye, vaso nervorumların mikroanjiyopatisi ise diyabetik nöropatiye sebep olur. Diyabetik

hastalardaki makroanjiyopati ise aterosklerozun ileri bir şekli olup, koroner, karotis ve periferik arterleri etkileyerek miyokard enfarktüsü riskini artırır, inme ve diyabetik ayak gelişimine neden olur (5,6).

Diyabetes Mellitus'ta gelişen mikrovasküler anjiyopatilerde en önemli etken yüksek kan şekeri (11). Bunun yanı sıra obezite, tansiyon yüksekliği, sigara, hiperkolesterolemi, dislipidemi gibi faktörler de mikroanjiyopatiye neden olabilmektedir. Makroanjiyopatide ise kan şekeri yüksekliğinden ziyade mikroanjiyopatiye de neden olabilen diğer risk faktörleri ön plana çıkmaktadır. Bu risk faktörleri inflamasyon ve endotel disfonksiyonuna ve bunun sonucu olarak damar duvarında ilerleyici bir hasarına yol açar. Mikro ve makroanjiyopati oluşumunda endotel disfonksiyonun öneminin ortaya konmasını takiben yapılan çalışmalar bu konuya odaklanmıştır (14).

Endotel, basitçe damar iç katmanı olup damar fonksiyonlarının düzenlenmesinde anahtar rol oynamaktadır (91). Endotelin herhangi bir nedenle oluşan hasara bağlı fonksiyon görememesine endotel disfonksiyonu denir. Hiperkolesterolemi, dislipidemi, sigara kullanımı ve diyabet gibi faktörler endotel disfonksiyonuna neden olabilecek risk faktörleri arasındadır (92). Diyabetik olgularda gelişen retinopati, nefropati ve ateroskleroz gelişimi endotel disfonksiyonuyla ilişkilidir (93).

Yüksek yağlı diyet (HFD), hiperkolesterolemi oluşturarak arter duvarlarında kolesterol depolanmasına yol açabilir (94,95). Yağlı dejenerasyon (ateroz) ve damar daralması (skleroz) birlikteliğinin bir sonucu olarak ateroskleroz oluşmaktadır. Aterosklerozun endotele bağlı vazodilatasyonu deneysel hayvan modellerinde (96-99) ve insanlarda (100, 101) bozduğu gösterilmiş olup vazokonstrüksiyona ve damar spazmına yol açabileceği düşünülmektedir. Pek çok çalışma vasküler gevşeme yanıtının endotelden kaynaklanan relaksasyon faktörü (EDRF) aracılığıyla olduğunu göstermiştir (102,103,104). Daha sonraları EDRF'nin nitrik oksid (NO) ile aynı madde olduğu bildirilmiştir (105).

Endotel disfonksiyonunun patofizyolojisi karmaşıktır ve çeşitli mekanizmalar yoluyla oluşabilir. Bu mekanizmalardan belki de en önemlisi endotelden NO salınımında azalmadır (106). NO endotelden salınan en

önemli vazodilatatör maddedir. Vazodilatasyon yanında düz kas hücrelerinin büyümesini ve inflamasyonu inhibe eder, aynı zamanda plateletler üzerinde antiagregan etkileri de vardır. NO düzeylerinde azalmanın endotel disfonksiyonu ile ilişkili olduğu pek çok çalışmada rapor edilmiştir. Bu durum endotelyal NO sentetaz (eNOS) enziminin aktivitesinin azalmasından veya NO'nin biyolojik aktivitesinde azalmadan kaynaklanabilir. Serbest oksijen radikallerinin (SOR) NO ile reaksiyona girerek peroksinitrit oluşumuna neden olduğu, bu sitotoksik oksidanın da proteinlerin nitrasyonu yoluyla hücreyel proteinlerin fonksiyonunu bozarak endotel disfonksiyonuna yol açtığı bilinmektedir. Peroksinitrit, düşük dansiteli lipoprotein (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'nin aktivitesini azaltır. C reaktif proteinin (CRP) de eNOS aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (106).

Hipertansif hastalarda oksidatif stres NO düzeylerini azaltır ve endotel bağımlı vazodilatasyonun bozulma derecesi ile pozitif korelasyon gösterir. Kronik renal yetmezlikli hastalarda da oksidatif stres belirteçlerinin endotel fonksiyonları ile negatif korelasyon gösterdiği saptanmıştır. SOR nin ayrıca apoptozise yol açarak endotel hasarını tetiklediği düşünülmektedir (106).

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. Hiperkolesterolemik bireylerde ADMA düzeylerindeki artış ile endotele bağımlı vazodilatasyon arasında negatif

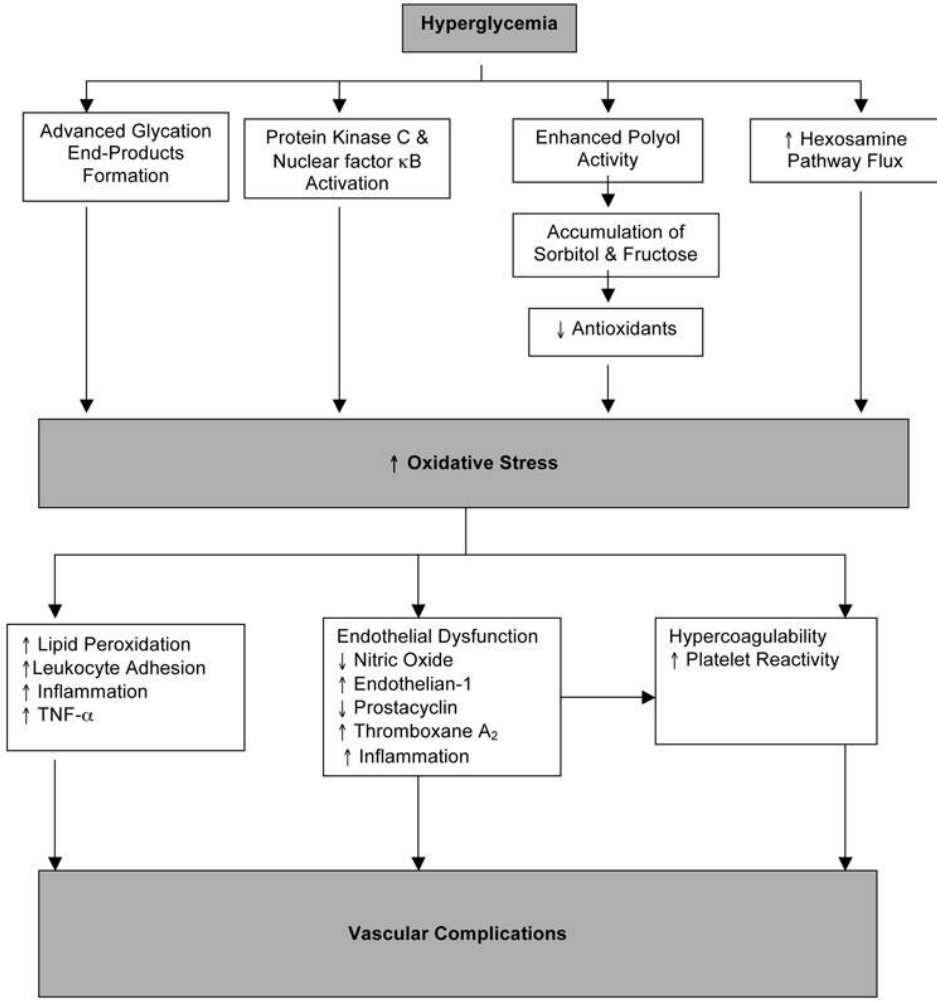
korelasyon bulunmuş, eNOS enziminin substratı ve ADMA'nın kompetitif inhibitörü olan L-arjinin infüzyonunun endotel fonksiyonlarını düzelttiği gösterilmiştir (106).

Diyabette endotel disfonksiyonu, vazokonstrüksiyon ve vazodilatasyon arasında dengesizlikle kendini gösterir. Büyük boy arterlerde NO, endotele bağlı gevşemede ana rolü üstlenmektedir (102). NO'nun anormal üretimi ya da yanıtının diyabette görülen vasküler ve endotelial disfonksiyona katkıda bulunmaktadır.

NO, nitrik oksit sentaz (NOS) aracılığıyla, L-arjinin amino asidinin guanido nitrojeninin oksitlenmesi sonucu oluşur. Stabil olmayan bir madde olup nitrit ve nitrate indirgenir. Sentez için nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), kalmodulin, oksijen ve kofaktör olarak hem, flavin, mononükleotid, flavin adenin dinükleotid ve tetrahidrobiopterin gereklidir (107).

NO sentezine aracı olan NOS enziminin nöronal, endotelyal ve immünolojik olmak üzere üç farklı izoformu vardır. Bunlardan nöronal ve endotelyal izoformlar, yapısal NO-sentaz (cNOS) şeklinde isimlendirilmiştir (107).

Hiperglisemi, NO oluşumu ve fonksiyonunu etkiler; ayrıca süperoksit oluşumunu artırmaktadır (şekil 2.2). Diyabetik endotel disfonksiyonuna süperoksit ( $O_2^-$ ) ve NO üretimi arasındaki dengesizliğin yol açtığı düşünülmektedir (108). Süperoksit, nitrik oksidi peroksinitrite dönüştürerek inaktive eder ve NO oluşumu ve biyoyararlanımı azaltır. Diyabetin vasküler komplikasyonlarının tedavisinde hedef, NO oluşumu ve biyoaktivitesini arttırmak ve reaktif oksijen radikallerinin oluşumu azaltmak olmalıdır.



**Şekil 2.2 Diyabetes Mellitus'ta Oksidatif Stres ve Vasküler Komplikasyonlar** (Eric L. Johnson, *Diabetes: An Old Disease, a New Insight*)

Diyabetik sıçanlarda koroner arterlerde, asetilkolinle oluşan damar gevşemesindeki düşüşlerin, plazma NO seviyelerinde ve eNOS protein ekspresyonundaki azalma ile birlikte olduğu gösterilmiştir (109). Streptozotosinle diyabet oluşturulmuş sıçanların torasik aortlarında benzer bir sonuç elde etmiştir (110). Endotelial NOS, endotelde NO sentezini sağlamaktadır. İnsülin rezistans ve diyabetik sıçanlarda endotelial NO sentezi ve vazodilatasyon önemli ölçüde bozulmuştur (111,109). Bir başka çalışmada diyabetik sıçanlarda eNOS ekspresyonu azaldığı gösterilmiştir (112).

Diyabetik komplikasyonların oluşumunda iki temel mekanizma vardır; bunlardan biri polyol yolağı, diğeri ise nonenzimatik glikozilasyondur. Kronik hiperglisemi non-enzimatik glikozilasyonu ile ilerlemiş glikasyon son ürünleri (advanced glycation end products, AGE) oluşumu ve birikimine neden olur. AGE birçok diyabet komplikasyonunda rol alır. Makrofaj ve monositlere AGE'nin yapışmasında artışla destrüktif hücrelerin stimuluslara duyarlılığı artar ve çok fazla sitokin salınımında artış olur. Hiperglisemik ortamda kapiller bazal membranında kalınlaşma oksijen difüzyonunda, metabolik atık eliminasyonunda, PMN migrasyonu ve antikor difüzyonunda bozulma olabilir. Vasküler endotel hücrelere AGE'nin bağlanması koagülasyonu indükler, bu da vazokonstriksiyon, mikrotrombüs oluşumuna dolayısıyla doku perfüzyonunda bozulmaya neden olur. AGE oluşumu ile hemoglobin, plazma albumin, lens proteinler ve lipoproteinler gibi proteinler fonksiyonlarını değiştirir. Bu nedenle kan glukoz seviyesini normal seviyede tutmak diyabetin kontrolü için önemlidir. Bu kontrolün etkinliğinin ölçümü glikozile alfa hemoglobin (HbA1c) ile yapılır.

Polyol yolunda ise glikoz sorbitole ve sonra fruktoza aldoz redüktaz ve sorbitol dehidrogenazı kullanarak okside olur. NADPH oksidasyonda kofaktör olarak kullanılır. NADPH fazla kullanılırsa hücre homeostazisine zarar verici etkisi olur. Redoks dengesini değiştirir ve hücre içi oksidatif strese neden olur. Oksidatif stres reaktif oksijenler ve antioksidanların üretimi arasındaki dengenin bozulmasıdır ve doku hasarına neden olur. Oksidatif stres insülin direncini artırır. Hiperglisemi oksidatif stresin oluşmasında önemli bir faktördür.

Fazla glikoz, reaktif oksijen türlerinin aktivasyonunu artan AGE oluşumu ve plazma membran NADPH oksidaz aktivasyonu ile sağlar. Diyabetes Mellitus'ta vasküler NADPH oksidazın etkinliği ve ekspresyonu artmaktadır (113). NADPH oksidaz diyabetli kişilerde veya hiperglisemili durumlarda reaktif oksijen türlerinin önemli kaynağıdır. NADPH fagositik ve fagositik olmayan hücrelerde (endotel h., fibroblast, adipositler) bulunur.

Endotel disfonksiyonuna yol açan başka bir faktör de hiperhomosisteinemidir. Homosistein düzeyi yüksek olan normotansif

bireylerde endotel fonksiyonlarının bozulmuş olduğu görülmüştür. Kronik renal yetmezliği olan çocuklarda folik asit verilmesi homosistein seviyelerini düşürerek endotel disfonksiyonunu düzeltmiştir (106).

## **2.5. Selenyum ve Diyabet Üzerine Etkileri**

Selenyum antioksidan özellikte esansiyel iz elementtir (114). Selenyumla yapılan ilk çalışmalarda selenyumun spermatogenez sürecinde normal büyüme ve çoğalma için gerekli olduğu gösterilmiştir (115). Bunun yanı sıra eksikliğinde oluşan oksidatif hasara bağlı, Çin'de endemik fatal bir kardiyopati olan Keshan hastalığı (116) ve uzun süreli selenyumdan yoksun, parenteral beslenmeye bağlı hastalarda müsküler distrofiler (117) tanımlanmıştır. Bu dönemlerde yapılan diğer çalışmalar, E vitaminin selenyum eksikliğinde kısmen de olsa yerine koyma tedavisinde faydalı olabileceğini göstermiştir.

Selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz ve diğer selenoproteinlerin yapısında yer almaktadır (118, 119). İnsanlarda glutatyon peroksidaz ve trioredoksin redüktaz gibi antioksidan enzimlerin yapısına kofaktör olarak katılmaktadır. Glutatyon peroksidaz enzimi hidrojen peroksiti indirger ve süperoksit dismutaz ve katalaz ile birlikte organizmada hücrel antioksidan savunma sistemini oluşturur. Antioksidan savunma, reaktif oksijen radikallerinin lipid peroksidasyonu oluşturmasını ve hücre içinde makromoleküllerle reaksiyona girmesini önler (120, 121).

Selenyumun antioksidan özelliğine bağlı olarak kanser, inflamatuvar hastalıklar, tiroid fonksiyonu, karaciğer nekrozu, kardiyovasküler hastalık, nörolojik hastalıklar, yaşlanma, infertilitede de koruyucu etkisi olduğu son yıllarda yoğunluk kazanan çalışmalarda saptanmıştır (122-125). Selenyum tedavisinin kemoterapi uygulanan hastalarda verildiği durumlarda immün uyarıcı etkileri olduğu gözlenmiştir. Selenyum kanser için yalnızca koruyucu değil, aynı zamanda kanserin başlangıç fazında tümör gelişimini durdurucu etkiye de sahiptir (122,125).

Selenyum insan diyetinde hayvansal kaynaklı selenosistein ve bitkisel kaynaklı selenometiyonin olmak üzere iki formda bulunmaktadır. 900 mg/gün üzerinde toksik etkiler göstermektedir. İnorganik tuz formları, sodyum selenit



(selenyum oksidasyon derecesi +4) ve sodyum selenattır (selenyum oksidasyon derecesi +6). Antioksidan özelliği nedeniyle özellikle oksidatif strese bağlı diyabet gelişimine karşı önemli olduğu düşünülen bir elementtir. Bazı çalışmalarda tip 2 diyabet riskini arttırdığı da öne sürülmüştür (126).

Yapılan çalışmalarda selenyumun inorganik formu olan selenatin, diyabette çeşitli faydaları gösterilmiştir (127-133). İn vivo ve in vitro insülin mimetik özelliktedir. Bu etkiye muhtemelen insülin sinyal yolundaki tirozin kinazın uyarılması sonucunda neden olabilmektedir. Selenyum hücrelere glukoz alımını arttırmaktadır.

Selenatin rat adipositlerinde, doza bağlı glukoz transportunu arttırdığı gösterilmiştir (134). Selenyum glukoz transport aktivitesini glukoz taşıyıcılarının translokasyonu, cAMP fosfodisteraz aktivite ve ribozomal S6 protein fosforilasyonu aracılığıyla yapmaktadır (134). Bunun yanı sıra selenyum, streptozotosinle diyabet oluşturulmuş sıçanlarda, insülin seviyelerindeki değişikliklerden bağımsız olarak, glikoliz ve glikoneogenezde rol oynayan çeşitli enzimlerin fonksiyonlarını düzenlemektedir (135, 136).

Selenat uygulaması, tedavi edilmemiş diyabetik sıçanlarda artmış sol ventrikül basıncını hemen hemen kontrolle aynı olacak şekilde düzeltmektedir (137). Diyabetes Mellitus'ta hücrede antioksidan aktivite ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz seviyeleri düşmektedir. Selenat insülin-mimetik etki gösterir ve selenat tedavisi G6PD seviyeleri kontrolün % 80- 90'ına kadar düzelir (138). Selenat, insülin sinyal yolunda insülin reseptörünün b subünitinin fosforilasyonunu stimüle eder (139). Ek olarak selenat, epidermal büyüme faktörü fosforilasyonunu ve çeşitli yerlerde kinaz aktivitelerini stimüle etmektedir (140). Son yıllarda yapılan çalışmalarda selenyumun hücre büyümesi, transkripsiyon faktörleri ve apoptoz üzerinde de etkileri olabileceği bildirilmiştir (125).

### III. GEREÇ-YÖNTEM

#### 3.1. Ratlarda Deneysel Diyabet Modelinin Oluşturulması ve Tedavi

##### Uygulaması:

Çalışmaya deney hayvanı olarak yaklaşık 200-250 gr. 10- 12 haftalık aylık erkek wistar albino türü sıçanlar alındı. Deney hayvanları her grupta en az 7 hayvan olacak şekilde kontrol (K), tedavisiz diyabet grubu (HFD+ STZ), 180 µg/kg/gün selenyum tedavisi alacak diyabetik grup (HFD+ STZ+ SEL180), 300 µg/kg/gün selenyum tedavisi alacak diyabetik grup (HFD+ STZ+ SEL300) ve 500 µg/kg/gün selenyum tedavisi alacak diyabetik grup (HFD+ STZ+ SEL500) 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 (141). 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 (Contour TS-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 (142). Diyabetik gruptaki tüm streptozotosin uygulamalarına paralel olarak kontrol grubuna intraperitoneal sitrat tampon (pH:4.4, 0,25 ml/kg) enjeksiyonu yapıldı.

Tüm selenyum uygulamaları, diyabet modellerinin oluşumunu takiben, dört hafta süreyle, oral gavaj yoluyla, günlük 180 µg/kg , 300 µg/kg ve 500 µg/kg olacak şekilde yapıldı (143,144,145).

### **3.2. Damar Yanıtlarının İncelenmesi**

Deney hayvanları intraperitoneal üretan enjeksiyonu (780 mg/kg) ile anestezide alındı. Solunumdaki olası ani değişiklikler dikkatle gözlenerek ağrılı uyaranlara yanıt ortadan kalktığı zaman göğüs boşluğu açıldı ve torasik aorta izole edildi. Önceden hazırlanmış, %95 O<sub>2</sub> ve %5 CO<sub>2</sub> ile gazlandırılmış, soğutulmuş Krebs-Henseleit solüsyonu içerisinde (NaCl 119 mM, KCl 4,7mM, MgSO<sub>4</sub> 1,5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM, NaHCO<sub>3</sub> 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. Kalan parça RNA ekstraksiyonu için kullanıldı.

3-4 mm'lik aort halkaları, 37 °C de, sürekli %95 O<sub>2</sub> ve %5 CO<sub>2</sub> 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 yikanarak 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 ( $EC_{80}$  ve  $EC_{50}$ ) 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  $EC_{80}$  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  $EC_{50}$  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 ( $3500 \times g$ , 10 dakika,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) elde edilen serumların bir kısmı açlık kan glukozu, total kolesterol, trigliserid ve yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) tayini için kullanıldı.

Bir kısmı ise insülin, MDA ve NO 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 (146).

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 (146).

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 (146).

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

### **3.5 Serum ve Karaciğer Örneklerinde MDA Ölçümü**

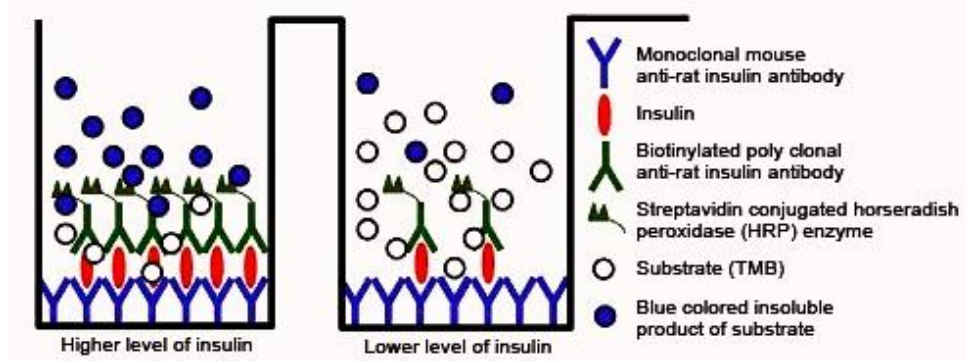
Deney hayvanlarından alınan kan örneklerinin serumlarında ve karaciğer homojenatlarında MDA düzeyi spektrofotometrik olarak ölçüldü. Bu amaçla 50 µl sodyum dodesil sülfat (SDS, %8.1)'a 100 µl serum veya doku homojenatı eklendi ve vortekslenip oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra 375 µl 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, vortekslenildi 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, doku için ise nmol/g 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 antikorları ile kaplı kuyucuklara tutunur ve yakalanan insüline biyotinlenmiş poliklonal antikorlar bağlanır. Yıkama işlemi ile bağlı olmayan kısım uzaklaştırılır. Böylelikle kuyucuklar içinde anti-rat insüline bağlı insülin ve insüline bağlı poliklonal antikorlar 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 absorban ölçümüyle tespit edilir. Ölçülen absorban farkı, plazma insülin konsantrasyonlarıyla doğru orantılıdır. Rat

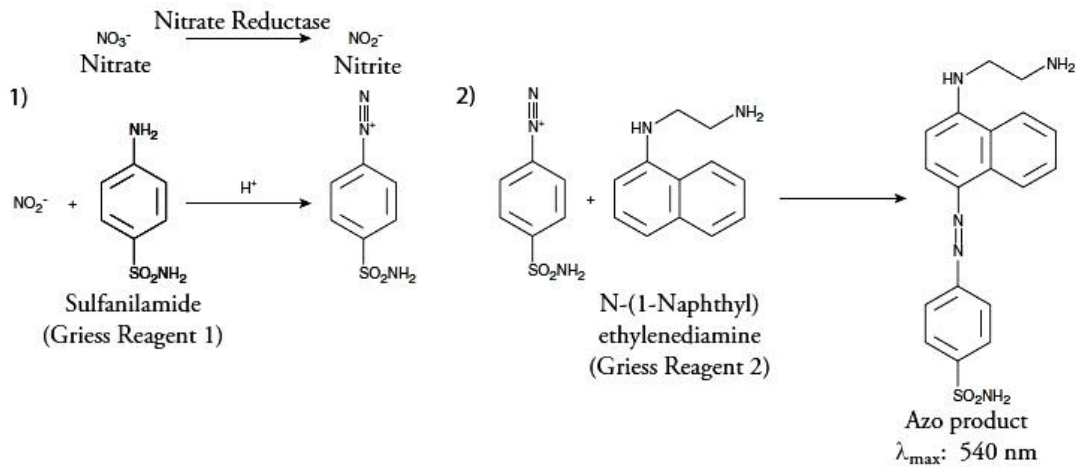
insülin standartları ile çizilen standart eğri grafiğinden çalışılan örneklerin insülin konsantrasyonları hesaplanır (147) (Şekil 3.1).



**Şekil 3.1 İnsülin Seviyelerinin Ölçüm Prensiibi**

### 3.7 Serum NO Seviyelerinin Ölçümü:

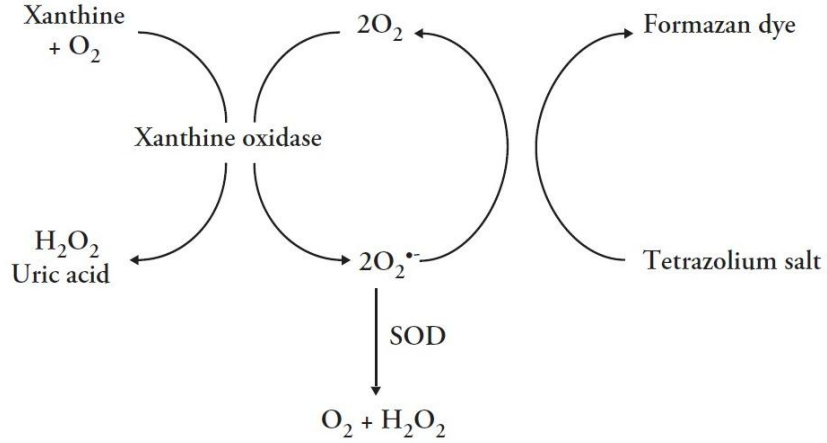
NO konsantrasyonu ölçümünde, nitrat/nitrit kolorimetrik test kiti (Cayman chemical, USA) kullanıldı. Bu test, nitratın nitrite, nitrat reduktaz ile çevrilmesini baz almaktadır. Nitrit, griess diazotizasyon reaksiyonu sonucu oluşan renkli bileşik ile tespit edildi ve miktar absorbanısı 540 nm olan spektrofotometri ile ölçüldü. NO standartları kullanılarak standart bir eğri elde edildi. Elde edilen NO değerleri bu standarta göre hesaplandı (148). (Şekil 3.2)



### Şekil 3.2 NO Seviyelerinin Ölçüm Prensipli

#### 3.8 Süperoksid Dismutaz Aktivitesi Ölçümü:

Deneyde kullanılan grupların karaciğer homojenatlarında süperoksid dismutaz (SOD) aktivitesi ölçümü yapıldı ve bunun için süperoksid dismutaz assay kiti (cayman chemical, USA) kullanıldı. Bu yöntemde ksantin-ksantin oksidaz (XOD) sistemiyle süperok-sit 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 subs-trat solüsyonu ile karıştırılır. 125µl ksantin oksidaz (80 U/ml) karışıma eklenerek absorbans artışı 505 nm'de 3 dakika izlenir.





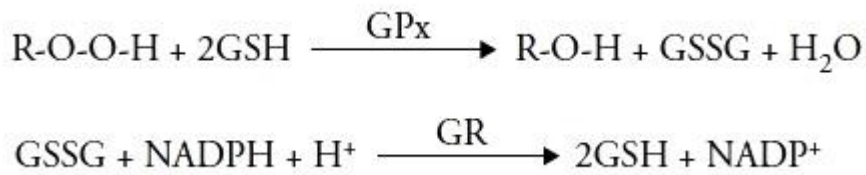
### Şekil 3.3 SOD Seviyelerinin Ölçüm Prensibi

#### 3.9 Katalaz Aktivitesi Ölçümü:

Deneyde kullanılan grupların karaciğer homojenatlarında katalaz (CAT) aktivitesi ölçümü yapıldı. Bu yöntemin esası doku homejenatlarına H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenerek katalaz tarafından su ve oksijene parçalanmasına dayanır. Bu olay ultraviyole spektrumunda absorbands azalması şeklinde ortaya çıkar ve bu azalma CAT enziminin aktivitesi ile doğru orantılıdır. Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 240 nm'de maksimum absorbands verir. Fosfat tamponuna göre 240 nm dalga boyunda sıfırlanan köre karşı H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisinin absorbandsı 0.500'e ayarlanır. Kör tüpüne 2.99 ml fosfat tamponu ile 0.01 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi, numune tüpüne 2.99 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi ile 0.01 ml örnek ilave edilerek quartz küvete konur ve absorbands okunur.

#### 3.10 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. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (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 3.3 GPx Seviyelerinin Ölçüm Prensipleri**

Bu yöntemde 50 mmol/L TRIS tamponunda (pH 7.6) hazırlanan 1 mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA, 2 mmol/L indirgenmiş glutatyon, 0.2 mmol/L NADPH, 4 mmol/L sodyum azid ve 1000 U glutatyon 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 absorbansların azalışı kaydedilir (146).

#### **3.11 NADPH oksidaz , Endotelial Nitrik oksit sentaz (eNOS) Genlerine Ait Ekspresyon Analizleri:**

Ratlara ait toraksik aortadan tripure izolasyon reagent kiti kullanılarak RNA izolasyonu yapıldı. Bu yöntemde doku bisturi yardımıyla ufaltılır. Green Beads tüplerin içine aktarılır. Tüplere 1 ml tripure eklenir ve tüpler MAGNA Lyser Homojenizatörde 45 saniye 4500 rpm' de döndürülür. Böylece tüpteki beadslerinde yardımıyla doku homojen bir görünüm alarak parçalanır ve tripure reagent etkisiyle de pembe bir renk görünümünü alır. Homojenizatörden çıkarılan tüpler cihazla birlikte gelen cooling block' a alınır ve 2 dakika bekletilir. 5 dakika oda ısısında bekletilir. Tüplere 200 µl kloroform eklenir ve 5 dakika beklenir. 12.000 g' de 4 °C'de 20 dakika santrifüj yapılır. Santrifüj sonunda 3 faz oluşur:

- 1.faz (sulu faz): RNA içerir (renksizdir).
- 2.faz: DNA içerir (beyaz renklidir).
- 3.faz: (organik faz): Protein içerir (kırmızı renktedir).

RNA izolasyonu için renksiz olan 1.faz yeni tüpe aktarılır. Yeni tüpe 500 µl izopropanol eklenir. Oda ısısında 10 dakika inkübe edilir. İzopropanol RNA' yı DNA ve diğer safsızlıklardan arındırmak için kullanılır. 12.000 g' de 4 °C'de 10 dak santrifüjlenir. Süpernatant atılır. Oluşan çökelek üzerine 1 ml %75 etanol eklenir. 7.500 x g' de 4 °C'de 5 dakika santrifüjlenir. Santrifüj sonunda

süpernatant atılır. 57°C'de etanol uçurulur. Kalan çökeleğe 50-100 ul RNase free su eklenerek pipetaj yapılır.

Elde edilen RNA örnekleri RT-PCR( Reverse Transkriptaz-PCR ) yöntemi ile komplementer DNA (c-DNA) 'ya çevrildi. cDNA sentezi için bir PCR tüpüne 8µl RNA örneği, 2 µl GE( 5Xg DNA Elimination buffer) konularak PCR cihazına yüklenir. 42 °C'de 5 dakika inkübe edilir. Başka bir PCR tüpünde 4µl BC3 (5XRT Buffer 3), 1 µl P2( Primer X External Control mix), 2 µl RE3 (RT Enzyme Mix 3), 3 µl H2O den oluşan PCR kokteyli hazırlanır. PCR kokteyli PCR cihazından çıkan PCR tüpüne eklenir ve PCR tüpü tekrar cihaza yüklenir. 42 °C'de 15 dakika, 95°C'de 5 dakika inkübe edilir.

Elde edilen cDNA örnekleri hedef genlerin ekspresyonunu tesbit etmek amacıyla Real-Time PCR cihazına yerleştirilir. Bunun için her bir örnek başına Sybergreen Mix'den 25 µl, Primer forward (10 pmol)'den 3 µl, Primer reverse (10 pmol)'den 3 µl alınır 5 µl cDNA eklenerek reaksiyon karışımı hazırlanır. Bu karışıma toplam volüm 50 µl'ye tamamlanacak şekilde dH2O eklenilir. Tüm karışım hazırlama işlemleri buz üzerinde gerçekleştirilir. Her bir örnek için hazırlanan bu PCR karışımları amplifikasyon için cihazın platine yüklenerek amplifikasyon program başlatılır. Amplifikasyon programı 95°C'de 5 dakika, 94°C'de 1 dakika, 61°C'de 40 saniye, 72°C'de 1 dakika ve son üç sikusun 40 kere tekrarlanması ve son uzama 2°C'de 2 dakika olarak uygulanır. PCR şartları çalışmaya göre optimize edilir. Reaksiyonda G6PDH geni endojen kontrol olarak kullanılmıştır.

Ekspresyon miktarı ölçmek için bir endojen kontrolle normalizasyon yapıldı. Standart eğriler hem hedef hem de endojen referans için hazırlandı. Her bir deneysel örnek için, hedef ve endojen referansın miktarı uygun standart eğriden tanımlandı. Sonra hedef miktar normalize edilmiş bir hedef değer elde etmek için endojen referans miktarına bölünerek hesaplandı. Tüm veriler gliseralaldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GADPH)'a göre normalize edildi.

### 3.12 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.

## IV. BULGULAR

### 4.1 Deney Hayvanlarının Genel Bulguları:

Deneylerde kullanılan sıçanlara tüm uygulamalar eş zamanlı olarak yapıldığından hayvanlardaki bir takım değişikliklerin gözlemsel ve basit ölçümlerle karşılaştırmalı olarak yapılması olanağı doğmuştur. 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, deneyin bitişi ile tedavi başlangıcı (5.hafta) 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 tedavisiz diyabetik grup da dahil olmak üzere tüm grupların deney sonu ağırlıkları başlangıç ağırlıklarına göre artmıştır. Gruplar arası kıyas yapıldığında deney sonunda tedavi almamış diyabetik gruptaki sıçanların diğer gruplara göre zayıf olduğu gözlemlenmiş olup bu ağırlık farkı, yalnızca düşük doz selenyum tedavisi alan grup ile 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<br>(Tedavi Sonrası)    |
|------------------------------------|---------------|----------------------------|------------------------------|
| <b>K (n=7)</b>                     | 233,57 ± 6,70 | 252,14 ± 6,97 <sup>a</sup> | 259,29 ± 6,49 <sup>a b</sup> |
| <b>HFD+ STZ (n=7)</b>              | 224,00 ± 5,62 | 230,29 ± 6,33 <sup>a</sup> | 242,14 ± 5,86 <sup>a b</sup> |
| <b>HFD+ STZ +SEL 180<br/>(n=7)</b> | 232,14 ± 5,75 | 260,43 ± 7,98 <sup>a</sup> | 288,14 ± 6,77 <sup>a d</sup> |
| <b>HFD+ STZ +SEL 300<br/>(n=7)</b> | 226,43 ± 9,17 | 236,43 ± 7,53 <sup>a</sup> | 264,14 ± 6,33 <sup>a b</sup> |
| <b>HFD+ STZ +SEL 500<br/>(n=7)</b> | 225,71 ± 9,47 | 251,43 ± 12,23             | 263,57 ± 12,80               |

Kontrol grubu (K), tedavisiz diyabet grubu (HFD+ STZ), selenyum 180 mikrogram/kg/ gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ +SEL 180), selenyum 300 mikrogram/ kg/ gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ +SEL 300), selenyum 500 mikrogram/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ +SEL 500) 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, <sup>a</sup> p< 0,05 aynı grubun başlangıç değerine, <sup>b</sup> p< 0,05 aynı grubun 5. hafta değerine ise, <sup>d</sup> p< 0,05 tedavisiz diyabetik gruba göre göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

Genel olarak deney hayvanlarının açlık kan şekerleri karşılaştırıldığında deney sonunda tedavi almış ya da almamış bütün diyabetik sıçanların açlık kan şekerlerinin kontrole göre anlamlı olarak yüksek olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte tedavi almış sıçanlarda açlık kan şekerinin, her üç grupta da, tedavi almamış diyabetik sıçanlara kıyasla anlamlı bir şekilde düşmüş olduğu görülmüştür. Bunun yanı sıra 4 haftalık yağlı yem diyetinin ve STZ enjeksiyonun ardından 5. haftada yapılan ölçümler göz önüne alındığında tüm gruplarda başlangıç açlık kan şekeri değerlerine göre bir artış olduğu gözlemlenmiştir.

**Tablo 4.2 Deney Hayvanlarının Açlık Kan Şekeri Değerleri**

| Açlık Kan Şekeri (mg/dl) | Başlangıç     | 5. Hafta                    | Bitiş (Tedavi Sonrası)            |
|--------------------------|---------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| K (n=7)                  | 70,57 ± 2,68  | 70,71 ± 2,73                | 69,29 ± 3,97                      |
| HFD+ STZ (n=7)           | 78,71 ± 2,70  | 438,57 ± 17,58 <sup>a</sup> | 528,14 ± 14,413 <sup>a b c</sup>  |
| HFD+ STZ+ SEL 180 (n=7)  | 77,86 ± 2,39  | 425,14 ± 39,29 <sup>a</sup> | 224,00 ± 39,19 <sup>a b c d</sup> |
| HFD+ STZ+ SEL 300 (n=7)  | 72,85 ± 3,00  | 309,71 ± 30,80 <sup>a</sup> | 216,51 ± 38,59 <sup>a b c d</sup> |
| HFD+ STZ+ SEL 500 (n=7)  | 72,429 ± 3,74 | 314 ± 32,30 <sup>a</sup>    | 292,71 ± 52,85 <sup>a c d</sup>   |

Kontrol grubu (K), tedavisiz diyabet grubu (HFD+ STZ), selenyum 180 mikrogram/kg/ gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ +SEL 180), selenyum 300 mikrogram/ kg/ gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ +SEL 300), selenyum 500 mikrogram/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ +SEL 500) 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, <sup>a</sup> p< 0,05 aynı grubun başlangıç değerine, <sup>b</sup> p< 0,05 aynı grubun 5. hafta değerine ise, <sup>d</sup> p< 0,05 tedavisiz diyabetik gruba göre göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

Elde edilen kantitatif verilerin yanı sıra deneyin bitişine kadar geçen uzun süreçte kafeslerde beslenen ve bakımı yapılan sıçanlarda bir takım değişiklikler gözlemsel olarak belirlenmiştir. STZ enjeksiyonunu takiben kan şekeri yüksekliği gelişen diyabetik sıçanlarda, tedavi almamış grupta deney sonuna kadar, tedavi almış gruplarda ise daha ziyade tedavi başlangıcında, bir takım cilt yaraları olduğu gözlemlenmiştir. Özellikle sıçanların gözlerinde ve karın kısımlarının yere temas eden bölgelerinde gözlemlenen bu yaraların, kontrol grubundaki sıçanlarda herhangi bir travmaya bağlı oluşmuş yaralara göre nispeten yavaş iyileştiği ya da iyileşmediği görülmüştür. Tedavi almamış diyabetik gruptaki sıçanlarda başlangıçta beyaz (albino) olan dış görünümün zamanla bazı bölgelerde, olası cilt altı kanama ya da zayıflamaya bağlı, gölgelendiği de gözlemsel bulgular arasındadır. Bunlara ek olarak

deney bitiminde tedavi almamış diyabetik gruptaki bazı sıçanlarda katarakt bulgusu olabilecek gözde matlaşma tespit edilmiştir (şekil 4.1, şekil 4.2).



**Şekil 4.1** Tedavi almamış diyabetik sıçan dış görünüş ve gözde matlaşma (1,3 MP samsung digital camera, Zeynep Öztürk)



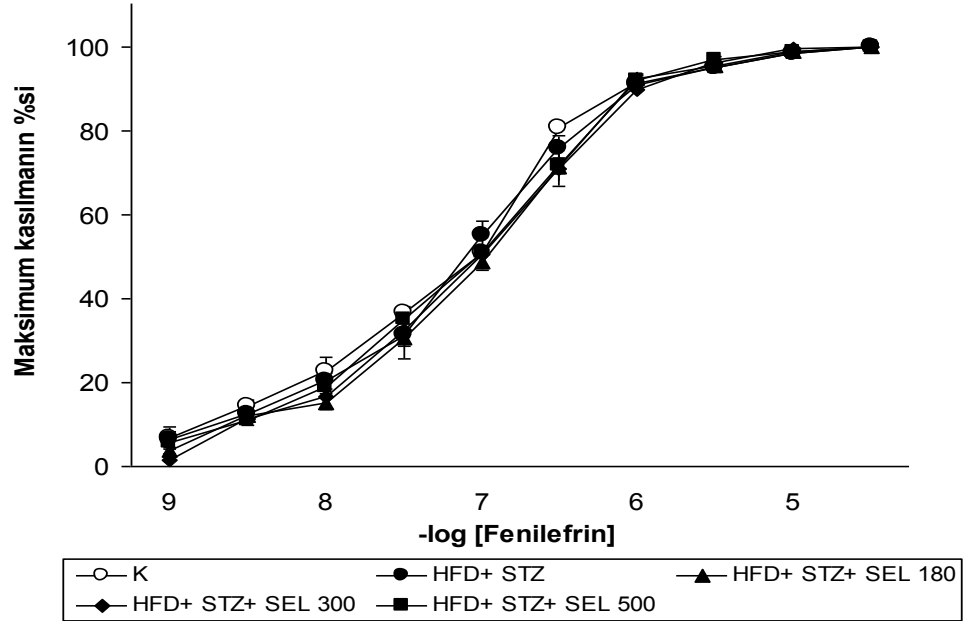
**Şekil 4.2** Kontrol sıçan dış görünüşü ( 1,3 MP samsung digital camera, Zeynep Öztürk)



#### 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.

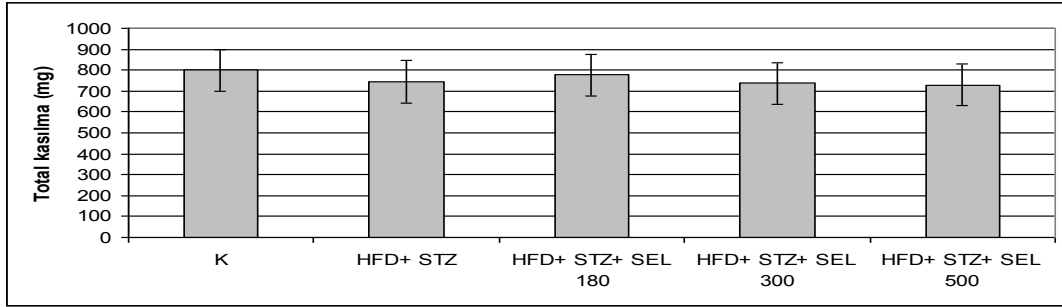
İzole edilen damar şeritlerinde fenilefrinle kasılma yanıtları logaritmik doz-yanıt eğrisinde gösterilmiş olup fenilefrinin herhangi bir dozunda gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 4.3) .



#### Şekil 4.3 Damar şeritlerinde fenilefrinle elde edilen kasılma yanıtları

Kontrol grubu (K), tedavisiz diyabet grubu (HFD+ STZ), selenyum 180 mikrogram/kg/ gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ+ SEL 180), selenyum 300 mikrogram/ kg/ gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ+ SEL 300), selenyum 500 mikrogram/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ+ SEL 500) olarak kısaltılmıştır. Değerler  $\pm$  SEM olarak verilmiş olup her grupta n= 7'dir.

İzole edilen damar şeritlerinde fenilefrinle total kasılma miktarları tüm gruplarda birbirine yakındır. Tedavi edilmemiş diyabetik grupta total kasılmada bir miktar düşüş gözlemlense de bu istatistiksel olarak anlamlılık göstermemektedir. (Şekil 4.4)



#### Şekil 4.4 Damar şeritlerinde fenilefrinle elde edilen total kasılma miktarları

Kontrol grubu (K), tedavisiz diyabet grubu (HFD+ STZ), selenyum 180 mikrogram/kg/ gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ+ SEL 180), selenyum 300 mikrogram/ kg/ gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ+ SEL 300), selenyum 500 mikrogram/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ+ SEL 500) olarak kısaltılmıştır. Değerler  $\pm$  SEM olarak verilmiş olup her grupta n= 7'dir.

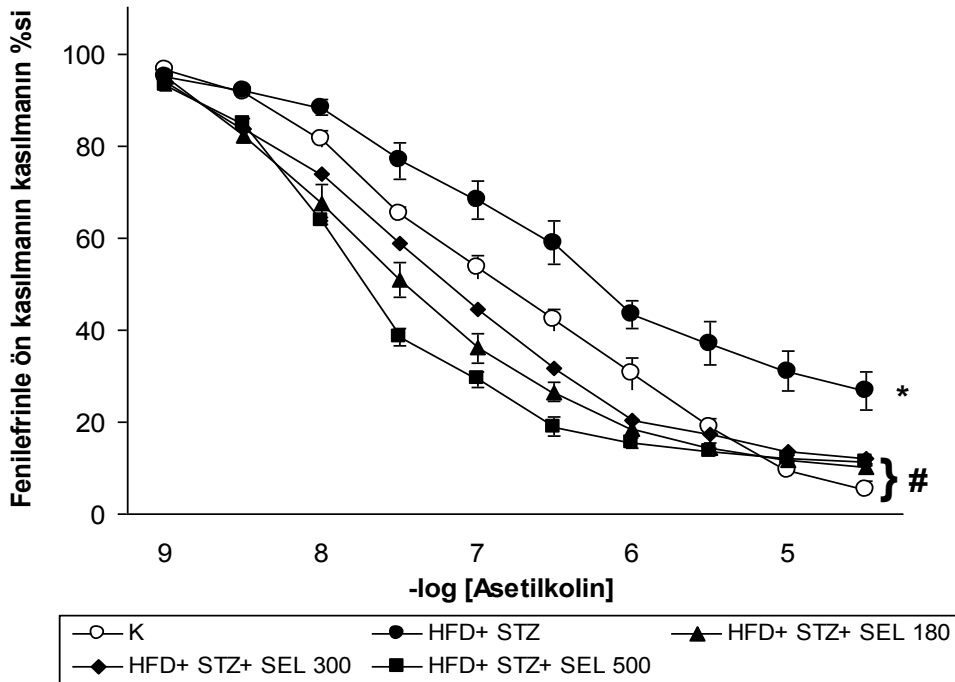
Yapılan damar çalışmalarından elde edilen verilerden hesaplanan, fenilefrine ait  $EC_{50}$  ve  $pD_2$  değerleri de Tablo 4.3'de verilmiştir. Bu değerler incelendiğinde de gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemektedir.

**Tablo 4.3 Fenilefrinin  $EC_{50}$  ve  $pD_2$  (-log  $EC_{50}$ ) değerleri**

|                         | $EC_{50}$         | $pD_2$            |
|-------------------------|-------------------|-------------------|
| <b>K</b>                | 0,6386 $\pm$ 0,18 | 7,2143 $\pm$ 0,16 |
| <b>HFD+ STZ</b>         | 1,1857 $\pm$ 1,06 | 7,0629 $\pm$ 0,38 |
| <b>HFD+ STZ +SEL180</b> | 1,2871 $\pm$ 0,71 | 7,0014 $\pm$ 0,32 |
| <b>HFD+ STZ +SEL300</b> | 0,8800 $\pm$ 0,90 | 7,0500 $\pm$ 0,05 |
| <b>HFD+ STZ +SEL500</b> | 0,8243 $\pm$ 0,48 | 7,1357 $\pm$ 0,25 |

Kontrol grubu (K), tedavisiz diyabet grubu (HFD+ STZ), selenyum 180 mikrogram/kg/ gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ+ SEL 180), selenyum 300 mikrogram/ kg/ gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ+ SEL 300), selenyum 500 mikrogram/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ+ SEL 500) olarak kısaltılmıştır. Değerler  $\pm$  SEM olarak verilmiş olup her grupta n= 7'dir

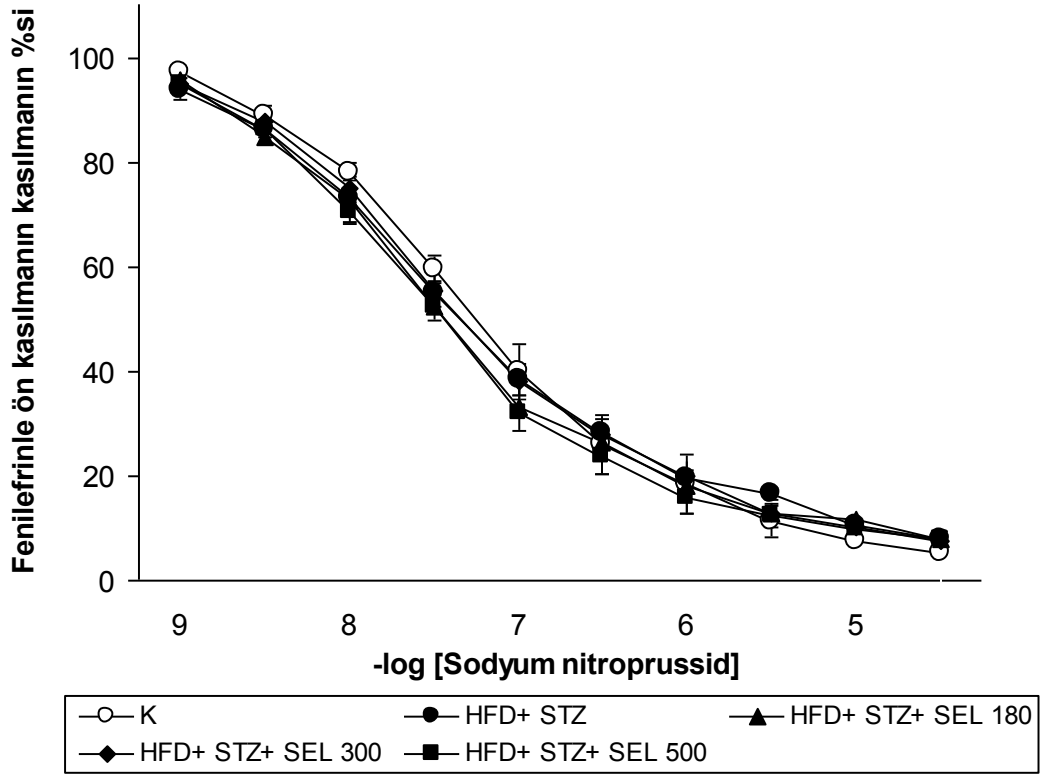
Fenilefrinin EC80 dozu ile ön kasılma sağlanmış damarlarda bakılan asetilkolinle elde edilen gevşeme yanıtları logaritmik doz-yanıt eğrisinde gösterilmiştir (Şekil 4.5). Gevşeme yanıtları genel olarak değerlendirildiğinde tedavi edilmemiş diyabetik grupta, diğer tüm gruplara göre, asetilkoline bağlı gevşemede bir azalma gözlenmiş olup bu istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur. Diğer bir deyişle tedavi almış diyabetik gruplarda, tedavi almamış diyabetik grupta gözlenen gevşeme yanıtının azalması gözlenmemiştir. Tedavi alan diyabetik grupların gevşeme yanıtları başlangıç dozlarında daha belirgin olmak üzere, bazı dozlarda kontrolle farklılık gösterse de asetilkolinle sağlanan total gevşeme yanıtı açısından kontrolle bu gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır.



**Şekil 4.5 Damar şeritlerinde asetilkolinle elde edilen gevşeme yanıtları**

Kontrol grubu (K), tedavisiz diyabet grubu (HFD+ STZ), selenyum 180 mikrogram/kg/ gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ+ SEL 180), selenyum 300 mikrogram/ kg/ gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ+ SEL 300), selenyum 500 mikrogram/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ+ SEL 500) olarak kısaltılmıştır. Değerler  $\pm$  SEM olarak verilmiş olup her grupta n= 7'dir. \* p< 0,05 diğer tüm gruplara göre , # p< 0,05 tedavisiz diyabetik gruba göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

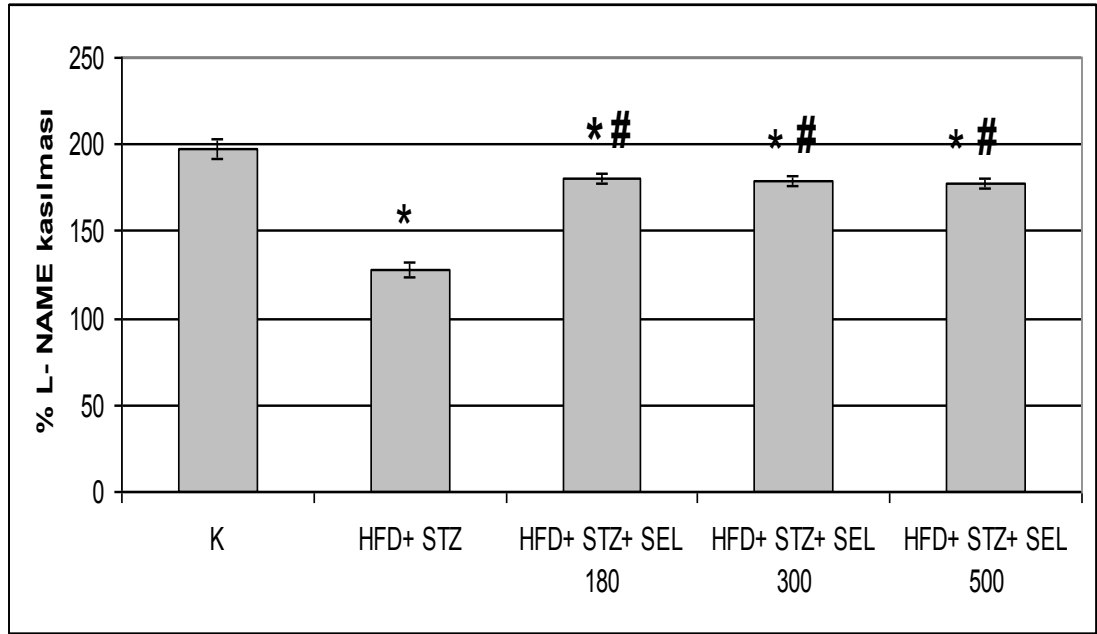
Fenilefrinin EC80 dozu ile ön kasılma sağlanmış damarlarda bakılan sodyum nitroprussid ile elde edilen gevşeme yanıtları logaritmik doz-yanıt eğrisinde gösterilmiştir (Şekil 4.6). Gevşeme yanıtları karşılaştırıldığında tüm gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemektedir.



**Şekil 4.6 Damar şeritlerinde sodyum nitroprussid ile elde edilen gevşeme yanıtları**

Kontrol grubu (K), tedavisiz diyabet grubu (HFD+ STZ), selenyum 180 mikrogram/kg/ gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ+ SEL 180), selenyum 300 mikrogram/ kg/ gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ+ SEL 300), selenyum 500 mikrogram/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ+ SEL 500) 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 amacıyla yapılmış tek doz L-NAME uygulamasına kasılma yanıtları, ön kasılmanın %'si olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.7). Tedavi almamış ve almamış diyabetik gruplarda L-NAME ile kasılma yanıtında anlamlı bir düşüş gözlenirken tedavi almış diyabetik gruplar ile tedavisiz diyabetik grup karşılaştırıldığında tedavi almış olan grupların kasılma yanıtlarında anlamlı bir artış söz konusudur.



**Şekil 4.7 Damar şeritlerinde L-NAME ile elde edilen kasılma yanıtları**

Kontrol grubu (K), tedavisiz diyabet grubu (HFD+ STZ), selenyum 180 mikrogram/kg/ gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ+ SEL 180), selenyum 300 mikrogram/ kg/ gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ+ SEL 300), selenyum 500 mikrogram/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ+ SEL 500) 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.

### 4.3. Deney Hayvanlarının Lipid Profiline Ait Bulgular:

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

**Tablo 4.4 Kan Örneklerinden Elde Edilen Lipid Değerleri**

|                         | <b>Total Kolesterol (mg/dl)</b> | <b>Trigliserid (mg/dl)</b> | <b>HDL-kolesterol (mg/dl)</b> | <b>LDL-kolesterol (mg/dl)</b> |
|-------------------------|---------------------------------|----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| <b>K</b>                | 25,14± 2,62                     | 38,57± 5,87                | 10,14± 1,33                   | 8,86± 0,91                    |
| <b>HFD+ STZ</b>         | 51,86± 4,41 <sup>c</sup>        | 139,00± 13,71 <sup>c</sup> | 13,00± 0,78 <sup>a</sup>      | 9,86± 1,20                    |
| <b>HFD+ STZ +SEL180</b> | 25,86± 1,16 <sup>d</sup>        | 50,57± 3,62 <sup>d</sup>   | 8,71± 0,64 <sup>d</sup>       | 7,29± 1,20                    |
| <b>HFD+ STZ +SEL300</b> | 35,14± 2,70 <sup>d</sup>        | 81,43± 9,70 <sup>c d</sup> | 11,14± 1,03                   | 7,71± 0,68                    |
| <b>HFD+ STZ +SEL500</b> | 29,14± 2,49 <sup>d</sup>        | 43,71± 7,57 <sup>d</sup>   | 12,57± 1,27 <sup>a</sup>      | 7,43± 1,34                    |

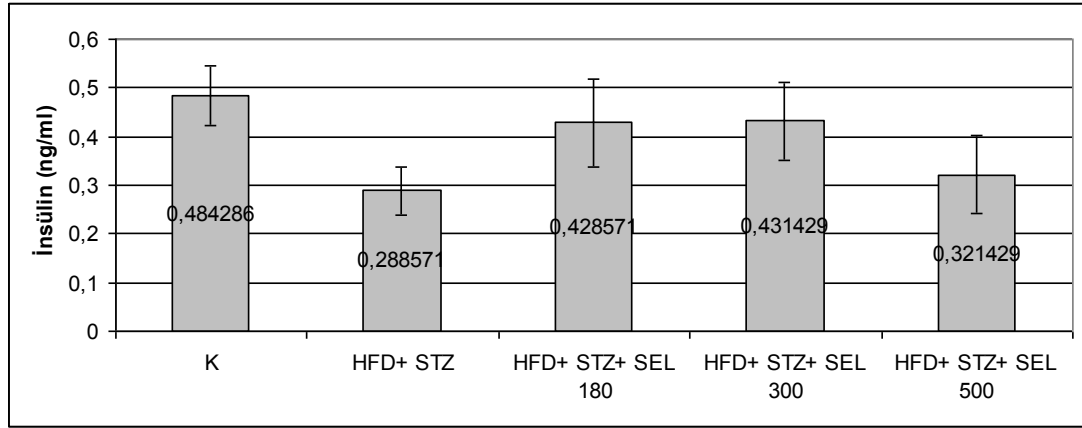
Kontrol grubu (K), tedavisiz diyabet grubu (HFD+ STZ), selenyum 180 mikrogram/kg/ gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ+ SEL 180), selenyum 300 mikrogram/ kg/ gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ+ SEL 300), selenyum 500 mikrogram/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ+ SEL 500) olarak kısaltılmıştır. Değerler ± SEM olarak verilmiş olup her grupta n= 7'dir. <sup>c</sup> p< 0,05 kontrole göre, <sup>d</sup> p< 0,05 tedavisiz diyabetik gruba göre, <sup>a</sup> p< 0,05 selenyum180 mikrogram/kg/ gün tedavi verilmiş diyabetik gruba göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

Buna göre tedavi almamış diyabetik grubun total kolesterol ve trigliserid değerleri diğer tüm gruplara göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Tedavi alan sıçanların hepsinde total kolesterol ve trigliserid değerlerinde, diyabete kıyasla anlamlı bir düşüklük söz konusudur. LDL-kolesterol değerleri açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmezken HDL- kolesterol düzeyleri düşük doz selenyum tedavisi alan grupta tedavisiz diyabetik gruba kıyasla anlamlı olarak azalmıştır. Genel olarak düşük doz selenyum tedavisi alan diyabetik grup hariç tedavili ve tedavisiz diyabetik gruplarda HDL-

kolesterol düzeyleri açısından kontrole göre bir yükselme gözlene dahi bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

#### 4.4. Deneysel Hayvanlarının İnsülin ve NO Seviyelerine Ait Bulgular:

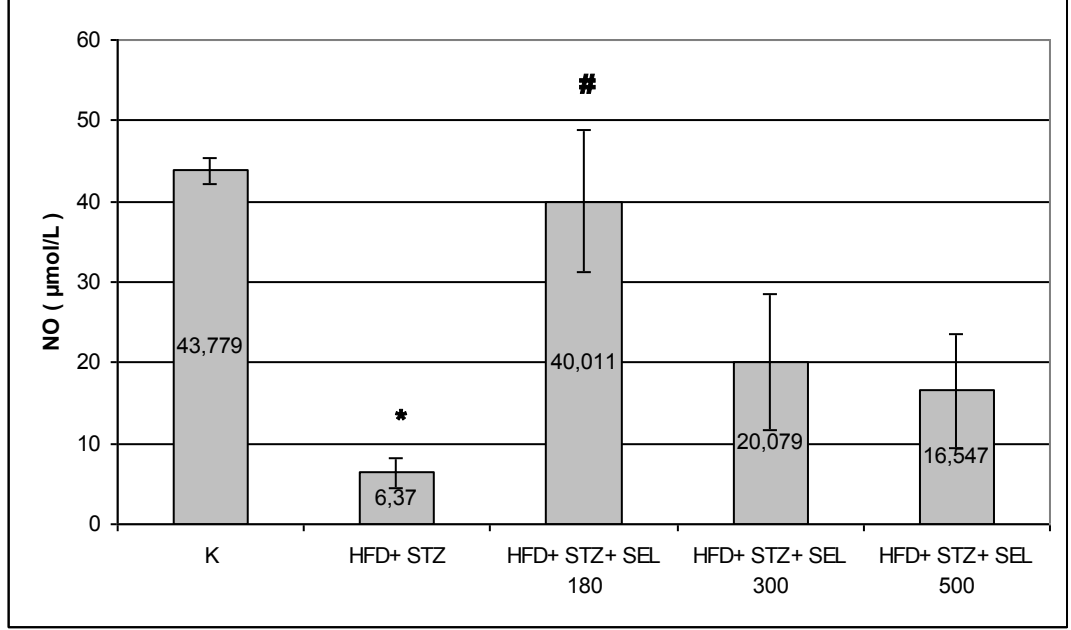
Deneysel alınan sıçanların serumlarında özel rat insülin kiti ile analiz edilen insülin değerleri şekil 4.8'de verilmiştir. Buna göre tedavi almamış diyabetik grubun insülin değerleri ortalama olarak diğer gruplara kıyasla bir miktar düşük olsa da bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. Sonuç olarak serum insülin değerleri açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır.



**Şekil 4.8 Serum insülin seviyeleri**

Kontrol grubu (K), tedavisiz diyabet grubu (HFD+ STZ), selenyum 180 mikrogram/kg/ gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ +SEL 180), selenyum 300 mikrogram/ kg/ gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ +SEL 300), selenyum 500 mikrogram/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ +SEL 500) olarak kısaltılmıştır. Değerler  $\pm$  SEM olarak verilmiş olup her grupta n=7'dir.

Deneysel alınan sıçanların serumlarında nitrit/nitrat kolorimetrik ölçüm kiti ile analiz edilen NO değerleri şekil 4.9'de verilmiştir. Buna göre tedavi almamış diyabetik grubun NO değerleri diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Tedavi almış diyabetik gruplarda ise NO seviyeleri açısından tedavi almamış diyabetik gruba göre bir yükselme mevcut olsa da yalnızca düşük doz selenyum tedavisi alan gruptaki yüksek NO değerleri istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir.



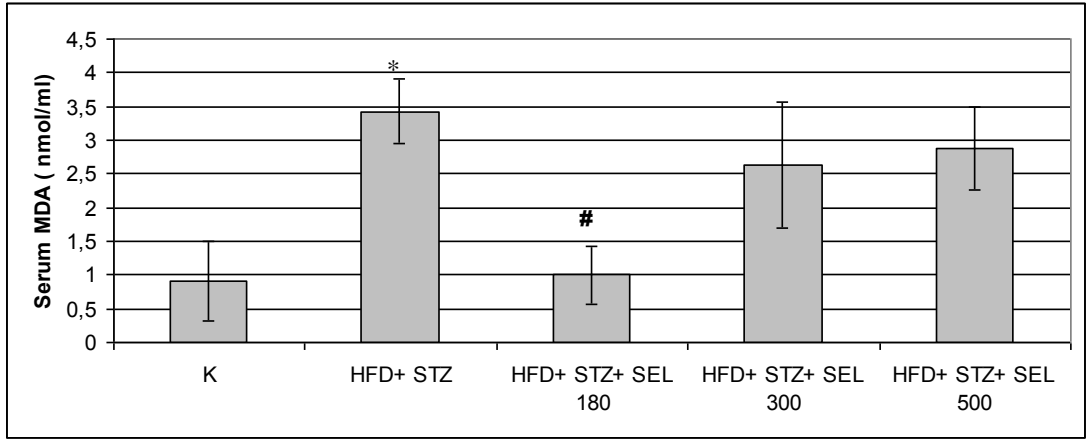
#### Şekil 4.9 Serum NO seviyeleri

Kontrol grubu (K), tedavisiz diyabet grubu (HFD+ STZ), selenyum 180 mikrogram/kg/ gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ +SEL 180), selenyum 300 mikrogram/ kg/ gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ +SEL 300), selenyum 500 mikrogram/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ +SEL 500) 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:

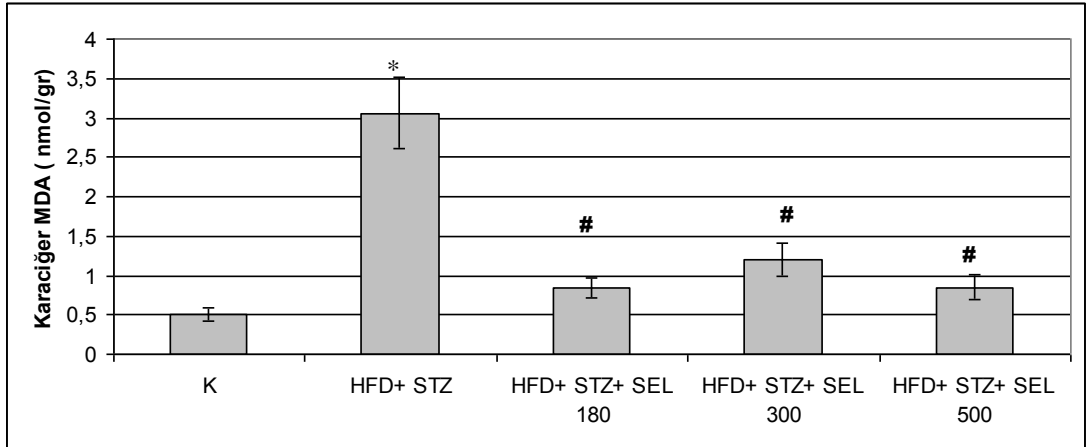
Deney hayvanlarının serumlarında ve karaciğer örneklerinde bakılan MDA düzeyleri Şekil 4.10 ve Şekil 4.11'de verilmiştir. Buna göre tedavi almamış diyabetik sıçanların serum ve karaciğer MDA düzeyleri kontrole göre anlamlı olarak yüksektir. Tedavi almış diyabetik sıçanların karaciğerlerinde ölçülen MDA seviyeleri tedavi almamış diyabetik sıçanlarınkiyle karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük bulunurken bu anlamlı farklılık, serum örneklerinde yalnızca düşük doz selenyum tedavisi almış sıçan grubunda görülmektedir.





**Şekil 4.10 Serum MDA seviyeleri**

Kontrol grubu (K), tedavisiz diyabet grubu (HFD+ STZ), selenyum 180 mikrogram/kg/ gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ +SEL 180), selenyum 300 mikrogram/ kg/ gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ +SEL 300), selenyum 500 mikrogram/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ +SEL 500) 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.

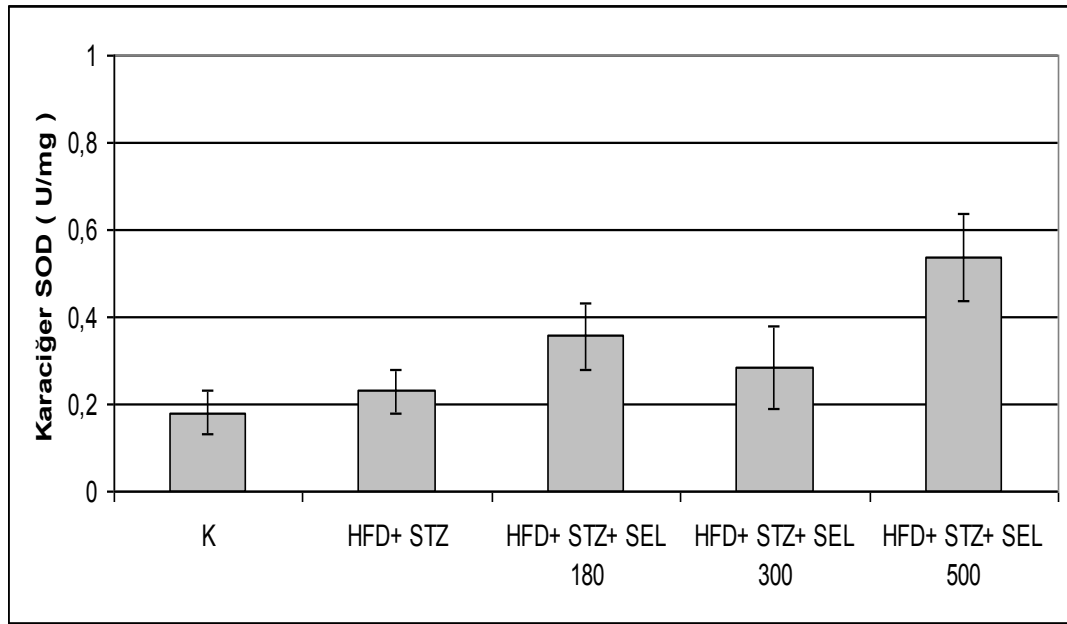


**Şekil 4.11 Karaciğer MDA seviyeleri**

Kontrol grubu (K), tedavisiz diyabet grubu (HFD+ STZ), selenyum 180 mikrogram/kg/ gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ +SEL 180), selenyum 300 mikrogram/ kg/ gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ +SEL 300), selenyum 500 mikrogram/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ +SEL 500) 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.

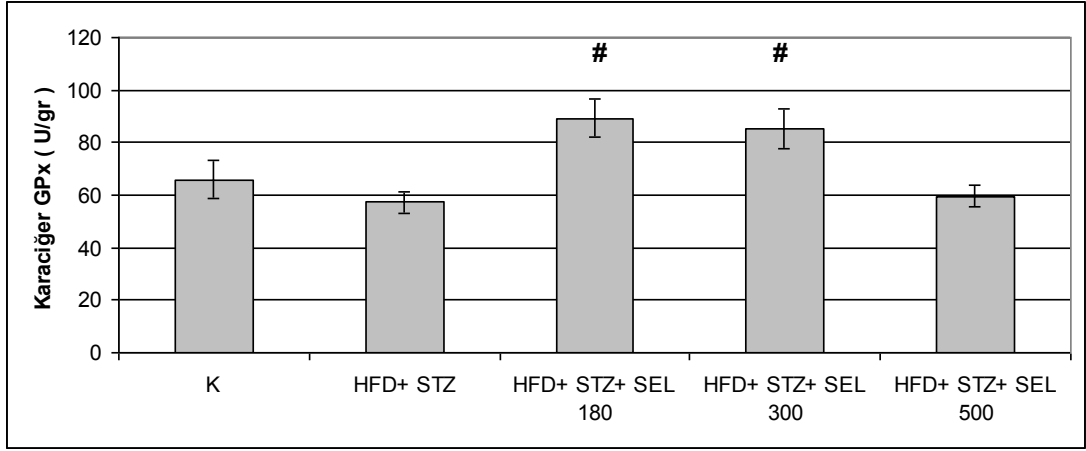
#### 4.6. Deneş Hayvanlarının Süperoksid Dismutaz, Katalaz ve Glutasyon Peroksidaz Seviyelerine Ait Bulgular:

Deneş hayvanlarının karaciğer örneklerinde bakılan süperoksid dismutaz, glutasyon peroksidaz ve katalaz düzeyleri Şekil 4.12, Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'de verilmiştir. Buna göre süperoksid dismutaz ve glutasyon peroksidaz değerleri açısından gruplar arasında bir farklılık gözlenmemiştir. Karaciğer katalaz seviyeleri karşılaştırıldığında ise tedavi almamış diyabetik grubun katalaz seviyelerinin kontrole göre anlamlı olarak arttığı, tedavi almış diyabetik grubun katalaz seviyelerinin ise tedavi almamış diyabetik gruba göre anlamlı olarak düşük olduğu görülmüştür.



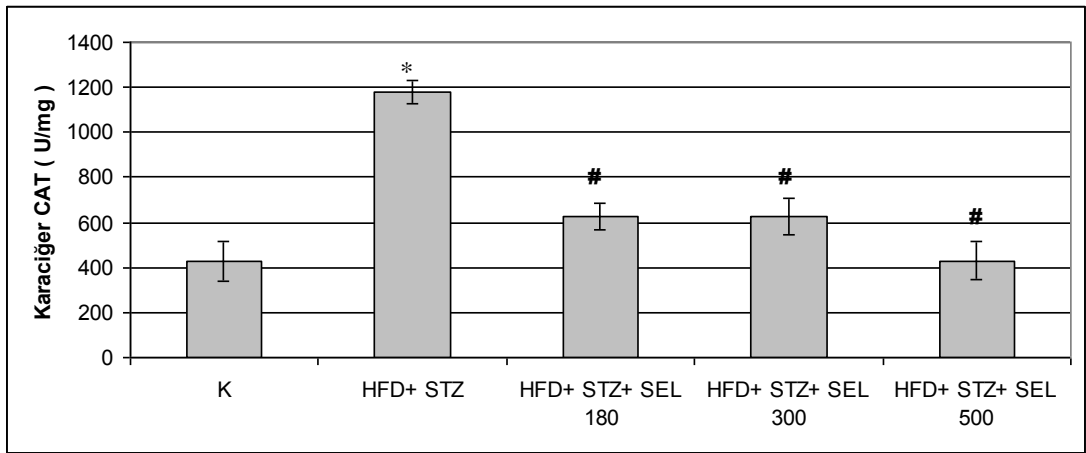
**Şekil 4.12 Karaciğer SOD seviyeleri**

Kontrol grubu (K), tedavisiz diyabet grubu (HFD+ STZ), selenyum 180 mikrogram/kg/ gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ +SEL 180), selenyum 300 mikrogram/ kg/ gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ +SEL 300), selenyum 500 mikrogram/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ +SEL 500) olarak kısaltılmıştır. Değerler  $\pm$  SEM olarak verilmiş olup her grupta n=7'dir.



#### Şekil 4.13 Karaciğer GPx seviyeleri

Kontrol grubu (K), tedavisiz diyabet grubu (HFD+ STZ), selenyum 180 mikrogram/kg/ gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ +SEL 180), selenyum 300 mikrogram/ kg/ gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ +SEL 300), selenyum 500 mikrogram/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ +SEL 500) olarak kısaltılmıştır. Değerler  $\pm$  SEM olarak verilmiş olup her grupta n=7'dir. # p< 0,05 tedavisiz diyabetik gruba göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

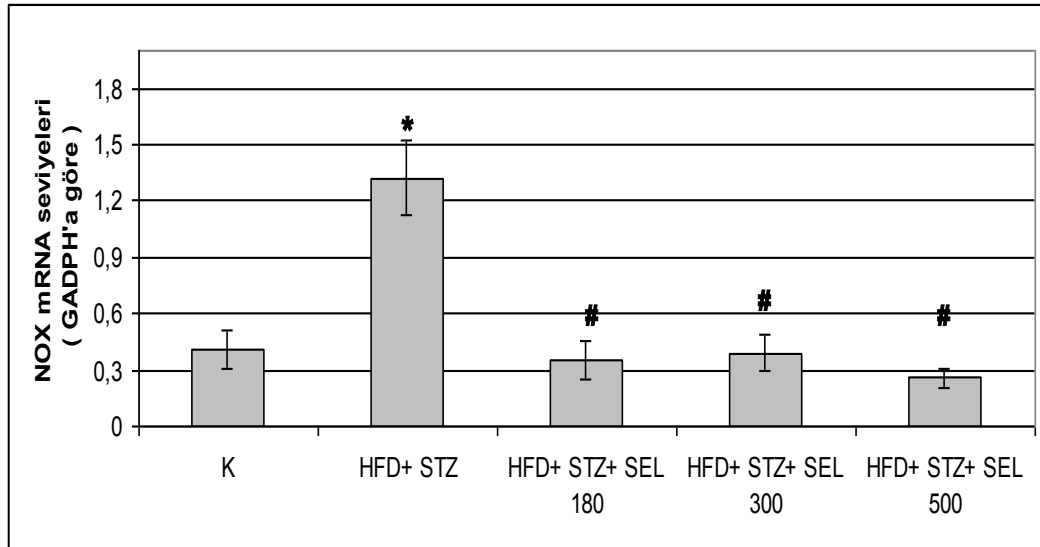


#### Şekil 4.14 Karaciğer CAT seviyeleri

Kontrol grubu (K), tedavisiz diyabet grubu (HFD+ STZ), selenyum 180 mikrogram/kg/ gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ +SEL 180), selenyum 300 mikrogram/ kg/ gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ +SEL 300), selenyum 500 mikrogram/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ +SEL 500) 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.

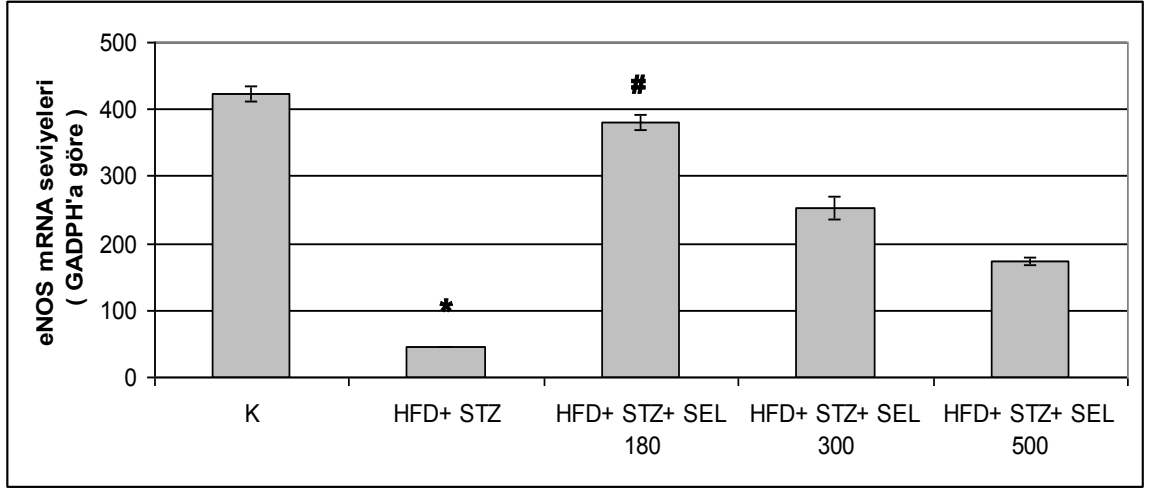
#### 4.7 Deney Hayvanlarının NADPH oksidaz ve eNOS Gen Ekspresyonlarına Ait Bulgular:

Deneyde kullanılan sıçanların torasik aorta örneklerinde NADPH oksidaz ve eNOS enzimlerinin mRNA ekspresyonları analiz edilmiş olup gliseralaldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GADPH)'a göre normalize edilmiş sonuçlar Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'da verilmiştir. Buna göre tedavi almamış diyabetik grupta her iki enzim mRNA ekspresyonu açısından anlamlı farklılıklar gözlenirken NADPH oksidaz gen ekspresyonlarının arttığı eNOS gen ekspresyonlarının ise anlamlı olarak azaldığı görülmektedir. Öte yandan NADPH oksidaz mRNA seviyeleri tedavi almış diyabetik grupta, tedavi almamış diyabetik gruba göre anlamlı olarak düşüktür. Yine tedavi almamış diyabetik grupta düşen eNOS gen ekspresyonlarının genel olarak tedavi almış diyabetik gruplarda arttığı görülmüş olup bu artış yalnızca düşük doz selenyum tedavisi almış grupta istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.



#### Şekil 4.15 NOX<sub>4</sub> mRNA ekspresyonu

Kontrol grubu (K), tedavisiz diyabet grubu (HFD+ STZ), selenyum 180 mikrogram/kg/ gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ +SEL 180), selenyum 300 mikrogram/ kg/ gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ +SEL 300), selenyum 500 mikrogram/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ +SEL 500) olarak kısaltılmıştır. Değerler  $\pm$  SEM olarak verilmiş olup her grupta n=7'dir. \* p< 0,05 diğer tüm gruplara göre , # p< 0,05 tedavisiz diyabetik gruba göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.



#### Şekil 4.16 eNOS mRNA ekspresyonu

Kontrol grubu (K), tedavisiz diyabet grubu (HFD+ STZ), selenyum 180 mikrogram/kg/ gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ +SEL 180), selenyum 300 mikrogram/ kg/ gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ +SEL 300), selenyum 500 mikrogram/kg/gün tedavi verilmiş diyabetik grup (HFD+ STZ +SEL 500) olarak kısaltılmıştır. Değerler  $\pm$  SEM olarak verilmiş olup her grupta n=7'dir. \* p< 0,05 diğer tüm gruplara göre , # p< 0,05 tedavisiz diyabetik gruba göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

## V. TARTIŞMA

Hiperglisemi ve obezite çalışmalarında kullanılan bir takım deneysel modeller bulunmakla birlikte (ob/ob mouse, Zucker rats, OLETF rats vs.) bunlar hem çok pahalı, hem de üretimi zordur. HFD ile beslenen sıçanlarda insulin direnci geliştiğine dair çalışmalar mevcuttur (149,150,151). Aynı zamanda düşük doz STZ'in beta hücreleri üzerine ılımlı bir destrüksiyon yaptığı bilinmektedir (152,153). Bu da tip 2 DM'nin ileri dönem bulgularıyla uyumaktadır. Bu nedenle araştırmacılar, HFD ve bunu izleyen düşük doz STZ uygulamasıyla hastalığın doğal seyrini yakalamaya çalışmışlardır (152, 153,154). STZ dozunu tespit etmek maksadıyla metoda yönelik çalışmalar da yakın zamanda yapılmıştır (155,156). Bu çalışmanın amacı Tip 2 DM'nin doğal gidişine ve metabolik karakteristiklerine uygun deneysel bir oluşturmak ve bu modelde antioksidan özelliği bilinen bir madde olan selenyumun tedavi edici etkisini araştırmaktır.

Multipl düşük doz STZ enjeksiyonunun diyabet modeli oluşturabileceğine dair çalışmalar mevcuttur. Korede yapılan bir çalışmada erkek Sprague-Dawley sıçanlarda tek ve yüksek doz STZ (IP, 80 mg/kg) enjeksiyonunun hızlı bir yıkıma yol açtığı; ancak sıçanlara multipl düşük doz STZ (20mg/kg 5 gün süreyle, IP) verildiğinde  $\beta$  hücrelerinde kademeli ve otoimmün bir destrüksiyonun ortaya çıktığı bildirilmiştir (157). Wright Jr. ve Lacy sıçanlarda multipl düşük doz STZ (25mg/kg IP haftada bir, 3 hafta) enjeksiyonu sonucu diyabet oluşmadığını bildirmiştir. Immunolojik faktörlerin de multipl düşük doz STZ ile diyabet oluşumunda sinerjistik etki gösterdiği düşünülmektedir (158). Böylelikle kademeli bir  $\beta$ -hücre destrüksiyonu oluşmaktadır. Bu durum tip 2 diabetin dekompanze safhasında meydana gelebilir.

HFD (yüksek yağ içerikli diyet) insulin direnci oluşturmak amacıyla kullanılmıştır (159,160,161). Bu yöntem multipl düşük doz STZ uygulamasıyla kombine edilirse insulin direnci oluşturmak yanında bir insulin yetmezliği de gelişeceğinden uygun bir tip 2 diyabet hayvan modeli olabilir. Bu çalışmada da üzerinde durulan noktalardan biri budur. Son yıllarda deneysel diyabet oluşturmak maksadıyla yağlı yemle beslenen sıçanlarda yapılmış, STZ'nin değişik dozlarının denendiği detaylı bir çalışmanın sonuçları da multipl düşük doz STZ (30mg/kg IP haftalık, 2 hafta süreyle) uygulamasının HFD-besili sıçanlarda açık bir hiperglisemi oluşturduğunu, başarı oranının yüksek olduğunu ortaya koymuştur (141). 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.

Genel olarak yüksek doz STZ ile oluşturulan ve yeni tip 2 diyabet modelleri oluşturulana kadar sıkça kullanılan deneysel modellerde 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 (153). Bu çalışmada da deney hayvanlarının vücut ağırlıkları deney başlangıcı, hiperglisemik dönem ve deney bitiminde ölçülmüş olup yapılan karşılaştırmalarda diyabetik sıçanlarda zaman içerisinde kilo kaybı gözlenmemiştir. Vücut ağırlığı artışı açısından gruplar arası değerlendirmeler, tedavi almamış diyabetik sıçanların vücut ağırlıklarının kontrole ve tedavi almış diyabetik sıçanlara göre daha az değiştiğini göstermiştir. Sağlıklı sıçanlarda değişik dozlarda selenyum uygulamasının etkilerinin araştırıldığı son yıllarda yapılan bir çalışmada selenyumun vücut ağırlığını arttırıcı etkisi

gösterilmiştir (162). Bu çalışmada da tedavide kullanılan selenyumun düşük dozlarda diyabetik sıçanlar üzerinde vücut ağırlığını arttırıcı bir etki oluşturduğu gözlenmiştir.

Selenyum ilk olarak 1817 yılında Jons Jacob Berzelius tarafından keşfedilmiş olup antioksidan özelliği nedeniyle üzerinde pek çok hastalık modeliyle ilişkili çalışmalar yapılmaktadır. Selenyum insan sağlığı için olan esansiyel bir element olup başta böbrek ve karaciğer olmak üzere insanın tüm dokularında bulunmaktadır. İn vitro ve in vivo çalışmalar selenyumun diyabet tedavisinde bazı olumlu etkileri olduğunu göstermiş olup insuline benzer özellikleri ortaya konmuştur.

Yapılan çalışmalar selenyumun glisemik kontrolü sağlamak yanında diyabette kalp, böbrek ve karaciğerde meydana gelen bazı değişiklikler üzerinde de etkili olduğunu göstermiştir. Buna göre selenyumun diyabetik farelerde kan glukozu yanı sıra lipid peroksidasyon, glutatyon peroksidaz, glutatyon S transferaz ve kan selenyum seviyelerine de düzeltici etkisi bulunmaktadır. Bu verilerle selenyumun diyabetle ilişkili oksidatif stresi azaltmada rol oynadığı düşünülmektedir (23,24,120,125,130,136). Bu çalışma da streptozotosinle diyabet oluşturulmuş ve yüksek yağ içerikli diyetle beslenen sıçanlarda açlık kan glukozunu, kan lipid seviyelerini ve lipid peroksidasyon göstergesi olan MDA seviyelerini düzelttiğini ortaya koymaktadır.

Diyabette SOD düzeylerinin arttığı, değişmediği veya azaldığı şeklinde birbiriyle çelişen çalışmalar vardır (163,164,165). Selenyum glutatyon peroksidazın bir integral parçasıdır(166). Yapılan çalışmalarda diyabetli hastalarda serum glutatyon peroksidaz aktivitesinin azalmış olduğu rapor edilmektedir (163,165). Bununla birlikte son yıllarda yapılan bir çalışmada selenyumun değişik dozlarının 8 hafta boyunca diyetle katılmasının sağlıklı sıçanlarda da katalaz düzeylerini düşürdüğü, GPx düzeylerini de arttırdığı bildirilmiştir (162). Bu çalışmada da oksidatif stres düzeyindeki değişiklikleri değerlendirmek maksadıyla yaptığımız analizlerde SOD düzeylerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmezken selenyumun diyabette artmış olan katalaz



seviyelerini düşürdüğü, diyabette düşmüş olan GPx düzeylerini ise arttırdığı görülmüştür.

Gerek deneysel modelin başarısı, gerekse tedavinin etkinliğini değerlendirmek açısından deneyde kullanılan sıçanlarda ölçülen insülin değerleri önem taşımaktadır. 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 (141,142). HFD ve tek- düşük doz STZ'nin sıçanlar üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada ise yine düşük doz STZ uygulamasının plazma insülin değerlerini değiştirmedığı, tek başına HFD ile beslenmenin insülin seviyelerini arttırdığı, kombine uygulamanın ise plazma insülin seviyelerini azalttığı gözlemlenmiştir (153) . Deneysel tip 2 diyabet modeli karakterizasyonu üzerine yapılmış bir çalışmada çoklu- düşük doz STZ uygulanmış HFD- besili sıçanlarda intraperitoneal glukoz tolerans testi (IPGTT) uygulanmış olup elde edilen sonuçlar anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (141). Bu çalışmada ise elde edilen veriler insülin seviyelerinin tedavi almamış diyabetik sıçanlarda ortalama olarak bir miktar azaldığı; ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı yönündedir. İnsülin seviyelerinde değişiklik olmaksızın oluşan hiperglisemi, HFD ile beslenme ve çoklu- düşük doz STZ ile gelişmiş olası bir insülin direncine bağlı olabilir.

Tip 2 diyabet hayvan modelleri ve hastalarda, çeşitli damar yataklarında, asetilkolinle oluşan endotele bağlı gevşeme yanıtları bozulmuştur. Asetilkolin gevşetici etkisini NO, prostasiklin gibi endotelden kaynaklanan gevşetici faktörlerin ve endotelden kaynaklanan hiperpolarizasyon faktörün (EDHF) salınımını sağlayarak gösterir. Büyük boy arterlerde NO, endotele bağlı gevşemede ana rolü üstlenmektedir (102). NO'in anormal üretimi ya da yanıtının diyabette görülen vasküler ve endotelyal disfonksiyona katkıda bulunmaktadır. Diyabetik sıçanlarda koroner arterlerde, asetilkolinle oluşan damar gevşemesindeki düşüşlerin, plazma NO seviyelerinde ve eNOS protein ekspresyonundaki azalma ile birlikte olduğu gösterilmiştir (109). Streptozotosinle diyabet oluşturulmuş sıçanların torasik aortlarında benzer bir

sonuç elde etmiştir (110). Bu çalışma da diyabetik sıçan aortlarında asetilkoline endotelial yanıtın azaldığını göstermektedir. 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.

Bunun yanı sıra bu çalışmada kontrol ve diyabetik sıçanlarda, bir NO donörü olan sodyum nitroprussid (SNP) ile oluşan ve endotele bağlı olmayan gevşeme yanıtları karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak diyabetik sıçanlarda damar düz kas hücrelerinin NO'ye duyarlılığının sürdüğü görülmüştür; bu daha önce yapılan çalışmalarla da uyum sağlamaktadır (109,110).

Selenyum, damarda asetilkolinle oluşan endotele bağlı gevşemedeki bozukluğu iyileştirmekte, serum NO seviyelerini yükseltmekte; ancak diyabetik sıçanlarda aortta SNP ile oluşan endotele bağlı olmayan gevşemede herhangi bir değişiklik yaratmamaktadır. Tüm bunların sonucu olarak denilebilir ki selenyum, damarın asetilkoline yanıtını NO biyoaktivitesi aracılığıyla düzeltmektedir.

Diyabette fenilefrine vazokonstriksiyon yanıtlarının mevcut olduğu bildirilmiştir; ancak elde edilmiş sonuçlar birbirinden farklıdır. Bazı çalışmalarda streptozotosinle diyabet oluşturulmuş sıçanların pulmoner arterlerinde fenilefrine kasılma yanıtlarında azalma gösterilmiştir (167). Bazılarında Goto–Kakizaki diyabet sıçanlarında aortun fenilefrine cevabının değişmediği yönünde olup (107), bir diğer çalışma da, db/db model farelerde bu yanıtın arttırdığı bulunmuştur. (168). Bu farklılıkların nedeni açık olmamakla birlikte, hayvan modellerinin farklılığı, hipergliseminin doğal seyri ve şiddeti ile ilgili olabilir. Yapılan bir diğer çalışmada da diyabette vasküler fenilefrin cevaplarının zaman bağlı değişim gösterdiği, erken dönemde daha kuvvetli kasılma oluşurken geç dönemde zayıf kasılma cevapları olduğu bulunmuştur (169). Bu durum, streptozotosinle diyabet oluşturulmuş sıçan aortlarında, azalmış NO düzeylerinin fenilefrin cevabını kuvvetlendirebileceğini ve NO artışının fenilefrine bağlı vazokonstriksiyonun şiddetini azaltabileceğini göstermektedir. Diyabetik aortta, alfa

adrenoreseptör sayısında ve duyarlılığındaki değişiklikler, fenilefrine farklı vasküler yanıtların oluşmasına yol açabilir. Bu çalışmada diyabetik sıçanlarda NO seviyeleri, kontrole göre düşük ve selenyum uygulanmış diyabetik sıçanlarda uygulanmamışlara göre yüksek olmasına rağmen fenilefrin yanıtları her dört grupta da benzer bulunmuştur. Bu sonuçlar NO seviyelerinin, diyabetik sıçanların aortlarında fenilefrin yanıtlarına etkisi olmadığını düşündürmektedir. Son yıllarda yapılan bir başka çalışmada da buna benzer şekilde, diyabetik farelerde, düşük NO seviyelerinin fenilefrine kasılma yanıtını artırmadığını bulunmuştur (168).

Selenyum NO biyoyararlanımı üzerindeki etkisini endotelial nitrik oksid sentaz (eNOS) ve NADPH oksidaz üzerinden gerçekleştirmektedir. Streptozotosin uygulamasıyla diyabet oluşturulmuş sıçanlarda (170), diyabetik spontan hipertansif sıçanlarda (171) ve in vitro hiperglisemiye maruz kalmış insan aortik endotelial hücrelerde (172) eNOS'un down-regulasyonu gözlemlenmiştir.

Bu çalışmada da diyabet, NO aracılı endotele bağlı gevşemeyi bozmuş, NO seviyelerini düşürmüştü ve eNOS mRNA ekspresyonlarını azaltmıştır. Bununla birlikte selenyum tedavisi, diyabette bozulmuş olan vazorelaksasyonu iyileştirmiş, NO seviyelerini arttırmış ve eNOS mRNA ekspresyonunu arttırmıştır. Bu sonuçlara göre eNOS'dan elde edilmiş NO'deki artışlar, diyabetik aortta endotele bağlı gevşemede yararlı olabilir.

Oksidatif stresin diyabetik endotelial disfonksiyon oluşumunda önemli bir rol oynadığı büyük ölçüde kanıtlanmıştır. Hiperglisemi ve dislipidemi, süperoksid gibi reaktif oksijen radikallerinin fazla miktarda oluşmasına neden olmaktadır. Süperoksid oluşumu NO'nin peroksinitrite (ONOO<sup>-</sup>) dönüşümüne neden olabilmekte, böylelikle NO biyoyararlanımını azaltmakta ve bu da damar gevşemesinde bozukluğa yol açmaktadır. Kardiyovasküler sistemde oksidatif streste rol oynayan, reaktif oksijen radikallerini sentezleyen enzimler arasında NADPH oksidaz, ksantin oksidaz ve mitokondrial süperoksid sentezleyici enzimler bulunmaktadır. NADPH oksidaz süperoksid oluşumunda ve NO'nin vasküler doku içerisinde parçalanmasında ana rol oynamaktadır. Çok sayıda çalışma IDDM ve NIDDM hayvan modellerinde

NADPH oksidaz aktivitesi ve ekspresyonunun arttığını (up-regulation) göstermiştir ve bu da superoksid üretimine kaynaklık etmektedir. (173,174,175). Bu çalışma da, NADPH oksidaz'ın esas olarak endotelial hücrelerde bulunan bir alt tipi olan NOX<sub>4</sub>'ün mRNA ekspresyonlarının , diyabetik sıçan aortlarında belirgin bir biçimde arttığını, bununla birlikte selenyum uygulamasının NOX<sub>4</sub> mRNA ekspresyonunu azalttığını, sonuç olarak NO biyoyararlanımını arttırarak endotelial disfonksiyonu düzelttiğini göstermiştir.

## VI. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak bu çalışmada, streptozotosinle diyabet oluşturulmuş ve yüksek yağ içerikli diyetle beslenen sıçanlarda, selenyum tedavisinin endotelial disfonksiyon üzerindeki etkileri incelenmiştir. Selenyum tedavisi glukoz ve lipid metabolizma bozukluklarını iyileştirmektedir. Oksidatif stres ve diyabette artan katalaz seviyelerini düşürmekte, azalmış glutatyon peroksidaz seviyelerini ise artırmaktadır. Selenyum diyabetik sıçan aortlarında asetilkolin aracılı damar gevşemesini belirgin olarak düzeltmektedir. Bu etki NO düzeylerinin artmasıyla ilişkili olup, eNOS ekspresyonunu arttırmak ve NADPH oksidaz ekspresyonunu azaltmak suretiyle gerçekleşmektedir. Buna bağlı olarak selenyum, tip 2 diyabet ve onun vasküler komplikasyonlarının tedavisinde faydalı olabilir.

## VII. ÖZET

### **Selenyumun Yüksek Yağ İçerikli Diyet ve Streptozotosinle Diyabet Oluşturulmuş Sıçanlarda Endotel Bağımlı Damar Fonksiyonlarındaki Rolü**

Tip 2 diyabete bağlı vasküler komplikasyonların gelişiminden endotelial disfonksiyon sorumludur. Endotelial disfonksiyon gelişimi oksidatif stres ve buna bağlı oluşan bir patolojik sürecin sonucudur. Selenyum antioksidan etkileri bilinen esansiyel bir elementtir. Bu çalışmada selenyumun tip 2 diyabet modeli oluşturulmuş sıçanlarda endotelial disfonksiyon ve oksidatif stres üzerine etkileri araştırılmıştır. Deneyde kullanılan sıçanlar kontrol, tedavi almamış diyabetik ve 3 ayrı dozda selenyum tedavisi almış (180- 300- 500 mcg/kg/gün) diyabetik grup olmak üzere beş gruba ayrılmıştır. Diyabetik gruptaki sıçanlar deney sonuna kadar (8 hafta) yüksek yağ içerikli diyet (high fat diet, HFD) ile beslenmiş olup streptozotosin (STZ) uygulaması intraperitoneal, düşük dozda (30 mg/kg) ve iki kez yapılmıştır. Deneye alınan sıçanların torasik aortlarında asetilkolin ve sodyum nitroprussidle elde edilen endotele bağlı gevşeme yanıtları ile eNOS ve NADPH oksidaz (NOX4) mRNA ekspresyonlarına bakılmıştır. Selenyum tedavisi ile diyabette artış gösteren NOX4 ekspresyonlarında azalma tespit edilmiş olup diyabette azalmış eNOS ekspresyonları artmıştır. Bunun yanı sıra kan örneklerinde açlık kan şekeri, lipid profili, lipid peroksidasyonu (MDA), insülin ve NO değerleri incelenmiş olup sıçanlardan alınan karaciğer örneklerinde MDA'nın yanı sıra SOD, CAT ve GPx düzeyleri incelenmiştir. Selenyum tedavisi diyabetik sıçanlarda artmış olan açlık kan şekeri, total kolesterol ve trigliserid düzeyleri ile karaciğer katalaz ve MDA miktarlarını da düşürmektedir. Diyabette azalmış bulunan GPx seviyeleri de selenyum tedavisi ile artmış bulunmaktadır. Elde edilen verilere göre selenyum tedavisi diyabette bozulan damarsal yanıtları ve endotel fonksiyonu düzeltmekte, bunu NO seviyelerini ve eNOS ekspresyonlarını arttırarak yapmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** tip 2 diyabet, selenyum, nitrik oksid, endotel disfonksiyonu, oksidatif stres, yüksek yağ içerikli diyet

## VIII. SUMMARY

### **The Role of Selenium on Vessel Function in Diabetic Rats Induced by High Fat Diet and Streptozotocin**

Endothelial dysfunction is responsible for diabetic vascular complications, develops as a result of oxidative stress and its pathological process. Selenium is an antioxidant essential element. In this study we investigate the effects of selenium on endothelial dysfunction and oxidative stress in type 2 diabetic rats. The rats were divided into 5 groups as control, diabetic group without treatment and diabetic group with treatment in 3 different selenium doses (180- 300- 500 mcg/kg/day). To develop of the type 2 diabetic rat model, the diabetic rats were fed the high fat diet (HFD) until the end of study and the control rats were fed regular chow. The diabetic groups were injected intraperitoneally (i.p) twice, with low doses streptozotocin (30 mg/kg). To investigate the effects of diabetes and selenium in diabetic rats induced by high fat diet and multiple low doses intraperitoneal streptozotocin, acetylcholine and sodium nitroprusside induced relaxation, also eNOS and NADPH oxidase (NOX<sub>4</sub>) mRNA expressions, were measured in rat thoracic aortas. The expressions of NOX<sub>4</sub> were significantly decreased with selenium treatment, while its expressions were increased in aortas from diabetic rats without treatment. The expressions of eNOS were significantly increased with selenium treatment, while its expressions were decreased in aortas from diabetic rats without treatment. Moreover, in blood samples of rats fasting blood glucose, lipid profile, lipid peroxidation (MDA), insulin and NO, also in rat liver samples MDA, SOD, CAT and GPx levels were measured. Selenium treatment significantly increased fasting blood glucose, total cholesterol, triglyceride levels, also catalase and MDA levels in liver in diabetic rats. GPx levels, increased in diabetes, were decreased with selenium. The results showed that selenium restores the vascular responses and endothelial dysfunction in diabetes through increased NO levels and eNOS expressions.

**Key words:** type 2 diabetes, selenium, nitric oxide, endothelial dysfunction, oxidative stress, high fat diet

## IX. KAYNAKLAR

1. Kahn CR, Weir GC, King GL et al., Joslin's Diabetes Mellitus. 14.th Edition. Lippincott Williams-Wilkins, 2005
2. Fox CS, Coary S, Sorlie PD et al., Trends in cardiovascular complications of diabetes.JAMA, J.Am.Med.Assoc.292,2495-2499, 2004
3. Stamler, J., Vaccaro, O., Neaton, J.D. et al., 1993. Diabetes, other risk factors,and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. Diabetes Care 16, 434–444.
4. Goldberg RB. Cardiovascular disease in patients who have diabetes.Cardiol. Clin. 21, 399–413, vii,2003
5. Duby JJ, Campbell RK, Seter SM, White et al., Diabetic neuropathy:an intensive review. Am. J. Health Syst. Pharm. 61, 160–173, 2004
6. Porta M and Bandello F. Diabetic retinopathy: a clinical update.Diabetologia 45,1617–1634, 2002
7. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensivetreatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. N. Engl. J. Med. 329, 977–986,1993
8. Maritim, A.C., Sanders, R.A., Watkins, J.B.I., 2003. Diabetes, oxidative stress, andantioxidants: a review. J. Biochem. Mol. Toxicol. 17, 24–38.
9. Stehouwer, C. D., Lambert, J., Donker, A. et al., Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy. Cardiovasc. Res. 34, 55–68,1997



10. Patel, V., Rassam, S. M., Chen et al., Oxygen reactivity in diabetes mellitus: effect of hypertension and hyperglycaemia. *Clin Sci (Lond)*, 1994.86(6): p. 689-95.
11. Tesfamariam, B., Free radicals in diabetic endothelial cell dysfunction. *Free Radic Biol Med*, 1994. 16(3): p. 383-91.
12. Memisogullari R, Taysi S, Bakan E et al., Antioxidant Status and Lipid Peroxidation in Type II Diabetes Mellitus. *Cell Biochem Func*. 21: 291-296, 2003.
13. Şekeroğlu MR, Şahin H, Dülger H, et al, 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*. 33:669-674, 2000.
14. Altan N, Sepici-Dincel A, Koca C. Diabetes mellitus ve Oksidatif Stres. *Turk J Biochem* 2006; **31(2)**: 51-56.
15. Lipinski, B: Pathophysiology of oxidative stress in diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and Its Complications*. 15: 203–210, 2001.
16. Coskun O, Kanter M, Korkmaz A, et al. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and  $\beta$ -cell damage in rat panceas. *Pharmacol Res* 2005; **51**: 117-123.
17. Rajasekaran S, Sivagnanam K, Subramanian S. Antioxidant effect of *Aloe vera* gel extract in streptozotocin-induced dibates in rats. *Pharmacol Rep* 2005; **57**: 90-96.
18. Hayashi K, Kohma R, Gto M. Strain Differences in the Diabetogenic Activity of Streptozotocin in mice. *Biol Pharm Bull* 2006; **29(6)**: 1110-1119.
19. Szkudelski T. The mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B cells of the Rat Pancreas. *Physiol Res* 2001; **50**: 536-546.

20. Thulesen J, Holst JJ, Poulsen SS. Short Term Insulin Treatment Prevents the Diabetogenic Action of Streptozotocin in Rats. *Endocrinology*.1997; **138**: 62-68.
21. Foster LH, Sumar S. Selenium in health and disease: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1997; **37(3)**: 211-228.
22. Mukherjee B, Anbazhagan S, Roy A, et al. Novel implications of the potential role of selenium on antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic mice. *Biomed Pharmacother* 1998; **52(2)**: 89-95.
23. Douillet C, Bost M, Accominotti M, et al. Effects of selenium and vitamin E supplements on tissue lipids, peroxides, and fatty acid distribution in experimental diabetes. *Lipids* 1998; **33(4)**: 393-399.
24. Can B, Ulusu NN, Kilinc K, et al. Selenium treatment protects diabetes-induced biochemical and ultrastructural alterations in liver tissue. *Biol Trace Elem Res* 2005; **105(1-3)**: 135-150.
25. Larner, J. (1985). Insulin and oral hypoglysemic drugs, glucagon. Goodman and Gilman's the pharmacological basis therapeutics. 7th Eds: Gilman A.G., Goodman L.S., Rall T.W., Murad F., MacMillan Publ. Comp., New York, p: 1490-1516.
26. Global Prevalence of Diabetes Estimates for the year 2000 and projections for 2030 *Diabetes care* 27:1047-1053, 2004
27. WHO Prevalence Prevalence of diabetes in the WHO European Region-Country and regional data.
28. Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, et al. Williams Textbook of Endocrinology 9th edition WB. Saunders Compan
29. Özata, M. and Yöntem, A., Endokrinoloji Metabolizma ve Diabet. 1.Baskı. 2006,İstanbul: İstanbul medikal yayıncılık.

30. Satman I, Yılmaz T, Bostar I et al. Diabetes Epidemiology Study in Turkey : First Step Data results. *Diabetes*;47:A384,1480 ,1998
31. Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, et al. *Williams Textbook of Endocrinology* 9th edition WB. Saunders Company
32. Scarlett JA, Gray RS, Griffin J, et al, İnsülin treatment reverses the insülin resistance of type II diabetes mellitus .*Diabetes Care* 5:353-363,1982
33. Wing RR, Blair EH, Bononi P, Marcus MD, et al, Caloric restriction per se is a significant factor in improvements in glycemic control and insulin sensitivity during weight loss in obese NIDDM patients .*Diabetes Care* 17:30-36,1994
34. Shuman, CR. 1988. Diabetes mellitus: Definition, Clasification and Diagosis. In: Galowa JA, Patwin JH, Shuman CR, eds. *Diabetes Mellitus*. Ninth Edition, Eli Lilly and Company.
35. Diabetes mellitus-wikipedia, the free encyclopedia [web page on the internet]: [http://en.wikipedia.org/wiki/Diabetes\\_mellitus](http://en.wikipedia.org/wiki/Diabetes_mellitus).
36. Kabalak, T., Yılmaz, C., Tüzün, M., *Endokrinoloji El Kitabı*, 3. Basım, Güven Kitabevi, İzmir., 2004
37. Kannel WB. Contribution of the Framingham Study to the Coquest of Coronary Artery Disease. *Am. J. Cardiol*;62:1109-1112,1988
38. Kayaalp O. *Klinik Farmakolojinin Esasları ve Temel Düzenlemeler*. 11. baskı. Ankara: Hacettepe TAŞ, 2006.
39. Pari L, Umamaheswari J. Antihyperglycaemic activity of *Musa sapientum* flowers: effect on lipid peroxidation in alloxan diabetic rats. *Phytother Res* 2000;14:136-8.

40. Ahmad M, Akhtar MS, Malik T, et al. Hypoglycaemic action of the flavonoid fraction of *Cuminum nigrum* seeds. *Phytother Res* 2000;14:103-6.
41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. 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.
46. Dunn JS, Duffy E, Gilmour MK, et al. Further observations on the effects of alloxan on the pancreatic islets. *J Physiol* 1944;103:233-43.
47. Pushparaj P, Tan CH, Tan BKH. Effects of *Averrhoa bilimbi* leaf extract on blood glucose and lipids in streptozotocin-diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 2000;72:69-76.
48. Kohnert KD, Axcróna UM, Hehmke B, et al. Islet neuronal abnormalities associated with impaired insulin secretion in type 2 diabetes in the Chinese hamster. *Regul Pept* 1999;82:71-9.

49. Chang AY, Perry CS. Acid glycohydrolase in Chinese hamster with spontaneous diabetes. IV. Diabetes- and linedependent variation in plasma enzyme activity. *Diabetologia* 1978;15:423-9.
50. Ejrnaes M, Von Errath MG, Christen U. Cure of chronic viral infection and virus-induced type 1 diabetes by neutralizing antibodies. *Clin Dev Immunol* 2006;13:67-77.
51. Pickup JC, Williams G. Textbook of Diabetes 2nd ed. Volume 1. Blackwell Science, Inc; 2002.
52. Irer S., Alper G., Deneysel Diyabet Modelleri, Türk Klinik Biyokimya Dergisi, 2004, Cilt 2, Sayı 3, Sayfa(lar) 127-136
53. 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*, vol. 49, no. 11, pp. 1390–1394, 2000.
54. 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*, vol. 52, no. 4, pp. 313–320, 2005.
55. F. Franconi, G. Seghieri, S. Canu, et al, "Are the available experimental models of type 2 diabetes appropriate for a gender perspective?" *Pharmacological Research*, vol. 57, no. 1, pp. 6–18, 2008.
56. 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*, vol. 56, no. 9, pp. 1233–1240, 2007.
57. S. Zhao, Y. Chu, C. Zhang, et al., "Diet-induced central obesity and insulin resistance in rabbits," *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, vol. 92, no. 1, pp. 105–111, 2008.

58. 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*, vol. 56, no. 12, pp. 1719–1728, 2007.
59. A. M. Flanagan, J. L. Brown, C. A. Santiago, et al., "High-fat diets promote insulin resistance through cytokine gene expression in growing female rats," *The Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 19, no. 8, pp. 505–513, 2008.
60. 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*, vol. 137, no. 2, pp. 263–271, 2004.
61. C. F. Howarth, A. Qureshi, A. Shahin et al., "Effects of single high-dose and multiple low-dose streptozotocin on contraction and intracellular Ca<sup>2+</sup> in ventricular myocytes from diabetes resistant and susceptible rats," *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 269, no. 1, pp. 103–108, 2005.
62. N. T. E. Friesen, A. S. Büchou, 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*, vol. 47, no. 4, pp. 676–685, 2004.
63. 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*, vol. 25, no. 3, pp. 289–302, 2006.
64. 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*, vol. 188, no. 2, pp. 263–270, 2006.

65. 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*, vol. 37, no. 1, pp. 112–118, 1988.
66. Diplock, A. 1998. Healthy lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. ILSI Europe concise monograph series, 59 p., Belgium.
67. Nawar, W.W. 1996. Lipids. In “Food Chemistry”, O.R. Fennema (Ed), pp: 225-319. Marcel Dekker, New York.
68. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease. *Methods Enzymol.* 186; 1-85.
69. Meydani, M. 2001. Antioxidants and cognitive function. *ILSI. Nutrition Reviews.*, 59(8); S75-S82.
70. Kaur, C. and Kapoor, H.C. 2001. Antioxidants in fruits and vegetables—the millennium’s health. *Int. J. Food Sci. Tech.* 36; 703-725.
71. Elliot, J.G. 1999. Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. *Food Tech.* 53(2); 46-48.
72. Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., and Deemer, E.K. 2002. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study. *J. Agric. Food Chem.* 50(11); 3122-3128.
73. Giugliano, D., Ceriello, A., and Paolisso, G., Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care*, 1996. 19(3): p. 257-67.

- 74.** King GL., Banskota NK. 1994. Mechanism of diabetic microvascular complications. In: Kahn, C.R., Weir G.C. eds, Joslin's Diabetes Mellitus (International Ed. Thirteenth Ed. Company). 634-648.
- 75.** Armstrong, AM., Chestnutt, JE., Gormley, MJ., Young IS. 1996. The effect of dietary treatment on lipid peroxidation and antioxidant status in newly diagnosed noninsulin dependent diabetes. *Free Radic Biol Med*, 21(5):719-26.
- 76.** Robertson RP, Harmon J, Tran PO, et al (2004)  $\beta$ -cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes* 53(Supplement 1), 119-124.
- 77.** Rösen P, Du X, Tschöpe D (1998) Role of oxygen derived radicals for vascular dysfunction in the diabetic heart: prevention by  $\alpha$ -tocopherol?. *Molecular and Cellular Biochemistry* 188(1-2), 103-111.
- 78.** Du X, Stockklauser-Farber K, Rösen P (1999) Generation of reactive oxygen intermediates, activation of NF KappaB, and induction of apoptosis in human endothelial cells by glucose: role of nitric oxide synthase? *Free Radical Biology and Medicine* 27(7-8), 752-763.
- 79.** Giugliano I, Ceriello A, Paolisso G (1996) Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 19(3), 257-267.
- 80.** Ceriello A (1997) Acute hyperglycemia and oxidative stress generation. *Diabetic Medicine* 14(Supplement.3), 45-49.
- 81.** Houslay MD (1991) 'Crosstalks': a pivotal role for protein kinase C in modulating relationships between signal transduction pathways. *European Journal of Biochemistry* 195(1), 9-27.
- 82.** Das K, Chainy GBN (2001) Modulation of rat liver mitochondrial antioxidant defense system by thyroid hormone. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1537(1), 1-13.



- 83.** Altan N, Buğdaycı G, Tutkun-Kosova F, et al (1998) The Influence of the Sulfonylurea Glyburide on Nitric Oxide in Streptozotocin Induced Diabetic Rat. *General Pharmacology* 31(2), 319-321
- 84.** Colhoun HM, Lee ET, Bennett PH, et al (2001) Risk factors for renal failure: The WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes. *Diabetologia*(Supplement. 2), 46-53.
- 85.** Battist WP, Palmisano J, Keane WF (2003) Dyslipidemia in patients with type 2 diabetes. Relationships between lipids, kidney disease and cardiovascular disease. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 41, 1174-1181.
- 86.** Januszewski AS, Alderson NL, Metz TO, et al (2003) Role of lipids in chemical modification of proteins and development of complications in diabetes. *Biochemical Society Transactions*. 31(6), 1413-1416.
- 87.** Dean RT, Fu S, Stocker R, et al (1997) Biochemistry and Pathology of Radical-mediated Protein Oxidation. *Biochemical Journal* 324(1), 1-18.
- 88.** Dillard CJ, Downey JE, Tappel AL (1984) Effect of antioxidants on lipid peroxidation in iron-loaded rats. *Lipids* 19(2), 127-33.
- 89.** Dillmann WH (1989) Diabetes and thyroid- hormone induced changes in cardiac function and their molecular basis. *Annual Review of Medicine* 40, 373-94.
- 90.** Diekman MJ, Romijn JA, Endert E, et al (1998) Thyroid hormones modulate serum leptin levels: observations in thyrotoxic and hypothyroid women. *Thyroid* 8(12), 108-6.
- 91.** Cines, D. B., Pollak, E. S., Buck, C. A. et al. (1998) Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 91, 3527–3561
- 92.** Khan, B. V., Harrison, D. G., Olbrych, et al (1996) Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and

redoxsensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 9114–9119

- 93.** Flyvbjerg, A. (2000) Putative pathophysiological role of growth factors and cytokines in experimental diabetic kidney disease. *Diabetologia* **43**, 1205–1223
- 94.** O'hara, Y., Pterson, T.E. & Harrison, D.G. (1993) Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J. Clin. Invest.* **91**, 2546–2551.
- 95.** Brown, M.S. & Goldstein, J.L. (1984) How LDL-receptor influences cholesterol and atherosclerosis. *Sci. Am.* **251**, 52–60.
- 96.** Jayakody, R.L., Thomson, A.B.R. & Kappagoda, C.T. (1985) Cholesterol feeding impairs endothelium dependent relaxation of rabbit aorta. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **63**, 1206–1209.
- 97.** Freiman, P.C., Mitchell, G.C., Heistad, et al. (1986) Atherosclerosis impairs endothelial dependent relaxation to acetylcholine and thrombin in primates. *Circ. Res.* **58**, 783–789.
- 98.** Chappell, S.P., Lewis, M.J. & Henderson, A.H. (1987) Effect of lipid feeding on endothelial dependent vascular relaxation in rabbit aorta preparation. *Cardiovasc. Res.* **21**, 34–38
- 99.** Harrison, D.G., Freimann, P.C., Armstrong, et al (1987) Alteration of vascular reactivity in atherosclerosis. *Circ. Res.* **61**, II-74–II-80.
- 100.** Bossaler, C., Habib, G.B., Yamamoto, C., et al (1987) Impaired muscarinic endothelial-dependent relaxation and cyclic guanosine 5-monophosphate formation in atherosclerotic human coronary artery and rabbit aorta. *J. Clin. Invest.* **79**, 170–174.
- 101.** Forstermann, U., Mugge, A., Acheid, et al (1988) Selective attenuation of endothelial mediated vasodilation atherosclerotic human coronary arteries. *Circ. Res.* **62**, 185–190.

- 102.** Furchgott, R.F. (1984) The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **24**, 175–197.
- 103.** Griffith, T.M., Edwards, D.H., Lewis, M.J., et al (1984) The nature of endothelium derived vascular relaxant factor. *Nature (London)* **308**, 645–647.
- 104.** Rubayni, G.M., Lorenz, R.R. & Vanhoutte, P.M. (1985) Bioassay of endothelium derived relaxing factor(s): inactivation by catecholamines. *Am. J. Physiol.* **249**, H95–H101.
- 105.** Palmer, R.M.J., Ferrige, A.G. & Moncada, S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factor. *Nature (London)* **327**, 524–526.
- 106.** Endemenn DH, Schriffrin EL. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol.* 2004 Aug;15(8):1983-92
- 107.** Takahashi, Y., Nakano, T., Wakabayashi, I., 2008. Increased induction of inducible nitric oxide synthase expression in aortae of type 2 diabetes rats. *J. Pharmacol. Sci.* 107, 190–200.
- 108.** Srinivasan, S., Hatley, M.E., Bolick, D.T., et al 2004. Hyperglycaemia-induced superoxide production decreases eNOS expression via AP-1 activation in aortic endothelial cells. *Diabetologia* 47, 1727–1734.
- 109.** Tawfik, H.E., El-Remessy, A.B., Matragoon, S., et al, 2006. Simvastatin improves diabetes-induced coronary endothelial dysfunction. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319, 386–395.
- 110.** 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.

111. Shinozaki, K., Suzuki, M., Ikebuchi, M., et al 1995. Insulin resistance associated with compensatory hyperinsulinemia as an independent risk factor for vasospastic angina. *Circulation* 92, 1749–1757.
112. Wu, J., Lei, M.X., Liu, L., et al 2007. Aortic endothelium-dependent vasodilation function and PI3K-, PKB-, eNOS mRNA expressions in insulin-resistant and type 2 diabetic rats. *Zhonghua Xin. Xue. Guan. Bing. Za Zhi.* 35, 265–270.
113. Turko, I.V, Marcondes, S., Murad, F., 2001. Diabetes-associated nitration of tyrosine and inactivation of succinyl-CoA:3-oxoacid CoA-transferase. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 281, 2289–2294.
114. Wilber C G 1980 Toxicology of selenium: a review; *Clin. Toxicol.* 17 171–230
115. Smith A M and Picciano M F 1986 Evidence for increased selenium requirement for the rat during pregnancy and lactation; *J. Nutr.* 11 1068–1079
116. Yang G, Chen J, Wen Z and Ge K 1984 The role of selenium in Keshan disease; in *Advances in nutritional research* (eds) H H Drapper (New York: Plenum Press) pp 203–231
117. Van Rij A M, Thomson C D, McKenzie J M , et al 1979 Selenium deficiency in total parenteral nutrition; *Am. J. Clin. Nutr.* 32 2085–2086
118. Behn D, Weiss-Nowak C, Kalcklosch M, et al 1995 Studies on the distribution and characteristics of new mammalian selenium-containing proteins; *Analyst* 120 823–825
119. Stadtman T C 1996 Selenocysteine; *Annu. Rev. Biochem.* 65 83–100

120. Beckett GJ, Arthur JR. Selenium and endocrine systems. *J Endocrinol* 2005; **184(3)**: 455-465.
121. Oldfield JE. The two faces of selenium. *J Nutr* 1987; **117(12)**: 2002-2008.
122. Brown KM, Arthur JR. Selenium, selenoproteins and human health: a review. *Public Health Nutr* 2001; **4(2B)**: 593-599.
123. Kohrle J, Jakob F, Contempre B, et al, Selenium, the thyroid, and the endocrine system. *Endocr Rev* 2005; **26(7)**: 944-984.
124. Patrick L. Selenium biochemistry and cancer: a review of the literature. *Altern Med Rev* 2004; **9(3)**: 239-258.
125. Rayman MP. The importance of selenium to human health. *Lancet* 2000; **356(9225)**: 233-241.
126. S. Stranges, J. R. Marshall, R. Natarajan, et al, *Ann. Intern. Med.*, 2007, 147, 217–223.
127. A. S. Mueller and J. Pallauf, *J. Nutr. Biochem.*, 2006, 17, 548–560.
128. E. A. Berg, J. Y. Wu, L. Campbell, et al., *Biochimie*, 1995, 77, 919–924.
129. A. S. Mueller, J. Pallauf and J. Rafael, *J. Nutr. Biochem.*, 2003, 14, 637–647.
130. J. H. McNeill, H. L. M. Delgatty and M. L. Battell, *Diabetes*, 1991, 40, 1675–1678.
131. M. L. Battell, H. L. M. Delgatty, L. M. Delgatty and J. H. McNeill, *Mol. Cell. Biochem.*, 1998, 179, 27–34.
132. A. S. Mueller, E. Most and J. Pallauf, *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 2005, 89, 94–104.

133. A. S. Mueller, A. Bosse and J. Pallauf, *Curr. Nutr. Food Sci.*, 2006, 2, 151–168.
134. Ezaki, O. (1990). The insulin-like effects of selenate in rat adipocytes. *J Biol Chem.* 265(2):1124- 8.
135. Mcneill, J.H., Delgatty, H.L., Battell, M.L. (1991). Insulin like effects of sodium selenate in streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes.* 40(12): 1675- 8.
136. Ghosh R., Mukherjee, B., Chatterjee, M. (1994). A novel effect of selenium on streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes Res.* 25(4):165- 71.
137. M. L. Battell, H. L. M. Delgatty and J. H. McNeill, *Mol. Cell. Biochem.*, 1998, 179, 27–34.
138. E. A. Berg, J. Y. Wu, L. Campbell, M. Kagey and S. R. Stapleton, *Biochimie*, 1995, 77, 919–924.
139. S. R. Stapleton, G. L. Garlock, L. Foellmi-Adams and R. F. Kletzien, *Biochim. Biophys. Acta*, 1997, 1355, 259–269.
140. T. S. Pillay and M. W. Makgoba, *FEBS Lett.*, 1992, 308, 38–42.
141. Zhang, M, Lv, X.Y., Li, J., et al., 2008a. The characterization of high-fat diet and multiple low-dose streptozotocin induced type 2 diabetes rat model. *Exp. Diabetes Res.* 704045 2008.
142. Wang C, Li J, Lv X et al. (August 2009). "Ameliorative effect of berberine on endothelial dysfunction in diabetic rats induced by high fat diet and streptozotocin". *European Journal of Pharmacology* **620** (1–3): 131–7
143. Tian-Jiao Xu, Bing-Xiang Yuan\*, Ya-Min Zou, et al, The effect of insulin in combination with selenium on blood glucose and GLUT4

expression in the cardiac muscle of streptozotocin-induced diabetic rats, *Fundamental & Clinical Pharmacology* 24 (2010) 199–204.

144. E Zeydanli, A. Bilginoglu, E. Tanriverdi, et al, Selenium restores defective beta-adrenergic receptor response of thoracic aorta in diabetic rats, *Mol Cell Biochem* DOI 10.1007/s11010-009-0353-5, published online 2009.
145. Ben Amara, I., Fetoui, H., Guermazi, F., et al., 2009. Dietary selenium addition improves cerebrum and cerebellum impairments induced by methimazole in suckling rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* 27, 719–726.
146. İ Halifeoğlu, F Karataş, R Çolak ve ark.,, Tip 2 Diyabetik Hastalarda Tedavi Öncesi ve Tedavi Sonrası Oksidan ve Antioksidan Durum, *Fırat Tıp Dergisi* 2005;10(3): 117-122.
147. Millipore, EIA insülin rat kiti kullanım kılavuzu, 2012.
148. Cayman, nitrite/nitrate assay kit kullanım kılavuzu, 2012.
149. S. Zhao, Y. Chu, C. Zhang, et al., “Diet-induced central obesity and insulin resistance in rabbits,” *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, vol. 92, no. 1, pp. 105–111, 2008.
150. 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*, vol. 56, no. 12, pp. 1719–1728, 2007. Ming Zhang et al. 9
151. A. M. Flanagan, J. L. Brown, C. A. Santiago, P. Y. et al, “High-fat diets promote insulin resistance through cytokine gene expression in growing female rats,” *The Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 19, no. 8, pp. 505–513, 2008.

152. 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*, vol. 49, no. 11, pp. 1390–1394, 2000.
153. 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*, vol. 52, no. 4, pp. 313–320, 2005.
154. 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*, vol. 56, no. 9, pp. 1233–1240, 2007.
155. 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*, vol. 137, no. 2, pp. 263–271, 2004.
156. 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*, vol. 37, no. 1, pp. 112–118, 1988.
157. E. Kim, S. Sohn, M. Lee, J. Jung, et al, "Differential responses of the growth hormone axis in two rat models of streptozotocin-induced insulinopenic diabetes," *Journal of Endocrinology*, vol. 188, no. 2, pp. 263–270, 2006.
158. 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*, vol. 37, no. 1, pp. 112–118, 1988.
159. S. Zhao, Y. Chu, C. Zhang, et al., "Diet-induced central obesity and insulin resistance in rabbits," *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, vol. 92, no. 1, pp. 105–111, 2008.



- 160.** 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*, vol. 56, no. 12, pp. 1719–1728, 2007.
- 161.** A. M. Flanagan, J. L. Brown, C. A. Santiago, et al, "High-fat diets promote insulin resistance through cytokine gene expression in growing female rats," *The Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 19, no. 8, pp. 505–513, 2008.
- 162.** A. S. Mueller, A. C. Bosse, E Most, . D. Klomann, et al, Regulation of the insulin antagonistic protein tyrosine phosphatase 1B by dietary Se studied in growing rats, *Journal of Nutritional Biochemistry* 20 (2009) 235–247
- 163.** Memisogullari R, Taysi S, Bakan E, Capoglu I: Antioxidant Status and Lipid Peroxidation in Type II Diabetes Mellitus. *Cell Biochem Func.* 21: 291-296, 2003.
- 164.** Abou-Seif MA, Youssef A. Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients. *Clinica Chimica Acta* 346 (2004) 161–170
- 165.** Komosin´ska-Vassev K, Olczyk K, Olczyk P, et al. Effects of metabolic control and vascular complications on indices of oxidative stress in type 2 diabetic patients. *Diabetes Research and Clinical Practice* 68 (2005) 207–216
- 166.** Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 54:176-186, (2001)
- 167.** Gurney, A.M., Howarth, F.C., 2009. Effects of streptozotocin-induced diabetes on the pharmacology of rat conduit and resistance intrapulmonary arteries. *Cardiovasc. Diabetol.* 4 8:4.

- 168.** Khazaei, M., Moien-Afshari, F., Kieffer, T.J., et al., 2008. Effect of exercise on augmented aortic vasoconstriction in the db/db mouse model of type-II diabetes. *Physiol. Res.* 57, 847–856.
- 169.** Xavier, F.E., Davel, A.P., Rossoni, L.V., et al., 2003. Time-dependent hyperreactivity to phenylephrine in aorta from untreated diabetic rats: role of prostanoids and calcium mobilization. *Vascul. Pharmacol.* 40, 67–76.
- 170.** Lu, Y.L., Hu, S.J., Shen, Z.J., et al., 2004. Changes of macrovascular endothelial ultrastructure and gene expression of endothelial nitric oxide synthase in diabetic rats. *Chin. Med. J. (Engl.)*. 117, 1165–1169.
- 171.** Ibrahim, M.A., Kanzaki, T., Yamagata, S., et al., 2005. Effect of diabetes on aortic nitric oxide synthesis in spontaneously hypertensive rats; does captopril modulate this effect? *Life Sci.* 77, 1003–1014.
- 172.** Srinivasan, S., Hatley, M.E., Bolick, D.T., et al, 2004. Hyperglycaemia-induced superoxide production decreases eNOS expression via AP-1 activation in aortic endothelial cells. *Diabetologia* 47, 1727–1734.
- 173.** Gorin, Y., Block, K., Hernandez, J., et al, 2005. Nox4 NAD(P)H oxidase mediates hypertrophy and fibronectin expression in the diabetic kidney. *J. Biol. Chem.* 280, 39616–39626.
- 174.** Hwang, J., Kleinhenz, D.J., Rupnow, et al., 2007. The PPARgamma ligand, rosiglitazone, reduces vascular oxidative stress and NADPH oxidase expression in diabetic mice. *Vascul. Pharmacol.* 46, 456–462.
- 175.** San, M.A., Du, P., Dikalova, A., et al, 2007. Reactive oxygen species-selective regulation of aortic inflammatory gene expression in Type 2 diabetes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 292, 2073–2082.