

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ZEYTİN YAPRAĞI (*Olea Europaea* L.) EKSTRAKTI'NIN
DENEYSEL DİYABETTE
ANTİDİYABETİK, ANTİOKSİDAN, 8-OHdG ve KORUYUCU
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

HAZIRLAYAN: Mehmet Ali TEMİZ
DANIŞMAN : Doç. Dr. Atilla TEMUR

VAN-2016

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ZEYTİN YAPRAĞI (*Olea Europaea* L.) EKSTRAKTI'NIN
DENEYSEL DİYABETTE
ANTİDİYABETİK, ANTİOKSİDAN, 8-OHdG ve KORUYUCU
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

HAZIRLAYAN: Mehmet Ali TEMİZ

Bu çalışma YYÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından **2013-FBE-D063**
No'lu proje olarak desteklenmiştir.

VAN-2016

KABUL VE ONAY SAYFASI

Biyoloji Anabilim Dalı'nda Doç. Dr. Atilla TEMUR danışmanlığında, Mehmet Ali TEMİZ tarafından sunulan “Zeytin Yaprağı (*Olea Europaea* L.) Ekstraktı'nın Deneysel Diyabette Antidiyabetik, Antioksidan, 8-OHdG ve Koruyucu Etkilerinin Araştırılması” isimli bu çalışma Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince 20/01/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan:
Prof. Dr. İsmail ÇELİK

İmza: 

Üye:
Prof. Dr. Mustafa KAVUTÇU

İmza: 

Üye:
Doç. Dr. Atilla TEMUR

İmza: 

Üye:
Doç. Dr. Yasin TÜLÜCE

İmza: 

Üye:
Yrd. Doç. Dr. M. Kazım KARA


İmza: 

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 29/01/2016 tarih ve 2016/6-I sayılı kararı ile onaylanmıştır.


İmza
Prof. Dr. Suat SENSOY
Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.



Mehmet Ali TEMİZ

ÖZET

ZEYTİN YAPRAĞI (*Olea Europaea* L.) EKSTRAKTI'NİN DENEYSEL DİYABETTE ANTİDİYABETİK, ANTİOKSİDAN, 8-OHdG ve KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

TEMİZ, Mehmet Ali
Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Doç. Dr. Atilla TEMUR
Ocak 2016, Sayfa 115

Bu araştırmada Zeytin (*Olea europaea* L.) yaprağı ekstraktının (Olive Leaf Extract-OLE) deneysel diyabetik sıçanlarda hipoglisemik, antioksidan, karaciğer koruyucu ve oksidatif DNA hasarına karşı etkisinin araştırılması amaçlanmaktadır. Bu amaç doğrultusunda 56 adet *Wistar albino* sıçan 7 gruba ayrıldı (Kontrol, Diyabet, Diyabet+25, Diyabet+50, Diyabet+100, D+İnfüzyon ve D+Akarboz). 21 günlük deneme sonunda biyokimyasal, histopatolojik, immunohistokimyasal ve moleküler analizler gerçekleştirildi. OLE uygulanan diyabetik gruplarda glukoz ve HbA_{1c} düzeyleri ile serum AST ve ALT enzimlerinin azaldığı görülmüştür. Ayrıca, α -amilaz ve α -glukozidaz aktiviteleri azalırken, PC düzeyi artmıştır. GSH seviyesinde ve G6PD aktivitesinde artma tespit edilmiştir. Karaciğer dokusunda SOD ve GPx aktivitesi önemli düzeyde artış göstermiştir. OLE gruplarında 8-OHdG konsantrasyonu azalmıştır. OLE'nin histopatolojik olarak büyük oranda karaciğer ve pankreas dokusunda dejeneratif ve nekrotik değişiklikleri azalttığı izlenmiştir. Sonuç olarak; OLE'nin diyabetik sıçanların kan glukoz kontrolünde etkili olduğu, α -amilaz ve α -glukozidaz inhibisyonunda iyi bir aktivite gösterdiği, antioksidan savunma sistemini güçlendirdiği, oksidatif DNA hasarına karşı koruyucu olduğu belirlenmiştir. Bu veriler doğrultusunda OLE'nin terapötik etkisinin kuvvetli olduğu kanısına varılmıştır. Bunun yanında bir yan etkisinin olmadığı göz önüne alındığında antidiyabetik ilaçlara göre iyi bir alternatif fitoformülasyon olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Diabetes mellitus, Zeytin yaprağı ekstraktı, Oleuropein, Antioksidan, İmmunohistokimya, 8-OHdG

ABSTRACT

AN INVESTIGATION OF ANTIDIABETIC, ANTIOXIDANT, 8-OHdG and PROTECTIVE EFFECTS OF OLIVE LEAF (*Olea Europaea* L.) EXTRACT ON THE EXPERIMENTAL DIABETES

TEMİZ, Mehmet Ali

The Degree of Ph.D., Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Atilla TEMUR

January 2016, pages 115

The purpose of this study was to determine the effects of Olive (*Olea europaea* L.) Leaf Extract (OLE) on hypoglycemic, antioxidant, hepatoprotective, and oxidative DNA damage on experimental diabetic rats. In order to achieve this task, 56 *Wistar albino* rats were divided into 7 groups (Control, Diabetic, D+25, D+50, D+100, D+Inf and D+Ak). After 21-day administration biochemical, histological, immunohistochemical and molecular analysis were performed. It was observed that glucose and HbA_{1c} levels, and serum AST and ALT decreased in OLE treated diabetic groups. Besides, while α -amylase and α -glucosidase activity decreased, PC level increased. An increase in GSH levels and G6PD activities was detected. SOD and GPx activities significantly increased in the liver tissue. 8-OHdG concentration decreased in the OLE groups. It was observed that OLE histopathologically reduced degenerative and necrotic changes, in liver and pancreas tissues to large extent. The findings of this research revealed that OLE is effective in blood glucose control of diabetic rats; shows good activity inhibitions of α -amylase and α -glucosidase; strengthens antioxidant defense system, and works as protective against oxidative DNA damage. Based on these findings, we concluded that OLE's therapeutic effect is powerful. Considering the fact that OLE does not have any side effects, it could be a better alternative for fitoformulation than the antidiabetic drugs.

Key words: Diabetes mellitus, Olive leaf extract, Oleuropein, Antioxidant, Immunohistochemistry, 8-OHdG

ÖN SÖZ

Ülkemizde ve dünyada sosyoekonomik ve kültürel gelişmelere bağlı ve hızla farklılaşan demografik yapılara paralel olarak toplumun sağlık düzeyi de değişmektedir. Bireyleri en çok etkileyen sağlık problemlerinin başında “Diyabet” gelmektedir. Diyabetin bireye, topluma ve ülkeye getirmiş olduğu yük, çok yönlü olarak irdelenmesi gereken bir olgudur. Bireyin yaşam standartlarını etkileyen diyabetin tedavisi ve bu süreçte özellikle beslenme disiplindeki radikal değişiklikler ile birey, refaha kavuşturulmaya çalışılmaktadır. Bu manada hayatın ‘sürekliliğini’ de ‘sonunu’ da getirecek olan glukozun kompleks karbonhidratlardan alınması ve dengeli beslenme, bu iki seçenekten hangisinin tercih edileceğini belirleyecektir. 21. yüzyılın en büyük problemini oluşturan sedanter yaşam şekilleri ile birlikte gelişen ve toplumsal olarak artan obezite ve devamındaki komplikasyonlar, yine hayat döngüsünde tercih edilecek yol ayrımlarından birini oluşturmaktadır. Son yıllarda sağlıklı beslenme ve bu olguya bağlı olarak fonksiyonel gıdalarda bulunan ve özellikle antioksidan etki gösteren bileşikler hakkındaki araştırma ve uygulamalar gittikçe önem kazanmaktadır.

Doğada sayılamayacak kadar alternatif besin bulunmaktadır. Bunlardan birisi de insanlık tarihi kadar eski olan “Zeytin”dir. Zeytin, insanlık tarafından binlerce yıl önce keşfedilmiş, barışın, refahın, bolluğun ve ölümsüzlüğün simgesi olan efsanevi bir bitkidir. İnsanoğlunun asırlık dostu olan zeytin hayat boyunca çeşitli birçok ihtiyacını da karşılamıştır. Günümüzde zeytin ve ürünleri içerdiği fitokimyasallar olan fenolik bileşikler sayesinde yine cazibesini sürdürmektedir. Doğal beslenme alışkanlıkları, hareketli bir yaşam ve bilinçlenme, başta diyabet olmak üzere pek çok hastalığı bertaraf edecektir. Ancak şu da unutulmamalıdır ki, bitkisel formülasyonlar ve antioksidanlar diyabet, kanser ve yaşlılık etkilerinin risklerini azaltmakta önemli olsalar da, "sihirli iksir" değildirler.

Bu çalışmada, sadece ülkemizin değil dünya milletlerinin de muzdarip olduğu diyabete karşı zeytin yaprağının deney hayvanları modellemesiyle, insan sağlığı için önemli olan hipoglisemik, antioksidan, karaciğer koruyucu ve DNA oksidatif hasarına karşı koruyucu rolünün olup olmadığının *in vivo* olarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım değerli danışman hocam Doç. Dr. Atilla TEMUR’a, çalışmalarımın yönlendirilmesinde

bilgileriyle yardımını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. İsmail ÇELİK'e, Doç. Dr. Yasin TÖLÖCE'ye, çalışmam esnasında desteğini gördüğüm Prof. Dr. Zabit YENER'e, Prof. Dr. Semiha DEDE'ye, Arş. Gör. Sedat ÇETİN'e ve ayrıca bütün eğitimim boyunca manevi desteklerini esirgemeyen aileme, çalışmamın değişik aşamalarında bana yardımcı olan herkese teşekkür ederim.

Bu alışma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Başkanlığı tarafından 2013-FBE-D063 nolu proje ile desteklenmiştir.

Mehmet Ali TEMİZ
Ocak, 2016

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖN SÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Diabetes Mellitus.....	1
1.1.1. HbA1C.....	2
1.2. Diyabetin Sınıflandırılması.....	2
1.2.1. Tip 1 Diyabet (İnsüline Bağımlı Diyabet).....	2
1.2.2. Tip 2 Diyabet (İnsülden Bağımsız Diyabet).....	3
1.2.3. Gestasyonel Diyabet.....	4
1.2.4. Diğer Spesifik Tipler.....	5
1.3. Diyabetin Komplikasyonları.....	6
1.4. Diyabet ve Oksidatif Stres.....	9
1.5. Oksidatif DNA Hasarı.....	11
1.6. Antioksidan Savunma Sistemi.....	12
1.6.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) (EC 1.15.1.1).....	13
1.6.2. Glutasyon Peroksidaz (GPx) (EC 1.11.1.9).....	14
1.6.3. Katalaz (KAT) (EC 1.11.1.6).....	14
1.6.4. Glutasyon Redüktaz (GR) (EC 1.8.1.7).....	15
1.6.5. Glutasyon-S-transferazlar (GST) (EC 2.5.1.18).....	15
1.6.6. Glutasyon.....	16
1.7. α -Amilaz ve α -Glukozidaz.....	16
1.8. Karaciğer.....	17
1.9. Pankreas.....	17
1.10. İnsülin.....	19

	Sayfa
1.11. Zeytin Yaprağı.....	21
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ.....	24
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	28
3.1. Deneyde Kullanılan Materyaller.....	28
3.1.1. Deney Hayvanı ve Zeytin Yaprağı Materyali.....	28
3.1.2. Analizlerde Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	28
3.2. Zeytin Yaprağı Ekstraksiyonu.....	29
3.3. HPLC ile Ekstrakt İçeriğinin Belirlenmesi.....	29
3.4. Doz Belirlenmesi.....	29
3.5. LD ₅₀ Çalışması.....	30
3.6. Deneysel Protokole Hazırlık.....	30
3.7. Deneysel Uygulama.....	30
3.8. Kan ve Doku Örneklerinin Alınması.....	31
3.8.1. Doku Ekstraksiyonu.....	31
3.9. Analizlerin Yapılması.....	32
3.9.1. Süperoksid Dismutaz (SOD) Enzim Tayini.....	32
3.9.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Enzim Tayini.....	33
3.9.3. Katalaz (KAT) Enzim Tayini.....	34
3.9.4. Redükte Glutasyon (GSH) Tayini.....	34
3.9.5. Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz (G6PD) Tayini.....	35
3.9.6. Protein Karbonil (PC) Tayini.....	36
3.9.7. Protein Miktar Tayini.....	37
3.10. α -Amilaz Tayini (EC 3.2.1.1).....	39
3.11. α -Glukozidaz Tayini (EC 3.2.1.20).....	39
3.12. 8-OHdG (8-hidroksi-2'-deoksiguanozin).....	40
3.13. Histopatoloji.....	40
3.14. İmmünohistokimya.....	41
3.15. İstatistiksel Analizler.....	41
4. BULGULAR.....	42
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	74
KAYNAKLAR.....	93
ÖZGEÇMİŞ.....	115

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. Hiperglisemi ve diyabet komplikasyonları.....	8
Şekil 1.2. Hiperglisemi ve oksidatif stres sonucu gelişen mekanizmalar.....	10
Şekil 1.3. 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG).....	12
Şekil 1.4. Sıçan ve insan pankreas adacıklarında hücre dağılımları.....	19
Şekil 1.5. İnsan proinsülini primer yapısı.....	20
Şekil 1.6. İnsan insülini primer yapısı.....	20
Şekil 1.7. Oleuropeinin hidrolizi.....	22
Şekil 3.1. Protein standart grafiği.....	38
Şekil 4.1. OLE'nin HPLC kromotogramı.....	42
Şekil 4.2. OLE uygulanan diyabetik sıçanların kan Glukoz düzeyleri.....	43
Şekil 4.3. OLE uygulanan diyabetik sıçanların HbA1c düzeyleri.....	44
Şekil 4.4. OLE uygulanan diyabetik sıçanların α -Amilaz ve α -Glukozidaz aktiviteleri..	45
Şekil 4.5. OLE uygulanan diyabetik sıçanların Protein Karbonil düzeyi.....	49
Şekil 4.6. OLE uygulanan diyabetik sıçanların bazı doku ve kan GSH düzeyi.....	51
Şekil 4.7. OLE uygulanan diyabetik sıçanların G6PD aktiviteleri.....	53
Şekil 4.8. OLE uygulanan diyabetik sıçanların bazı dokularının SOD aktivitesi.....	55
Şekil 4.9. OLE uygulanan diyabetik sıçanların bazı dokularının GPx aktivitesi.....	58
Şekil 4.10. OLE uygulanan diyabetik sıçanların bazı dokularının KAT aktivitesi.....	61
Şekil 4.11. Diyabetik sıçanların oksidatif DNA hasar 8-OHdG konsantrasyonu.....	63
Şekil 4.12. Kontrol grubu karaciğer dokusu histolojik görünümü.....	65
Şekil 4.13. Diyabet grubu karaciğer dokusu histolojik görünümü.....	66
Şekil 4.14. D+100 grubu karaciğer dokusu histolojik görünümü.....	67

Şekil 4.15. Kontrol grubu pankreas Langerhans adacığının histolojik görünümü.....	68
Şekil 4.16. Diyabet grubu pankreas Langerhans adacığının histolojik görünümü.....	69
Şekil 4.17. D+100 grubu pankreas Langerhans adacığının histolojik görünümü.....	70
Şekil 4.18. Kontrol grubu pankreas Langerhans adacığ β -hücrelerinin İmmunohistokimyasal reaksiyonu.....	71
Şekil 4.19. Diyabet grubu pankreas Langerhans adacığ β -hücrelerinin İmmunohistokimyasal reaksiyonu.....	72
Şekil 4.20. D+100 grubu pankreas Langerhans adacığ β -hücrelerinin İmmunohistokimyasal reaksiyonu.....	73

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.1. OLE'nin 280 nm dalga boyundaki fenolik bileşik profili.....	42
Çizelge 4.2. OLE uygulanan diyabetik sıçanların çeşitli parametreleri.....	43
Çizelge 4.3. OLE uygulanan diyabetik sıçanların serum parametreleri.....	47
Çizelge 4.4. OLE uygulanan diyabetik sıçanların çeşitli dokularındaki GSH düzeyleri.....	50
Çizelge 4.5. OLE uygulanan diyabetik sıçanların çeşitli dokularındaki SOD aktiviteleri.....	54
Çizelge 4.6. OLE uygulanan diyabetik sıçanların çeşitli dokularındaki GPx aktiviteleri.....	57
Çizelge 4.7. OLE uygulanan diyabetik sıçanların çeşitli dokularındaki KAT aktiviteleri.....	60
Çizelge 4.8. OLE'nin pankreas ve karaciğer üzerindeki histopatolojik bulguları.....	64
Çizelge 4.9. OLE'nin pankreas ve karaciğer üzerindeki histopatolojik bulgularının ikili grup karşılaştırmalarının p değerleri.....	64

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

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

Simgeler	Açıklama
α	Alfa
β	Beta
bw	vücut ağırlığı
dk	Dakika
dL	desilitre
ε	Epsilon
γ	Gama
g	Gram
L	Litre
μ	Mikron
mg	Miligram
mL	Mililitre
M	Molar
M^{-1}	1/Molarite
mM^{-1}	1/Milimolarite
mM	Milimolarite
mmol	Milimol
nm	nanometre
μmol	Mikromol
rpm	Devir/dakika
sn	Saniye
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
δ	Sigma
U	Ünite

Kısaltmalar	Açıklama
ΔA	Absorbans değışimi
6-4 PP	6-4 pirimidin pirimidinon fotoürünleri
8-OHdG	8-hidroksi-2-deoksiguanozin
ALT	Alanin amino transferaz
AKG	Açlık kan glukoz
AST	Aspartat amino transferaz
ATP	Adenozin tri fosfat
BHT	Bütillenmiş hidroksi tolüen
COX	Siklooksijenaz
CPD	Siklobütan pirimidin dimeri
CPK	Kreatin fosfokinaz
DAG	Diaçilgliserol
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DTNB	5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit)
e-	Elektron
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
ERK	Ekstrasellüler sinyal-düzenleyici kinaz
G6PD	Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz
GLUT-2	Glukoz taşıyıcısı
GR	Glutatyon redüktaz
GSH	Redükte glutatyon
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz
GSSG	Okside glutatyon
GSSG-R	Glutatyon redüktaz
GST	Glutatyon S-transferaz
Hb	Hemoglobin
HbA_{1c}	Glikoze olmuş hemoglobin
H₂O₂	Hidrojen peroksit
IL-6	İnterlökin-6
JNK	c-jun N terminal kinaz
LDH	Laktat dehidrogenaz

LOOH	Lipid hidroperoksit
LPO	Lipid peroksidasyonu
MAPK	Mitojenle etkileşen protein kinaz
MDA	Malondialdehit
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
NAD⁺	Yükseltgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid
NADH	İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid
NFκβ	Nüklear faktör κβ
NO[•]	Nitrik oksit radikali
ONOO[•]	Peroksinitrit
O₂^{•-}	Süperoksit radikali
¹O₂	Singlet (Tekli) oksijen
OH[•]	Hidroksil radikali
PARP	Poli ADP riboz polimeraz
PKC	Protein kinaz C
RAGE	AGE reseptörü
RNA	Ribonükleik asit
ROO[•]	Peroksil radikali
RO[•]	Alkoksil radikali
ROT	Reaktif oksijen türleri
SD	Standart sapma
-SH	Sülfidril
SOD	Süperoksit dismutaz
STZ	Streptozotosin
TBA	Tiyobarbütik asit
TG	Trigliserit
TGF-β	Dönüştürücü büyüme faktörü-β
TNF-α	Tümör nekrozis faktör-α
TCA	Trikloraasetik asit
UV	Ultraviyole ışınlar
VEBF	Vasküler endotelial büyüme faktörü

1. GİRİŞ

Canlılar yaşamlarını sürdürebilmek için enerjiye ihtiyaç duyarlar. Enerjinin elde edilebilmesi için de besin tüketimine gereksinim duyarlar. Enerji üretimi ve hücrelerin normal metabolizmasının sürdürülmesi esnasında meydana gelen birçok biyokimyasal tepkime mevcuttur. Bu biyokimyasal tepkimelerden biri olan enerji metabolizmasının başrolünü ise glukoz oluşturmaktadır. Glukoz metabolizmasında meydana gelebilecek herhangi bir aksaklık pek çok hastalığın ve metabolik sendromun oluşmasına sebep olabilir ki bunlardan birisi de *diyabettir*.

1.1. Diabetes Mellitus

Diyabet bir hastalık olmaktan çok insülinin kısmen veya tamamen eksik olmasına bağlı olarak gelişen, özellikle bozulmuş açlık ve bozulmuş glukoz toleransı ile gelişen kan glukozunun yüksekliği (hiperglisemi) ile karakterize edilen heterojen bir sendrom grubudur (Champe ve ark., 2007). Diyabette insülin etkisinin yetersizliği yaygın olarak karbonhidrat, lipit, protein ve benzeri metabolizmalarda karakteristik anormalliklere yol açar (Kuzuya ve ark., 2002). Aynı zamanda doku ve hücrelerde insülin direnci de hiperglisemi ve diyabetin patogenezinde etkili olmaktadır (Tomas ve ark., 2002).

Uluslararası Diyabet Federasyonu'nun (IDF) tahminlerine göre 2013 yılında 382 milyon olan diyabetli sayısının, 2035 yılında 592 milyona çıkacağı öngörülmektedir. Türkiye'de bu sayının 11.8 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir. Ayrıca, Türkiye, Avrupa ülkeleri arasında prevalansı % 14,8 ile en yüksek ülkedir. Diyabet, 2013 yılında 5,1 milyon insanın ölümüne neden olmuştur. Başka bir ifadeyle, bu muazzam rakam her 6 saniyede bir kişinin ölmesi demektir (IDF, 2013). Diyabet ile mücadelede IDF'in verilerine göre 2013 yılında 548 milyar dolar harcanmış, 2035 yılında ise bu rakamın 627 milyar dolar olması tahmin edilmektedir.

Genel tanı kriterleri arasında açlık kan şekeri düzeyi 126 mg/dL, 75 g Oral Glukoz Tolerans Testi (OGTT) sırasında 2. saat plazma glukoz değerinin \geq 200 mg/dL olması, HbA1c'nin \geq % 6.5 olması (American Diabetes Association, 2014), klasik klinik bulgular olan poliüri, polidipsi, polifaji, ağız kuruluğu, ağız kokusu (ketoasidoz), kilo kaybı ve yorgunluk hissi gibi semptomlar mevcuttur.

1.1.1. HbA_{1c}

HbA_{1c}, hiperglisemi nedeniyle eritrositlerde bulunan hemoglobinin non-enzimatik olarak glikozillenme reaksiyonu sonucu oluşur (Kurt, 2003). Kandaki glukoz oranı ne kadar yüksek ise hemoglobinin glikozillenme oranı da paralel olarak yükselir. HbA_{1c}, geçmiş 8 ile 12 haftalık plazma glukoz oranını yansıtır (Nathan ve ark., 2007). Günlük glisemik kontrolün takibinde, sıklıkla kan glukoz ölçümü kullanılırken, uzun dönem glisemik kontrolün takibinde HbA_{1c} ölçümü kullanılmaktadır. Gün içinde herhangi bir zamanda açlık gibi özel bir hazırlık gerekmeden ölçümü yapılabilir. Bu özellikleri sayesinde diyabetik kişilerde glisemik kontrolde tercih edilen bir yöntemdir. Son zamanlarda diyabet için bir tanılayıcı test ve yüksek diyabet riski olan kişiler için de tarama testleri arasında ilgi uyandıran mevcut analiz yöntemidir (The International Expert Committee, 2009).

1.2. Diyabetin Sınıflandırılması

Bir kişiye bir diyabet tipinin tanısının konması genellikle o andaki koşullara bağlıdır. Ancak Diabetes Mellitusun patalojisi heterojenik bir sendrom olması sebebiyle pek çok diyabetik kişi tek bir sınıfa dahil edilemez (American Diabetes Association, 2004). Bu yüzden geçmişte bireysel çalışmalarda diyabetin pek çok sınıflandırması yapılmıştır. Uzman bir kominite tarafından diyabetin ilk sınıflandırması Amerikan Ulusal Diyabet Veri Grubu (National Diabetes Data Group, NDDG) tarafından 1979 yılında yayınlanmıştır. Diğer taraftan bu sınıflandırmaların anlaşmazlıklara neden olabileceği düşünülerek 1980 yılında WHO (Dünya Sağlık Örgütü) ve NDDG tarafından diyabet, 4 ana gruba ayrılmıştır. Bunlar: Tip 1 Diyabet (T1D), Tip 2 Diyabet (T2D), Gestasyonel Diyabet (GD) ve Diğer Spesifik Tipler şeklinde sınıflandırılmıştır. Günümüze gelinceye kadar ki süreçte ise diyabetin etiyoloji ve epidemiyolojisinin daha iyi anlaşılmasına başlanmasıyla klinik anlamda 3 ana sınıflama (T1D, T2D ve GD) kullanılmaktadır.

1.2.1. Tip 1 Diyabet (İnsüline Bağımlı Diyabet)

Tip 1 diyabetin tanımlanmasının yolunu açan 1965 yılında insülitisi tanımlamasıyla W. Gepts olmuştur. T1D temelde bir otoimmün hastalığıdır.

Lenfositlerin aktive olarak pankreatik β -hücrelerine invazyonuyla gelişip yok etmesiyle ortaya çıkar. Bunun sonucunda insülin üretimi gerçekleştirilemez ve birey mutlak insülin eksikliği yaşar. Genellikle genetik yatkınlığı olan kişilerde enfeksiyon, stres veya travma gibi bir olay sonrasında tetiklenmektedir. Daha çok çocuklukta ve genç yaşta hızlı ve ani bir şekilde ortaya çıkarak ömür boyu eksojen insülin ile tedavi sürdürülür. Dünya çapında diyabet hastalarının % 5-10'u tip 1 dir (WHO, 1985; Committee Report, 1998). T1D çok nadir olarak da etiyolojisi bilinmeyen bir şekilde otoimmün atak gerçekleşmeden idiyopatik gelişir. Birey, aralıklı ketoasidoz ve insülinin çeşitli derecelerde gereksinimiyle ortaya çıkan diyabetin bu formuna muzdariptir. Güçlü bir olasılıkla diyabetin bu formu kalıtımsaldır (Banerji ve Lebovitz, 1989).

T1D'te hızla diyabetik ketoasidoz tablosu gelişir ve hastanın nefesi aseton kokmaya başlar. Tanı sırasında hastalarda ağız kuruluğu, polidipsi ve buna bağlı olarak poliüri görülür. Hastada aynı zamanda polifaji vardır ancak yine de kilo kaybı mevcuttur. Çünkü hücre içerisine insülin yokluğu sebebiyle glukoz alımı yapılamadığı için hücre açlık çekmektedir. Bu hücresel açlık sinyali nedeniyle de sürekli yeme isteği oluşur. Diğer tanı kriterleri ise yorgunluk, halsizlik ve bulanık görme şikâyetleridir (Kuzuya ve ark., 2002; The Expert Committee, 2002).

T1D'li bireyler günlük insülin tedavisi ile birlikte, düzenli bir diyet ve düzenli fiziksel aktiviteyle normal yaşamlarını sürebilirler.

1.2.2. Tip 2 Diyabet (İnsülin Bağımsız Diyabet)

T2D, diyabet formları arasında en yaygın olanıdır. T2D'in etiyolojisi multifaktöriyel olduğu için oldukça komplekstir. Tip 2 Diabetes Mellitus'ta bir glisemik uyarıyı takiben hedef dokuların normal insülin seviyesine karşı azalmış yeteneğinden dolayı, pankreatik adacık β -hücrelerinin uyarılmasıyla artmış insülin üretimi hiperinsülinemia ile sonuçlanır (Home ve Pacini, 2008). Bu nedenle kronik aşırı yüksek insülin sekresyonu β -hücre fonksiyonlarının azalmasına neden olabilir (Tibaldi, 2008). Daha sonra büyük ölçüde karaciğerde insülin duyarsızlığı (insülin direnci) sebebiyle hepatik glukoz üretimi devam ederken β -hücrelerinin tükenmesi insülin seviyesinde azalmayla birlikte hiperglisemi ile sonuçlanır (Tibaldi, 2009). Sonuç olarak, hastalık ilerledikçe β -hücre fonksiyonunun bozulması insülin duyarsızlığını

telafi edemez duruma getirir. Bu nedenle T2D'li pek çok bireyde hem insülin direnci hem de göreceli olarak insülin eksikliği mevcuttur (Riddle, 2000).

Periferik dokularda insüline karşı oluşan duyarsızlık glukozun hücrelere alımını engellemektedir. İnsülinin β -hücrelerinde üretilip salınmasından, hedef hücrelere ulaşmasına ve biyolojik etkisini gösterebilmesi için hücrelerde bulunan spesifik glukoz transport reseptörleri ile etkileşime geçmesi süreci basamaklarından herhangi birinde ve/veya bir kaçında meydana gelebilecek aksama sonucunda oluşan bir etki azalması insülin direnci ile sonuçlanır. İnsülin direncinin birden fazla sebebi olabilir.

İnsülin direnci ya yetersiz insülin üretiminden ya da insülin sinyal yollarındaki anormalliklerden dolayı oluşur (DeFronzo ve ark., 1992). Bu yolak serbest insülinin hücre membranında bulunan insülin reseptörüne bağlanarak aktive edilir. İntrinsik tirozin kinazın aktivasyonundan sonra insülin reseptörünün β -subünitesinin fosforile edilmesiyle insülin sinyal kaskadının aktivasyonu uyarılmış olur. Daha sonra bu kaskadda bulunan insülin reseptör substrat protein-1, fosfatidilinositol 3-kinaz ve protein kinaz B aracılığı ile son olarak iskelet kası ve adipoz hücrelerde hücre membranına glukoz transportunun (GLUT4) translokasyonuna öncülük eder. Böylelikle bu mekanizma ile de glukoz hücre içine alınmış olur (Pessin ve Saltiel, 2000). İnsülin direnci de bu yolağın içindeki herhangi bir anormallikten dolayı oluşmaktadır. Örneğin yaygın olarak iskelet kasında insülin reseptörlerinin insülin tarafından uyarılmasında veya insülin reseptör substrat protein-1 fosforilasyonunda ya da fosfatidilinositol 3-kinaz aktivitesinde ki azalma olduğu görülmüştür (Kraegen ve ark., 1991).

İnsülin direncinin diğer bir sebebi ise sedanter yaşam ve aşırı kalori alımının bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır (Tomas ve ark., 2002).

Kısaca özetlenecek olursa, diyabetik hipergliseminin patogenezinde üç önemli faktör rol oynamaktadır. Bunlar; β -hücre insülin salgısının bozulması, insülin direnci ve karaciğerde glukoz üretiminin artışıdır.

1.2.3. Gestasyonel Diyabet

Gebeliğin en yaygın komplikasyonlarından biri Gestasyonel Diyabet'tir. GD hamilelik sırasında başlayan veya ilk tanıyla birlikte çeşitli şiddetlerde glukoz intoleransı ile gelişen bir diyabet tipidir (Buchanan ve ark., 2007). Diyabetik gebelerin gebelikleri hem anne hem de bebek için olumsuz sonuç riski taşıdığı bilinmektedir. GD

yenidoğanlar için makrozomik bebek, doğum travması, hipoglisemi, ileri yaşlarda çocukluk obezitesi, bozulmuş glukoz toleransı ve zihinsel gelişimi içeren artmış perinatal risk ile ilişkilidir. Annede ise preeklemsi, sezeryan doğum ve ileriki yaşlarda gelişebilecek artmış T2D riskini içerir (Whitelaw ve Gayle, 2011).

GD tedavi edilebilir olduğundan tanı kriterlerinin hassas bir şekilde uygulanarak değerlendirilmesi anne ve bebek sağlığı açısından önemlidir.

1.2.4. Diğer Spesifik Tipler

Diğer spesifik tipler arasında, β -hücre fonksiyon genetik bozuklukları (örneğin; MODY1-2-3-4-5-6 ve mitokondriyal DNA), İnsülin etkisindeki genetik bozukluklar (örneğin; Tip A insülin direnci, leprekonizm, Rabson-Mendenhall sendromu ve lipoatrofik diyabet), Ekzokrin pankreas rahatsızlığı (örneğin; pankreatitis, travma/pankreatektomi, neoplazi ve kistik fibrozis gibi), Endokrinopatiler (örneğin; akromegali, Cushing sendromu, glukagonoma, hipertiroidizm, somatostatinoma ve aldosteronoma gibi), İlaç veya kimsiyal indüklenme (örneğin; vacor, pentamidin, nikotinic asit, glukokortikoidler, diazoksit, β -adrenerjik antagonistler ve dilantin gibi), İnfeksiyonlar (örneğin; sitomegalovirüs ve konjenital kızamıkcık), İmmun aracılı diyabetlerin yaygın olmayan formları (örneğin; Stiff-man sendromu ve anti-insülin reseptör antikoları) ve diğer genetik sendromlar (örneğin; down sendromu, turner sendromu, klinefelter sendromu ve wolfram sendromu gibi) sayılabilir (American Diabetes Association, 2004).

Aslında diyabetin 4 ana tipi, klinik anlamda ise 3 tipi olmakla birlikte Diabetes İnsipidus'ta (Dİ) olduğu gibi hormonal bozukluk nedeniyle kısmi diyabet komplikasyonları da mevcuttur. Ancak, Dİ bir diyabet türevi değildir.

Dİ, hipotalamustan arjinin vasopressin (anti diüretik hormon) sentezinin ve/veya nörohipofizden salınımının eksikliğinden dolayı poliüri ve polidipsi ile karakterize edilen nadir bir hipotalamus-pituiter hastalığıdır (Bellastella ve ark., 2012). Vasopressin üretimi, plasma osmolaritesiyle doğrudan ilişkili olmasına karşın, plasma hacmi ile ters orantılıdır. Yani vasopressin, böbreklerde suyun reabsorpsiyonu ile hacmi düşük, yoğunluğu yüksek bir idrar oluşumunu sağlayarak idrar konsantrasyonunu regüle eder (Ball, 2007).

1.3. Diyabetin Komplikasyonları

Bozulmuş açlık ve glukoz toleransı ile birlikte gelişen hiperglisemi pek çok metabolik bozukluklara neden olur. Gelişen bu metabolik bozukluklar doku ve organlarda çeşitli komplikasyonlara yol açar. Hiperglisemi birkaç sinyal mekanizması ile diyabetik komplikasyonları tetikler (Şekil 1.1; Ceriello, 2005'ten modifiye edilerek). Bu mekanizmalar poliol yolağının aktivasyonu, ileri glikasyon son ürün oluşumunun artması, protein kinaz C aktivasyonu ve heksosamin yolağının aktivasyonudur. Ayrıca reaktif oksijen türlerindeki yükselme de komplikasyonların gelişmesinde etkili olmaktadır (Brownlee, 2005; Ceriello, 2005).

Diyabet zamanla ilerledikçe, çoklu organ sistemleriyle ilgili olan komplikasyonlardan öncelikle ikincil vasküler hastalıklar gelişir. Diyabet hem retinopati, nöropati ve nefropati gibi mikrovasküler hem de kalp-damar ve periferel damar hastalıkları gibi makrovasküler hastalıkları içeren yüksek morbidite ve mortalite oranlarıyla ilişkilidir (Harris, 1998).

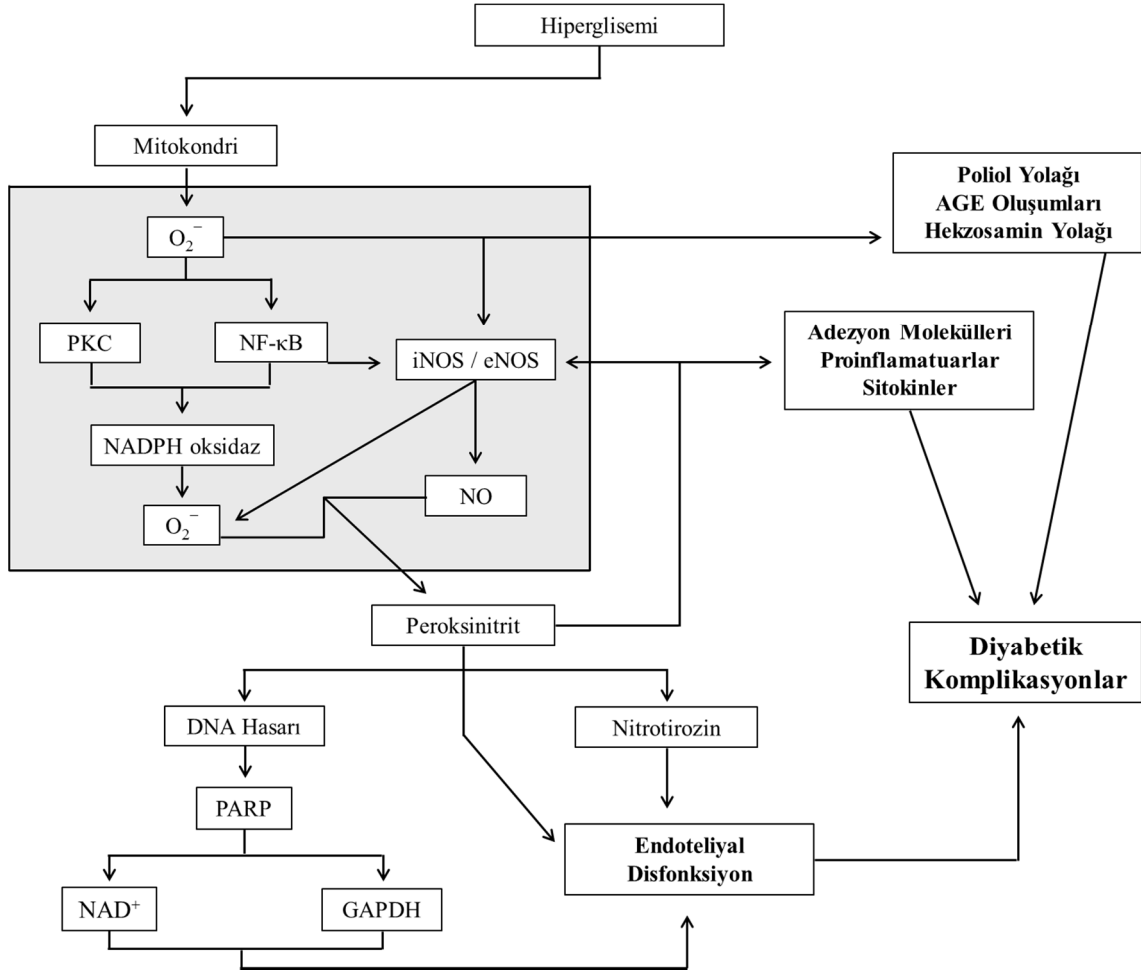
Diyabetik retinopati, erken non-proliferatif evre ve geç proliferatif evre olmak üzere iki sınıfa ayrılır. Diyabetik retinopatinin erken non-proliferatif evresi belirgin vasküler lezyonlara sahiptir. Bu evre kılcal damarlarda sakküler mikroanevrizma oluşumu, retinal kanama, venöz dilatasyonu, retinal lipid birikimi, perisit dejenerasyonu, tıkanma ve retinal kapiller dejenerasyonuyla histolojik olarak karakterizedir (Kern, 2007). Diyabetik retinopatinin geç proliferatif evresinde, anormal yeni damarlar, retinal yüzeyde fibröz doku proliferasyonu gelişir. Yeni oluşmuş kan damarları anormal ve kırılabilir olmaları nedeniyle gözün merkezine kan sızdırmaya meyillidirler ve bu da bulanık görme ve/veya körlüğe neden olabilir. Diyabetik retinopati ilerledikçe retinada, küçük kan damarlarından plazmanın sızması sonucu maküler ödem gelişir. Böylece ciddi görme kayıpları meydana gelir (Frank, 2004). Diyabetik retinopatiden korunmada mevcut yaklaşımlar kan glukozu, kan basıncı ve serum lipidlerinin kontrolü gibi genel tıbbi ölçümlerdir. Ayrıca, hiperglisemi ve hipertansiyon gibi risk faktörlerinden korunma diyabetik retinopatiden koruyabilir ya da ilerlemesini geciktirebilir (Ciulla ve ark., 2003). Hiperglisemi çeşitli biyokimyasal mekanizmalar ile diyabetik retinopatinin ilerlemesine neden olabilir. Kan glukoz seviyesinin yükselmesi protein kinaz C β 'yı aktive eder ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi bazı büyüme faktörlerinin salınımını stimüle eder. Bu mekanizma

diyabetik retinopatinin başlaması ve ilerlemesinin baskın biyokimyasal faktördür (Kroll ve ark., 2007). VEBF, anjiyogenezisi stimüle eder (Karkkainen ve Petrova, 2000). Bu reaksiyonda tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) ve interlekin-6 (IL-6)'yı stimüle eder. TNF- α ve IL-6 pro-inflamatuar sitokinlerdir ve bunlar VEBF ekspresyonunu artırır (Mysliwiec ve ark., 2008).

Diyabetik nefropatide, ilk olarak kollajen birikimi, glomeruler ve tübüler bazal membran ile mesangial matrikste diğer ekstrasellüler matriks proteinleri birikimi belirgin fibrozistir (Mason ve Wahab, 2003). Diyabetik nefropati, genişlemiş glomerulus, glomerular bazal membran kalınlaşması, tubulointerstisyel ve mesangiyumda ekstrasellüler matriksin genişlemesi, inflamuar hücrelerin infiltrasyonu, podositlerin kaybı ve glomeruloskleroz gibi morfolojik ve patolojik olarak karakterizedir (Brosius, 2008). Proinflamuar sitokinlerden TNF- α , kollajen ve fibronektin gibi matriks birikimlerini artırır (Westermann ve ark., 2007). İnterstisyumda fibrotik birikim renal disfonksiyon ile ilişkilidir. Fibrotik dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- β) ekstrasellüler matrikste inaktif pro-TGF- β kompleksi halinde bulunur. Ancak diyabetik nefropatide idrarda artmış TGF- β bulunur (De Muro ve ark., 2004). İnaktif pro-TGF- β aktive edildiğinde TGF- β haline dönüşerek salınır ve bölgesel sinyal mekanizmalarını stimüle eder. TGF- β , TGF- β reseptörüne bağlanır ve pro-fibrotik transkripsiyon faktörü smad2/3 fosforilasyonla aktive edilir (Murphy-Ullrich ve Poczatek, 2000).

Diyabetik nöropatide ilk semptomlar ekstremitelerde başlar ve proksimale doğru ilerleme gerçekleşir (Said, 2007). Diyabetik nöropatili kişilerde sızlama, yanma ve karıncalanma gibi çeşitli artmış duyu hisleri, normal uyarılara rağmen aşırı hassasiyet (allodini) ya da ağrıya aşırı duyarlı olma (hiperaljezi) gibi pek çok duyu hassasiyeti gelişir. Diğer taraftan bu hastalar uyuşukluk, güçsüzlük ve propiyosepsiyon kaybı gibi duyu kayıpları yaşayabilirler (Zochodne, 2007). Diyabetik nöropatili kişiler toplu olarak kronik hiperglisemiden dolayı farklı sinir tellerinde hasara sahiptirler. Etkilenmiş küçük ve büyük sinir tellerin distal aksonların simetrik kaybı diyabetik periferik nöropatidenin bir özelliğidir (Zochodne, 2007). Sadece etkilenmiş sinirleri değil aynı zamanda destek hücreleri ve sinir sistemini besleyen damarlarda histolojik olarak bazı anormallikler mevcuttur. Sinir aksonlarının segmental demiyelinizasyon ve remiyelinizasyonu mevcuttur ve bu akson boyunca sinir bağlantılarının artmasına katkı

sağlayabilir (Said, 2007). Vaza nervorumdaki artışlar nöronal iskemiyeye ve endotelial bazal membranın kalınlaşmasından dolayı aksonlara besinlerin difüzyonunun azalmasına neden olabilir (Zochodne, 2007). Kronik ve tekrarlayan sinir demiyelinizasyonu ve remiyelinizasyonu gösteren periferel sinirlerin morfolojik olarak incelenmesinde genellikle “yumru şekli” (onion bulb) oluşumu görülmektedir (Naba ve ark., 2000). Hiperglisemiden dolayı hücre içi glukoz konsantrasyonunun artması glikolizi aşar ve parçalanamaz. Bundan dolayı glukoz, oksidatif stres artışı ile sonuçlanan polioli yolağına girebilir. Glikolizin iki ara ürünü olan Fruktoz 6-fosfat ve gliseraldehit 3-fosfat seviyesi artar ve önce heksosamin yolağına sonra protein kinaz C yolağına aktarılır. Gliseraldehit 3-fosfat ve aynı zamanda polioli yolağından fruktozun artışı, ileri glikasyon son ürün oluşumuna katkı sağlar ve geridönüşümsüz protein modifikasyonlarına neden olur (Tomlinson ve Gardiner, 2008).



Şekil 1.1. Hiperglisemi ve diyabet komplikasyonları (Ceriello, 2005'ten modifiye edilerek).

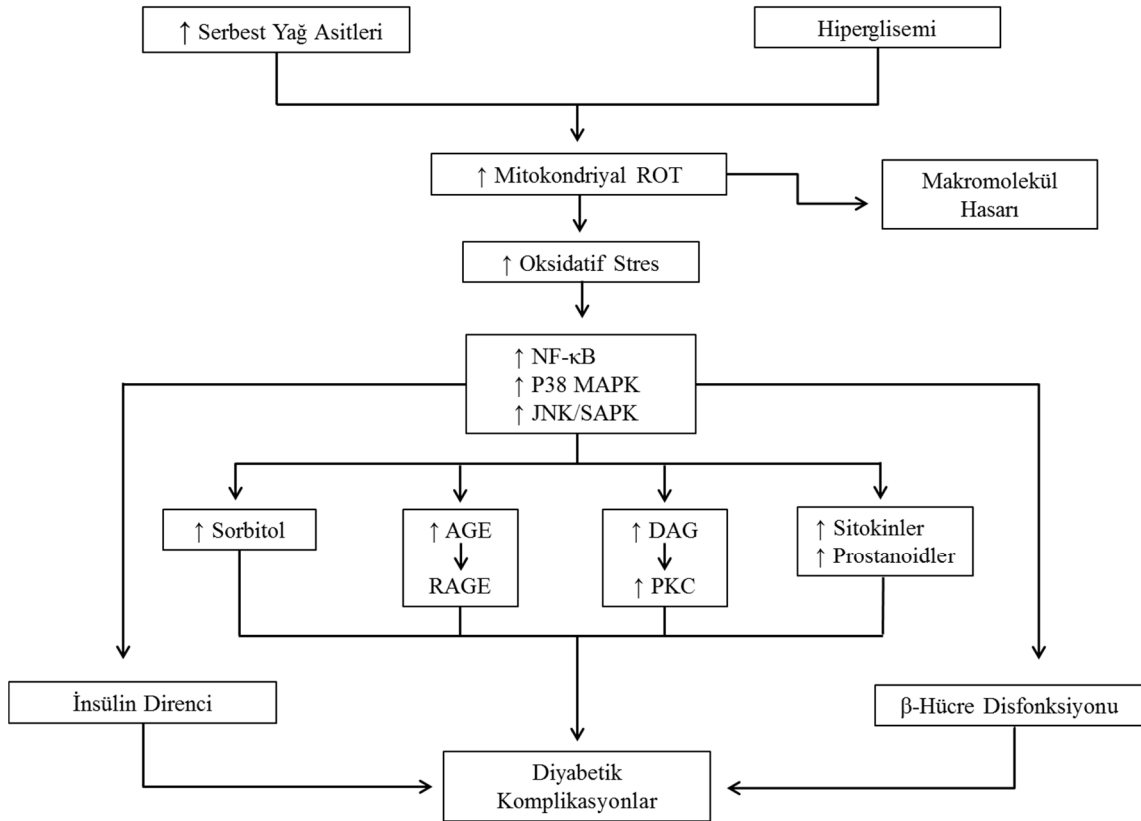
Makrovasküler komplikasyonlar için daha az iyi tanımlanmış biyokimyasal mekanizmalar vardır. Miyokardiyal infarktüs, inme, kalp-damar hastalıkları, periferik arteriyel hastalıklar makrovasküler komplikasyonlar arasındadır (Krentz ve ark., 2007). Diyabette artmış ateroskleroz riski hipertansiyon ve hiperlipidemi gibi olgular ile ilişkilidir. Hem insülin direnci hem de hiperinsülinemi hipertansiyonda rol oynamaktadır. Hem tip 1 hem de tip 2 DM'de artmış çok düşük yoğunluklu lipoproteinler (VLDL)'den dolayı oluşan hipertrigliseridemi iyi tanımlanmış bir lipid anormalliğidir ki bu, ateroskleroz için bilinen bir risk faktörüdür. Diyabetin, lipoproteinlerin yükselmiş glikasyon ve oksidasyonu ile artmış aterogenez; bazı pıhtılaşma faktörleri ve platelet agregasyonunu artırarak diyabete bağlı prokoagülan duruma sebep olma; tip 2 DM'de hiperinsülinemiden dolayı damar duvarlarında proaterojenik değişimler; hiperglisemik etkiden dolayı damar duvarlarında proaterojenik değişimler gibi risk faktörü durumlarına sinerjistik etki yapabileceği gözlenmiştir (Laakso, 1999; Mooradian ve Thurman, 1999). Tip 2 diyabetli hastalar ile yapılan bir meta-analiz sonucuna göre sıkı glisemik kontrol makrovasküler olguların insidansının düşmesine, özellikle inme ve periferik damar hastalıklarının azalmasına yardımcı olmuştur (Stettler ve ark., 2006).

Gerek mikrovasküler gerekse makrovasküler komplikasyonlar olsun olguların oluşmasını ve/veya oluşuktan sonra ilerlemesini engellemek ya da durdurmak için sıkı bir glisemik kontrole ihtiyaç duyulmaktadır.

1.4. Diyabet ve Oksidatif Stres

Reaktif oksijen türleri, moleküller oksijen metabolizmasından türeyen ve bütün aerobik organizmalarda doğal olarak kendiliğinden oluşan serbest radikallerdir. Bu aynı zamanda "aerobik yaşamın paradoksu" olarak da adlandırılır (Davies, 1995). Pek çok reaktif oksijen türü normal ve gerekli olan metabolik reaksiyonların yan ürünleri olarak ortaya çıkar. Bu reaksiyonlardan endojen kaynaklı olanlar; mitokondride enerji üretimi esnasında elektron transfer zincirinden sızan elektronlar ya da sitokrom P-450 gibi detoksifikasyon reaksiyon sistemleri, fagositlerin "solunum patlaması" olarak bilinen fagositozis esnasında bakteri ve virüsleri yok ederken yüksek miktarda oksijenin tüketilmesi sayılabilir. Eksojen kaynaklı olanlar ise sigara dumanına maruz kalma, çevresel kirlilik, aşırı alkol tüketimi, asbest, radyasyona maruziyet, bakteriyel, fungal

ve viral enfeksiyonlar sayılabilir (Beyer, 1992). Aşırı üretilen reaktif oksijen türleri membran lipidleri, protein ve DNA gibi yapıların normal çalışma düzenlerini engelleyerek hasara neden olabilir. Biyolojik sistemlerdeki bu hasarların sebepleri bir taraftan aşırı reaktif oksijen türlerinin üretimi, diğer taraftan da bu üretimleri engelleyecek ya da azaltacak olan enzimatik ve non-enzimatik antioksidanların eksikliğidir (Dröge, 2002). Biyolojik hasara neden olan reaktif oksijen türleri organizmada pro-oksidan/antioksidan dengeyi bozar ve oksidatif strese neden olur (Kovacic ve Jacintho, 2001). Şekil 1.2 de Hiperglisemiyle gelişen oksidatif stres ve buna bağlı mekanizmalar özetlenmiştir (Evans ve ark., 2002'den modifiye edilerek).



Şekil 1.2. Hiperglisemi ve oksidatif stres sonucu gelişen mekanizmalar (Evans ve ark., 2002'den modifiye edilerek).

Diyabetik kişilerin plazmalarında oksidatif hasar göstergesi olan tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri (TBARS) ve lipid peroksitlerin artışı hiperglisemi ile oksidatif stres arasında güçlü bir bağlantı olduğunu göstermektedir (Nourooz-Zadeh ve ark., 1997). Hipergliseminin indüklemesiyle oluşan nonenzimatik glikozilasyon, polioli yolağı, glukoz oto-oksidasyonu ve monosit disfonksiyonu serbest radikallerin devamlı olarak üretilmesine neden olur (Hegde ve ark., 2013). Hem hipergliseminin

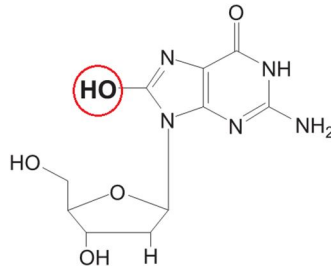
mevcudiyeti hem de bundan dolayı oluşan sürekli serbest radikallerin üretimi, LDL'de bulunan lipidlerin serbest radikaller ile etkileşimi sonucu oluşan oksidasyonu lipid peroksidasyonu ile son bulmaktadır. Oksidatif stres sonucu gerçekleşen bu zincir reaksiyonlar aterosklerozu neden olmaktadır (Pratico, 2001). Glukozun yüksek konsantrasyonu sebebiyle glukoz poliol yolağına girerek aldoz redüktaz aracılığıyla sorbitole metabolize olur. Artmış poliol yolağı aktivitesi kofaktör NADPH'yı tüketir (Miwa ve ark., 2003). NADPH, Glutasyon redüktaz vasıtasıyla okside glutasyonun (GSSG) tekrar redükte (GSH) hale gelmesinde kullanılır (Urso ve Clarkson, 2003). Artan sorbitol üretimi hücre içi osmotik dengeyi bozar. Ayrıca azalan antioksidan aktivite daha fazla oksidatif stres oluşumuna neden olur (Stevens ve ark., 1993). Bu şekilde artan oksidatif stres aynı zamanda insülin direncine de neden olabilir. Muhtemel mekanizmalar arasında oksidatif stresin, stres sinyali olan mitojenle etkileşen protein kinazları (MAPKs) stimule etmesidir. Örneğin c-jun N terminal kinaz (JNK) insülin sinyalinin inhibisyonuna neden olur. Reaktif oksijen türleri JNK'yı aktif edebilir ve bu da MAPK fosfatazı (Kamata ve ark., 2005) ya da Glutasyon S-transferazı (Adler ve ark., 1999) inaktif edebilir. JNK'nın aktivasyonu T2D ve insülin direncinin etiolojisinde önemli bir rol oynamaktadır (Hotamisligil, 2006).

1.5. Oksidatif DNA Hasarı

Organizma oksidatif stres altındayken, serbest radikaller indirgenemezler ve nükleik asitler, lipidler ve proteinler gibi hücrel makromoleküllerin hasarına neden olurlar (Bokov ve ark., 2004). Hem nükleer hem de mitokondriyal DNA, oksidasyona çok duyarlı bir moleküldür. Hidroksil radikalleri, tekli oksijen, peroksil radikalleri ve peroksinitrit gibi reaktif oksijen türleri DNA bazlarının modifikasyonlarına ve çeşitli DNA hasarlarına neden olurlar (Whiteman ve ark., 2002).

Guanin, DNA'nın yapısında en düşük iyonlaşma potansiyeline sahip olan ve oksidasyona en yatkın olan bazdır (McDorman ve ark., 2005). Modifiye bir baz olan 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin, reaktif oksijen türlerinin DNA'da yaptığı 20'den fazla oksidatif baz hasar ürününden biri olup guaninin 8. karbon atomuna hidroksil radikali atakları sonucu oluşan oksidatif DNA hasarının duyarlı bir göstergesidir (Şekil 1.3). Aslında değişmiş ya da hasarlanmış DNA'da bulunan 8-OHdG rezidülerini spesifik bir endonükleaz uzaklaştırabilmektedir (Chung ve ark., 1991). Ancak, oksidatif stresin aşırı

derecede yükselmesi, glikozilazlar tarafından DNA'nın onarımını engeller (Gate ve ark., 1999). DNA'nın oksidasyonu sonucu 8-hidroksi guanozin (8-OHdG) oluşumuyla birlikte mutasyonlar ve tek-zincir kırılmaları meydana gelir (Marnett, 2000). Ayrıca, 'OH tarafından guanin oksidasyonu sonucu DNA'nın hasarlanarak değişimine (Kasai ve ark., 1986), mutasyonların (Ames, 1983) ve kanser oluşumlarına (Floyd, 1990) öncülük eder. 8-OHdG nispeten stabil bir oksidasyon ürünüdür. DNA hasarında 8-OHdG, hem dokuda hem de idrarda yüksek doğrulukta DNA'nın oksidasyon/onarım oranının ölçülebilir bir göstergesidir. Hücresel yaşlanma, apoptozis ve kanserli hücre fenotiplerinin gelişmesi, DNA'nın oksidasyonu ile sıkı bir ilişki içindedir (Wu ve ark., 2004). Pek çok çalışma hiperglisemisi varlığı sebebiyle daha önce de bahsedilen (glukoz otooksidasyonu, poliol yolağı, AGE gibi) yollar (Hegde ve ark., 2013) vasıtasıyla oksidatif stresin artması sonucu idrarda ve lenfositlerde 8-OHdG artışına sebebiyet vermektedir (Suzuki ve ark., 1999).



Şekil 1.3. 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG).

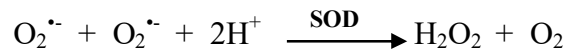
1.6. Antioksidan Savunma Sistemi

Antioksidanlar, düşük konsantrasyonlarda bulunan ve okside olabilen bir substratın oksidasyonunu önemli derecede engelleyen ya da geciktiren indirgeyici ajanlardır (Halliwell ve Gutteridge, 1995). Oksidatif hasara karşı antioksidan koruma mekanizması, reaktif oksijen türleri (ROT) oluşumlarının engellenmesi, oluşan ROT'ların yok edilmesi veya inaktive edilmesi ve ROT zincir reaksiyonlarının kırılması şeklindedir (Benzie, 2000). Vücutta pek çok farklı antioksidan ve antioksidan enzim vardır. Bu yapılar çeşitli mekanizmalar ile birbirleriyle bağlantılı olarak koordine bir biçimde savunma sistemini oluştururlar.

1.6.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) (EC 1.15.1.1)

Süperoksitin (O_2^-) üretimi hücre metabolizması esnasında kaçınılmaz bir sonudur. Aktif nütrofillerde NADPH oksidazın O_2 'yi okside etmek için NADPH'ı kullanmasından (Babior, 2000); ürik asit üretiminde ksantin oksidaz ve ksantin dehidrogenaz enzimleri tarafından ksantin ve hipoksantin oksidasyonundan (Radi ve ark., 1992); monoaminlerin oksidasyonundan (Fang ve ark., 2002) ve sitokrom P-450 tarafından O_2 'nin bir elektron indirgenmesinden sonraki (Fleming ve Buse, 2001) O_2^- anyon oluşumu verilebilecek sadece birkaç örnektir.

İlk kez McCord ve Fridovich (1969) tarafından tanımlanmış olan süperoksit dismutaz (SOD), oksijenli solunum reaksiyonları esnasında oluşan süperoksit anyonunun (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dönüşümünü katalizler (Flohe ve Ötting, 1984; Sun ve ark., 1988). O_2^- nun bu reaksiyonu kendiliğinden meydana gelir. Ancak SOD aracılığı ile bu dismutasyon reaksiyonunun hızı 4000 kat artar (Flohe ve Ötting, 1984). SOD, hücrel reaksiyonlarda süperoksit düzeylerini kontrol etmede, doğrudan oksidatif hasara karşı hücreleri ve molekülleri korumada önemli bir role sahiptir (Flohe ve Ötting, 1984; Sun ve ark., 1988).



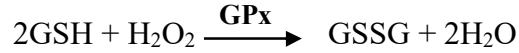
Reaktif oksijen türlerine karşı antioksidan savunmanın ilk basamağını SOD oluşturur. SOD aktivitesiyle açığa çıkan hidrojen peroksiti suya indirgeyen glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz (KAT) ikinci savunma hattını meydana getirirler. Bu nedenle SOD aktivitesindeki herhangi bir artış, ikinci kademedeki savunma enzimlerinin aktivitesinde bir artışa neden olmaktadır. Yüksek süperoksit üretimine karşı bir adaptasyonu gösteren SOD artışı ile GPx arasındaki dengesizlik, hücrelerdeki oksidatif stresin bir göstergesidir. Bir başka ifadeyle SOD/GPx oranındaki yükselme oksidatif hasara ve patolojik olayların başlamasına neden olabilir (Gaeta, 2002). SOD, oksijeni metabolize ederek enerji sağlayan hücreleri süperoksit radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumak ve böylece lipid peroksidasyonunun başlamasını engelleyerek antioksidan savunma sağlaması açısından canlılar için önemi büyüktür (Niwa ve ark., 1990).

1.6.2. Glutasyon Peroksidaz (GPx) (EC 1.11.1.9)

Biyolojik sistemlerdeki $O_2^{\cdot-}$ 'in dismutasyonu sonucu açığa çıkan H_2O_2 aslında bir serbest radikal değildir. H_2O_2 serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynamasının nedeni gerçekleştirdiği reaksiyonlar sonucunda $\cdot OH$ iyonu gibi daha güçlü reaktif türlerin oluşmasıdır (McCord, 1993). Bu yüzden dismutasyon sonucu açığa çıkan H_2O_2 'nin derhal ortadan kaldırılması hücre için büyük bir önem arz etmektedir.

Glutasyon peroksidaz bünyesindeki dört selenyum atomuyla selenoprotein ailesine ait olup peroksidazlara karşı önemli rol oynayan bir savunma mekanizmasıdır (Imai ve Nakagawa, 2003).

GPx, H_2O_2 ve diğer hidroperoksidleri indirgerken elektron donörü olarak glutasyonun redükte formunu (GSH) kullanır. Redükte glutasyon (GSH), glutasyon redüktaz (GR) aracılığıyla NADPH kullanılarak okside glutatyondan (GSSG) elde edilir (Chance ve ark., 1979). GPx, Katalaz gibi H_2O_2 'nin yüksek konsantrasyonlarında değil, düşük H_2O_2 konsantrasyonlarında etkili bir şekilde H_2O_2 'yi ortamdan uzaklaştırır (Dat ve ark., 2000). Bu şekilde lipid peroksidasyonunu önleyerek biyolojik membranların yapı ve fonksiyonlarının sürdürülmesinde önemli bir rol üstlenir (Young ve Woodside, 2001). GPx, peroksitlerin alkollere dönüşümünü katalize ederek; eritrosit, zar lipidleri, hücre zarı, sellüler ve subsellüler membranların oksidatif hasardan korunmasını sağlar (Oldfield, 1987).



KAT ve GPx enzimlerinin benzer etkisi olduğu halde hücre içindeki yerleşim ve etki yerleri bakımından farklılık gösterirler. GPx enzimi başlıca sitozol ve mitokondride bulunurken (Gilbert ve Colton, 1999), KAT enzimi peroksizomlarda bulunmaktadır (Karihtala ve Soini, 2007).

1.6.3. Katalaz (KAT) (EC 1.11.1.6)

Katalaz, glikoprotein yapısında bir hemoproteindir (Von Sonntag, 2006). Katalaz dört subüniteden oluşmakla beraber, her subünite bir hem grubu içerir ve katalazın aktivitesini gerçekleştirmekle sorumludur (Mari ve Cederbaum, 2001). Katalaz özellikle karaciğer ve eritrositte en yüksek konsantrasyonda bulunur. Böbrekte

oldukça yüksek; beyin, kalp ve iskelet kasında düşük; destek dokusunda ise en düşük aktiviteye sahiptir (Pryor, 1986). Hidrojen peroksiti, su ve oksijene metabolize eder.



Katalaz, en yüksek turnover sayısına sahip enzimlerden birisi olup dakikada 5 milyon molekül aktivitesiyle çok etkilidir. Bu yüzden H_2O_2 'nin yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu ortamlarda oldukça etkili temizleme kapasitesine sahiptir (Halliwell, 1974). H_2O_2 'nin makromoleküllerle reaksiyona girmesinden hemen önce onu detoksifiye ederek, DNA gibi hassas yapıların korunmasında ne kadar önemli olduğunu ortaya koymaktadır (Mari ve Cederbaum, 2001).

1.6.4. Glutatyon Redüktaz (GR) (EC 1.8.1.7)

GSH oksidatif stres altındayken kolayca okside olur. Okside olmuş iki molekül GSH birbirleriyle reaksiyona girer ve bir disülfid bağı ile GSSG dimerini oluştururlar. Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz (G6PD) bir indirgeyici güç olan NADPH üretir. GR için zorunlu kofaktör olan NADPH temin edilerek, GSSG'de bulunan sülfür köprüsü kırılır ve tekrar iki molekül GSH üretilmiş olur (Lu, 1998). Bu mekanizma ile GR, GSH/GSSG oranını yüksek tutarak hücre içi $-\text{SH}/-\text{SS}$ oranını korur. Bundan dolayı bu enzim hücrelerde reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hücre hasarına karşı, yüksek GSH konsantrasyonunun devamı ve GSH redoks dengesinin sürdürülmesi için kritik öneme sahiptir (Chance ve ark., 1979). Özellikle üretilen bu NADPH eritrositlerin oksidatif hasar sonucu hemoliz olmalarını önler (Chance, 1979). Çünkü GSH, oksidazlar tarafından protein sülfidlerine tercih edilen bir substrat olup protein sülfidril oksidasyonunun önlenmesinde rol oynar. Bundan dolayı canlılar için GSH'nun yüksek konsantrasyonları ve GSSG'un ise düşük konsantrasyonları oksidatif stresin engellenmesi için önemlidirler.

1.6.5. Glutatyon-S-Transferaz (GST) (EC 2.5.1.18)

GST'ler detoksifikasyon enzim ailesinden olup, ksenobiyotik ve karsinojenlerin metabolizmasından sorumlu, faz-II metabolize edici enzimler olarak çalışan fonksiyonel enzimlerdir. GST'ler, ksenobiyotikleri ve karsinojenleri taşıdığı bir elektrofilik merkez

ve GSH ile konjugasyon yoluyla daha çözünebilir ve daha kolay ayrıştırılabilir bileşiklere dönüştürerek detoksifikasyon yaparlar (Hayes ve Pulford, 1995).

1.6.6. Glutasyon

GSH; glutamat, sistein ve glisin içeren bir tripeptid non-enzimatik antioksidandır. GPx ve GST için zorunlu bir ko-substrat olmakla birlikte güçlü bir nükleofildir. Bu yüzden redoks tepkimelerinde tercih edilen bir molekül olmakla beraber, $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$ ve 1O_2 ile reaksiyona girerek nötralize olmalarını sağlar (Levine ve Kidd, 1986). Proteinlerdeki sülfidril gruplarını indirgenmiş halde tutarak onların okside olmasını engeller (Urso ve Clarkson, 2003).

1.7. α -Amilaz ve α -Glukozidaz

Nişasta; amiloz ve amilopektin polimerlerinin bir birleşimidir. Amiloz, α -1,4-glikozidik bağlar ile glukoz birimlerinin lineer polimer bağlanması ile oluşur. Amilopektinde ise amilozdan farklı olarak dallanmalar görülür (Stam ve ark., 2006). Nişastanın sindirimindeki metabolik yolakta önce ince barsaklarda α -amilaz tarafından hem lineer maltoz hem de dallanmış izomaltoz oligosakkarit ürünlerine dönüştürülür. Maltoz ya da izomaltoz gibi şekerlerin hiç biri α -glukozidaz tarafından hidroliz edilmeden kana absorbe edilemez (Casirola ve Ferraris, 2006). Amilaz hem pankreasta hem parotis bezinde üretilir ve serumda her ikisinde bulunur. Pankreastaki miktarı doğrudan ölçülebilir. Zimojen bir enzim değildir. Çünkü α -amilaz glikojenin dokularda yıkılmasında rol oynamaz, zira dokulardaki glikojenin α -1,4 glikozit bağının hidrolizi için fosforilize olarak aktif hale gelmesi gerekmektedir. Glikojendeki 1,6 bağlarını da yine amilaz değil, ancak α -1,6-amiloglikozidaz yıkabilir (Champe ve ark., 2007). İnce bağırsağın iç yüzeyindeki fırça kenarlarında bulunan α -glukozidazda, nişasta ve glikojen gibi karbonhidatların parçalanmasını sağlar. Glukozun α -bağlı polimerleri içeren glukokonjugatlardan glikozil rezidülerinin koparılmasını gerçekleştirir (Miura ve ark., 1998).

1.8. Karaciğer

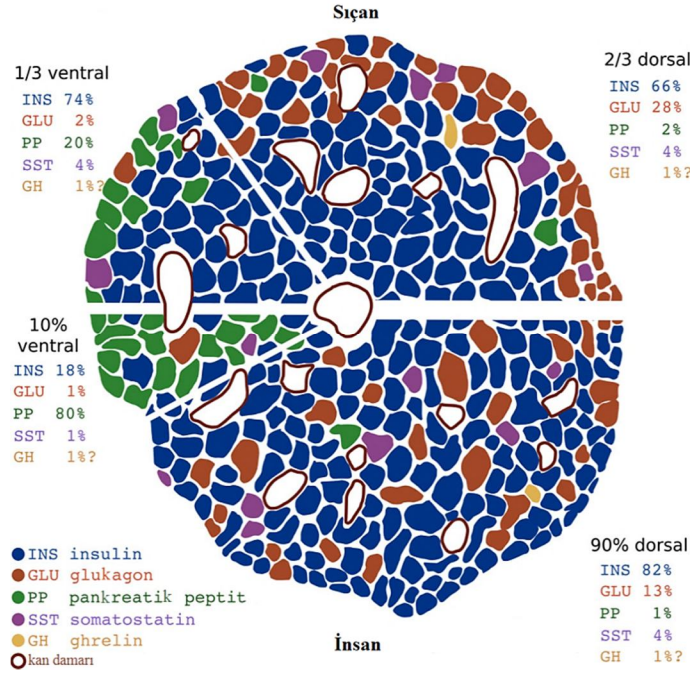
Karaciğer fizyolojik olarak karbonhidrat, yağ, protein, vitamin ve demir metabolizmasının yanı sıra pıhtılaşma faktörlerinin yapımı, ilaç ve toksik maddelerin detoksifikasyon işlemleri, hormonlar üzerine etkisi, retikulo endotelial sistem ile kan temizliği ve safra üretimi gibi pek çok fonksiyonu yerine getirir (Champe ve ark., 2007). Karaciğerde yapısal ve fonksiyonel birim karaciğer lopcuğudur (Abraham ve Kierszenbaum, 2006). Karaciğerin yapısal bileşenleri; hepatosit plakları içeren parankim, fibröz Glison kapsülü ile devam edip kan damarları, sinirler, lenfatik damarlar ve safra kanallarını barındıran bağ dokusu stroması, hepatosit tabakaları arasındaki vasküler kanalları oluşturan sinüzoidler, sinüzoidal endotel ve hepatositler arasında bulunan perisinüzoidal aralıklar (Disse aralıkları) şeklinde sıralanır. Hepatositler, karaciğerdeki hücrelerin yaklaşık %80'ini oluşturan bir hepatik lobülün fonksiyonel olan ekzokrin ve endokrin geniş poligonal hücreleridir (Ross ve ark., 2002). Hepatosit kordonları arasında yerleşmiş olan hepatik sinüzoidler, ince ve kesintili bir endotel ile örtülüdür. Bu kesintili sinüzoidal endotelin altında yer alan bazal membran da kesintilidir. Hepatik sinüzoidlerin duvarında bir çeşit makrofaj olan Kupffer hücreleri bulunur. Sinüzoidler, portal ven ve hepatik arterin terminal dallarından kanlanırlar. Kan içeriği hepatositlerde modifiye edildikten sonra terminal hepatik venüllere boşaltılır. Sinüzoidler kapillerlerden daha geniştir ve daha düzensiz bir yapıya sahiptir (Fawcett ve ark., 1986).

1.9. Pankreas

Pankreas abdominal boşlukta midenin arkasında 12-15 cm uzunluğunda gittikçe incelen yassı bir organdır (Gray, 2008). Baş, gövde ve kuyruk olmak üzere üç kısma ayrılır. Baş kısmı c-biçiminde duodenuma yakın genişlemiş bir bölgedir. Gövde ve kuyruk dalağın hilumuna doğru vücudun orta hat kısmında uzanır. Pankreas memelilerde en önemli endokrin salgı bezlerinden biridir. Aynı zamanda ekzokrin bir bezdir. Ekzokrin enzim salgılarıyla sindirime katılır ki pankreatik kanal duodenuma direkt bağlantılıdır. Çünkü pankreatik özsu duodenuma salgılanır. Endokrin salgılarıyla da kan glukoz seviyesini hormonal olarak regüle eder (Gardner ve Shoback, 2011).

Pankreasın ekzokrin dokusu tubuloasiner bez olarak bilinen üzüm salkımı gibi organize olmuştur. Ekzokrin doku hem asiner hücre hem de besin sindiriminden sorumlu kanal hücrelerine sahiptir. Pankreas içerisinde Langerhans adacık hücreleri olarak adlandırılan endokrin hücreleri, ekzokrin doku içine gömülü, asiner ve kanallar arasına rastgele dağılmış halde bulunur (Gardner ve Shoback, 2007). Ekzokrin dokuda bulunan asiner hücreler, karbonhidrat, protein, yağ ve nükleik asitlerin sindirim enzimleri ve mideden gelen asidik içeriği nötralize eden alkali bir sıvı olan bikarbonat iyonları üretir. Üretilen bu pankreatik özsu, ince bağırsak hormonlarına cevap olarak ekzokrin kanal vasıtasıyla duodenuma salgılanır (Guyton ve Hall, 1996).

Pankreasın %98-99'unu ekzokrin hücreler kaplarken, geri kalan kısımda ise adacık hücreleri vardır. Langerhans adacık hücrelerini ilk defa 1869 yılında Alman anatomist Paul Langerhans keşfetmiştir (Henderson ve Daniel, 1979). Pankreas adacık hücreleri 5 farklı tiptedir (Şekil 4). Toplam adacık hücrelerinin % 15-20'sini kan glukoz seviyesini yükselten glukagon üreten α -hücreleri; % 65-80'ini kan glukoz seviyesini düşüren insülin üreten β -hücreleri; % 3-10'unu α ve β hücre sekresyonuyla asiner ve kanal hücrelerin ekzokrin sekresyonunu inhibe eden somatostatin üreten δ -hücreleri; % 3-5'ini ekzokrin pankreatik sekresyonu inhibe eden pankreatik polipeptit üreten γ - (PP ya da F) hücreleri; ve %1'ini appetit salımını uyaran ghrelin üreten ϵ -hücreleri oluşturur (Cabrera ve ark., 2006). Endokrin dokunun ana görevi glukoz homeostazının regülasyonudur (Gardner ve Shoback, 2011). Bunun için de kan glukoz seviyesinin normal sınırlar içinde tutulmasına yardımcı olan hormonlardan biri de insülin dir.

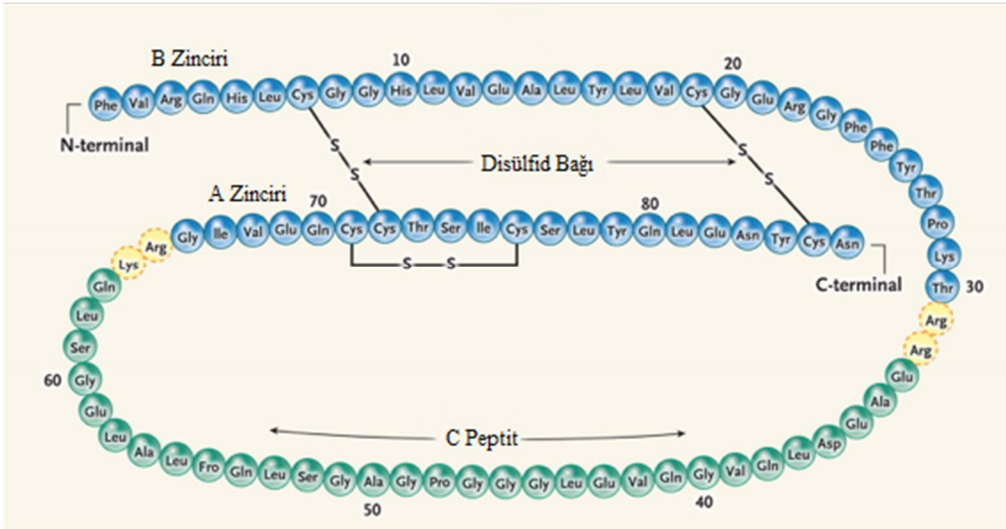


Şekil 1.4. Sıçan ve insan pankreas adacıklarında hücre dağılımları (Suckale ve Solimena, 2008).

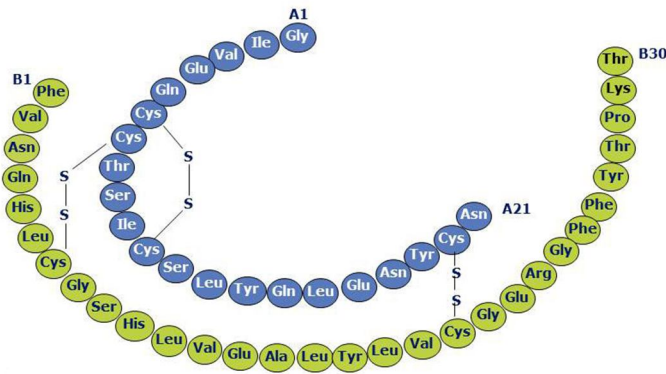
1.10. İnsülin

İnsülin, ilk defa Banting ve Best tarafından 1921 yılında pankreastan izole edilerek insanlık tarihine kilometre taşı olarak geçmiştir. Globüler bir protein olan insülin dizisi, ilk tespit edilen protein olma özelliğini de taşır (Ryle ve ark., 1955). İnsan insülin geni 11. Kromozomun kısa kolunda kodlanır ve klonlanan ilk insan genlerinden biridir (Owerbach ve ark., 1981). Genin endoplazmik retikulum içinde translasyonu sonucu oluşan ürün sinyal peptidi ile birlikte tek bir polipeptit halinde olan preproinsülinidir. Bu polipeptit translasyondan hemen sonra sinyal peptit uzaklaştırılarak B, C ve A zincirlerinden oluşan % 5 aktiviteye sahip proinsülin haline getirilir (Şekil 5). A zinciri daha kısa, kısmen asidik yapıda ve 21 amino asitten oluşur. B zinciri de az asidik yapıda ve 30 amino asitten oluşur. Proinsülinde A zinciri C-terminal uçta ve B zinciri N-terminal uçta olacak şekilde C zinciri ile birbirlerine bağlanırlar. Bu bağlantı noktalarında A ile C ve B ile C arasında ikişer bazik amino asit bulunur. Proinsülin daha sonra golgi aygıtına gönderilerek burada endopeptidaz vasıtasıyla C peptit ayrılır ve A zinciri ile B zinciri 51 amino asitten oluşan aktif insüline dönüştürülür (Şekil 6). A zinciri ile B zinciri arasında iki disülfid bağı (CysA7 ile CysB7, CysA20 ile CysB19 arasında), A zincirinin kendisi üzerinde bir disülfid bağı (CysA6 ile CysA11 arasında)

bulunur (Blundell ve ark., 1972; Baker ve ark., 1988). İnsülin, Zn^{+2} iyonu ile birlikte düzenli bir şekilde hekzamer kristalleri halinde C peptit ile sekretuar bir vezikül içinde depolanır (Howell ve ark., 1978). Pankreas adacık β -hücre yüzeyinde bulunan glukoz taşıyıcısı (GLUT-2) ile glukoz hücre içine taşınarak fosforillenir. Glukoz enerji metabolizmasına girer ve hücre içi ATP miktarı artar. Artan ATP miktarından dolayı β -hücre membranında bulunan ATP'ye bağımlı- K^+ kanalları kapanmasına neden olur ve hücre depolarize hale gelir. Depolarize olmuş membranda voltaja bağımlı- Ca^{+2} kanalları açılır ve hücre içine Ca^{+2} girişine neden olur. Böylece artan hücre içi Ca^{+2} miktarı insülin sekretuar vezikülünün ekzositoz ile salgılanmasını sağlar (Ashcroft ve Gribble, 1998). İnsülin, hedef dokularda reseptör bağımlı sinyal yollarını aktive etmek için Zn^{+2} 'siz monomer halinde hücrelere bağlanarak fonksiyon gösterir (Kahn, 1994).



Şekil 1.5. İnsan proinsülini primer yapısı.



Şekil 1.6. İnsan insülini primer yapısı.

1.11. Zeytin Yaprağı

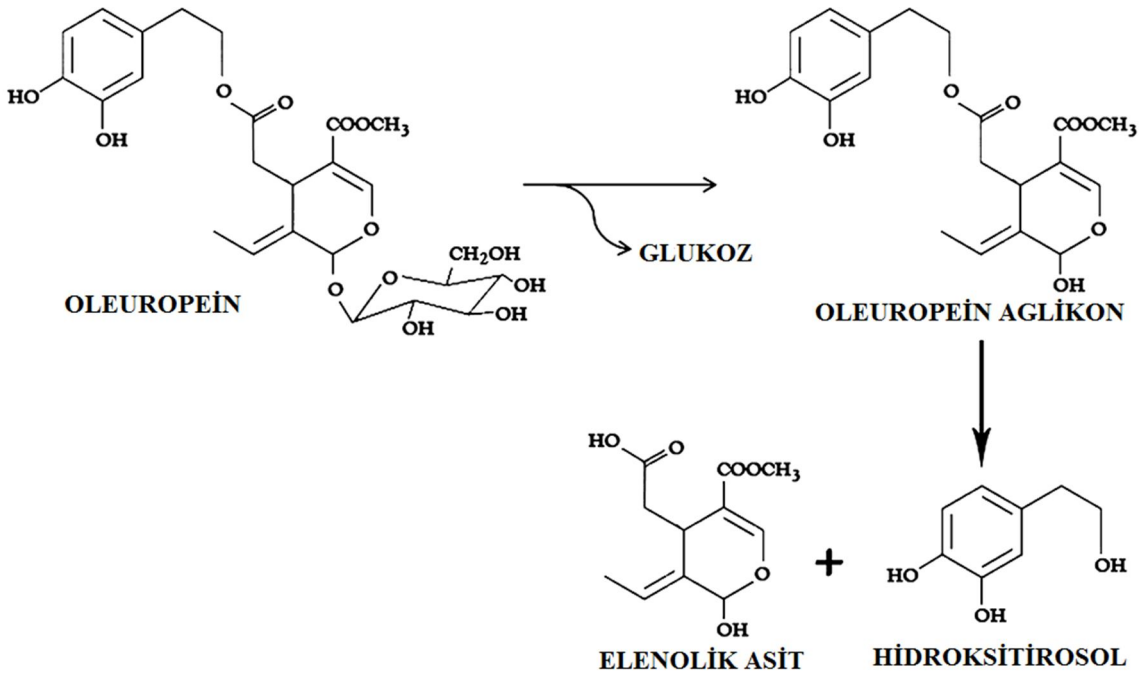
İnsanlar ile bitkiler arasındaki ilişki, insanın varlığı kadar eskidir. Bitkiler yiyecek, içecek, barınma, kereste, kâğıt, güzel koku, vakit geçirme, eğlence ve ilaç gibi pek çok şeyi insanlara sunmuştur. Bu zamana kadar bitkiler insanların hep ilgisini çekmiş ve şifalı sihirli güçlerinden dolayı büyülemiştir. Çünkü insanlar onların iyileştirici, mutluluk verici ve uzun ömürlü olmayı sağlama özelliklerinin olduğuna inanmaktadırlar. Bundan dolayı da bitkiler, her zaman “ölümsüzlüğün iksiri” olarak insanların nihai rüyası olmuştur. Bu mucizevi bitkilerden biri de zeytindir.

Zeytin, Oleaceae familyasına ait olup binominal adı *Olea europaea* L.'dir. Zeytin ağaçları her dem yeşil, bin yıldan daha fazla yaşayabilen, yeryüzünün en eski bitkilerinden birisidir. Zeytin, insanlık tarihinden daha eskidir ve barışın, bilgeliğin ve zaferin simgesi olarak bilinir. Eski Yunan olimpiyat oyunlarında kazananlar zeytin dalından yapılmış taç ile ödüllendirilmişlerdir. İlk modern olimpiyat oyunları olan 1896'daki Yaz Olimpiyatları'nda birinciler "gümüş madalya ve zeytin dalı" ile ödüllendirilmişlerdir. Zeytin, antik dönemlere kadar uzanan en eski ağaçlardan biridir. M.Ö 4000 yıllarında ıslahı, M.Ö 3000 yıllarında da güney ve batı sahillerine tüccarlar aracılığıyla getirildiği düşünülmektedir. Yüz yıllardır da hem meyvesi hem de yaprakları ve gövdesi kullanılmaktadır (Ünsal, 2006). Zeytinin ne kadar eski bir bitki olduğunu, Romalılar döneminde yaşamış olan en ünlü tarım yazarı Columella (M.S. 4-70) *De Re Rustica* adlı kitabında “*olea quae prima omnium arborum est*” yani “tüm ağaçlar arasında ilk zeytin ağaçları” olarak tanımlamıştır (Columella, ?). Eski zamanlarda zeytin ve ürünleri; diyetle, dini inançlarda, kap, çanak, saksı, duvar ve altın gibi pek çok objede ve dekorasyonda kullanılmıştır.

Zeytin ağaçları aynı zamanda bilinen en eski kültür bitkilerindedir. Dünya çapında yaklaşık 40 *Olea* varyetesi vardır. Günlük hayatta sofralık zeytin ve yağı geleneksel akdeniz diyetinde en çok kullanılan ürünlerdir. Zeytin ağacının köklerinden yapraklarına bütün kısımları farklı alanlarda değerlendirilir. Zeytin küçük beyaz çiçeklere ve dikkat çeken yeşil-gri üst yüzeyi, mavi-gümüşi renkteki alt yüzey yapraklara sahiptir. Zeytinin kendine has acımsı ve kekremsi bir koku ve tadı vardır. Zeytinin bu acı tat kaynağının Oleuropein olarak adlandırdıkları bileşik tarafından oluştuğunu; meyvede, yaprakta ve ağaç kabuğunda mevcudiyetini tespit etmişlerdir

(Bourquelot ve Vintilesco, 1908). Zeytinde fenolik bileşik çeşitleri ve seviyeleri yapraklarda, meyvelerde ve çekirdekte farklıdır (Ryan ve ark., 2002). Olgunlaşma periyodu esnasında yapraklarda ve meyvelerdeki fenolik bileşiklerde önemli değişiklikler vardır (Briante ve ark., 2002a).

Zeytin, % 1-3 aralığında değişen yüksek konsantrasyonda zengin bir biyofenolik içeriğe sahiptir (Servili ve ark., 2004). Zeytin yaprağında en bol bulunan ve en aktif olan fenolik bileşik oleuropein maddesidir. Oleuropein, tanen ile ortak özellikler paylaşmaktadır (Cruess ve Alsberg, 1934). Sekoiridoid grubundan olan doğal bir biyoaktif bileşiktir. Oleuropeinin hidrolizi sonucu diğer aktif metabolitler olan elenolik asit ve hidroksitirosol (3,4-dihidroksi-feniletanol) oluşmaktadır (Al-Azzawie ve ark., 2006) (Şekil 7). Verbaskozit, Luteolin-7-glukozit, Apigenin7-glukozit ve Tirozol zeytin yapraklarında bulunun diğer önemli aktif fenolik bileşiklerdir (Lee-Huang ve ark., 2003).



Şekil 1.7. Oleuropeinin hidrolizi.

Son yıllarda bazı besinlerin “doğal” yollardan hastalıkların önlenmesi ve tedavisindeki etkinliğinin bilimsel olarak ortaya konulması, insan sağlığının korunmasında beslenme desteğinin önemini arttırmıştır. Bu nedenle fonksiyonel besinlerin nutrasötik ve terapötik kullanımları giderek yaygınlaşmaya başlamıştır.

Özellikle Akdeniz ülkelerinde pek çok farklı amaç için kullanılan zeytin ve onun çeşitli ürünleri profilaktik açıdan önem arz etmektedir. Bazı deneysel çalışmalar ile diyabetin özellikle en belirgin özelliği olan hipergliseminin azaltılması hedeflenmektedir.

Bu çalışma; zeytin yaprağı ekstraktının hipoglisemik, antioksidan, hepatoprotektif ve DNA oksidatif hasarına karşı etkisinin olup olmadığını araştırmak için planlanmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen verilerin özellikle farmakognozi, etnobotanik ve biyokimya alanlarındaki çalışmalara ışık tutacağı kanaatindeyiz.

2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

Hiperglisemi ile oksidatif stres arasında güçlü bir bağlantı bulunmaktadır (Pratico, 2001). Canlılar üzerinde hiperglisemi etkilerinin daha iyi araştırılabilmesi için diyabetik deney hayvanlarına başvurulmaktadır. Deneysel diyabet modelleri oluşturmak üzere genellikle streptozotosin (STZ) ya da alloksan kullanılmaktadır. STZ'nin diyabetojenik etkisi pankreas β -hücrelerine doğrudan toksik etkili olmasından dolayıdır. STZ, yapısında bir glukoz molekülü bulundurmaktadır. Bu yüzden glukozu duyarlı olan β -hücreleri tarafından STZ, GLUT-2 vasıtasıyla hücre içine taşınır. STZ, tek başına kuvvetli bir baz alkilleyicisidir ve direkt olarak β -hücre DNA'sının alkillenmesine neden olmaktadır (Szkudelski, 2001). Böylelikle β -hücreleri yıkılarak insülin eksikliğine bağlı diyabet oluşur.

Diyabetin tedavisinde gerek halk arasında gerekse deneysel çalışmalar ile tıbbi bitkilerin kullanılması çok eskilere dayanmaktadır. Diyabetin en belirgin özelliği olan hipergliseminin ve bunun sonucunda gelişen oksidatif hasarın azaltılması amacıyla en çok kullanılan bitkiler arasında tarçın (Cheng ve ark., 2012), sarımsak (Eidi ve ark., 2006), zencefil (Imani ve ark., 2014), aleo vera (Abo-Youssef ve Messiha, 2013), soğan (El-Demerdash ve ark., 2005) ve keten tohumu (Makni ve ark., 2011) sayılabilir. Bunların yanında çok daha eskilere dayanan ve çok farklı hastalıklara çare olan zeytinin yeri ayrıdır (Soler-Rivas ve ark., 2000). Zeytin ve ürünlerinden elde edilen bileşiklerin metabolik ve fizyolojik etkileri uzun yıllardır çalışılmalardan bir bileşen olmuştur. Zeytin yaprağı asırlardır yeryüzünde yetiştiği tüm bölgelerde halk tarafından çeşitli hastalıkların geleneksel tedavilerinde kullanılmaktadır (Soler-Rivas ve ark., 2000). Günümüzde bilimin, teknolojinin ve tıbbın gelişmesiyle birlikte yapılan çalışmalar sonucu geniş bir farmakolojik ve destekleyici özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir (Somova ve ark., 2004).

Zeytin yaprağı ekstraktının (Olive Leaf Extract-OLE) ana biyoaktif bileşenlerini oluşturan oleuropein, hidroksitirozol ve verbaskozit gibi polifenolik maddelerin etken değerlerinin çok yönlü olduğu artık bilinmektedir. Bu biyoaktif maddeler antioksidan, antiaritmik, spazmolitik, immun sistem uyarıcı, antimikrobiyal, hipotensif ve anti-inflamatuvar gibi geniş spektrumlu fizyolojik ve farmakolojik etkinliğe sahiptirler (Somova ve ark., 2004; Andreadou ve ark., 2006). Oleuropein ve metabolitleri olan

hidroksitirozol ve tirozolün serbest radikal temizleme ve özellikle LDL'nin oksidasyonunu inhibe etme yeteneği çok kuvvetlidir (Visioli ve ark., 1998; Stupans ve ark., 2002). Oleuropein'in süperoksit ve hidroksil radikallerini indirgeyici ayrıca nötrofillerin solunum patlamasından kaynaklı radikalleri inhibe etme özelliği vardır (Chimi ve ark., 1991; Visioli ve ark., 1998). Zeytin ürünlerinin Akdeniz diyetindeki yüksek tüketilme oranlarından dolayı içeriğini oluşturan fenolik bileşiklerden özellikle oleuropein'in antioksidatif, anti-iskemik ve hipolipidemik etkilerinden dolayı kardiyoprotektif etki gösterdiği rapor edilmiştir (Andreadou ve ark., 2006; Andreadou ve ark., 2007). Oleuropeine benzer şekilde hidroksitirozolda antimikrobiyal, antioksidatif, süperoksit anyon üretimini azaltıcı, peroksinitrit hasarı inhibe edici, tümöral hücre gelişimini yavaşlatıcı ve durdurucu (Visioli ve ark., 1999; Visioli ve ark., 2002) etkileriyle özellikle OLE'nin sinerjik etki yaratmasını sağlamaktadır. Karbontetraklorür ile karaciğerler hasarı oluşturulan BALB/cN fareleri üzerindeki bir çalışmada oleuropein, oksidatif/nitrozatif stres ve inflamatuvar cevabı azalttığı, bununla birlikte karaciğerde histolojik olarak ve hasar belirteçlerinde iyileşme sağlamıştır. Aynı zamanda oleuropein, kÜRatif gruplarda karaciğer kupffer hücrelerinde TNF- β 1 aracılı aktivasyonu ve kaspaz-3 aktivasyonunu önlemiştir (Domitrovic ve ark., 2012). Özellikle peroksidasyon reaksiyonlarının önlenmesinde etkili olduğunu gösteren sonuçlar mevcuttur. Kolestrolden zengin bir diyet ile beslenerek oral yoldan 3 mg/kg dozunda oleuropein ve türevi olan hidroksitirozol desteğini 16 hafta süresince alan sıçanların karaciğer TBARS değerini azalttığı ve antioksidan parametrelerden SOD ve KAT aktivitelerini de arttırdığı görülmüştür (Jemai ve ark., 2008). Zeytin yaprağı ekstratından elde edilen polifenollerden oleuropeinin, oksidatif metabolizmalardan H₂O₂ durdurucu etkisiyle trombosit aktivasyonunu da önleyici bir antioksidan olduğu bildirilmiştir (Singh ve ark., 2008). Hamden ve ark., (2009), zeytin işleme fabrikası atık sularından saflaştırılan hidroksitirozolün 20 mg/kg dozunda allakson indüklü diyabetik sıçanlara uygulama sonucunda karaciğer ve böbrek TBARS seviyesini düşürdüğü tespit etmişlerdir. Bir başka çalışmada ise içerik tayini yapılmadan STZ-indüklü sıçanlarda etanolik ekstrakt uygulanmıştır. Serum glukoz, AST, ALT ve üre seviyesinde diyabetik gruba göre 500 mg/kg oral ekstrakt uygulama grubunda azalmanın olduğunu bildirmişlerdir (Eidi ve ark., 2009).

Moleküler ve hormonal sinyal düzeyinde oleuropein ve hidroksitirozol 3T3-L1 hücrelerinin adipositlere farklılaşırken intrasellüler trigliserit birikimini baskılamaktadır. Flow sitometri her iki polifenolünde mitotik klonal büyüme sırasında 3T3-L1 preadipositlerin bölünmesini inhibe ettiği ve hücre döngüsünün gecikmesine neden olduğunu göstermiştir (Drira ve ark., 2011). Oleuropeinin hücre döngüsünde G1 ve S fazları arasını bloke ederek vasküler düz kas hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve muhtemel mekanizmanın ekstrasellüler sinyal-düzenleyici kinaz (ERK1/2) tarafından regülasyonu ile gerçekleştiği bildirilmiştir (Abe ve ark., 2011). G protein çift reseptör (GPCR) ailesinin bir üyesi olan, safra asitleri tarafından aktive edilen hücre yüzey reseptörü TGR5, hücre içinde tiroid hormonunun aktivasyonu ile enerji tüketiminde bir artışa öncülük eder. Bundan dolayı pek çok bileşiğin TGR5'in agonist ya da antagonist davranışlarıyla enerji metabolizmasını düzenlemektedir. Oleuropein ve olenolik asitin, TGR5'e potansiyel bir agonist olarak anti-diyabetik etkisi ile metabolik bozuklukların düzeltilmesinde önemli bir rol faktör olabileceği vurgulanmıştır (Sato ve ark., 2007).

Enfarktüs, kalıtsal ve beslenmeye dayalı olarak diyabet kadar önemli bir rahatsızlık olmasının yanında erkek ve kadınlar arasında prevalansı gittikçe artan bir sorun olmaktadır. Andreadou ve ark., (2007) doksorubisin ile kalp hasarı oluşturdukları sıçanlarda 100 ve 200 mg/kg oleuropein uygulaması sonucu miyokardiyal nekrozun göstergesi olan serum enzimlerden CPK, ALT, AST ve LDH düzeylerinde azalmanın olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı zamanda yükselmiş kardiyak MDA düzeyini oleuropein uygulanan her iki grupta da anlamlı olarak azaldığı görülmüştür. Deneysel fokal serebral iskemi oluşturulan sıçanlarda OLE'nin 50-75 ve 100 mg/kg günlük oral uygulanması sonucu enfarktüs hacmini, beyin ödemi, kan-beyin bariyeri geçirgenliğini azalttığı ve nörolojik hasar skorlarını iyileştirdiği gözlenmiştir. Bu yüzden OLE'nin nöroprotektif etkisinin olabileceği bildirilmiştir (Mohagheghi ve ark., 2011).

Ağrı modellemesi ile ilgili dikkat çeken çalışmalarda OLE'nin geniş spektrumlu farmakolojik etkilerinin olduğunu gözlenmesi büyük önem arz etmektedir. Esmaili-Mahani ve ark. (2010), sıçanlar üzerinde formalin ile kimyasal, hot plate ile termal ve kuyruğa fiziksel etki ile ağrı modellemesi oluşturmuşlardır. Formalin testinde OLE'nin 200 mg/kg i.p doz uygulaması birinci ve ikinci faz ağrı cevabında önemli ölçüde azalmaya neden olmuştur. Ayrıca düşük doz morfin indüklü hiperaljezinin

bloklanmasını sağlamıştır. Bu bulgular çerçevesinde OLE'nin ağrı koşullarında analjezik etkisinden dolayı potansiyel bir antinosiseptif özelliği olabileceği kanısına varılmıştır. HIV-1 ile enfekte olan H9, T lenfositlerle birlikte kültürlenmiş ve enfekte edilmemiş MT2 hücreleri kullanılarak sinsitya oluşumu vasıtasıyla analiz edildiğinde OLE'nin akut enfeksiyon ve HIV-1 'in hücreden hücreye bulaşmasını inhibe etmiştir. Aynı zamanda OLE, enfekte olmuş H9 hücrelerinin p24 ekspresyonu ile analizi sonucunda HIV-1 replikasyonunu inhibe etmiştir. HIV-1 enfekteli hücrelerin OLE ile muamelesi apoptozis inhibitör proteinleri olan IAP1 ve IAP2'nin ekspresyonunu upregüle (artarak düzenleme) ettiği gözlenmiştir (Lee-Huang ve ark., 2003).

Literatürden de anlaşılacağı üzere zeytin ve yaprağı üzerine yapılan çalışmalar 1990'larda başlamakla birlikte günümüze kadar devam etmiştir ve içeriğindeki aktif maddelerden dolayı da pek çok alanda devam edeceğe benzemektedir. Zeytin ürünlerinden elde edilen bileşiklerin etkileri multifaktöriyeldir. Bunun için de yapılan çalışmaların analizleri çok yönlü olarak değerlendirilmelidir. Her dokunun fizyolojisi ve metabolizması farklı olduğundan dolayı dokuları ve yapılan analizleri kombine değerlendirmek, OLE'nin biyokimyasını ve verdiği mesajları iyi anlamamız için önem arz etmektedir. Özellikle diyabet ile ilgili çalışmalarda görülen en büyük eksiklik içerik tayini yapılmadan ekstrakt uygulamasıdır. Doz ayarlarının kuru ekstrakt üzerinden yapılması aktif olarak oleuropein ve türevleri ile birlikte diğer fenolik miktarlarının etkisinin göz ardı edilmesidir. Bu yüzden ki çoğu çalışmada benzer analizlerin olması hem yapılan çalışmalarla karşılaştırma hem de yapılacak olan çalışmaların destekleyicisi olarak yapılması kaçınılmazdır. Yapılan ve sunulan bu çalışma ile içerik analizi yapılarak ekstrakta bulunan özellikle oleuropein ve diğer fenolik bileşiklerin etkilerinin ortaya konulması, ayrıca çoklu doku analizleri ile biyokimyasal, histopatolojik ve moleküler boyutunun multidisipliner ve multifaktöriyel olarak tespit edilmesi amaçlanmaktadır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Deneyde Kullanılan Materyaller

3.1.1. Deney hayvanı ve zeytin yaprağı materyali

Araştırmamızın canlı materyali olan 250-350 g ağırlığında, 5-6 aylık, 88 adet sağlıklı *Wistar albino* ırkı erkek sıçanlar, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesinden temin edilerek standart plastik rat kafeslerine yerleştirildi. Yapılan çalışmada parametrelere olumsuz etki edecek faktörlerin en aza indirilmesi için gerekli bütün önlemler alındı. Bu amaçla kontrol ve tüm deneme grubundaki denekler aynı koşullarda tutuldu. Ortam sıcaklığı $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, nem %50 ve 12 saat gece/gündüz döngüsünde barındırıldılar. Yapılan bu çalışma, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu tarafından 25.08.2014 tarih ve 2014/90 sayılı izni ile gerçekleştirilmiştir.

Etkileri araştırılacak bitki materyali olan Zeytin (*Olea europaea* L.) yaprağı Antalya ili yöresinden 2013 Ağustos ayında toplanarak gölgede ve açık havada kurutuldu. YYÜ Herbaryumuna VANF-164715 kodu ile kaydı yapıldı. Zeytin yaprakları öğütücüde toz haline getirilerek -20°C 'de kullanılacağı zamana kadar hava almayan kilitli poşetlerde saklandı.

3.1.2. Analizlerde kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmada kullanılan kit ve kimyasal maddelerden: Süperoksit dismutaz (SOD) ve Glutasyon peroksidaz (GPx) enzim kiti Randox-Ransel, α -Amilaz (Abnova), α -Glukozidaz (EnzyX-Assay Bio Tech), Protein Karbonil (Cayman), 8-OHdG (Enzo Life Sciences) STZ, Redükte glutasyon (GSH), 5-5'-Ditiobis 2- nitrobenzoik asit (DTNB), Sodyum sülfat Sigma'dan; Metafosforik asit, Sodyum klorür (NaCl), Sodyum hidroksit (NaOH), Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4), Sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4), Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), Hidrojen peroksit, Sodyum sitrat, Asetonitril, Fosforik asit Merck'ten temin edildi.

3.2. Zeytin Yaprağı Ekstraksiyonu

Zeytin yaprağı ekstraktındaki (OLE) fenolik bileşiklerin miktar tayini için 1 g toz haline getirilen zeytin yaprağı 100 mL'lik erleninde bulunan 50 mL distile suya eklendi ve ağzı iki kat parafilm ile kapatıldı. Erlenin ışık almaması için etrafı alüminyum folyo ile sarıldı. Hot plate üzerinde 80°C, 750 rpm de 12 saat boyunca ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra süzüntü katı partiküllerden ayrıştırılarak ağzı kapaklı falkon tüpte +4°C, 3500 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant 45 µm'lik PTFE filtre şırıngadan geçirilerek küçük partiküllerden arındırıldı ve içerik analizi için viallere aktarıldı.

Deneklere uygulanacak ekstraksiyon için döner evaporatörde 37°C ve 60 rpm de uçurma işlemi gerçekleştirildi. Ayrıca, 1,5 g/100 ml yaprak/su karışımı 80°C suda 5 dakika demlenme (infüzyon) işlemi ile günlük ev tipi ekstraksiyonu yapıldı.

3.3. HPLC ile Ekstrakt İçeriğinin Belirlenmesi

Ekstrakte edilmiş zeytin yaprakları Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) cihazında zeytin yapraklarında bulunan başlıca 4 biyoaktif madde olan Oleuropein, Hidroksitirozol, Tirozol ve Verbaskositin standartlara karşı kantitatif olarak miktar tayini tespiti yapıldı.

HPLC'de ayırma işlemi için Zorbax SB, 5 µm, 150 x 4.6 mm C18 kolon kullanıldı. Mobil faz olarak %80 distile su ve 0,1 M ortofosforik asit ile pH 3.0'a ayarlanmış %20 asetonitril kullanıldı. Bu çözücü polifenolik bileşiklerin ayrıştırılması ve miktar tayininin daha kolay yapılabilmesi için tasarlanmıştır. Waters serisi HPLC cihazında akış oranı 1 mL/dk ve enjeksiyon hacmi 20 µL olarak ayarlandı. Kromatogram polifenolik bileşiklerin tespit ve tayini için 280 nm dalga boyuna ayarlanarak ölçüm yapıldı. Çalışma OLE'de bulunan oleuropein miktarına göre standardize edilmiştir. Çünkü OLE'de bulunan oleuropein bilinen başlıca biyoaktif bileşiktir.

3.4. Doz Belirlenmesi

HPLC'de içerik miktar analizlerine göre elde edilen bulgular ışığında günlük olarak bir insanın tüketebileceği ve tüketmesi gereken gerçekçi zeytin yaprağının ekstrakt miktarı ile ve bu ekstrakt içeriğinde bulunan oleuropein ve diğer fenoliklerin

düzeyleri göz önüne alınarak ve nutrasötik/farmasötik/terapötik doz seviyelerine riayet edilerek ve ayrıca loretatür doğrultusunda Al-Azzawie ve Alhamdani (2006)'nin uyguladıkları etkin doz olan 20 mg/kg esas alınarak, 25-50 ve 100 mg/kg bw olarak belirlenmiştir. Sıçanlara ekstrakt muamelesi intragastrik sonda yardımıyla oral yolla uygulandı.

3.5. LD₅₀ Çalışması

Deney muamelesi gerçekleştirilmeden önce OLE içeriğinde 7 günlük LD₅₀ çalışması yapıldı. Amaç, eğer varsa OLE'nin akut toksisitesini belirlemektir. Bu bağlamda, literatürde tespit edilen en üst doz olan 500 mg/kg bw oral doz (Eidi ve ark., 2009) minimum doz seçildi. Probit analiz metodunun uygulanabilir koşullarının sağlanabilmesi için, 8'er sıçandan 4 farklı ardışık doz grubu ve bir kontrol grubu oluşturuldu. Buna göre, LD₅₀ dozları 500, 1000, 2000 ve 4000 mg/kg bw olarak belirlendi.

3.6. Deneysel Protokole Hazırlık

Deneysel gruplardaki sıçanlar rastgele 8'erden 7 gruba ayrıldı. Çalışma başlamadan önce sıçanlar bir süre ortama alıştırdı. Ağırlıkları tartılarak kayıt altına alındı. Her gruptaki sıçanların kan glukoz değerleri kuyruk bölümlerinden glukometre ile (Accu Check Nano) ölçülerek kayda geçildi. Uygulama başlatıldıktan sonra periyodik her hafta ağırlık ve kan glukoz değerleri ölçülerek takip edildi.

STZ, pH 4,5'e ayarlanmış soğuk sitrat tamponu içerisinde 45 mg/kg bw olacak şekilde taze olarak hazırlandı ve i.p yoldan uygulaması yapıldı. STZ uygulanmasından 3 gün sonra sıçanların kan glukoz değerleri 200 mg/dL ve üzerinde olanlar çalışmaya dâhil edildi.

3.7. Deneysel Uygulama

Her bir grupta 8 deney hayvanı olacak şekilde 7 grup oluşturuldu.

Kontrol Grup (KG): 1 ml serum fizyolojik intragastrik yolla verildi.

Diyabetik Grup (DG): Sıçanlara tek doz 45 mg/kg vücut ağırlığı (bw) STZ i.p yolla uygulandı (Rakieten ve ark., 1963; Tancredi ve ark., 1983).

Diyabet+OLE-25 (D+25): Sıçanlara tek doz 45 mg/kg bw STZ i.p yolla uygulanmasından 3 gün sonra, 25 mg/kg bw OLE intragastrik yolla hergün uygulandı.

Diyabet+OLE-50 (D+50): Sıçanlara tek doz 45 mg/kg bw STZ i.p yolla uygulanmasından 3 gün sonra, 50 mg/kg bw OLE intragastrik yolla hergün uygulandı.

Diyabet+OLE-100 (D+100): Sıçanlara tek doz 45 mg/kg bw STZ i.p yolla uygulanmasından 3 gün sonra, 25 mg/kg bw OLE intragastrik yolla hergün uygulandı.

Diyabet+İnfüzyon (D+İnf): Sıçanlara tek doz 45 mg/kg bw STZ i.p yolla uygulanmasından 3 gün sonra, infüzyon işlemi yapılan çözeltiden 1 ml intragastrik yolla uygulandı.

Diyabet+Akarboz (D+Ak): Sıçanlara tek doz 45 mg/kg bw STZ i.p yolla uygulanmasından 3 gün sonra, 150 mg/kg bw Glucobay (Bayer) intragastrik yolla uygulandı.

Bütün gruplar normal sıçan yemi ve musluk suyu ile *ad libitum* olacak şekilde beslendi. Uygulama 3 hafta devam ettirildi.

3.8. Kan ve Doku Örneklerinin Alınması

Deneme sonunda sıçanlar ketaminle bayıltılarak diseksiyona alındı. Biyokimya testleri olan ALT, AST, LDH, Kolesterol, TG, Kreatinin, Glukoz, Üre ve Ürik asit analizi için gerekli olan kan, enjektörler yardımıyla hayvanların kalbinden alınarak EDTA'lı tüplere, HbA_{1c} için heparinli tüplere aktarıldı. Serum enzimleri için biyokimya tüpleri 2500 rpm'de 10 dakika satrifüj edilerek, Roche Modular PP otoanalizörde analizleri yapıldı. Ayrıca, sıçanların karaciğer, böbrek, beyin, kalp, pankreas ve bağırsak dokuları alındıktan sonra, fizyolojik suyla yıkanıp kurutuldu ve analizlerin yapılacağı zamana kadar derin dondurucuda (-80°C) muhafaza edildi. Daha sonra antioksidan enzim ve redükte glutasyon ile protein karbonil tayini için doku ekstraksiyonları gerçekleştirildi (Xia ve ark., 1994).

3.8.1. Doku ekstraksiyonu

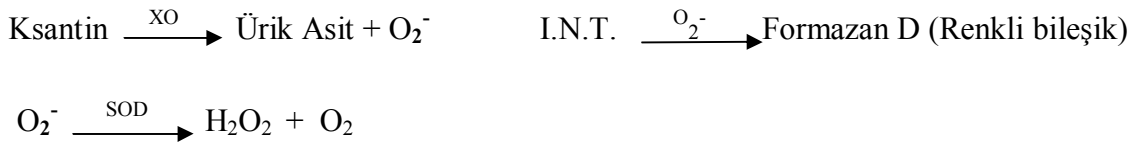
Uygulama sonrası derin dondurucuda (-80°C) saklanan sıçanların pankreas, karaciğer, böbrek, beyin, kalp ve bağırsak dokuları oda sıcaklığına gelinceye kadar kademeli olarak çözdürüldü. Dokularda antioksidan enzim, redükte glutasyon ve protein karbonil tayinleri için doku ekstraksiyon işlemi aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi.

Ekstraksiyon işlemi için homojenat tamponu olarak fosfat tuz tamponu (PBS) (pH 7,4) hazırlandı. Karaciğer, kalp, beyin, böbrek, pankreas ve bağırsak dokularından 500'er mg tartıldı ve küçük parçalar haline getirilerek fincan krozeeye kondu. Dokunun üzerine 5 mL soğuk tampon eklendi ve Bandelin Sonopuls HD 2200 ultrasonik homojenizatörde 3 dakika homojenize edildi. Ekstrakt hemen +4°C 30 dakika 9500 rpm'de soğutmalı santrifüj cihazında (Hettich Universal 320r) santrifüj edildi. Karaciğer, kalp, beyin, böbrek, pankreas ve bağırsak dokusundan elde edilen berrak süpernatantlar analizler için hazır hale getirildi (Xia ve ark., 1994).

3.9. Analizlerin Yapılması

3.9.1. Süperoksid Dismutaz (SOD) Enzim Tayini

Prencip: Süperoksid dismutazın rolü, oksidatif enerji basamağında üretilen toksik süperoksid radikalini (O_2^-), hidrojen peroksite (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dismutasyonunu hızlandırmaktır. SOD tayini McCord ve Fridovich (1969)'in metoduna göre çalışıldı. Bu metotla aşağıdaki formülde görüldüğü gibi ksantin ve ksantin oksidaz kullanılarak süperoksid radikali, 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolyum klorit (INT) ile kırmızı boya formuna dönüşür. SOD aktivitesi, bu reaksiyonun inhibisyon derecesi ile ölçülür.



Analizin yapılışı: SOD enzim aktivitesi Randox-Ransod enzim kiti ile Boeco S-22 UV/Vis spektrofotometrede 505 nm'de 37°C'de ölçüldü (Randox Lab., 1996). Analiz materyali olarak daha önce hazırlanan ve analiz zamanına kadar -80°C'de derin dondurucuda muhafaza edilen doku süpernatantları kullanıldı. İnhibisyonun % 30-60 arası olması sağlandı. Küvete aşağıdaki ayıraçlar pipetlendi.

Örnek	Ayıraç Körü	Standart	Sulandırılmış
Sulandırılmış			20 µl
Standart		20 µl	-----
Fosfat Tamponu	20 µl	-----	-----
Miks Substrat	680 µl	680 µl	680 µl

İçerik karıştırılarak ilk absorbands A_1 30 saniye sonra okundu ve eş zamanlı olarak zaman başlatıldı. Son absorbands A_2 3 dakika sonra okundu.

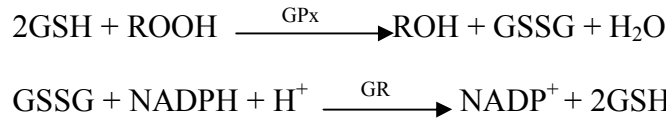
Hesaplama: Spektrofotometreden alınan optik dansite sonuçları aşağıdaki denklemde yerine konarak SOD enziminin % inhibisyonları hesaplandı.

$$100 - \frac{(\Delta A_{Std} \times 100)}{(\Delta A_{Blank})} = \% \text{ İnhibisyon} \quad 100 - \frac{(\Delta A_{\text{Örnek}} \times 100)}{(\Delta A_{Blank})} = \% \text{ İnhibisyon}$$

SOD enzim aktivitesinin hesaplanması için, standart grafiği elde edildi. Standart grafikten elde edilen $y=12,944 \ln(x)+61,831$ formülü ile sulandırma faktörü de hesaba katılarak SOD aktivitesi EU/mg protein olarak spesifik aktivite hesaplandı.

3.9.2. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Enzim Tayini

Prensip: Glutasyon peroksidaz, formülde görülen kümen hidroksidin ile indirgenmiş glutasyonu (GSH) okside eden reaksiyonu katalizler. Ortamda glutasyon redüktaz (GR) ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat hidrojen (NADPH) var ise yükseltgenmiş glutasyon (GSSG), NADPH'm NADP'ye oksidasyonu ile GSH'a indirgenir (Paglia ve Valentine, 1967).



Analizin yapılışı: Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesi, Randox-Ransel enzim kitleri ile Boeco S-22 UV/Vis spektrofotometrede 340 nm'de ultraviyole metotla 37 °C'de ölçüldü (Randox Lab., 1996). Analiz materyali olarak, daha önce hazırlanan ve analiz zamanına kadar -80°C'de derin dondurucuda muhafaza edilen doku süpernatantları kullanıldı.

Kümete aşağıdaki ayıraçlar pipetlendi.

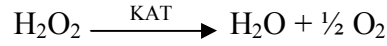
	Ayıraç Körü	Sulandırılmış Örnek
Sulandırılmış Örnek	-----	15 µl
Distile Su	15 µl	-----
Ayıraç	750 µl	750 µl
Kümen	30 µl	30 µl

Küvetler karıştırılarak, örnek ve körün absorbansları 1 dakika sonra okundu. Zamanın başlatılmasından, 1 ve 2 dakika sonra absorbanslar tekrar okunarak dakikadaki absorbans değişimi hesaplandı.

Hesaplama: Örnek ve körün nmol/mg protein sonuçları için, örnek değerden nmol/mg protein, kör değeri nmol/mg protein çıkarıldı. Sulandırma faktörüde hesaba katılarak sonuçlar nmol/mg protein cinsinden spesifik aktivite hesaplandı.

3.9.3. Katalaz (KAT) Enzim Tayini

Katalaz aktivitesi Aebi'nin (1984) metoduna göre çalışıldı. Hidrojen peroksit (H_2O_2) 240 nm 'de maksimum absorbans verir. Deney ortamına ilave edilen H_2O_2 katalaz tarafından su ve oksijene parçalanmakta, bu ise kendini ultraviyole spektrumda absorbans azalması şeklinde göstermektedir. Absorbanstaki bu azalma KAT enziminin aktivitesi ile doğru orantılıdır. Reaksiyon;



Kullanılan reaktifler;

Fosfat tamponu (pH 7 ve 50 mM); absorbansı 0.500 nm'ye H_2O_2 ile ayarlanmış olan H_2O_2 'li fosfat tamponu (H_2O_2 çözeltisi).

Küvete aşağıdaki ayraçlar pipetlendi.

	Kör (mL)	Numune (mL)
Fosfat Tamponu	2.99	----
H_2O_2 Çözeltisi	0.01	2.99
Süpernatant	----	0.01

Bir dakikalık lineer absorbans azalmasının en yüksek (OD_1) ve en düşük (OD_2) değerleri esas alınarak hesaplama yapıldı.

3.9.4. Redükte Glutatyon (GSH) Tayini

Prensip: Ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilmiş dokulardan hazırlanan hemolizat ve süpernatantlarında, sülfidril (SH) taşımayan tüm proteinler, çöktürücü (presipitasyon) çözelti ile çöktürüldü. İndirgenmiş glutatyon (GSH), elde edilen berrak sıvıda sülfidril gruplarının DTNB (5,5'-2-ditiobis nitrobenzoik asit) ile reaksiyonu

sonucu oluşan sarı rengin miktarı ile ölçüldü (Beutler ve ark., 1963; Rizzi ve ark., 1988).

Ayırıcılar:

1. Çöktürücü Çözelti: 1.67 g metafosforik asit, 0.2 g EDTA (disodyum etilen diamin tetraasetik asit), 30 g NaCl 100 ml'ye distile suda eritilerek tamamlandı.

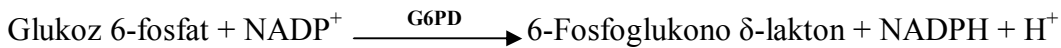
2. Fosfat Çözeltisi: 0.3 M disodyum fosfat distile su ile hazırlandı.

3. DTNB (Ellman's Ayıracı): 40 mg DTNB (5,5'-(2-ditiobis) nitrobenzoik asit), %1 sodyum sitrat, 100 ml'ye distile su ile tamamlandı.

Analizin yapılışı: Doku süpernatantlarından 500 µl alınarak 750 µl çöktürücü çözelti ile karıştırıldı ve +4°C 3500 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatnatın 500 µl si başka bir tüpe alındı ve çökelti atıldı. Üzerine 2 ml fosfat tamponu, 250 µl DTNB ayıracı eklendi. Blank için 500 µl çöktürücü çözeltisi (3 kısım çöktürücü çözelti + 2 kısım distile su), 2 ml fosfat tamponu ve 250 µl DTNB ayıracı tüpe alınarak hazırlandı. Kan numuneleri için 200 µl örnek 1,8 mL PBS ile dilüe edilerek uygun oranda çöktürücü ve diğer ayırıcılar eklendi. Tüpler vorteks ile iyice karıştırıldı ve 5 dakika inkübe edilerek Boeco S-22 UV/Vis spektrofotometrede 412 nm'de köre karşı örnek ve standart numunelerin optik dansiteleri okundu. Sonuçlar nmol/mg doku olarak hesaplandı (Beutler ve ark., 1963; Rizzi ve ark., 1988).

3.9.5. Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz (G6PD) Tayini

G6PD (EC 1.1.1.49), enziminin aktivitesi spektrofotometrede 37°C'de Beutler metoduna göre yapıldı. Bu metod glukoz 6-fosfat varlığında NADP⁺'nin indirgenmesinden oluşan NADPH'nın 340 nm'de verdiği absorbans değeri esasına dayanır (Beutler, 1971). G6PD enzimi aşağıdaki reaksiyonu katalizler:



NADPH'nin oluşum oranı G6PD aktivitesine bağımlı olup 340 nm'deki absorbans artışı ile ölçülebilmektedir.

Küvete aşağıdaki ayırıcılar pipetlendi.

Çözeltiler	Kontrol Küveti Hacim μ l	Numune Küveti Hacim μ l
1 M Tris-HCl, 5 mM EDTA	100	100
0,1 M MgCl ₂	100	100
2 mM NADP ⁺	100	100
6 mM G6P	100	100
Saf Su	600	550
Homojenat	---	50

Karışım 37°C de 10 dakika inkübe edildikten sonra kontrole karşı numunenin absorbands artışı 1 dk arayla 3 dakika okundu. Enzim aktivite hesabı:

$$A \text{ (EÜ/mL)} = (\Delta\text{OD}/6,22) \times (\text{VT}/\text{VE}) \times \text{SF}$$

EÜ/ml : 1 ml'deki enzim ünitesi

Δ OD : Bir dakikadaki absorbands değişimi

6,22 : 1 mM NADPH'in oluşturduğu absorbands değeri (ekstinksiyon katsayısı)

VT : Ölçümün yapıldığı toplam küvet hacmi

VE : Ölçümün yapıldığı küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi

SF : Seyreltme faktörü

3.9.6. Protein Karbonil (PC) Tayini

Protein oksidasyonu Cayman's Protein Carbonyl Assay Kit (Cat. no 10005020) ile örneklerde karbonil bileşik olarak ölçüldü. Karbonil grubunun 2,4-dinitrofenil hidrazin ile reaksiyona girerek 2,4-dinitrofenilhidrazon oluşturması prensibine dayanmaktadır (Levine ve ark., 1990). Protein-hidrozon ürün miktarı 360 nm de spektrofotometrik olarak tayin edildi. Proteinin içeriği protein konsantrasyonuna göre standardize edildi (Lowry ve ark., 1951).

Analizin yapılışı:

1. 2 adet 2 mL'lik ependorf tüpün her birine 200 μ L örnek konur. Tüplerden biri sample (S), diğeri kontrol (K) tüpü olacak şekilde işaretlenir.
2. Örnek tüpüne 800 μ L 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH), kontrol tüpüne de 800 μ L 2,5 M HCl eklenir.
3. Her iki tüp karanlıkta oda sıcaklığında bir saat inkübe edilir. Her 15 dakikada bir kısa süreli olarak vortekslenir.

4. Her iki tüpe 1 mL %20 TCA eklenir ve vortekslenir. Daha sonra tüpler buz aküsünün üstünde 5 dakika inkübe edilir.
5. Sonra tüpler 10.000 x g 'de 10 dakika +4°C de santrifüj edilir.
6. Üstteki süpernatant atılarak 1 mL %10'luk TCA içinde pellet tekrar süspansedilir ve tüpler buz aküsü üstünde 5 dakika bekletilir.
7. Tüpler 10.000 x g 'de 10 dakika +4°C de santrifüj edilir.
8. Üstteki süpernatant atılır. Pellet 1 mL Etanol/Etil asetat (1:1) ile karıştırılarak pellet süspansedilir ve iyice vortekslenir. Tekrar tüpler 10.000 x g 'de 10 dakika +4°C de santrifüj edilir.
9. 8. Basamak iki kere tekrarlanır.
10. Son yıkamadan sonra 500 µL guanidin hidroklorid ile vorteksleyerek protein pelletleri süspansedilir.
11. Artıklardan arındırmak için tüpler 10.000 x g 'de 10 dakika +4°C de santrifüj edilir.
12. En az iki tekerrür olacak şekilde 96-well plate'in kuyucuğuna sample tüpünden 220 µL örnek konur.
13. En az iki tekerrür olacak şekilde 96-well plate'in iki kuyucuğuna kontrol tüpünden 220 µL örnek konur.
14. 360 nm dalga boyunda mikroreader ile absorbans okunur.

Hesaplama:

$$\text{Protein Karbonil (nmol/ml)} = [\text{CA}/0,011](500\mu\text{L}/200\mu\text{L})$$

CA: Correted absorbans (Örnek absorbansından kontrol absorbansının çıkarılması)

3.9.7. Protein miktar tayini

Protein miktar tayini Lowry ve ark., (1951)'nin yöntemi modifiye edilerek yapıldı. Bu metoda göre, alkali koşullar altında proteinlerin Cu^{+2} ile reaksiyona girerek Cu-protein komplekslerini oluşturması ve Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edildiğinde Cu-protein komplekslerinin tirozin ve triptofan artıklarına bağlanarak mavi bir renk oluşturması ilkesine dayanmaktadır.

Gerekli çözeltiler:

A çözeltisi

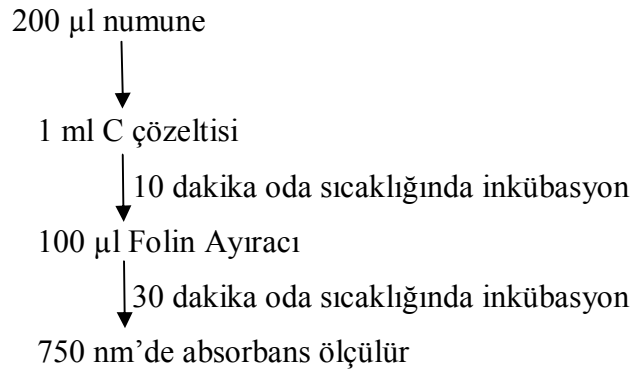
- 0.1 N NaOH : 1 g NaOH distile su ile 250 ml' ye tamamlanır.
- % 2'lik Na_2CO_3 : 2 g Na_2CO_3 0,1 N NaOH ile 100 ml' ye tamamlanır.

B çözeltisi

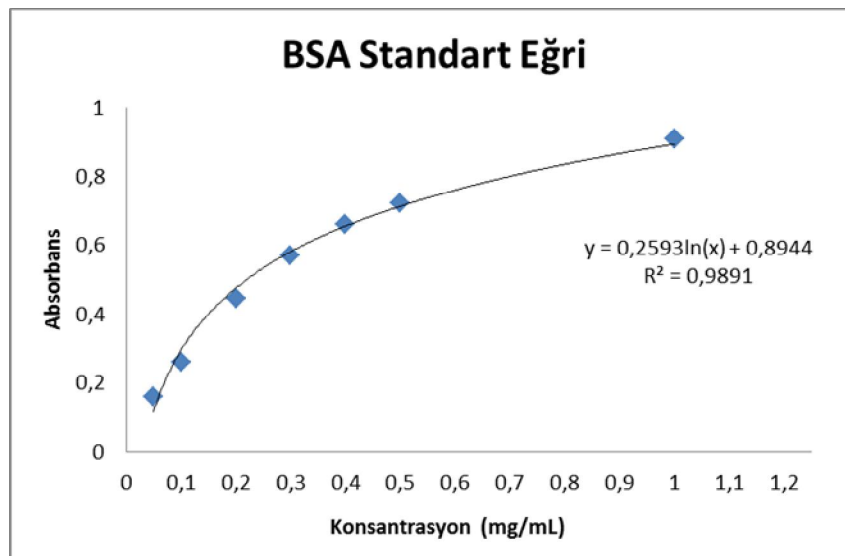
- % 1' lik $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
 - % 2' lik NaK Tartarat
- 1:1 (v/v) karıştırılır

C çözeltisi

- 50 ml A çözeltisi + 1 ml B çözeltisi karıştırılır
- 1N Folin-Ciocalteu ayıracı



Elde edilen absorbanslar protein standart grafiği yardımıyla protein miktarı hesaplandı.



Şekil 3.1. Protein standart grafiği.

3.10. α -Amilaz (EC 3.2.1.1) Tayini

Amilaz, tükürük ve pankreasta bulunan glikosit hidrolaz enzim ailesine ait olup, nişasta içerisinde bulunan glukoz molekülleri arasındaki α -1,4-glikozit bağlarının parçalanmasını sağlar. α -Amilaz aktivite ölçümü Alpha-Amylase Assay kit (Abnova) kullanılarak tayin edilmiştir. Çözünmeyen boyalı bir çiftleşmiş amiloz azur substratı α -Amilaz tarafından parçalanır. Oluşan renk şiddeti 595 nm de ölçülerek örnekteki enzim aktivitesi tespit edilir (Rinderknecht ve ark., 1967).

Analizin Yapılışı:

1. Gruplandırılmış boş 1.5 mL lik ependorf tüplere 10 μ L örnek konur. Üzerine 190 μ L substrat eklenerek düşük devirde vortekslenir ve 5 dakika inkübe edilir. Kör olarak sadece 10 μ L saf su, 190 μ L substrat ve 80 μ L stop reagent kullanılır.
2. Her örnek tüpüne 80 μ L Stop Reagent eklenerek reaksiyon durdurulur. Karışım hemen vortekslenir ve 14.000 rpm, 5 dakika ve +4°C'de santrifüj edilir. 200 μ L süpernatant dikkatlice alınır ve 96-well kuyucuklara transfer edilir. Farklı iki kuyucuğa 200 μ L saf su ve 200 μ L kalibratör eklenir.
3. 595 nm de plate reader ile okuma yapılır.

Hesaplama:

$$\alpha\text{-Amilaz aktivitesi (U/L): } (OD_{\text{örnek}} - OD_{\text{blank}}) / (OD_{\text{cal}} - OD_{\text{H}_2\text{O}}) \times n \times 550 \text{ (U/L)}$$

$OD_{\text{örnek}}$: Numunenin absorbans değeri

OD_{blank} : Blank absorbans değeri

OD_{cal} : Kalibratörün absorbans değeri

$OD_{\text{H}_2\text{O}}$: Distile suyun absorbans değeri

n : Dilüsyon faktörü

550 : Analiz koşullarında kalibratörün equivalent aktivitesi

3.11. α -Glukozidaz (EC 3.2.1.20) Tayini

İnce bağırsağın iç yüzeyindeki fırça kenarlarında bulunan α -Glukozidaz, nişasta ve glikojen gibi karbonhidratların parçalanmasını sağlar. Glukozun α -bağlı polimerleri içeren glukokonjugatlardan glikozil rezidülerinin koparılmasını gerçekleştirir. α -

Glukozidaz aktivite ölçümü, Alpha-Glucosidase Assay (Assay bio Tech) kullanılarak tayin edilmiştir. α -Glukozidaz, 4-Nitrofenil α -D-glukopiranozit ile reaksiyona girer ve sarı renkli bir kompleks oluşur. Oluşan bu kompleksin 405 nm'de verdiği absorbansın ölçülmesi ile aktivite tayini gerçekleştirilir (Kim ve ark., 2005).

Analizin Yapılışı:

1. En az iki tekrerr olcak şekilde her örnek ve standarttan 50 μ L bütün kuyucuklara eklenir.
2. Standart, kontrol ve örnek kuyucuklarının her birine 50 μ L Reaction Mix karışımından eklenir.
3. 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edilerek ve 405 nm de mikroplate reader ile tek seferde okuma yapılır.

Hesaplama:

$$\alpha\text{-Glukozidaz (mU/mL)} = [(OD_{\text{örnek}} - OD_{\text{blank}}) / \text{Eğim}] \times n$$

$OD_{\text{örnek}}$: Numunenin absorbans değeri

OD_{blank} : Blank absorbans değeri

n : Dilüsyon faktörü

3.12. 8-OHdG (8-hidroksi-2'-deoksiguanozin)

DNA hasarında ELISA, (enzyme-linked immunosorbent assay) serumda 8-OHdG'nin tespiti ile miktar tayini için hızlı ve hassas bir yöntemdir. Prensip olarak, tetrametilbenzidin substratının mikroreader ile 450 nm de ölçümüne dayanmaktadır. Oluşan sarı rengin şiddeti 8-OHdG'nin konsantrasyonuyla ters orantılıdır. Serum örneklerindeki 8-OHdG ticari ELISA kiti kullanılarak tespit edildi (Enzo Life Science ADI-EKS-350).

3.13. Histopatoloji

Deneme sonunda sıçanların karaciğer ve pankreas dokularından parçalar alındı ve Fosfat tuz tamponu (PBS) ile yıkandı. Ardından dokular %4'lük soğuk, taze hazırlanan paraformaldehitte 2 saat bekletilerek tespit edildi. Tespit işleminin ardından dokular PBS ile yıkanarak %0.1 sodyum azid içeren %30'luk sükröz çözeltisinde

bekletildi. Karaciğer ve pankreas dokusu için rutin parafine gömme ve hemetoksilen-eozin ile boyama yapıldı. Boyaması yapılan preparatlar Leica ICC 50 ışık mikroskobu ile görüntülenerek değerlendirildi (Bancroft ve Stevens, 1982). Dokuların istatistik analiz çalışması için 6 örnek değerlendirilmiştir. Gruplar arasındaki farkın önemli olup olmadığını tespit etmek için Minitab 14 paket programı yardımıyla Z oran testi yapıldı.

3.14. İmmünohistokimya

Pankreas İmmüno-histokimyasal olarak ABC metoduna uyularak boyandı (Kanter ve ark., 2006). De-parafinizasyon sonrası peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için %3'lük H₂O₂'de 30 dk bekletildi ve distile su ile yıkandı. Non spesifik bağlanmaları önlemek için 1/4 dilüsyonda PBS ile hazırlanan normal keçi serumunda (DAKOX 0907, Denmark) protein blok yapıldı. Kesitler Monoklonal İnsülin proteininde (18-0066, Zymed, San Francisco, CA) 1/40 konsantrasyonda (+4 C) bir gece bekletildi. Kesitler 30 dk PBS ile yıkandı. Biotinli antimouse IgG (DAKO LSAB 2li Kit) 30x2 dk. bekletildi ve PBS ile yıkandı. AEC (Aminoethylcarbazole Substrate Kit, Zymed Labaraturies) 10 dk. bekletildi ve çeşme suyunda yıkandı. Hemetoksilen ile zıt boyama yapılarak su bazlı yapıştırıcı ile kapatıldı. Boyaması yapılan preparatlar Leica ICC 50 ışık mikroskobu ile görüntülenerek değerlendirildi.

3.15. İstatistiksel Analizler

Elde edilen bulgular istatistik olarak değerlendirilerek, aritmetik ortalamaları (X) ve standart sapmaları (\pm SD) bulundu. Gruplar arasındaki farkın önemli olup olmadığını tespit etmek için ANOVA (tek yönlü varyans analizi; one-way ANOVA) testi uygulandı. İkili grupların kendi aralarında karşılaştırılması için de POST HOC testlerden varyansların eşit olması durumunda Tukey HSD testi, varyansların eşit olmaması durumunda ise Tamhane's T2 testi yapıldı (Pallant, 2001). Anlamlılık sınırı olarak $p < 0.05$ kabul edildi. Bu istatistiksel işlemler SPSS.18 paket programı ile gerçekleştirildi.

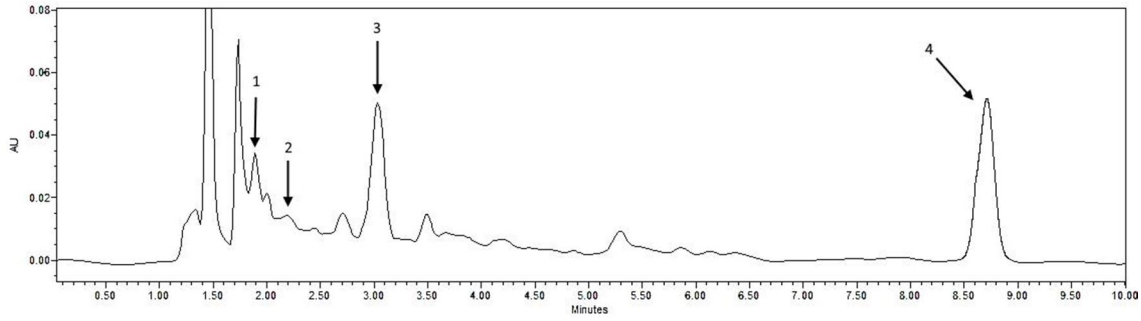
4. BULGULAR

Pek çok metabolik etkisi bulunan zeytin yaprağının, fenolik profilinin ortaya konması, antioksidan, hipoglisemik, hepatoprotektif ve DNA oksidatif hasarının araştırılması amacıyla planlanan bu çalışma sonucu elde edilen bulgular, çizelgeler ve şekiller halinde aşağıda verilmiştir.

Zeytin yaprağının ekstraksiyonu sonucu Waters Serisi HPLC cihazında 280 nm dalga boyunda elde edilen sulu ekstraktaki polifenolik bileşik profilinin kromotogramı Şekil 4.1’de ve miktarları da Çizelge 4.1’de sunulmuştur.

Çizelge 4.1. OLE’nin 280 nm dalga boyundaki fenolik bileşik profili

Fenolik Bileşikler	Tutulma Zamanı (dk)	Miktar (µg/g)	Bağlı miktar (%)
Hidroksitirozol	1,889	461,05	2,84
Tirozol	2,439	41,6	0,25
Verbaskozit	3,221	357,6	2,20
Oleuropein	8,702	15335,55	94,68



Şekil 4.1. OLE’nin HPLC kromotogramı. 1. Hidroksitirozol, 2. Tirozol, 3. Verbaskozit, 4. Oleuropein.

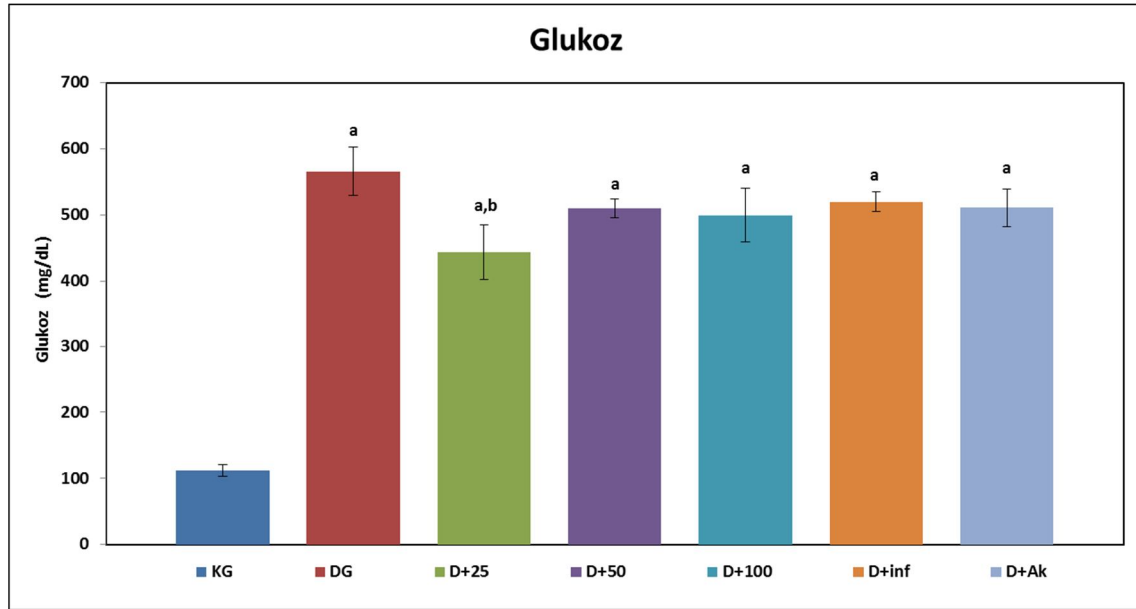
Çizelge 4.1’deki fenolik bileşik profili bulgularına göre, oleuropein 15335,55; hidroksitirozol 461,05; verbaskozit 357,6 ve tirozol 41,6 µg/g bulunmaktadır. Kromotogramda 1.50 dk’da ilk gelen pik metanole aittir.

Yapılan LD₅₀ denemesi sonucu; biri kontrol grubu olmak üzere 4 farklı (500-1000-2000-4000 mg/kg) letal doz uygulaması sonucu hiç bir grupta ölüm gerçekleşmemiştir.

Çizelge 4.2. OLE uygulanan diyabetik sıçanların çeşitli parametreleri

Analizler	KG	DG	D+25	D+50	D+100	D+İnf	D+Ak
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$
Glukoz (mg/dL)	112±9	566±37	444±41	510±14	500±41	520±15	511±28
HbA _{1c} (%)	4,5±0,2	9±0,4	7,4±0,2	7,7±0,5	7,4±0,3	7,7±0,4	8,1±0,3
α -Amilaz (U/L)	2969±198	1950±182	1063±87	1135±93	1340±136	1534±129	1296±184
α -Glukozidaz (mU/mL)	3166±119	3475±180	2696±201	3262±82	3301±148	3364±104	3132±122

OLE uygulanan diyabetik sıçanların kan Glukoz ve HbA_{1c} düzeylerinden elde edilen bulgular aşağıda sunulmuştur (Şekil 4.2-3).



Şekil 4.2. OLE uygulanan diyabetik sıçanların kan glukoz düzeyleri.

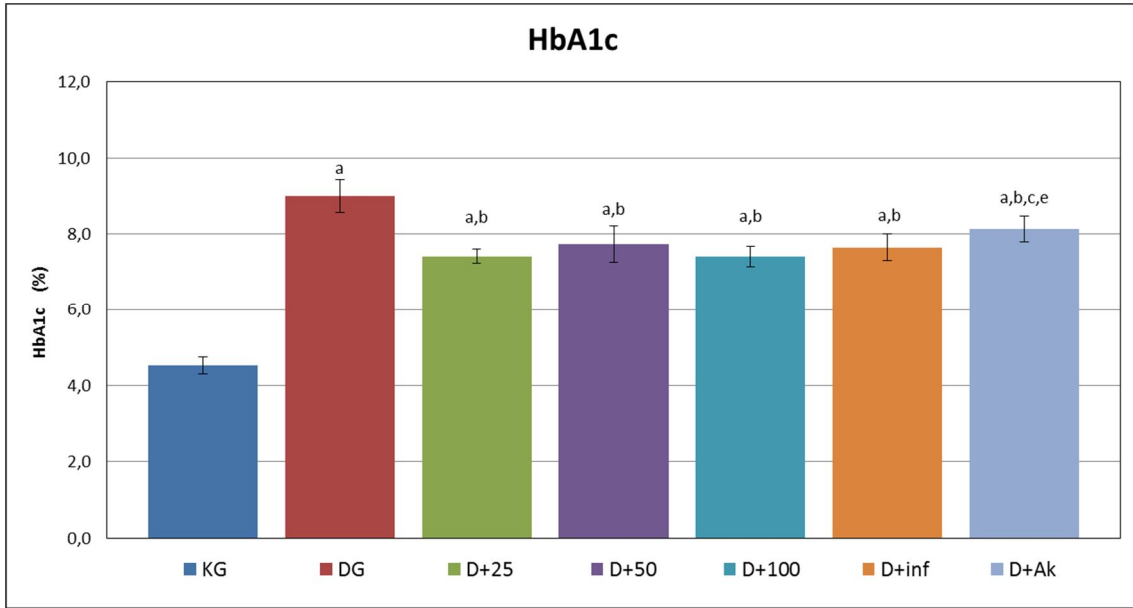
a: Kontrol grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).

b: Diyabet grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).

Şekil 4.2'de sunulan grafikte, kan glukoz değerlerinin ortalama ve standart sapmaları ($\bar{X} \pm SD$) KG, DG, D+25, D+50, D+100, D+inf ve D+Ak gruplarında sırasıyla; 112,2±8,7, 566±36,9, 443,7±41,2, 510,2±14,2, 499,5±40,6, 520±15,3 ve 511,0±28,5 mg/dL olarak tespit edilmiştir.

Bu sonuçlara göre; kan glukoz seviyeleri karşılaştırıldığında, glukoz seviyesinin diyabet grubunda en yüksek düzeye ulaştığı görülmektedir. OLE uygulanan gruplarda

ise, kan glukoz seviyesinin diyabet grubuna göre azalmasına rağmen, sadece D+25 grubunda istatistik olarak anlamlı fark tespit edilmiştir ($p<0.05$).



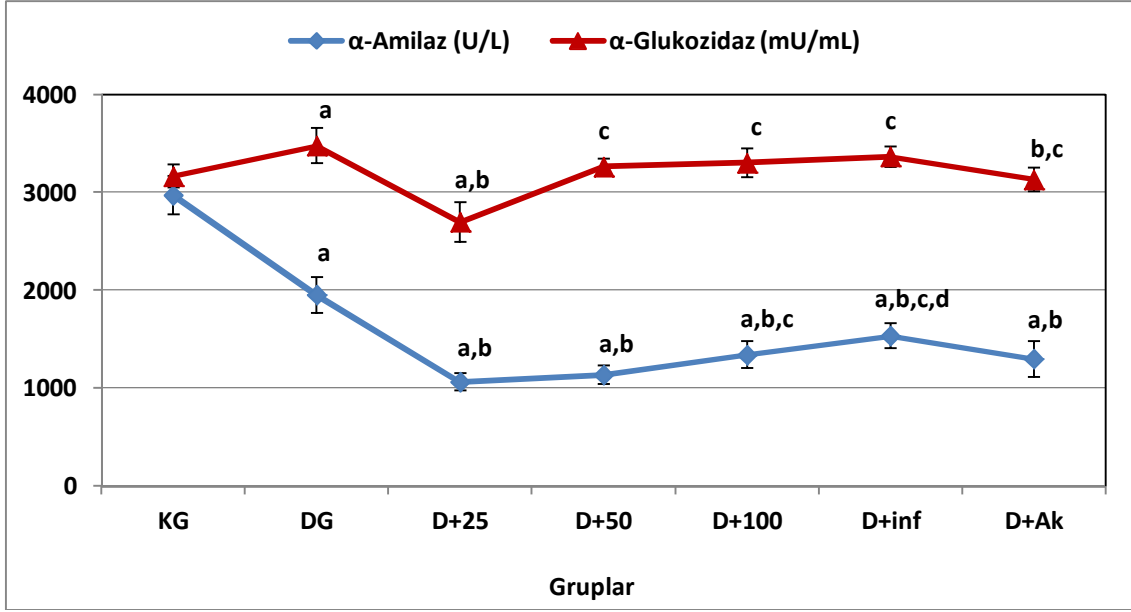
Şekil 4.3. OLE uygulanan diyabetik sıçanların HbA_{1c} düzeyleri.

- a: Kontrol grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.001$).
b: Diyabet grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.001$).
c: D+25 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).
e: D+100 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).

Şekil 4.3'deki grafikte, HbA_{1c} seviyelerinin ortalama ve standart sapmaları (% ($\bar{X} \pm SD$)) KG, DG, D+25, D+50, D+100, D+inf ve D+Ak gruplarında sırasıyla 4.5 ± 0.2 , 9 ± 0.4 , 7.4 ± 0.2 , 7.7 ± 0.5 , 7.4 ± 0.3 , 7.7 ± 0.5 ve 8.1 ± 0.3 olarak tespit edilmiştir.

Bu bulgulara göre; HbA_{1c} seviyesinin bütün diyabetik gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yükseldiği görülmektedir ($p<0.05$). Diğer yandan D+25, D+50, D+100, D+inf ve D+Ak grupları, diyabet grubuyla karşılaştırıldığında, HbA_{1c} seviyesindeki düşüşler istatistik olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

OLE uygulanan diyabetik sıçanların pankreas α -Amilaz ve bağırsak α -Glukozidaz aktivitelerinden elde edilen bulgular aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.4. OLE uygulanan diyabetik sıçanların α -Amilaz ve α -Glukozidaz aktiviteleri.

- a: Kontrol grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
b: Diyabet grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
c: D+25 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
d: D+50 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).

Yukarıdaki grafikte α -Amilaz ve α -Glukozidaz enzim değerlerinin ortalama ve standart sapmaları ($\bar{X} \pm SD$) Şekil 4.4'te gösterilmiştir. α -Amilaz aktivite değerleri KG, DG, D+25, D+50, D+100, D+inf ve D+Ak gruplarının ortalamaları sırasıyla 2969±198, 1950±182, 1063±87, 1135±93, 1340±136, 1534±129 ve 1296±184 (U/L) olarak tespit edilmiştir. α -Glukozidaz aktivite değerleri ise, KG, DG, D+25, D+50, D+100, D+inf ve D+Ak gruplarında sırasıyla 3166±119, 3475±180, 2696±201, 3262±82, 3301±148, 3364±104 ve 3132±122 (mU/mL) olarak elde edilmiştir.

Diyabet grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, α -Amilaz aktivitesinin istatistik olarak anlamlı derecede düştüğü, ancak α -Glukozidaz aktivitesinin ise yükseldiği görülmektedir ($p < 0.05$). D+25 grubu ise ikili karşılaştırmada hem kontrol hem de diyabet grubuna göre her iki enzim aktivitelerinde azalma istatistik olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). D+50, D+100, D+inf ve D+Ak grupları, D+25 grubu ile karşılaştırıldığında α -Glukozidaz aktivitesindeki artış istatistik olarak anlamlıdır. Benzer şekilde, D+Ak grubunun, diyabet grubuna göre α -Glukozidaz aktivitesi azalması da istatistik olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). Diğer yandan D+50, D+100, D+inf ve D+Ak gruplarının, kontrol ve diyabet gruplarına göre α -Amilaz aktivite düşüşleri de istatistik olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$).

OLE uygulanan diyabetik sıçanların serum parametrelerinden elde edilen bulgular aşağıda sunulmuştur.

Çizelge 4.3. OLE uygulanan diyabetik sıçanların serum parametreleri

SERUM (U/L)	KG	DG	D+25	D+50	D+100	D+İnf	D+Ak
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$
AST	95±11,2	236±24 ^a	171,7±15,5 ^{a,b}	170,2±25,3 ^{a,b}	161,5±15,4 ^{a,b}	175,8±16,1 ^{a,b}	193,7±13,4 ^{a,b}
ALT	44,8±4	123,3±17,3 ^a	87±9,3 ^{a,b}	66,0±12,1 ^{a,b,c}	73,7±12,1 ^{a,b}	76,7±12,3 ^{a,b}	81,7±7,7 ^{a,b}
LDH	448,3±54,5	656,8±56 ^a	602,5±57,2 ^a	626±53,3 ^a	624±38,1 ^a	488,8±38,5 ^{b,c,d,e}	620,8±81,2 ^{a,f}
KOLESTROL	64,8±3,7	51,8±8,7 ^a	45,8±6,6 ^a	70,0±6,7 ^{b,c}	74,3±6,2 ^{b,c}	62,2±2,8 ^{c,e}	59,5±5,1 ^{c,e}
TRİGLİSERİT	77,0±3,5	79,6±6,2	46,3±4,9 ^{a,b}	67,2±6,0 ^{b,c}	66,8±6,8 ^{b,c}	64,5±6,5 ^{a,b,c}	64,2±5,7 ^{a,b,c}
KREATİNİN	0,50±0,02	0,70±0,06 ^a	0,60±0,05 ^{a,b}	0,67±0,01 ^{a,c}	0,67±0,03 ^{a,c}	0,67±0,03 ^{a,c}	0,71±0,02 ^{a,c}
ÜRE	37,8±3,8	62,8±6,2 ^a	68,5±5,8 ^{a,b}	69,0±5,9 ^{a,b}	87,3±7,7 ^{a,b}	69,7±3,8 ^{a,b}	83,0±6,8 ^{a,c,d,e,f}
ÜRİK ASİT	1,3±0,2	1,6±0,2	1,3±0,1	1,4±0,1	1,6±0,1	1,4±0,2	1,4±0,2

a: Kontrol grubu ile arasındaki fark anlamlıdır (p<0.05).

c: D+25 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır (p<0.05).

e: D+100 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır (p<0.05).

b: Diyabet grubu ile arasındaki fark anlamlıdır (p<0.05).

d: D+50 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır (p<0.05).

f: D+İnf grubu ile arasındaki fark anlamlıdır (p<0.05).

Çizelge 4.3'deki sonuçlara göre; diyabet grubunun AST ve ALT değerlerinde, KG'na göre istatistik olarak anlamlı yükselme gözlenmiştir ($p<0.05$). AST ve ALT değerlerinin diyabetik grupta artmasına rağmen, D+25, D+50, D+100, D+İnf ve D+Ak grupların istatistik olarak azaldığı gözlenmiştir ($p<0.05$).

Diyabetik grupta LDH düzeyi, kontrol grubuna göre anlamlı bir artış göstermiştir ($p<0.05$). D+25, D+50 ve D+100 gruplarındaki LDH düzeyinde düşüş olmasına rağmen, bu düşüşün istatistik olarak bir anlamı yoktur. D+inf grubunda ise DG'na göre istatistik olarak anlamlı bir düşüş vardır ($p<0.05$).

Kolestrol değerlerinde, DG ve D+25 gruplarında KG'na göre istatistik olarak anlamlı azalma görülmüştür. Buna karşılık, D+50 ve D+100 gruplarında DG'na göre istatistik olarak anlamlı artış gözlenmiştir ($p<0.05$).

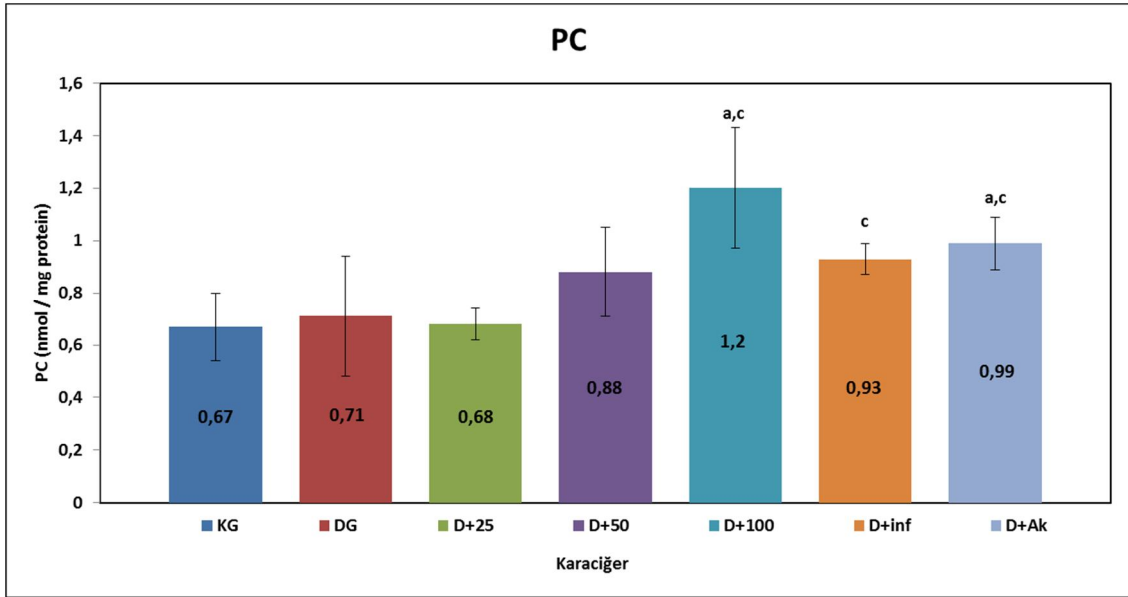
Trigliserit seviyesi, DG'na göre D+25, D+50 ve D+100 gruplarında istatistik olarak anlamlı derecede düşmüştür ($p<0.05$).

Böbrek fonksiyon testlerinden Kreatinin seviyesi KG'na göre, bütün diyabetik gruplarda istatistik olarak yükselmiştir ($p<0.05$). Buna karşılık OLE uygulanan gruplardan D+25 grubunda, diyabet grubuna göre kreatinin seviyesindeki azalma istatistik olarak anlamlıdır ($p<0.05$). Diğer OLE gruplarında ise, diyabet grubuna göre istatistik olarak anlamlı olmasa da küçük bir azalma görülmektedir.

Benzer şekilde, Üre seviyelerinde de KG'na göre, bütün diyabetik gruplarda istatistik olarak anlamlı artış gözlenmiştir. Buna karşılık, DG'na göre bütün OLE gruplarında üre seviyesinde istatistik olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Ürik asit miktarlarında ise, gruplarda meydana gelen değişimler istatistik olarak anlamlı bulunmamıştır.

OLE uygulanan diyabetik sıçanların karaciğer protein oksidasyon düzeyleri ile ilgili elde edilen bulgular aşağıya çıkarılmıştır.



Şekil 4.5. OLE uygulanan diyabetik sıçanların Protein Karbonil düzeyi.

a: Kontrol grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).

c: D+25 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).

Şekil 4.5’de sunulan grafikte, PC düzeylerinin ortalama ve standart sapmaları ($\bar{X} \pm SD$) KG, DG, D+25, D+50, D+100, D+inf ve D+Ak gruplarında sırasıyla 0.67 ± 0.13 , 0.71 ± 0.23 , 0.68 ± 0.06 , 0.88 ± 0.17 , 1.2 ± 0.23 , 0.93 ± 0.06 ve 0.99 ± 0.1 nmol/mg protein olarak tespit edilmiştir.

D+100 ve D+Ak grupları KG ile karşılaştırıldığında, PC değeri, bakımından istatistik olarak anlamlı artış görülmektedir ($p < 0.05$). Benzer şekilde, D+100, D+inf ve D+Ak grupları, D+25 grubuyla ikili olarak karşılaştırıldığında da anlamlı olarak yükseldiği bulunmuştur ($p < 0.05$). OLE grupları arasında ise sadece D+25 grubunun PC düzeyini kontrol grubu değerlerine indirdiği görülmektedir. D+25 grubunun diyabet grubuna göre, PC düzeyini aşağı doğru düşürmesine rağmen istatistik olarak anlamlı olmadığı görülmüştür.

OLE uygulanan diyabetik sıçanların GSH düzeylerinden elde edilen bulgular aşağıda verilmiştir.

Çizelge 4.4. OLE uygulanan diyabetik sıçanların çeşitli dokularındaki GSH düzeyleri

GSH	KG	DG	D+25	D+50	D+100	D+İnf	D+Ak
(nmol/mgdoku)	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$
Karaciğer	4,92±0,18	3,55±0,29 ^a	4,16±0,14 ^{a,b}	3,69±0,08 ^{a,c}	3,68±0,20 ^{a,c}	4,53±0,30 ^{b,d,e}	3,97±0,30 ^{a,b,f}
Böbrek	2,20±0,12	2,68±0,11 ^a	3,09±0,46	2,81±0,29	3,37±0,33 ^a	3,23±0,16 ^{a,b}	2,98±0,11 ^{a,b}
Kalp	1,32±0,11	1,14±0,14	1,33±0,30	1,50±0,10 ^b	2,17±0,16 ^{a,b,c,d}	2,38±0,12 ^{a,b,c,d}	1,72±0,20 ^{a,b,c,e,f}
Beyin	1,19±0,12	0,82±0,13 ^a	1,01±0,11	1,27±0,12 ^{b,c}	1,12±0,14 ^b	1,09±0,03 ^b	1,19±0,04 ^b
Kan (nmol/ml)	7,50±0,45	8,84±0,93	11,37±0,96 ^{a,b}	12,43±0,50 ^{a,b}	13,10±0,85 ^{a,b,c}	12,28±0,86 ^{a,b}	11,46±0,73 ^{a,b,e}

a: Kontrol grubu ile arasındaki fark anlamlıdır (p<0.05).

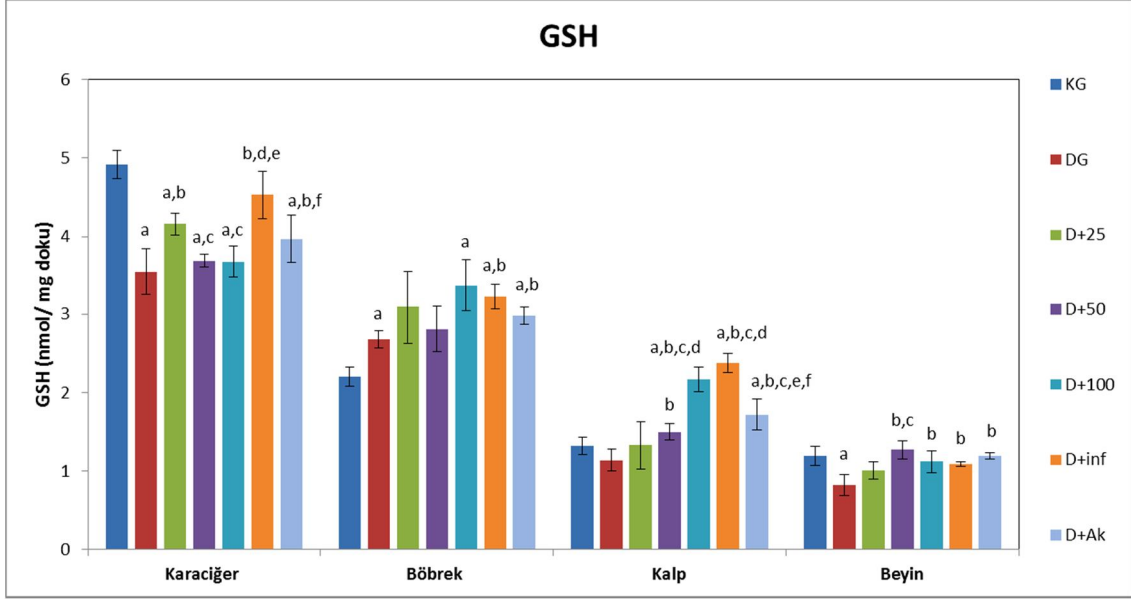
c: D+25 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır (p<0.05).

e: D+100 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır (p<0.05).

b: Diyabet grubu ile arasındaki fark anlamlıdır (p<0.05).

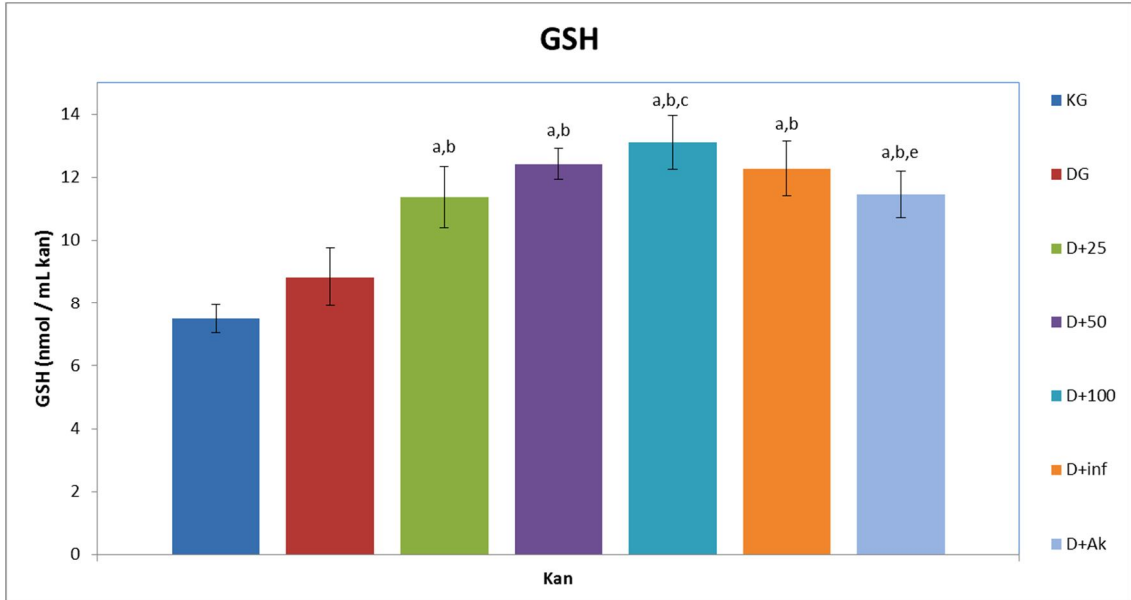
d: D+50 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır (p<0.05).

f: D+İnf grubu ile arasındaki fark anlamlıdır (p<0.05).



Şekil 4.6. OLE uygulanan diyabetik sıçanların bazı dokularındaki GSH düzeyi.

- a: Kontrol grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
b: Diyabet grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
c: D+25 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
d: D+50 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
e: D+100 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
f: D+İnf grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).



Şekil 4.6. OLE uygulanan diyabetik sıçanların kan GSH düzeyi (Devamı).

- a: Kontrol grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
b: Diyabet grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
c: D+25 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
d: D+50 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
e: D+100 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
f: D+İnf grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).

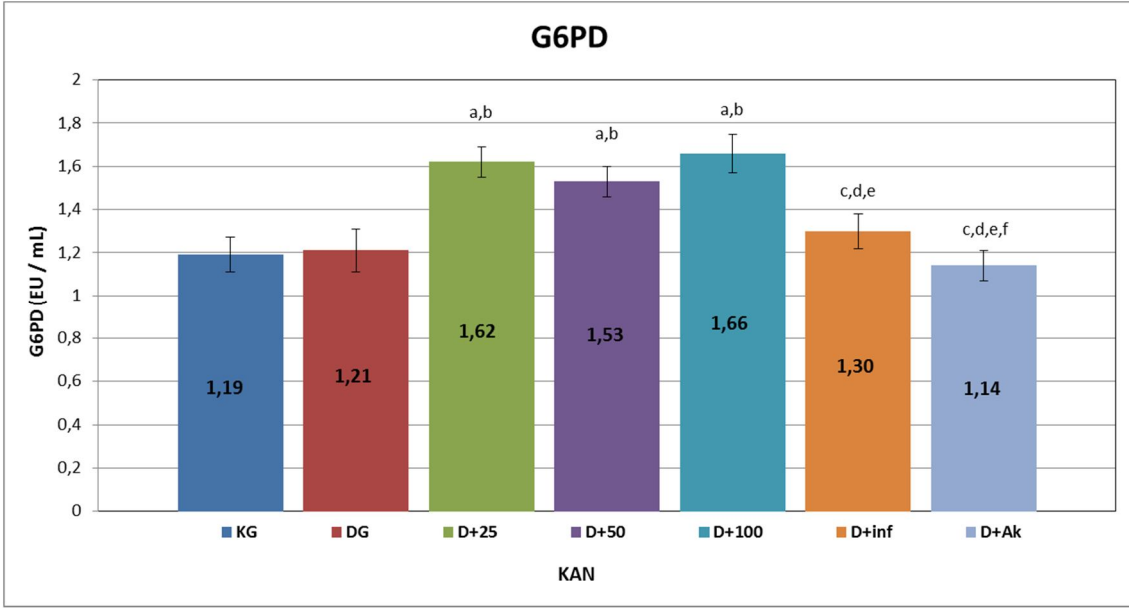
Çizelge 4.4'deki sonuçlar incelendiğinde, DG'daki karaciğer dokusu GSH düzeyindeki azalma, kontrol grubuna göre istatistik olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Diyabet grubundaki bu azalmaya karşılık, D+25, D+inf ve D+Ak gruplarında istatistik olarak anlamlı artış olmuştur ($p<0.05$).

Böbrek dokusunda GSH düzeyinde, diyabet grubu, kontrol grubuna göre anlamlı bir artış göstermiştir. D+100, D+inf ve D+Ak grupları kontrol grubuna göre, D+inf ve D+Ak grupları da diyabet grubuna göre istatistik olarak anlamlı yükselme göstermiştir ($p<0.05$).

GSH düzeyi kalp dokusunda, kontrol grubuna göre D+100, D+inf ve D+Ak gruplarında anlamlı olarak arttığı görülmektedir. Ayrıca, diyabet grubuna göre, D+50, D+100, D+inf ve D+Ak gruplarında GSH düzeyindeki artışta istatistik olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

Beyin dokusu diyabet grubu, KG'na göre anlamlı düzeyde azalma göstermiştir. Buna karşılık, D+50, D+100, D+inf ve D+Ak gruplarında GSH düzeyi DG ile karşılaştırıldığında, istatistik olarak anlamlı derecede arttığı tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Son olarak, kan dokuda OLE uygulanan gruplarda ve akarboz grubunda hem kontrol hem de diyabet gruplarına göre GSH düzeyindeki artma istatistik olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).



Şekil 4.7. OLE uygulanan diyabetik sıçanların kan G6PD aktiviteleri.

- a: Kontrol grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
b: Diyabet grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
c: D+25 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
d: D+50 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
e: D+100 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
f: D+İnf grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).

Şekil 4.7’de, G6PD aktivite değerleri için grupların ortalama ve standart sapmaları ($\bar{X} \pm SD$) KG, DG, D+25, D+50, D+100, D+inf ve D+Ak gruplarında sırasıyla 1.19 ± 0.08 , 1.21 ± 0.1 , 1.62 ± 0.07 , 1.53 ± 0.07 , 1.66 ± 0.09 , 1.30 ± 0.08 ve 1.14 ± 0.07 EU/mL olarak tespit edildiği görülmektedir.

Gruplar ikili olarak birbirleri ile karşılaştırıldığında, D+25, D+50 ve D+100 gruplarının G6PD aktivite artışı kontrol ve diyabet gruplarına göre istatistik olarak anlamlı derecede yükselme göstermiştir ($p < 0.05$). D+inf ve D+Ak grubu, kontrol ve diyabet grubu değerlerinde seyretmektedir.

OLE uygulanan diyabetik sıçanların SOD aktivilerinden elde edilen bulgular aşağıda sunulmuştur.

Çizelge 4.5. OLE uygulanan diyabetik sıçanların çeşitli dokularındaki SOD aktiviteleri

SOD EU/mg protein	KG	DG	D+25	D+50	D+100	D+İnf	D+Ak
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$
Karaciğer	25,75±0,85	20,86±0,45 ^a	24,13±0,50 ^{a,b}	24,26±0,82 ^{a,b}	24,48±0,79 ^b	23,32±0,73 ^{a,b}	21,90±0,65 ^{a,c,d,e,f}
Böbrek	29,70±0,65	25,61±1,38 ^a	28,60±0,20	27,91±0,66 ^a	28,05±0,57 ^a	27,99±0,34 ^a	25,93±1,03 ^{a,c,e}
Kalp	30,91±0,99	26,56±0,92 ^a	29,77±0,30 ^b	29,94±0,26 ^b	30,72±0,31 ^{b,c,d}	29,60±0,50 ^{b,e}	27,61±1,01 ^{a,d,e}
Beyin	440,39±5,31	403,31±10,76 ^a	431,98±9,43 ^b	433,90±5,11 ^b	428,66±6,23 ^b	420,44±3,02 ^{a,b,d}	411,31±5,87 ^{a,c,d,e}

a: Kontrol grubu ile arasındaki fark anlamlıdır (p<0.001).

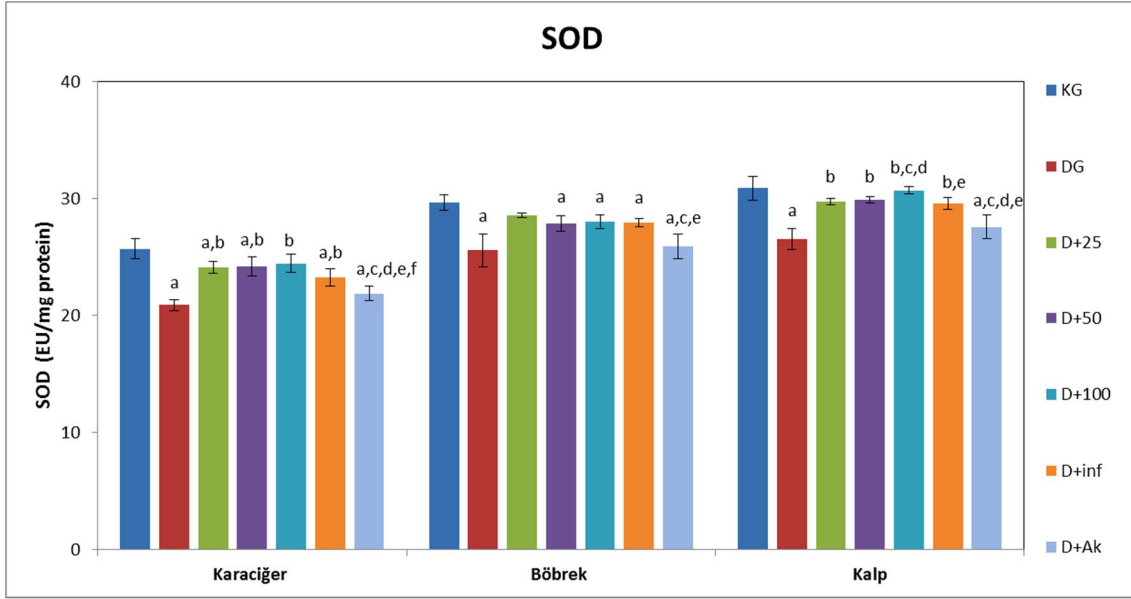
b: Diyabet grubu ile arasındaki fark anlamlıdır (p<0.05).

c: D+25 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır (p<0.05).

d: D+50 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır (p<0.05).

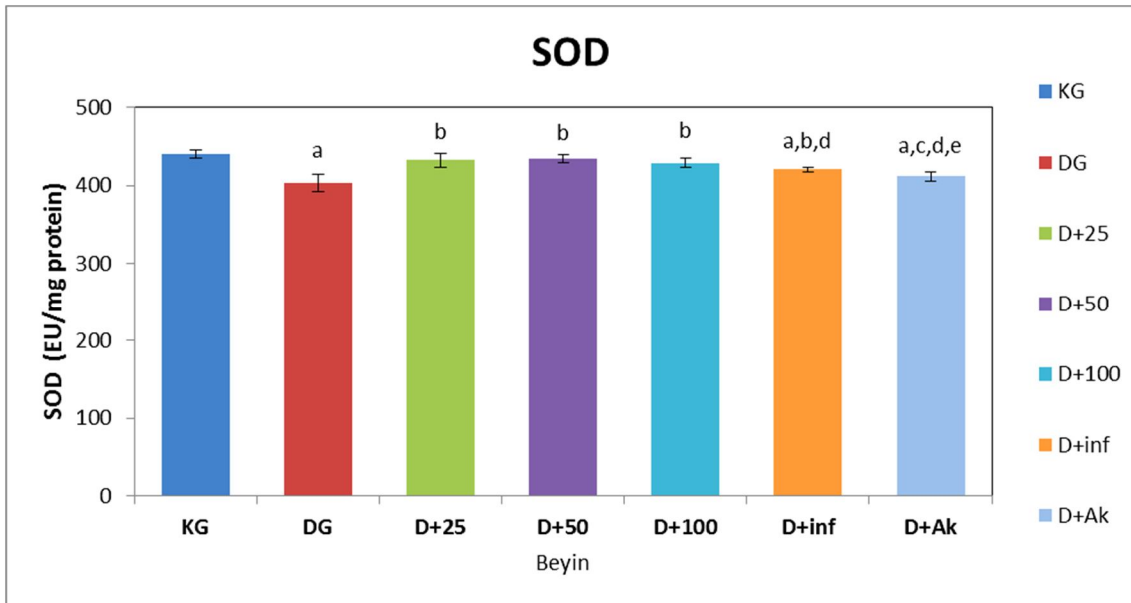
e: D+100 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır (p<0.05).

f: D+İnf grubu ile arasındaki fark anlamlıdır (p<0.05).



Şekil 4.8. OLE uygulanan diyabetik sıçanların bazı dokularının SOD aktivitesi.

- a: Kontrol grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.001$).
b: Diyabet grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).
c: D+25 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).
d: D+50 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).
e: D+100 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).
f: D+İnf grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).



Şekil 4.8. OLE uygulanan diyabetik sıçanların bazı dokularının SOD aktivitesi (Devamı)

- a: Kontrol grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.001$).
b: Diyabet grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).
c: D+25 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).
d: D+50 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).
e: D+100 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).
f: D+İnf grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$).

SOD aktivitesi için karaciğer, böbrek, kalp ve beyin dokularında gruplara ait tanımlayıcı istatistikler ve karşılaştırma sonuçları Çizelge 4.5 ve Şekil 4.8'de verilmiştir.

Bütün dokular için diyabet grupları, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; SOD aktivitesindeki azalma istatistik olarak anlamlıdır ($p<0.001$). Buna karşın, karaciğer, kalp ve beyin dokularında OLE uygulanan (D+inf dahil) diyabetik gruplarda (D+25, D+50, D+100 ve D+inf) SOD aktivitesinin DG'a göre istatistik olarak anlamlı derecede arttığı görülmüştür ($p<0.05$).

OLE uygulanan diyabetik sıçanların GPx aktivitelerinden elde edilen bulgular aşağıda verilmiştir.

Çizelge 4.6. OLE uygulanan diyabetik sıçanların çeşitli dokularındaki GPx aktiviteleri

GPx	KG	DG	D+25	D+50	D+100	D+İnf	D+Ak
EU/mg protein	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$
Karaciğer	11,02±0,86	3,61±0,31 ^a	4,69±0,30 ^{a,b}	7,95±0,58 ^{a,b,c}	5,29±0,57 ^{a,b,d}	6,16±0,76 ^{a,b,d}	4,86±0,60 ^{a,b,d}
Böbrek	2,24±0,37	3,10±0,38	3,83±0,74 ^a	3,58±0,38 ^a	4,35±0,69 ^{a,b}	3,66±0,78 ^a	4,81±0,47 ^{a,b,d,f}
Kalp	1,17±0,12	0,86±0,10 ^a	1,35±0,22 ^b	1,16±0,15	1,24±0,16 ^b	1,32±0,33	0,79±0,07 ^{a,c,d,e}
Beyin	0,80±0,05	0,73±0,03	0,98±0,05 ^{a,b}	1,01±0,14	1,01±0,19	1,21±0,10 ^{a,b,c}	0,81±0,11 ^f

a: Kontrol grubu ile arasındaki fark anlamlıdır (p<0.05).

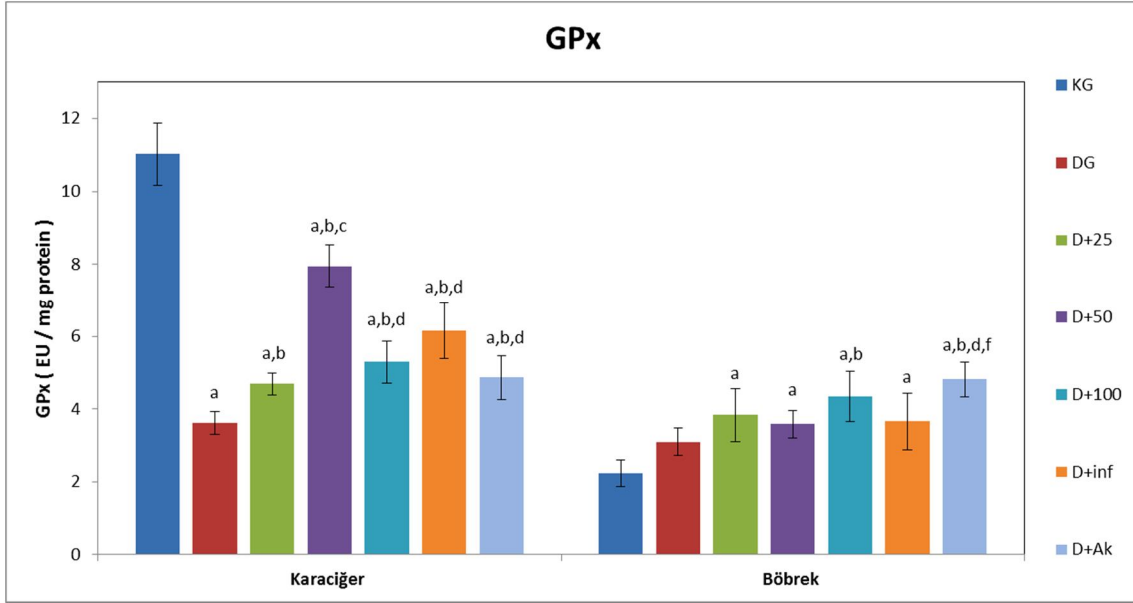
c: D+25 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır (p<0.05).

e: D+100 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır (p<0.05).

b: Diyabet grubu ile arasındaki fark anlamlıdır (p<0.05).

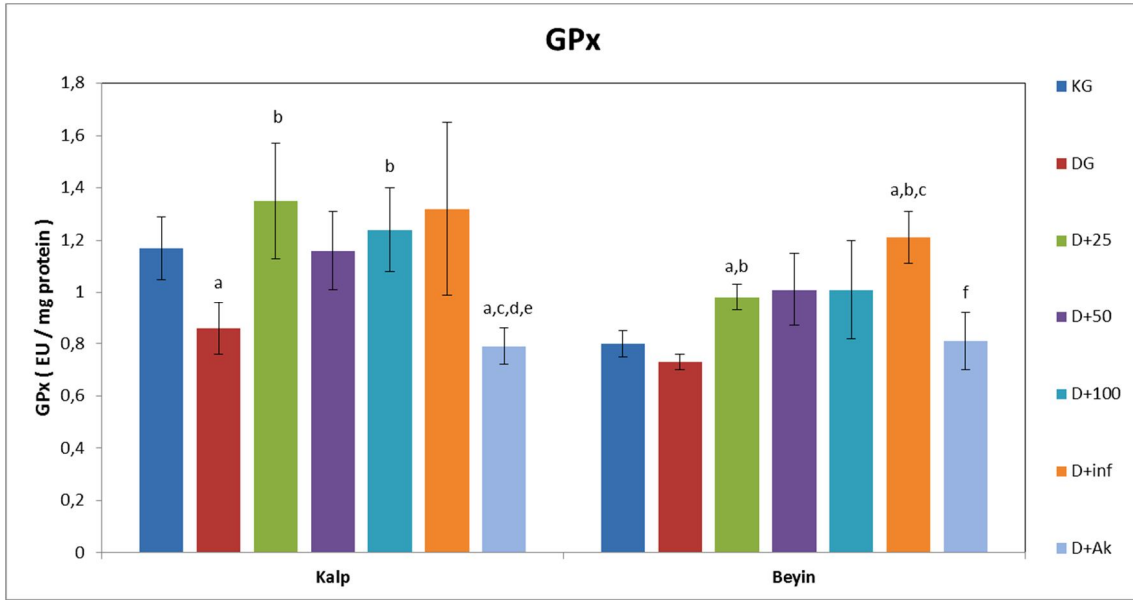
d: D+50 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır (p<0.05).

f: D+İnf grubu ile arasındaki fark anlamlıdır (p<0.05).



Şekil 4.9. OLE uygulanan diyabetik sıçanların bazı dokularının GPx aktivitesi.

- a: Kontrol grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
 b: Diyabet grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
 c: D+25 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
 d: D+50 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
 e: D+100 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
 f: D+İnf grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).



Şekil 4.9. OLE uygulanan diyabetik sıçanların bazı dokularının GPx aktivitesi (Devamı).

- a: Kontrol grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
 b: Diyabet grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
 c: D+25 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
 d: D+50 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
 e: D+100 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
 f: D+İnf grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).

Dokularda GPx aktivitesi için gruplara göre tanımlayıcı istatistikler ve karşılaştırma sonuçları Çizelge 4.6 ve Şekil 4.9'da verilmiştir.

Karaciğer dokusunda GPx aktivitesi, bütün diyabetik gruplarda KG'na göre istatistik olarak anlamlı azalma göstermiştir. Diğer taraftan, GPx aktivitesi OLE gruplarında (D+50 grubunda daha fazla olarak) DG'na göre istatistik olarak anlamlı artış göstermiştir ($p<0.05$).

Böbrek dokusunda, GPx aktivitesi, DG'na göre D+100 ve D+Ak gruplarında istatistik olarak anlamlı artış gözlenmiştir ($p<0.05$).

Kalp dokusundaki GPx aktivitesi, diyabet grubunda, KG'na göre anlamlı azalma göstermesine karşın, D+25 ve D+100 gruplarında anlamlı artış göstermiştir ($p<0.05$).

Beyin dokusunda ise DG'nun KG'na göre aktivite azalması istatistik olarak anlamlı bulunmamıştır. Ancak, DG'nun aktivite düşüklüğünün aksine, D+25 ve D+inf gruplarındaki aktivite artışı anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

OLE uygulanan diyabetik sıçanların KAT aktivitelerinden elde edilen bulgular aşağıda sunulmuştur.

Çizelge 4.7. OLE uygulanan diyabetik sıçanların çeşitli dokularındaki KAT aktiviteleri

KAT	KG	DG	D+25	D+50	D+100	D+İnf	D+Ak
EU/mg protein	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$
Karaciğer	3,26±0,32	1,90±0,23 ^a	1,98±0,11 ^a	2,36±0,23 ^{a,b}	2,06±0,19 ^a	2,25±0,20 ^a	1,88±0,19 ^{a,d}
Böbrek	0,89±0,08	0,62±0,02 ^a	0,71±0,12	0,61±0,03 ^a	0,71±0,08	0,77±0,09	0,63±0,09 ^a
Kalp	0,116±0,005	0,162±0,004 ^a	0,159±0,009 ^a	0,153±0,005 ^a	0,159±0,007 ^a	0,149±0,008 ^a	0,144±0,006 ^{a,b,c,e}
Beyin	0,057±0,004	0,058±0,005	0,062±0,002	0,073±0,010 ^{a,b}	0,075±0,007 ^{a,b,c}	0,067±0,005	0,053±0,005 ^{d,e,f}

a: Kontrol grubu ile arasındaki fark anlamlıdır (p<0.05).

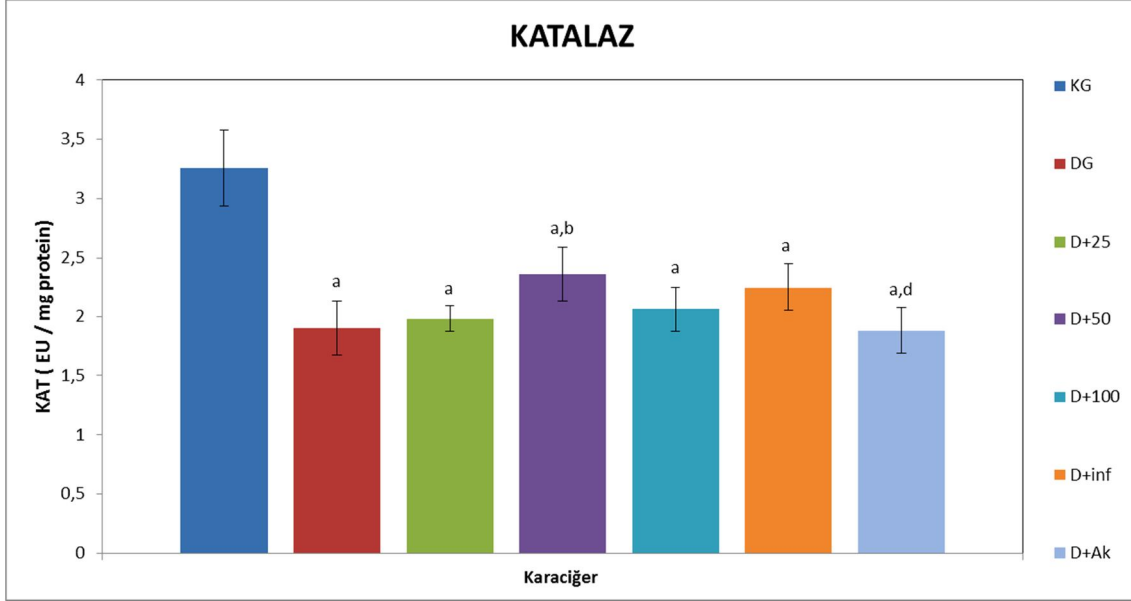
c: D+25 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır (p<0.05).

e: D+100 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır (p<0.05).

b: Diyabet grubu ile arasındaki fark anlamlıdır (p<0.05).

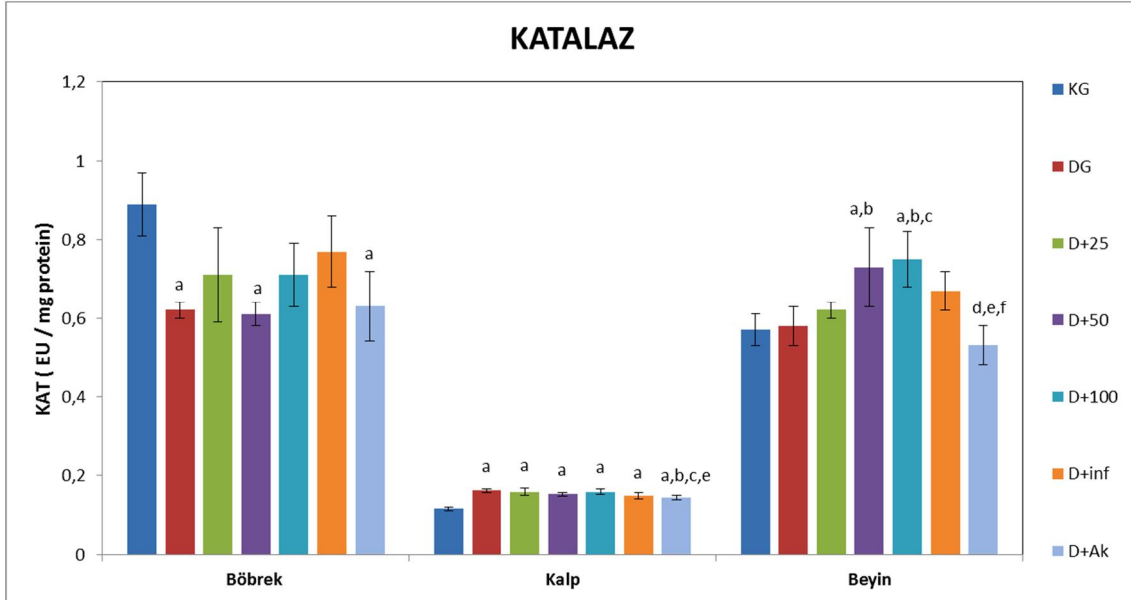
d: D+50 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır (p<0.05).

f: D+İnf grubu ile arasındaki fark anlamlıdır (p<0.05).



Şekil 4.10. OLE uygulanan diyabetik sıçanların bazı dokularının KAT aktivitesi.

- a: Kontrol grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
b: Diyabet grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
c: D+25 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
d: D+50 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
e: D+100 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
f: D+İnf grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).



Şekil 4.10 OLE uygulanan diyabetik sıçanların bazı dokularının KAT aktivitesi (Devamı).

- a: Kontrol grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
b: Diyabet grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
c: D+25 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
d: D+50 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
e: D+100 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).
f: D+İnf grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$).

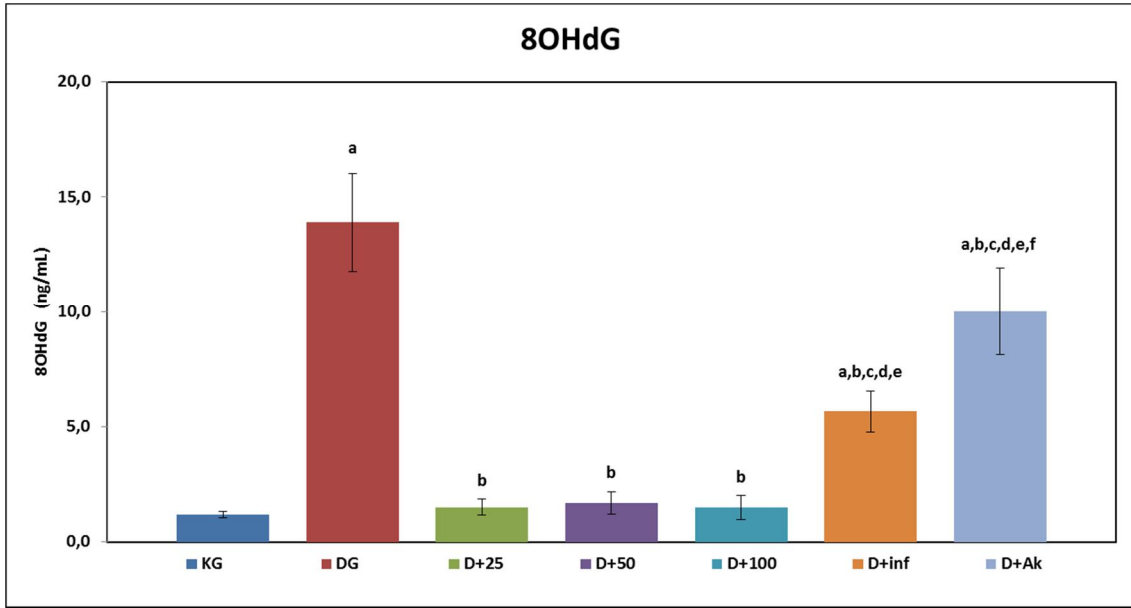
Çizelge 4.7'deki Katalaz aktiviteleri değerlendirildiğinde; karaciğer dokusunda ki aktivite bakımından diyabet grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, istatistik olarak anlamlı bir düşüş tespit edilmiştir. OLE uygulanan gruplar arasında ise sadece D+50'nin diyabet grubuna göre yükselişi istatistik olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

Böbrek dokusundaki katalaz aktivitesi diyabet grubu, D+50 ve D+Ak gruplarında azalması, kontrol grubuna göre anlamlıdır ($p<0.05$). Ancak, D+25, D+100 ve D+inf gruplarında artış görülmesine rağmen, bu artış diyabet grubuna göre anlamlı bulunmamıştır.

Beyin dokusu Katalaz aktivitesi bakımından kontrol ile diyabet grupları arasındaki fark, istatistik olarak anlamlı bulunamamıştır. OLE uygulanan D+50 ve D+100 gruplarının her ikisinde de kontrol ve diyabet grubuna göre aktivite artışı istatistik olarak anlamlıdır ($p<0.05$).

Kalp dokusunda ise diğer dokulardaki aktivite değişikliklerinden farklı olarak, diyabetik gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, önemli derecede anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.001$).

OLE uygulanan diyabetik sıçanların oksidatif DNA hasar düzeylerinden elde edilen bulgular aşağıda sunulmuştur.



Şekil 4.11. Diyabetik sıçanların oksidatif DNA hasar 8-OHdG konsantrasyonu.

- a: Kontrol grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.001$).
b: Diyabet grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.001$).
c: D+25 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.001$).
d: D+50 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.001$).
e: D+100 grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.001$).
f: D+İnf grubu ile arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.001$).

Şekil 4.11’de, diyabetik sıçanların oksidatif DNA hasar 8-OHdG konsantrasyon ortalama ve standart sapmaları ($\bar{X} \pm SD$) verilmiştir. 8-OHdG konsantrasyon değerleri için KG, DG, D+25, D+50, D+100, D+inf ve D+Ak gruplarında ortalamalar sırasıyla 1.2 ± 0.13 ; 13.9 ± 2.1 ; 1.5 ± 0.4 ; 1.7 ± 0.5 ; 1.5 ± 0.5 ; 5.7 ± 0.9 ve 10.0 ± 1.9 ng/mL olarak tespit edilmiştir. Diyabet grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 8-OHdG konsantrasyonlarında istatistik olarak anlamlı artış olduğu görülmektedir ($p < 0.001$). Buna karşın, OLE uygulanan D+25, D+50 ve D+100 gruplarının 8-OHdG konsantrasyonları, diyabet grubu ile karşılaştırıldığında, değerlerin kontrol grubu seviyelerine düştüğü ve bu düşüşün istatistik olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p < 0.001$). D+inf ve D+Ak gruplarının, kontrol grubuna göre konsantrasyon artışları önemli olmasına karşın, D+İnf grubu, diyabet grubu ile karşılaştırıldığında konsantrasyondaki azalmanın önemli düzeyde olduğu görülmektedir ($p < 0.001$).

OLE uygulanan diyabetik sıçanların karaciğer ve pankreas dokularının histopatolojik bulguları çizelge 4.8 ve 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.8. OLE'nin pankreas ve karaciğer üzerindeki histopatolojik bulguları

Lezyonlar (Pankreas)	KG	DG	D+25	D+50	D+100	D+İnf	D+Ak
Dejenerasyon	-/6	6/6 ^a	2/6 ^b	1/6 ^b	1/6 ^b	3/6 ^b	4/6 ^a
Nekroz	-/6	4/6 ^a	2/6	1/6 ^b	1/6 ^b	3/6 ^a	4/6 ^a
Langerhans adacıklarında atrofi	-/6	4/6 ^a	2/6	2/6	1/6 ^b	3/6 ^a	4/6 ^a
Lezyonlar (Karaciğer)	KG	DG	D+25	D+50	D+100	D+İnf	D+Ak
Dejenerasyon	-/6	6/6 ^a	2/6 ^b	2/6 ^b	1/6 ^b	1/6 ^b	3/6 ^{a,b}
Nekroz	-/6	5/6 ^a	2/6 ^b	2/6 ^b	2/6 ^b	3/6 ^a	2/6 ^b

a: KG ile arasındaki fark anlamlıdır

b: DG ile arasındaki fark anlamlıdır

Çizelge 4.9. OLE'nin pankreas ve karaciğer üzerindeki histopatolojik bulgularının ikili grup karşılaştırmalarının p değerleri

İkili Gruplar	Pankreas			Karaciğer	
	Dejenerasyon p	Nekroz p	L. ada. atro. p	Dejenerasyon p	Nekroz p
KG - DG	0,000	0,001	0,001	0,000	0,000
KG - D+25	0,083	0,083	0,273	0,083	0,083
KG - D+50	0,273	0,273	0,083	0,083	0,083
KG - D+100	0,273	0,273	0,083	0,273	0,083
KG - D+İnf	0,014	0,014	0,014	0,273	0,014
KG - D+Ak	0,001	0,001	0,001	0,014	0,083
DG - D+25	0,001	0,221	0,221	0,001	0,042
DG - D+50	0,000	0,042	0,221	0,001	0,042
DG - D+100	0,000	0,042	0,042	0,000	0,042
DG - D+ İnf	0,014	0,552	0,552	0,000	0,190
DG - D+ Ak	0,083	1,000	1,000	0,014	0,042
D+25 - D+ 50	0,497	0,497	0,497	1,000	1,000
D+25 - D+100	0,497	0,497	0,497	0,497	1,000
D+25 - D+İnf	0,552	0,552	0,190	0,497	0,552
D+25 - D+Ak	0,221	0,221	0,042	0,552	1,000
D+50 - D+100	1,000	1,000	1,000	0,497	1,000
D+50 - D+İnf	0,190	0,190	0,552	0,497	0,552
D+50 - D+Ak	0,042	0,042	0,221	0,552	1,000
D+100 - D+İnf	0,190	0,190	0,552	1,000	0,552
D+100 - D+Ak	0,042	0,042	0,221	0,190	1,000
D+İnf - D+Ak	0,552	0,552	0,552	0,190	0,552

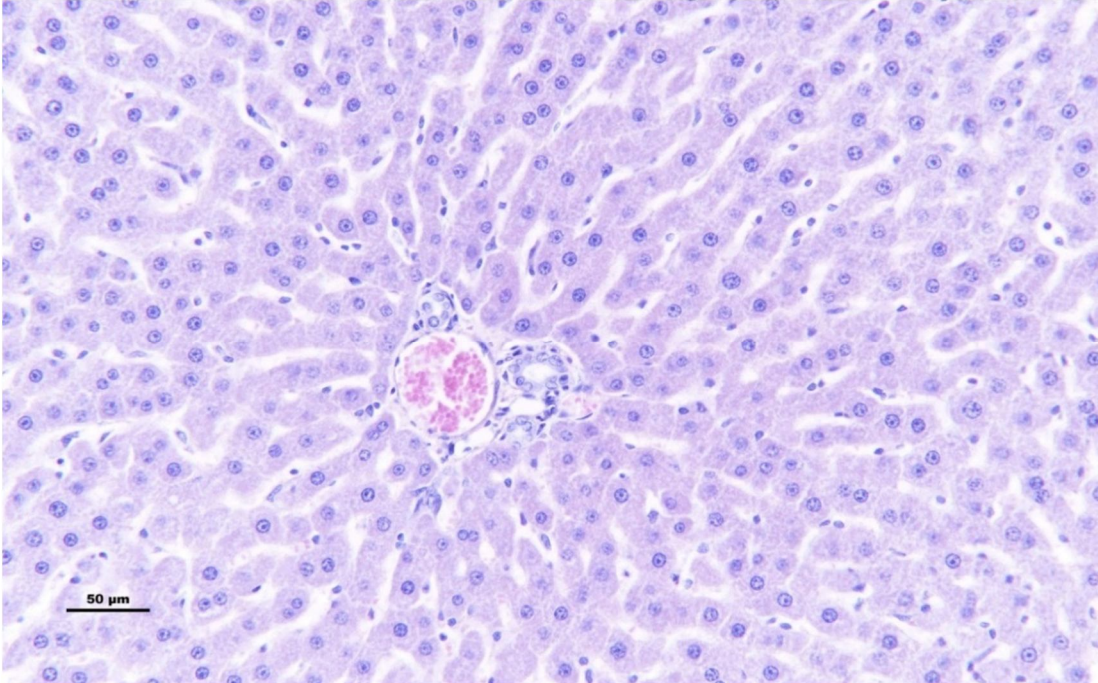
Karaciğer dokusunda histopatolojik bulgular dejenerasyon ve nekroz alanlarına göre değerlendirildi. Karaciğer histopatolojik bulguları Çizelge 4.8'de özetlendiği üzere,

diyabet grubundaki dejenerasyon ve nekroz alanlarının artış oranı kontrol grubuna göre istatistik olarak anlamlı bulundu ($p<0.001$). Buna göre OLE gruplarında da yer yer olmakla birlikte, dejenerasyon ve nekrozların diyabet grubuna göre azalması anlamlıdır.

Pankreas dokusunda ise histopatolojik bulgular; dejenerasyon ve nekroz alanları ile Langerhans adacıklarında atrofi özelliklerine göre değerlendirildi. Pankreas histopatolojik bulguları Çizelge 4.8'de özetlendiği üzere, diyabet grubundaki dejenerasyon ve nekroz alanlarının artışı, kontrol gruba göre istatistik olarak anlamlı bulundu ($p<0.001$). Ayrıca diyabet grubunda Langerhans adacıklarında gerçekleşen atrofinin anlamlı düzeyde olduğu görüldü ($p<0.001$).

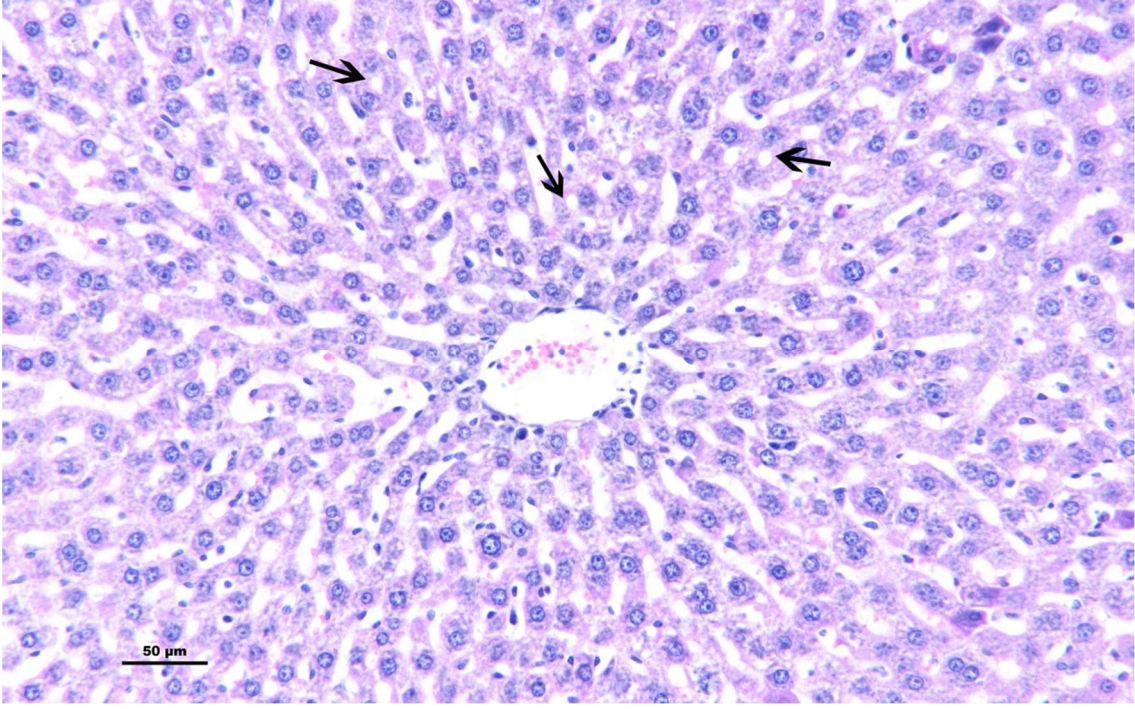
Karaciğer ve pankreas histopatolojisinde OLE gruplarının (D+25, D+50 ve D+100) kendi aralarında benzer görüntü olmasından dolayı örnek olarak sadece en yüksek doz olan D+100 grubu tercih edildi. Benzer şekilde pankreas immunohistokimyasal reaksiyonda örnek olarak sadece en yüksek doz olan D+100 grubu tercih edildi.

OLE uygulanan diyabetik sıçanların karaciğer dokularının mikroskopik incelemesi sonucu elde edilen bulgular Şekil 4.12-14'de sunulmuştur.



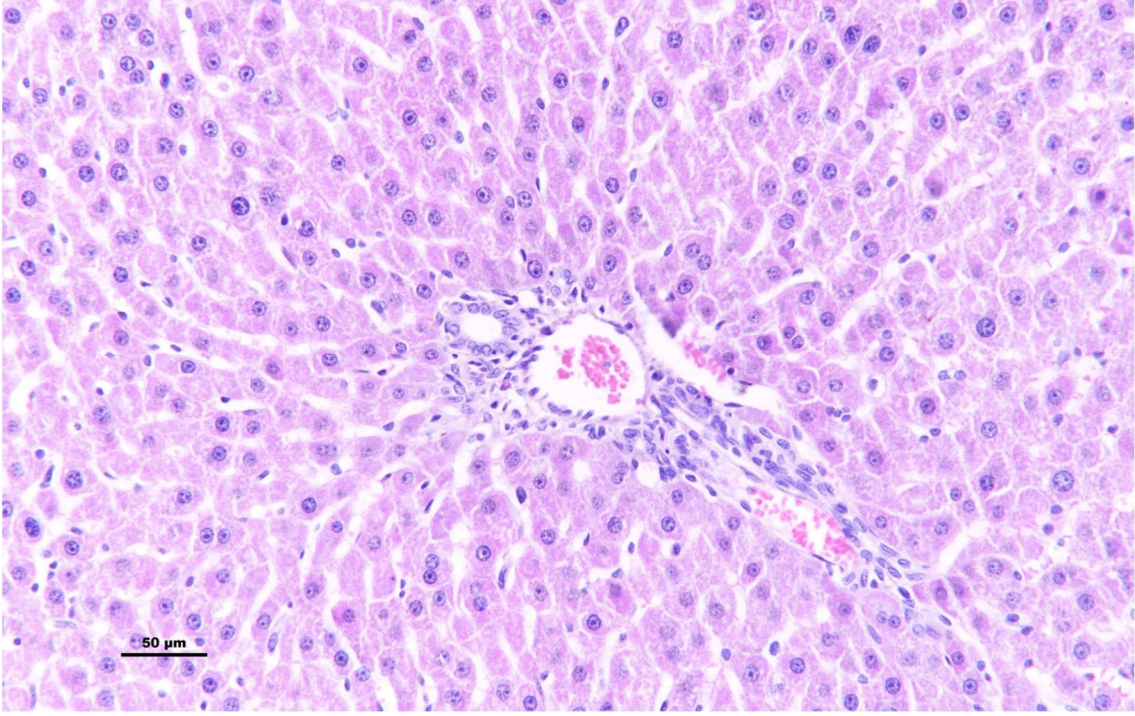
Şekil 4.12. Kontrol grubu karaciğer dokusu histolojik görünümü. H.E., Bar=50µm.

Kontrol grubunda sıçanların karaciğer dokuları normal histolojik görünümüne sahiptir (Şekil 4.12).



Şekil 4.13. Diyabet grubu karaciğer dokusu histolojik görünümü. H.E., Bar=50μm.

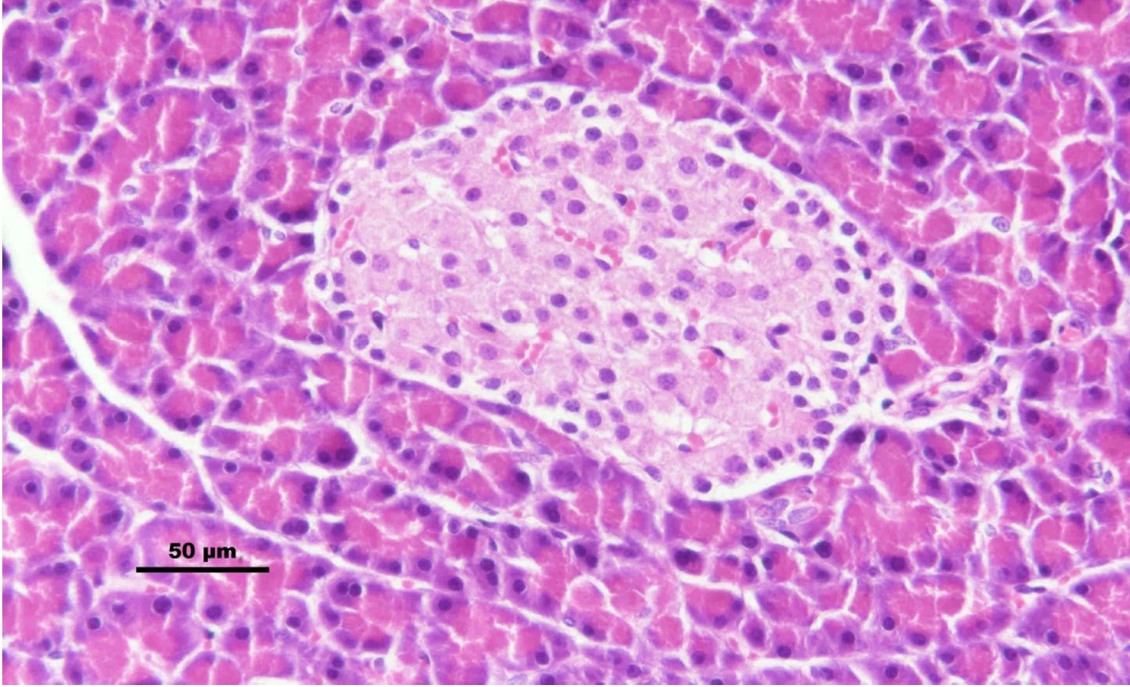
Diyabet grubunda, sıçanların karaciğer dokusunun mikroskopik incelemesinde hepatositlerin sitoplazmasında vakuoler dejenerasyon belirtileri olan vakuoler (oklar) ve hidropik dejenerasyonlar gözlendi (Şekil 4.13).



Şekil 4.14. D+100 grubu karaciğer dokusu histolojik görünümü. H.E., Bar=50μm.

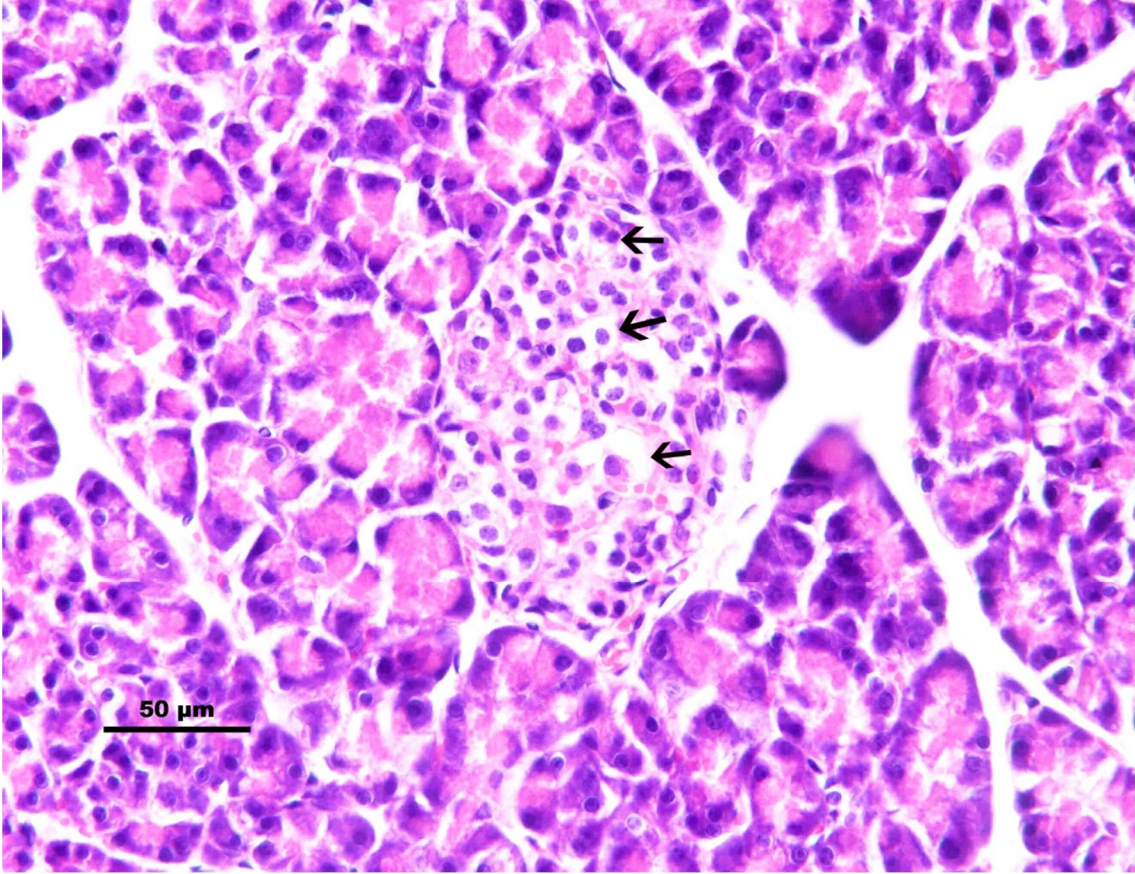
Yukardaki şekilde ekstrakt uygulanmış diyabetik gruplarda kontrol grubuna benzer histolojik bulgular görüldü. Buna ek olarak çok nadir perisinüzoidal hücrelerde artış ve sinüzoidal fokal mononükleer hücre infiltrasyonları görüldü (Şekil 4.14).

OLE uygulanan diyabetik sıçanların pankreas dokularının mikroskopik incelemesi sonucu elde edilen bulgular Şekil 4.15-17'da sunulmuştur.



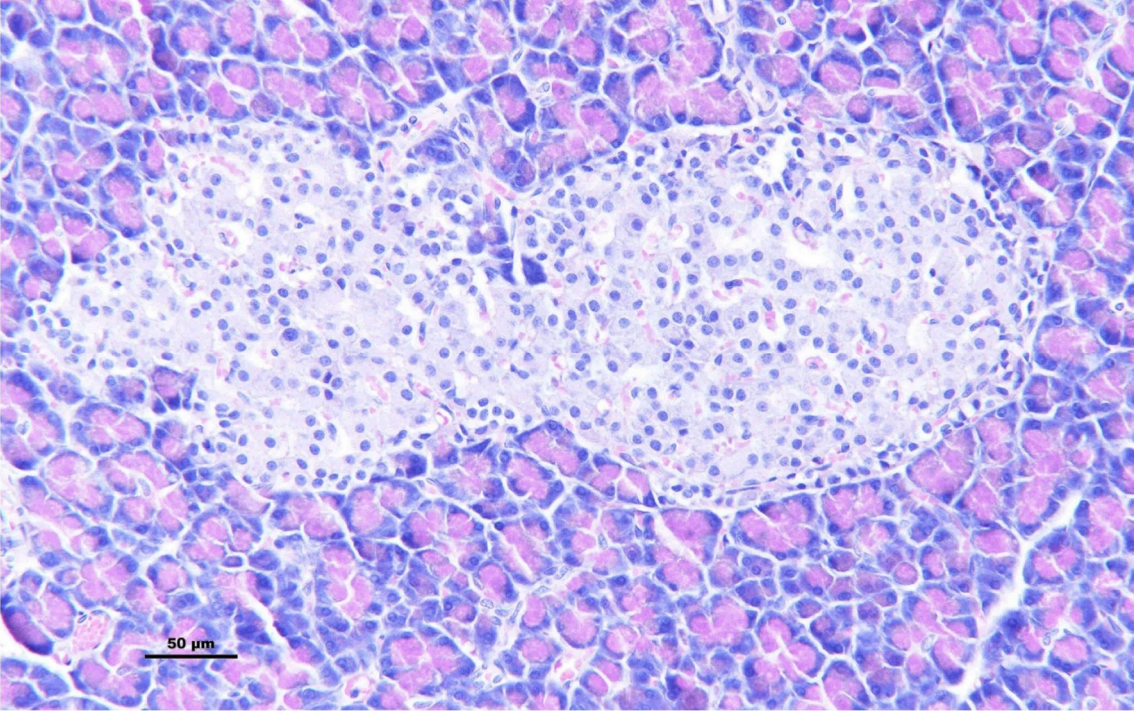
Şekil 4.15. Kontrol grubu pankreas Langerhans adacığının histolojik görünümü. H.E., Bar=50µm.

Kontrol grubunda sıçanların Pankreas Langerhans adacıkları normal histolojik görünümüne sahiptir (Şekil 4.15).



Şekil 4.16. Diyabet grubu pankreas Langerhans adacığının histolojik görünümü. H.E., Bar=50μm.

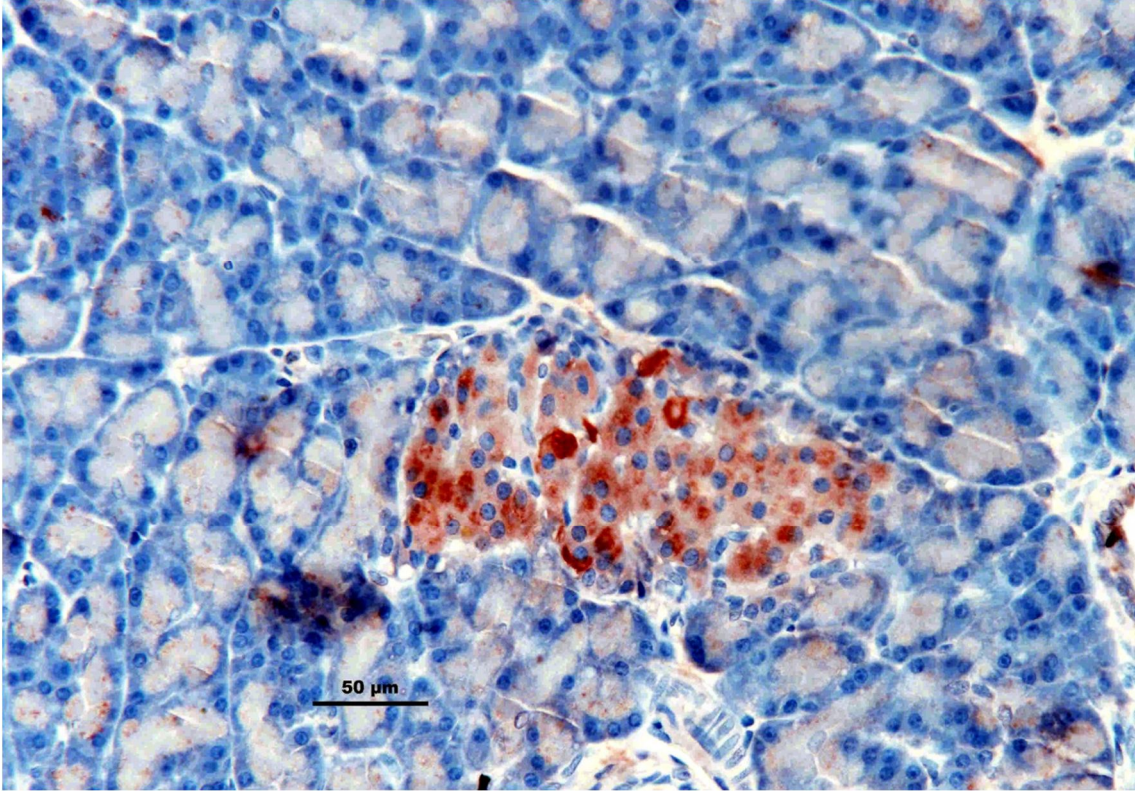
Diyabet grubunun mikroskobik incelemesinde; pankreas Langerhans adacık hücrelerinde dejeneratif ve nekrotik (oklar) değişiklikler belirgin olarak izlenmektedir. Bu hücrelerin sitoplazmaları şişkin ve çekirdekleri piknotik değişikliklere sahiptir (Şekil 4.16).



Şekil 4.17. D+100 grubu pankreas Langerhans adacığının histolojik görünümü. H.E., Bar=50μm.

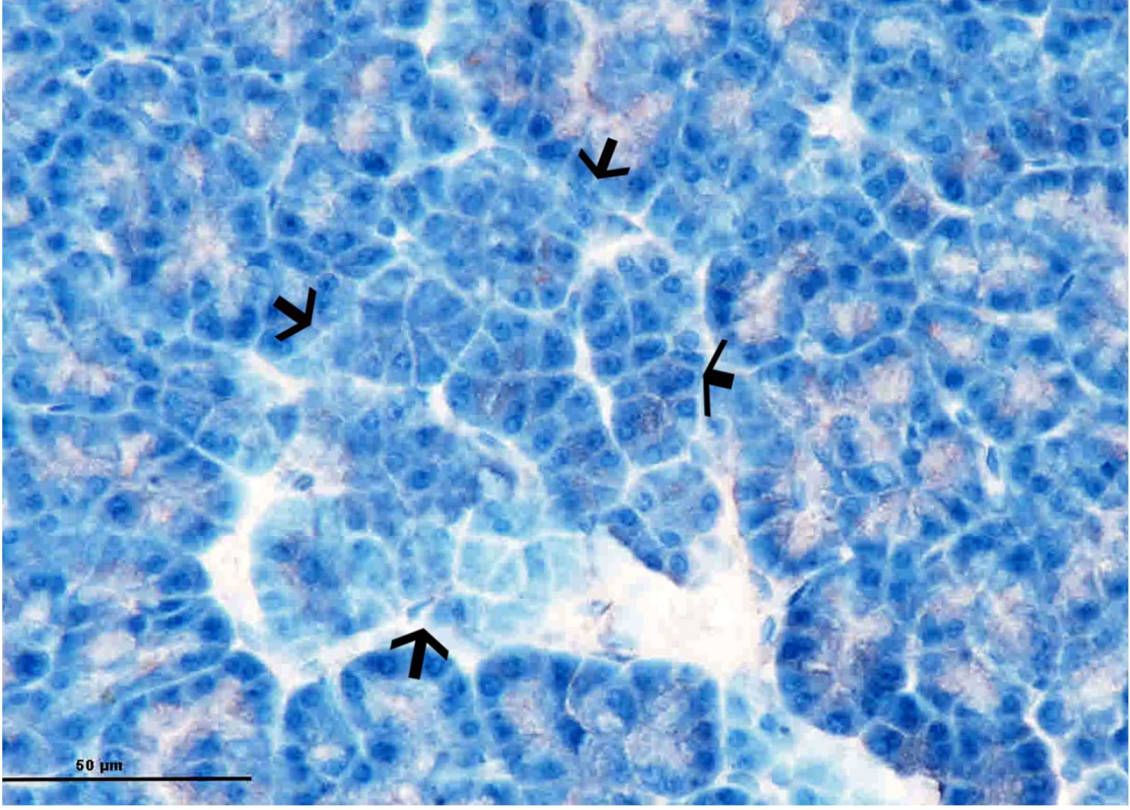
Şekil 4.17’de, Pankreasta Langerhans adacığındaki hücrelerde diyabet grubuna benzer şekilde dejeneratif ve nekrotik değişiklikler bulunmakla birlikte, bu olgular hafif olarak izlenmektedir.

İmmünohistokimyasal boyama yapılan pankreas dokularının mikroskopik incelemesi sonucu elde edilen bulgular aşağıda sunulmuştur (Şekil 4.18-20).



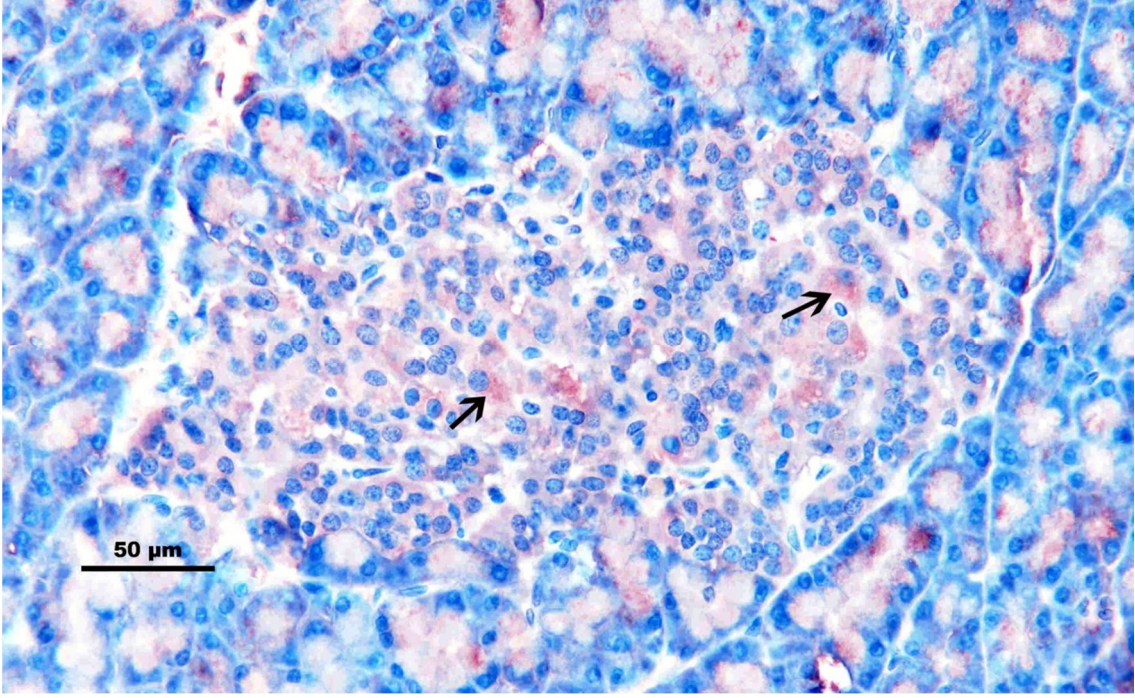
Şekil 4.18. Kontrol grubu pankreas Langerhans adacığı β -hücrelerinin İmmünohistokimyasal reaksiyonu. İmmünoperoksidaz-Hematoksilen, Bar=50 μ m.

İnsülin antikoru kullanılarak immünohistokimyasal boyama yapılan pankreas doku kesitlerinde, sitoplazmaları boyanan Langerhans adacığı β -hücreleri insülin pozitif hücreler olarak kabul edildi (Şekil 4.18).



Şekil 4.19. Diyabet grubu pankreas Langerhans adacığı β -hücrelerinin İmmunohistokimyasal reaksiyonu. İmmunoperoksidaz-Hematoksilen, Bar=50 μ m.

Langerhans adacığındaki (oklar) insülin için İmmunoperoksidaz-Hematoksilen ile zıt boyaması sonucu diyabet grubunda negatif reaksiyon tespit edilmiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.20. D+100 grubu pankreas Langerhans adacığ β -hücrelerinin İmmunohistokimyasal reaksiyonu. İmmunoperoksidaz-Hematoksilen, Bar=50µm.

Diğer taraftan OLE tedavisi uygulanan gruplarda, β -hücrelerinde insülinin kısmi immunoreaktif pozitif (oklar) olduğu görülmektedir (Şekil 4.20).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Küresel bir sağlık sorunu olan diyabetin tedavisinden önce önlenmesi hem birey hem de sağlık politikası için daha iyi bir çözüm olduğu bilinen bir gerçektir. Bu amaç doğrultusunda hem bireye hem de bireylerin bilinçlendirilmesine katkı sağlayacak çeşitli kuruluşlara büyük sorumluluk düşmektedir. Gerek kliniksel gerekse deneysel olarak diyabet ile ilgili çok fazla çalışma mevcuttur. Yapılan bu çalışmanın ana çıkış noktasını oluşturanda, milyonlarca diyabetli bireyin muzdarip olduğu çeşitli faktörlere multidisipliner bir bakış açısı ile değerlendirmeye çalışmaktır. Bunun içinde Columella'nın zeytin için *De Re Rustica* adlı kitabında bahsettiği gibi “evvelden gelen” zeytin ağacının yaprakları seçilmiştir.

Zeytinin geçmişten beri süregelen macerasının bir ürünü olan bu çalışma, zeytinin şimdi olduğu kadar ileriki zamanlarda da dikkat çeken pek çok özelliğinin araştırmalara konu olacağı aşikârdır. Zeytini bu kadar özel kılan, içerdiği biyobileşikler ve bunların canlılara kazandırdığı farklı metabolik etkilerinden dolayı geçmişten bu güne insanlar tarafından neredeyse “Âb-ı hayatı” vaat ettiği düşüncesidir. Zeytinin bu şaşırtıcı etkilerinde başrolü oynayan Oleuropein, çalışmanın odak noktasını oluşturmaktadır. Ayrıca, Oleuropein'in metabolitleri olan hidroksitirozol ve tirozolün yanı sıra, verbaskozit de çalışmanın diğer biyofenolik bileşimidirler. Zeytin yaprağında bulunan bu polifenolik bileşiklerin hipoglisemik, antioksidan, hepatoprotektif ve DNA oksidatif hasarına karşı etkilerinin araştırılması amaçlanmaktadır. Bu doğrultuda ilk olarak çalışmada kullanılan zeytin yaprağında içerik analizi yapılarak uygulanacak dozların belirlenmesi yapıldı.

Oleuropein yapısı ilk defa Panizzi ve ark., (1958; 1960) tarafından ortaya konmuştur. Oleuropein, sekoiridoidler grubuna ait olup Oleaceae, Gentianaceae, Cornaceae ve diğer pek çok familyada bol bulunur. Oleaceae familyasındaki sekoiridoidler genellikle glukozitlerin oleoside tipinden köken alırlar. Yani bir elenolik asit ve bir glukozidik rezidünün kombinasyonudurlar. Oleuropein 2-(3,4-dihydroxyphenyl) ethanol (hidroksitirozol)'ün bir esteridir ve oleosidik iskelete sahiptir. Bu Oleaceae familyasında sekoiridoid glukozitlerinde yaygındır ve aglikon formunda yağda çözünmeyen şeker parçalarını oluşturur (Soler-Rivas ve ark., 2000).

Zeytinin gelişimi genellikle üç evreye ayrılır. Bu evreler; Oleuropein oluşumu ve birikmesinin gerçekleştiği “büyüme evresi”, klorofil ve oleuropein seviyesinde azalmanın gerçekleştiği “yeşil olgunlaşma evresi” ve son olarak antosiyaninlerin belirmesiyle karakterize olan ve Oleuropein seviyesinde azalmanın devam ettiği “siyah olgunlaşma evresi”dir. Bu Oleuropein seviyesinde ki azalmanın yanında, verbaskozit gibi diğer polifenolik bileşiklerin seviyeleride artmaktadır (Amiot ve ark., 1989). Hidroksitirozol ve tirozol seviyesinde ki artışlar, Oleuropein hidroliziyle korelidir. Zeytin meyvelerinin gelişim evreleriyle eşgüdümlü olarak yapraklardaki metabolitlerin miktarlarındaki değişimler de benzer şekilde olmaktadır. Bu nedenle meyve ve yaprakların ne zaman hasat edildiği çok önemlidir.

Zeytin yaprağının ekstraksiyonu sonucu elde edilen miktarların HPLC ile tayini sonucu polifenolik bileşik profilinin kromatogramı (Şekil 4.1)'de ve miktarları Çizelge 4.1'de verilmiştir. Distile su ile gerçekleştirilen 80°C'deki bir gram zeytin yaprağından, ekstraksiyon sonucu elde edilen Oleuropein miktarı 15335,55 µg (1,53 g/100 g zeytin yaprağı) olarak tespit edilmiştir. Oleuropein için elde edilen bu değer daha önce Panizzi ve ark., (1958; 1960) tarafından bildirilen %1.5 ile %2 arasında tespit edilen değerler ile paralellik göstermektedir. Jemai ve ark., (2009) benzer şekilde metanol ve su karışımı (4:1 v/v) ile yapılan bir ekstraksiyondan sonra evaporasyon ile yoğunlaştırarak elde ettikleri dip kalıntısının, içerik analizi sonucu oleuropein miktarını 2.44 g/100 g olarak tespit etmişlerdir. Başka bir çalışmada (Briante ve ark., 2002b) ise, etanol/su karışımından (1:1 v/v) elde edilen ekstraksiyon sonucu % 10.4 Oleuropein miktarı elde edilmiştir. Bu literatür bulgusunun yüksek oluşunun sebebi, ekstraksiyon sonrası liyofilizasyon yaparak yoğunlaştırdıkları ürünün kuru ağırlık üzerinden çalışılmış olmasından kaynaklanmış olabilir. Yine daha önce yapılan başka bir çalışmada (Hayes ve ark., 2011), zeytin yaprakları saf metanol ile karıştırılarak doku homojenizatörü ile ekstre edilmiş ve Gradient solvent sistem ile HPLC analizi sonucu 1151.5 µg/mL Oleuropein tayini yapılmıştır. Hayes ve ark., (2011)'nin tespit ettikleri bu miktar, yapılan mevcut çalışma da elde edilen miktarlar ile benzerlik göstermektedir. Yine aynı çalışmada, verbaskozit, tirozol ve hidroksitirozol tayini de gerçekleştirilmiştir ve sırayla tespit ettikleri miktarlar 68.6 µg/mL, 15.6 µg/mL ve 10.2 µg/mL olarak bildirilmiştir.

Bu çalışmada sunulan verbaskozit (357,6 µg/g), hidroksitirozol (461,05 µg/g) ve tirozol (41,6 µg/g) miktarlarındaki literatür verilerine göre artış dikkat çekmektedir.

Bunun sebebi çalışmada materyal olarak kullanılan zeytin yapraklarının Ağustos ayında polifenolik profilinin ikinci evresi olan “yeşil olgunlaşma evresi”nde toplanmış olmasından kaynaklanıyor olabilir. Buna ilaveten, toprağın bileşiminden ve iklimsel faktörlerinde etkisinin olduğu düşünülmektedir.

Ekstraksiyon sonucu elde edilen polifenolik profil sonrasında zeytin yaprağının herhangi bir toksik etkisinin olup olmadığını tespit etmek için sıçanlara letal doz (LD₅₀) uygulaması yapıldı. LD₅₀ çalışmaları ilk defa J. W. Trevan (1927) tarafından yapılmıştır. Letal doz; bir maddenin tek seferde verildiğinde test grubundaki hayvanların % 50'sini öldüren doz olarak tanımlanır. Bu doğrultuda yapılan LD₅₀ çalışmasında elde edilen bulgular ışığında, doz gruplarında sıçan ölümlerinin gerçekleşmediği, dolayısıyla OLE'nin yüksek dozlarının güvenilir ve non-toksik olabileceği kanısına varılmıştır.

Diyabette hasarlanan ve kaybedilen β -hücrelerinin yeniden kazanılması, gelişen insülin direncinin azaltılması veya ortadan kaldırılması ya da kan glukoz seviyesinin düşürülmesi amacıyla besinler ile alınan karbonhidratların sindirimini inhibe edilmesi için pek çok farklı ajan ve yöntem geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bu amaç doğrultusunda, sülfonilüre grubu ajanlar β -hücrelerini glukozu duyarlı hale getirme ve insülin salgılanmasını artırma etkileriyle fonksiyon gösterirler (Gribble ve Reimann, 2003). Metformin grubu ajanlar, hepatik glukoneogenezi baskılayarak, AMP-aktive edici protein kinazın aktivasyonu ile glukoz ve yağ metabolizmasının dengelenmesi etkisiyle fonksiyon gösterirler (Gunton ve ark., 2003). Akarboz grubu ajanlar ise, bağırsaklarda karbonhidratların enzimatik parçalanmasını inhibe edip glukozun emilimini engelleme etkileriyle fonksiyon göstermektedirler (Tiwari ve Rao, 2002).

Bu etkilerin doğal yollardan elde edilebilmesi için son zamanlarda bitkisel kökenli bileşikler ve özütlenerek saflaştırılmış maddelerin etkinliklerinin araştırılma popülerliği artmaktadır. Çalışmada kullanılan OLE'nin de seçilme sebebi, doğal bir antidiyabetik madde olabileceği düşüncesidir.

Diyabetle ilgili yapılan çeşitli immunohistokimyasal çalışmalar sonucunda, diyabetik bireylerin pankreas Langerhans adalarında insülin pozitif reaksiyon veren alanların yoğunluğunun (Shao ve ark., 2006), β -hücre sayısının (Koyuturk ve ark., 2005) ve yüzdesinin (Kawasaki ve ark., 2005) diyabet olmayan bireylere göre oldukça az olduğu belirtilmektedir. Abdul-Hamid ve Moustafa (2013), yaptıkları

immunohistokimyasal çalışmada diyabetik sıçanların Langerhans adacıklarında insülin negatif hücreler olduğunu göstermişlerdir.

Bu çalışmada, diyabet grubunda immunohistokimyasal olarak pankreas Langerhans adacığı β -hücrelerinde insülin için negatif reaksiyon izlenmiştir. Bu sonuç literatür verileri ile uygunluk göstermektedir (Şekil 4.19). Aksine OLE tedavisi uygulanmış diyabetik sıçanların pankreas Langerhans adacığı β -hücrelerinde ise, immunohistokimyasal olarak insülin için kısmi pozitif reaksiyon izlenmiştir (Şekil 4.20). Bunun sebebi, STZ uygulamasının 3. gününden itibaren gerçekleştirilen OLE tedavisi, ya kısmi olarak β -hücre rejenerasyonunu sağlamış ve/veya hasarlanmamış β -hücrelerinde insülin ekspresyonunu up-regüle etmiş olabilir.

β -hücrelerinin hasar görmesi sonucu insülin salınımindaki bozukluktan dolayı kan glukoz seviyesinin arttığı kanıtlanmış gerçekler arasındadır (Maechler ve ark., 1999). Diyabetin en önemli belirtisi olan açlık kan glukoz (AKG) düzeyinin yüksek olması hastaların en çok muzdarip olduğu durumların başında gelmektedir. Kan glukozunun kontrol altında tutulamaması beraberinde diğer metabolik sendromların başlamasına öncülük etmektedir.

Yapılan bu çalışmada, sıçanların kan glukoz düzeyleri Şekil 4.2'de ve HbA_{1c} düzeyleri de Şekil 4.3'te verilmiştir. Tedavi uygulanmamış diyabet grubu AKG değerleri, kontrol ve diğer diyabetik tedavi gruplarına göre çok yüksek çıkmıştır. Bu durum, pankreas immunohistokimya boyamada da görüldüğü gibi, insülin eksikliğinden kaynaklanmış olabilir (Şekil 4.19).

Şekil 4.2'deki bulgulara göre, OLE uygulanan gruplarda diyabet grubuna göre AKG değerlerinde azalmanın olduğu görülmektedir. Ancak, bu gruplardan sadece D+25 grubundaki AKG düzeyinin azalmasının diyabet grubuna göre istatistik olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Bu sonuçlara paralel olarak, Gonzalez ve ark., (1992) alloksan indüklü diyabetik sıçanlarda 8 mg/kg zeytin yapraklarının, Jemai ve ark., (2009)'da alloksan indüklü diyabetik tavşanlarda 8 ve 16 mg/kg uyguladıkları Oleuropein ve hidroksitirozolün serum glukoz seviyelerini düşürdüğünü rapor etmişlerdir. Yine alloksan ile deneysel diyabet oluşturulan tavşanlarda 16 hafta süresince 20 mg/kg OLE'nin oral uygulaması sonucu 8. haftadan sonra kan glukoz seviyesinin 200 mg/dL'nin altına düştüğünü bildirmişlerdir (Al-Azzawie ve Alhamdani, 2006). Wainstein ve çalışma arkadaşları (2012), insanlar üzerinde kliniksel olarak 500

mg kapsül haline getirdikleri ekstraktı ayrıca deneysel olarak da STZ-indüklü sıçanlar üzerinde 600 mg nişasta/100 g bw ve 100 mg ekstrakt/100 g bw entübasyon ile uygulama yapmışlardır. Elde ettikleri sonuçlarda sıçanlarda diyabetli ve sadece nişasta verilen grup ile diyabetli ve nişasta ile birlikte ekstrakt uygulanan gruplar karşılaştırıldığında entübasyondan sonraki 30, 60 ve 120. dakikalarda kan glukoz düzeyinin 300-350 mg/dL arasında değiştiği ve azalmanın manidar olduğu bildirilmiştir (Wainstein ve ark., 2012).

Diyabetiklerde HbA_{1c} düzeyleri normal bireylere göre daha yüksek olduğu hem geçmiş hemde günümüzde çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Fox ve Sabovic, 1998; Büyükleblebici ve Karagül, 2012). Yapılan mevcut çalışmada da, HbA_{1c} diyabet grubunda %9±0.4 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.3). OLE uygulanan gruplar ve infüzyon grubu, diyabet grubuyla karşılaştırıldığında azalmanın önemli derecede olduğu görülmüştür (p<0.001). Wainstein ve ark., (2012) yukarıda belirtilen çalışmalarında insanlar üzerindeki uygulamada 14 hafta sonra HbA_{1c} düzeyinin %10'dan %8.0±1.5 seviyesine indiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada, bütün OLE gruplarında bu değerler %7,4 ile 7,7 arasında seyretmiş ve HbA_{1c} düzeyini aşağı yönde kontrol ederek literatürler ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. Ancak Wainstein ve ark., (2012)'nin yaptıkları çalışmada, katılımcıların fiziksel aktivite ya da beslenme çeşit ve şekilleri takip edilmemiştir. Bu yüzden ekstraktın bağımsız etkisi tam olarak tespit edilememiştir. Bu literatür bulguları, mevcut çalışmada elde edilen verilerle paralellik göstererek, OLE'nin hipoglisemik etkisinin olduğu sonucuna götürmektedir. Bu hipoglisemik etkinin, OLE'nin karbonhidratların parçalanma mekanizmalarını inhibe edebileceği düşüncesinden dolayı α -amilaz ve α -glukozidaz enzim aktiviteleri çalışılmıştır.

Oral α -glukozidaz inhibitörleri (örneğin akarboz) diyabetin tedavisinde yemek sonrası kan glukozunu düzenlemede kullanılan ajanlardan biridir. Ancak bu ajanlar kolonda sindirilmemiş nişastadan dolayı hastada çeşitli istenmeyen semptomlara neden olmaktadır. Bu semptomlar arasında şişkinlik hissi ve gaz sorunları %78; karında huzursuzluk ve diyare %14 dolaylarındadır. Hastaların % 20'si bu semptomların hepsinden muzdariptir (Cheng ve Fantus, 2005). Bu nedenle doğal kaynaklardan ve besinlerden türemiş alternatif α -glukozidaz inhibitörlerine yönelme daha etkili, daha güvenli, tolere edilebilir ve ucuz görünmektedir.

Şekil 4.4'te elde edilen bulgular değerlendirildiğinde α -amilaz aktivitesi diyabet grubunda kontrol grubuna göre azalırken, α -glukozidaz aktivitesinde artma olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Burada ki farklılığın muhtemel mekanizması duodenal bölgede hidroliz edilemeyen karbonhidatların ince bağırsak fırça kenarlarında bulunan α -glukozidaz enzimleri ile sindirimin devam ettirilerek enerji yoksunluğunu giderme adaptasyonu olarak değerlendirilebilir. OLE gruplarından özellikle D+25 grubunda her iki enzimde de diyabet grubuna göre daha fazla aktivite azalmasının gerçekleştiği görülmektedir. Ekstrakt dozu arttıkça kademeli olarak her iki enzimde de aktivite artışı olmaktadır. α -amilaz OLE grupları Akarboz grubu ile karşılaştırıldığında, aktivite değerlerinin Akarboz düzeyine gerilediği tespit edilmiştir. Benzer şekilde α -glukozidaz OLE grupları Akarboz grubu ile karşılaştırıldığında D+25 grubundaki aktivite değerinin Akarboza göre çok daha etkin olduğu görülmektedir.

Yapılan literatür taramalarında, Zeytin ve türevlerinin α -amilaz ve α -glukozidaz aktiviteleri üzerine *in vivo* bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle konu ile ilgili tartışma, kısmende olsa fikir vereceği kanaatiyle, *in vitro* çalışmalar üzerinden yürütülecektir. Komaki ve ark., (2003) daha önce yaptıkları *in vitro* çalışmada IC₅₀ değeri, sulu ekstrakta insan tükürük α -amilazına karşı 67.0 mg/mL ve insan pankreas α -amilazına karşıda 70.2 mg/mL, etanolik ekstrakta ise sırasıyla 4.0 ve 0.02 mg/mL olarak tespit etmişler ve etanolik ekstraktın α -amilaz inhibisyon etkinliğinin daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Bunun yanında Cardinali ve ark., (2010) *in vitro* çalışmalarında zeytin atık sularından saflaştırdıkları hidroksitirozolün α -amilaz IC₅₀ inhibisyon yüzdesini, 11.4 olarak hesaplamışlar ve potansiyel bir α -amilaz inhibitörü olabileceğini rapor etmişlerdir. Saf zeytin yağı ile yapılan başka bir *in vitro* çalışmada (Loizzo ve ark., 2011) ise α -glukozidaz ve α -amilaz IC₅₀ inhibisyon yüzdesini sırayla 184 ve 258 μ g/mL ve akarboz için buldukları değer ise 50 ve 35,5 μ g/mL olarak tespit etmişlerdir. Bu literatürler doğrultusunda mevcut çalışmada *in vivo* koşullarda elde edilen sonuçlar, çalışmayı pozitif yönde destekler niteliktedir. OLE'nin özellikle düşük dozunun iyi bir α -glukozidaz ve α -amilaz inhibitörü olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca α -glukozidaz ve α -amilaz enzim aktiviteleri ile kan glukoz değerleri karşılaştırıldığında, OLE gruplarında pozitif korelasyon olduğu görülmektedir. Özellikle D+25 grubunda belirgin şekilde enzim aktiviteleri azaldığı, aynı şekilde AKG değerlerinde de düşüş olduğu görülmektedir. Bu iki değer arasında tespit edilen pozitif korelasyon sonucu 25

mg/kg OLE dozunun daha etkin olduğu kanısına varılmıştır. OLE'nin, karbonhidratların sindirim enzimleri olan α -glukozidaz ve α -amilazı; (1) inhibe ederek, (2) bu enzimlerin gen ekspresyonlarını down regüle ederek kan glukoz düzeyinin düşürülmesinde etkili olduğu düşünölmektedir.

Diabetes mellitusta hiperglisemik koşullar altında oksidan/antioksidan dengenin oksidanlar yönünde artış gösterdiği bilinmektedir (Tabak ve ark., 2011). Artan oksidan düzeyide, oksidatif stresi indükleyerek doku hasarına neden olmaktadır. Bu hasarların ara mekanizmalarla protein glukasyonuna ve proteinlerin inaktivasyonuyla gerçekteşen lipit peroksidasyonu sonucu retinopati, nefropati ve koroner kalp hastalığına neden olduğu bildirilmektedir (Wolf, 1993). T1DM ve T2DM hastalarının artmış glukoprotein düzeyi, bozulmuş glukoz otooksidasyonu ve anormal antioksidan dengeye sahip olduğu rapor edilmiştir (Niwa ve ark., 2011). Tüm bu komplikasyonlar karaciğer ve böbrek gibi homeostazın düzenlenmesinde mihenk taşı olan doku ve organlarda hasara yol açmaktadır.

Çizelge 4.3'de, hepatositlerdeki akut karaciğer hasarlarını vurgulayan, infiltratif rahatsızlıklarda rol oynayan AST ile ALT seviyelerinde ve karaciğer parenkimal hasarlanmalarına neden olan LDH seviyesinde, diyabetik gruplarda kontrol gruplarına göre anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Yapılan histopatolajik değerlendirmelerde karaciğerde hepatositlerin sitoplazmasında vakuoller dejenerasyonların olduğu bununla birlikte hepatositlerde hidropik dejenerasyonların mevcudiyeti görölmektedir (Şekil 4.13). Dejenerasyon ve nekroza uğramış hepatositler AST, ALT ve LDH gibi enzimlerin seruma sızarak düzeylerinin artmasına neden olmaktadır. İnflamasyonlu hepatosellöler bozukluklar aşırı yükselmiş transaminaz (AST ve ALT gibi) seviyeleriyle sonuçlanır (Hultcrantz ve ark., 1986). OLE uygulanan diyabetik grupların tümünde AST ve ALT enzim düzeyleri Diyabet grubuna göre istatistik olarak anlamlı azalma göstermiştir. Ancak, LDH seviyesinde sadece D+İnf grubunun diyabete göre önemli düzeyde azaldığı tespit edilmiştir.

Yapılan literatür taramalarında, Diyabetik sıçanlarda karaciğer fonksiyonlarının bozularak harabiyetin olduğu ve bu yüzden serum AST ve ALT enzimlerinin yükseldiği bildirilmiştir (Eidi ve ark., 2006; Eidi ve ark., 2009). CCl₄ indüklü karaciğer harabiyeti oluşturulmuş farelerde 100 ve 200 mg/kg saflaştırılmış Oleuropein uygulamasının karaciğer fonksiyon bozukluğunu hem önleyici hem de koruyucu olduğunu rapor

etmişlerdir (Domitrovic ve ark., 2012). Yine benzer şekilde Andreadou ve ark., (2007) kalp hasarlı sıçanların Oleuropein uygulanması sonucu serum AST, ALT ve LDH düzeylerinin kontrol grubu seviyelerine gerilediğini bildirmişlerdir. Verilen bu literatür bildirişleri, takdim edilen bu çalışmanın sonuçlarıyla paralellik arz etmektedir. Mevcut çalışmada ayrıca, OLE gruplarının tümünde Trigiliserit düzeylerinin diyabet grubuna göre anlamlı düştüğü tespit edilmiştir. Diğer taraftan Kolestrol düzeylerinde bir dalgalanma olduğu görülmektedir. OLE'nin düşük doz grubu olan D+25 ve diyabet grubunda kontrole göre azalma; ancak D+50 ve D+100 gruplarında ise artma olmuştur. Daha önce yapılan buna benzer çalışmalarda (Eidi ve ark., 2006; Eidi ve ark., 2009) diyabetik sıçanların Trigiliserit ve Kolestrol düzeylerinin arttığı bildirilmiştir. Bu sonuç yapılan bu çalışmadaki Trigiliserit düzeyi için benzerlik göstermekle birlikte, kolestrol değerleri için zıtlık ifade etmektedir. Elde edilen sonuçlara göre, özellikle 25 mg/kg OLE'nin etkin bir şekilde kolestrol ve trigiliserit kontrolünde önemli olabileceği anlaşılmaktadır. Bunun yanında OLE'nin karaciğer koruyucu etkisinin olduğuda görülmektedir.

Üre, protein metabolizması sonucu karaciğer tarafından oluşturulan böbrekler tarafından atılan bir metabolittir. Kandaki üre nitrojenin konsantrasyonu, renal fonksiyonların bir parametresi olarak değerlendirilir. Benzer şekilde kreatininde, kaslarda atık veya fazla kreatin fosfatın yıkılması sonucu açığa çıkar ve sürekli sabit bir oranda kan üre nitrojeni ile göreceli oranda üretilerek böbrekler tarafından filtre edilir. Kandaki kreatinin seviyesindeki bir artış renal fonksiyon bozukluklarının önemli bir belirteci olarak iş görür (Champe ve ark., 2007). Diyabetik nefropati hastalar arasında en sık karşılaşılan komplikasyonlar arasındadır. Kronik hiperglisemiye maruz kalan doku, nefropatinin ana başlatıcı faktör rolünü oynamaktadır (DCCTRG, 1993) ve bu koşullar altında fizyolojik olarak renal disfonksiyon kaçınılmaz olmaktadır. Yapılan mevcut çalışmada, diyabetik sıçanlardaki üre ve kreatinin seviyesi kontrole göre önemli derecede yükselmiştir (Çizelge 4.3). Bu metabolitlerin artışı, diyabetik sıçanlarda renal glomerüler filtrasyonun dehidratasyon belirtisi ile kesintiye uğradığının bir göstergesi olduğu belirtilmektedir (Martin ve ark., 2005). Bununla birlikte OLE uygulanan gruplarda da üre seviyesi artış göstermiştir. Ürenin protein metabolizmasına bağlı bir metabolit olduğu düşünüldüğünde, bu artışın OLE gruplarındaki protein oksidasyon göstergesi olan PC düzeyleri (Şekil 4.5) ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir.

Oksidasyona uğramış ve fonksiyon kaybı yaşayan proteinlerin proteazlar vasıtasıyla sindirilip ortamdan uzaklaştırılmaları sonucu oksidatif deaminasyon ile fazla miktarda üre açığa çıkışı, gerçekleşen artışın muhtemel bir açıklamasıdır.

Yüksek ksantin oksidaz aktivitesi ve artmış lipid peroksidasyonu diyabetteki metabolik bozukluğu yansıtır (Anwar ve Meki, 2003). Ayrıca diyabette hiperglisemiden dolayı protein glikasyonu, kas zayıflığına ve pürin salınımında artışa neden olabilir. Pürinin yıkımı sonucunda son basamağı katalizleyen ksantin oksidaz aktivitesi ürik asitin ana kaynağını oluşturmaktadır (Anwar ve Meki, 2003). Flemmig ve ark., (2011) *in vitro* koşullarda yaptıkları çalışmada, zeytin yapraklarının etanolik ekstraktının ksantin oksidaz enzimini inhibe ettiklerini bildirmişlerdir. Mevcut çalışmada, diyabet grubunda istatistik olarak bir anlamlılık tespit edilemese de, ürik asit seviyesinin arttığı görülmektedir. Diğer taraftan, ekstrakt uygulaması sonucunda ürik asit seviyesi D+25 grubunda kontrol değerlerine gerilemiştir. D+50 grubunda ise kontrole yakın değerlere gerilediği görülmektedir. Bu bulgular doğrultusunda OLE'nin ksantin oksidaz enzimini inhibe ettiği ve dolayısıyla ürik asit seviyesinde azalmaya neden olduğu söylenebilir. Bu sonuçlar yukarıda verilen literatür verileri ile paralellik arz etmektedir.

Karaciğer protein karbonil düzeyi (Şekil 4.5) kontrol grubunda 0.67 ± 0.13 nmol/mg protein olarak tespit edilmiştir. Diyabet grubunda ise, bu değer istatistik olarak anlamlı olmamakla birlikte, 0.71 ± 0.23 nmol/mg protein olarak arttığı görülmektedir. OLE uygulanan gruplardan D+25 grubunda protein karbonil düzeyi 0.68 ± 0.06 nmol/mg protein olarak kontrol grubu seviyelerinde seyretmektedir. Ancak OLE gruplarında doz arttıkça protein karbonil düzeyide kademeli olarak artmaktadır. D+25 grubu hariç, OLE uygulanan diğer grupların protein oksidasyonuna duyarlı hale geldiği görülmektedir. Andreadou ve ark., (2007) zeytin yapraklarından izole ettikleri saf Oleuropeini 100 ve 200 mg/kg dozunda uyguladıkları kalp hasarlı sıçanların dokusunda protein karbonil içeriğinin 100 mg/kg dozundaki grupta kontrol grubuna göre yaklaşık bir buçuk kat daha fazla bulmuşlardır. Bu veri, mevcut çalışmada elde edilen bulgularla uygunluk göstermektedir. Ayrıca, OLE'nin ana bileşenini oluşturan oleuropeinin protein oksidasyonuna neden olduğu anlaşılmaktadır. Karaciğere glukozun girişi insülininden bağımsız olduğu için hiperglisemiden dolayı karaciğerde yüksek glukozun proteinler ile non-enzimatik reaksiyon verdiği düşünülmektedir. Aynı zamanda β -hücre hasarından dolayı insülin yokluğu karaciğerde glikolizi azaltmaktadır (Satake ve ark.,

2002). Bu mekanizma da, ileri glikasyon son ürün oluşumuna katkı sağlayarak geridönüşümsüz protein modifikasyonlarına neden olmaktadır (Tomlinson ve Gardiner, 2008). Hiperglisemi ile birlikte yüksek doz OLE (50 ve 100 mg/kg), glikoliz ara reaksiyon enzimlerini inhibe etmiş böylelikle de ileri glikasyon son ürün oluşum mekanizmasını tetikleyerek protein oksidasyonuna neden olmuş olabilir. OLE'nin farklı doz ve oksidasyon analizlerinin, ileriki çalışmalar ile irdelenmesi bu değişikliğin nedenin ortaya koyulması açısından önemlidir.

En küçük intrasellüler tiyol (-SH) molekülü olma özelliğine sahip olan GSH; glutamat, sistein ve glisinden (L- γ -glutamil-L-sisteinilglisin) oluşmuş önemli bir indirgeyici tripeptittir (Meister ve Larsson, 1989). Redoks özelliği ve yüksek intrasellüler konsantrasyonundan dolayı hücrenin redoks ortamının sağlanmasında en önemli oyuncusu olarak kabul edilir (Schafer ve Buettner, 2001). GSH, oksidatif stres durumunda kolayca okside olur. Bu koşullar altında okside olan GSH'nin iki molekülü birbirleriyle reaksiyona girer ve bir disülfid köprüsü ile GSSG dimerini oluşturur. Oluşan bu sülfür köprüsü daha sonra GR tarafından NADPH kofaktörlüğünde katalizlenerek tekrar iki molekül GSH'a indirgenir (Lu, 1998). Diyabet hiperglisemiden dolayı pek çok hasara neden olduğu gibi oksidatif strese de neden olarak antioksidan savunma sisteminde aksaklıklara sebebiyet verdiği bazı çalışmalar ile kanıtlanmıştır (Pratico, 2001; Hotamisligil, 2006; Hegde ve ark., 2013). Ayrıca diyabetik hastaların plazmalarında askorbat (Yue ve ark., 1989) ve glutatyon (Murakami ve ark., 1989) gibi antioksidanların azalan konsantrasyonu oksidatif stresin bir diğer göstergesidir.

Bu çalışmada sıçanların çeşitli dokularının GSH seviyeleri incelenmiştir (Çizelge 4.4). GSH düzeyleri, diyabet gruplarında kontrol gruplarına göre karaciğer ve beyin dokusunda azalırken, aksine böbrek dokusunda artış göstermiştir ($p<0.05$). OLE grupları ile diyabet grupları GSH düzeyleri açısından karşılaştırıldığında, D+25 grubunda karaciğer ve kan dokuda yükselme, D+50 ve D+100 gruplarında kalp, beyin ve kan dokuda yükselme, D+İnf grubunda ise bütün dokulardaki artış manidar bulunmuştur ($p<0.05$). GSH, özellikle eritrositlerde ve diğer dokularda, redoks tepkimelerinde tercih edilen bir moleküldür. Bu yüzden eritrositlerin canlılıklarının devamında büyük bir rol oynar. Çizelge 4.4 ve Şekil 4.6'da gösterildiği üzere OLE gruplarında GSH düzeylerinde artışlar görülmektedir.

Bu bulgulara paralel olarak, Weinbrenner ve ark., (2004) yaptıkları bir çalışmada, ekstra saf zeytinyağında bulunan biyofenolik bileşikler insanlarda redoks dengesini iyileştirme yönünde düzenlediğini göstermişlerdir. Ayrıca, Di Benedetto ve ark., (2007)'da özellikle ekstra saf zeytinyağında bulunan biyofenolik bileşiklerden oleuropein, tirozol, hidrokstirozol ve protokateşik asitin hücrelerde oksidatif stres esnasında GSH'ı tüketmeyerek aksine, konsantrasyonunu arttırdığını belirtmişlerdir. Biyofenollerin farklı sınıfları, farklı hücre tiplerinde GSH sentezi ve metabolizmasının dâhil olduğu enzimlerin aktivitelerinin iyileştirilmesine yardımcı olarak, GSH konsantrasyonunu arttırdığını göstermiştir (Moskaug ve ark., 2005). Saxena ve ark., (2005) T2D'li Hintli hastalar ile yüksek yağlı besin tüketimi sonrası yaptıkları bir çalışmada, diyabetli hastaların GSH konsantrasyonunda anlamlı bir artma tespit etmişlerdir. Verilen bu literatür bulguları, sunulan bu çalışmada elde edilen böbrek ve kan dokuda, diyabet grubundaki GSH düzeylerinin yüksekliğini desteklemektedir. Buna ilaveten, Al-Azzawie ve Alhamdani (2006) allakson diyabetli tavşanlarda, 20 mg/kg OLE uygulanan grup ile diyabet grubu karşılaştırmasında eritrosit GSH değerlerinde anlamlı bir artma olduğunu rapor etmişlerdir. Bu bağlamda, yapılan mevcut çalışmada da GSH'ın yapmış olduğu redoks tepkimelerine benzer şekilde, OLE'nin de oksidatif strese karşı savunmayı güçlendirerek, GSH'a sinerjik etki ile destek sağladığı düşünülebilir.

Şekil 4.7 kan G6PD aktivitesini göstermektedir. Buna göre, OLE doz grupları kontrol ve diyabet gruplarına göre G6PD aktivitesinde artış olduğu görülmektedir. Daha önce yapılan *in vitro* bir çalışmada (Zhang ve ark., 2000) aortik endotelial hücrelerde yüksek glukozun cAMP aracılığıyla G6PD enzimini inhibe ettiği rapor edilmiştir. Mevcut çalışmada, diyabetik gruptaki G6PD aktivitesinin azalması verilen bu literatür ile uygunluk göstermektedir. Ancak başka bir çalışmada (Gupte ve ark., 2009) ise, obez ve diyabetik ratların karaciğer ve kalplerinde G6PD ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir. Benzer şekilde Lee ve çalışma arkadaşları (2011) diyabetik hayvanlardan izole edilmiş pankreatik adacık hücrelerinde G6PD enziminin up-regüle olduğunu göstermişlerdir. Literatürdeki bu farklılıklar, yapılan G6PD analizinin farklı dokular üzerinde olmasından kaynaklanıyor olabilir.

İnsülin, G6PD geninin ekspresyonunu hızlandırarak, bu yolun işleyişini artırır (Wagle ve ark., 1998; Champe ve ark., 2007). Bu literatürler doğrultusunda, OLE

gruplarında insülinin kısmi pozitif reaksiyon verdiği hatırlanacak olursa (Şekil 4.20), bu gruplarda G6PD aktivitesinin neden arttığı açıklanabilir. Ayrıca, OLE'nin insülin benzeri etki yapmış olabileceği varsayılırsa bu enzimin ekspresyonunu hızlandırmış olabilir. Yapılan mevcut çalışmada bu bulgulara ek olarak, kan dokuda OLE gruplarında ki G6PD aktivitesi (Şekil 4.7) ile, GSH konsantrasyonu (Şekil 4.6) karşılaştırıldığında kendi içinde pozitif korele olduğu görülmektedir. OLE gruplarındaki G6PD aktivite artışı sonucu GSH düzeyide paralel olarak artmaktadır. Bu iki mekanizma Glutasyon Redüktaz (GR) aracılığıyla birbirine bağlanmaktadır. Okside forma dönüşen GSH (GSSG), GR aracılığıyla ve NADPH-bağımlı bir redüksiyon mekanizmasıyla katalizlenerek tekrar redükte hale (GSH) dönüştürülür (Chance ve ark., 1979). GR için zorunlu kofaktör olan NADPH'da, G6PD vasıtasıyla üretilir. Bu mekanizma ile yapılan çalışmada elde edilen G6PD artışıyla birlikte GSH düzeyinin artması açıklanmaktadır.

Bu araştırmada, karaciğer, böbrek, kalp ve beyin dokularında SOD aktivitesi, diyabet grubunda kontrol grubuna göre istatistik olarak önemli bir düşüş görülmüştür. Bununla birlikte, böbrek dokusu hariç diğer dokularda, OLE uygulanan tüm doz grupları (infüzyon grubu'da dâhil) diyabet grubu ile karşılaştırıldığında, diyabetik sıçanların SOD aktivitelerindeki artış manidar bulunmuştur (Çizelge 4.5). Hiperglisemi, diyabet grubunda antioksidan savunma sistemini zayıflatmıştır. Bunun en güçlü delili SOD gibi antioksidan enzim aktivitesinde ki düşüştür. Hiperglisemi sonucu artan ROT'lar SOD enzimini denatüre ederek diyabet grubunda enzim aktivitesinin azalmasına neden olmuş olabilir. Elde edilen sonuçlar Jemai ve ark. (2009) ve Hamden ve ark. (2009) tarafından rapor edilen bulgular ile benzerlik göstermektedir. Sunulan bu literatürlerde, hiperglisemiden dolayı glikolizasyon sonucunda oluşan serbest radikallerin antioksidan enzimleri inaktif hale getirmesinden kaynaklandığı belirtilmektedir. Zira, söz konusu literatürlerde ve mevcut çalışmada, ekstrakt uygulanan gruplarda SOD aktivitesi bütün dokularda oksidatif strese karşı antioksidan savunmayı güçlendirdiği görülmüştür. Bu antioksidan savunmanın güçlenmesinin, OLE'de bulunan polifenolik bileşikler yardımıyla olduğu düşünülmektedir. Bu etki Oleuropein ve hidroksitirozol gibi biyoaktif bileşiklerin hipoglisemik etkisi ve/veya antioksidan enzimlerin ekspresyon aktivitelerini arttırdığı yönündeki kuvvetli ihtimaller ile açıklanabilir. Bulgulara paralel olarak, Vina ve ark., (2006)'nın yaptıkları çalışma

da, polifenolik bileşiklerin, transkripsiyon seviyesinde SOD ve KAT enzimlerinin ekspresyonlarını arttırdığını göstermişlerdir.

Çizelge 4.6 incelendiğinde, karaciğer ve kalp dokularında GPx aktivitesinde diyabet gruplarında kontrol gruplarına göre istatistik olarak anlamlı azalma olduğu görülmektedir ($p<0.05$). Bunun yanında anlamlı olmasa da beyin dokusunda da GPx aktivitesi azalmıştır. Elde edilen bulgulara paralel olarak pek çok çalışmada (Miyake ve ark., 1998; Maritim ve ark., 2003; Saravanan ve Ponmurugan, 2011; Irudayaraj ve ark., 2012) diyabetik sıçanların karaciğer GPx aktivitelerinde azalma olduğu bildirilmiştir. Diğer taraftan böbrek dokusunda istatistik olarak önemli olmamakla birlikte, GPx aktivitesinde diyabetik grupta kontrol grubuna göre artma tespit edilmiştir. Daha önce yapılan bir çalışmada (Kakkar ve ark., 1995), 10 haftalık STZ-indüklü diyabetik sıçanların böbrek dokularında GPx aktivitesinin arttığı rapor edilmiştir. Benzer şekilde Maritim ve ark., (2003) diyabetik sıçanların böbrek GPx aktivitelerinde yükselme olduğunu bildirmişlerdir. Bahsi geçen literatürler de dâhil diyabetin farklı modellerinde antioksidan enzim aktivitelerinin bulguları göstermektedir ki, aktivitelerdeki artma ya da azalma değişiklikleri bir kargaşa yaratmaktadır. Bu nedenle antioksidan enzimlerin aktivite ve gen ekspresyonları dokudan dokuya ve hücre tipinden hücre tipine gibi farklı etkenlerden dolayı değişiklik gösterebileceğini düşündürmektedir. Çizelge 4.6'da ki bulgulara göre, diyabet grubuna göre OLE gruplarında D+25 grubunda karaciğer, kalp ve beyin dokularında GPx aktivitesinin artışı manidardır ($p<0.05$). Ayrıca anlamlı olmasa da, OLE etkisiyle böbrek dokusunda da aktivite artışı görülmektedir. D+50 grubunda sadece karaciğer dokusunda; D+100 grubunda karaciğer, böbrek ve kalp dokularında; D+İnf grubunda ise karaciğer ve beyin dokularında ki aktivite artışı önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Bu bulguları destekler mahiyette, Hamden ve ark., (2009) allakson-indüklü sıçanlara 20 mg/kg zeytin atık sularından saflaştırılmış hidroksitirozol uygulamasının karaciğer ve böbrek SOD, KAT ve GPx aktivitelerini, diyabetik gruba göre yükselttiğini bildirmişlerdir.

Hücrel ortamda bulunan H_2O_2 'nin Fenton reaksiyonları sonucu $\cdot OH$ oluşumu NF- κB 'nin aktivasyonuna sebep olur (Schreck ve ark., 1992). NF- κB aktivasyonu ise, çeşitli kaskat yollarının aktivasyonuna ve sonrasında da hücrenin ölümüne neden olabilir. Bu yüzden ortamdaki hızlı bir şekilde H_2O_2 'nin elimine edilmesi gerekliliği ortaya çıkar. Katalaz, H_2O_2 'nin yüksek konsantrasyona ulaştığı hücre ortamlarında

oldukça etkili temizleme sağlar (Halliwell, 1974). Ancak ortamdaki H_2O_2 konsantrasyonu düşük olduğu durumlarda hidrojen peroksiti substrat olarak kullanan GPx gibi diğer antioksidan enzimler devreye girerek H_2O_2 'yi ortamdan uzaklaştırırlar (Dat ve ark., 2000). KAT ve GPx enzimlerinin benzer etkisi olduğu halde hücre içindeki yerleşim ve etki yerleri bakımından farklılık gösterirler. GPx kofaktör olarak GSH'ı kullanarak (Barber ve Donohue, 1998) başlıca sitozol ve mitokondride bulunurken (Gilbert ve Colton, 1999); KAT peroksizomlarda bulunmaktadır (Karihtala ve Soini, 2007).

Çizelge 4.7'de verilen bulgularda; KAT aktivitesi karaciğer ve böbrek dokularında diyabet grubunda kontrol grubuna göre azalma tespit edilmiştir ($p<0.05$). Diğer taraftan kalp dokusunda ise bütün diyabetik gruplarda KAT aktivitesi yükselmiştir ($p<0.05$). Elde edilen bu bulgulara paralel olarak Jin ve çalışma arkadaşları (2008) yaptıkları bir çalışmada, diyabet gruplarının karaciğer ve böbrek KAT aktivitelerinin azaldığını rapor etmişlerdir. Diğer taraftan Babu ve ark., (2006), kalp dokusu üzerine yaptıkları çalışmada, diyabet gruplarında KAT aktivitesinin arttığını göstermişlerdir ki bu da mevcut çalışmanın bulgularını desteklemektedir. Benzer şekilde daha önce yapılan başka bir çalışmada (Kakkar ve ark., 1995) diyabetik ratların böbrek dokularında ki KAT aktivitelerinde azalma olduğu, bunun aksine kalp dokularında ise yükselme olduğu rapor edilmiştir. Diyabetik sıçanlarda katalaz aktivite yüksekliği, artmış endojen H_2O_2 üretiminden dolayı gerçekleşen oksidatif stresi telafi etmek için bir cevap olduğu düşünülmektedir. Katalaz yüksek peroksit seviyelerine karşı hücreyi korur, çünkü peroksitin aşırı miktarda mevcut olduğu varsayılır (Doroshov ve ark., 1980). Ayrıca Limaye ve ark., (2003) KAT gen ekspresyonundaki artışın oksidatif stres ile başa çıkmak için hücrede doğal bir cevap olduğunu ve STZ-diyabetik sıçanlarda katalaz transkriptinde yükselmenin olduğunu rapor etmişlerdir. Bu araştırmada, zeytin yaprağı ekstraktı uygulanan sıçanlardan D+50 grubu, diyabet grubu ile karşılaştırıldığında, karaciğer ve beyin dokusunda aktivite artışı olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Aynı zamanda, D+100 grubunda ise sadece beyin dokusundaki aktivite artışı önemlidir ($p<0.05$). Hem GPx hem de KAT H_2O_2 'nin detoksifikasyonundan sorumlu iki farklı antioksidan enzim grubudur. Bu iki enzimin hücrede yerleşim yerleri her ne kadar farklı olsa da, oksidatif strese karşı yapmış oldukları benzer etki, OLE'nin bu iki enzime etkin bir destek sağladığı ve savunmayı güçlendirdiği görülmektedir.

Elde edilen bulgular, OLE gruplarındaki GPx ve KAT aktivitelerindeki yükselmeler, hiperglisemi sonucu oluşan serbest radikallere karşı antioksidan savunma mekanizmasını güçlendirdiğini göstermiştir. Özellikle bu enzimlerin karaciğer ve beyin dokularında daha etkin bir koruyucu role sahip oldukları ve muhtemelen enzim ekspresyonlarının artışına bağlı olarak bu etkiyi gösterdikleri düşünülmektedir. Detoksifikasyon olaylarının en çok karaciğer dokusunda olduğu (Pryor, 1986) göz önüne alındığında, bu iki enziminde aktivite artışlarının olması doğal olarak manidar bulunmuştur. Pek çok çalışmada (Maxvell ve ark., 1997; Opara ve ark., 1999; Jin ve ark., 2008) diyabette reaktif oksijen türlerinin artmasından dolayı antioksidan kapasitenin baskılandığı gösterilmiştir. Bu araştırmada ise, zeytin yaprağı ekstraktında bulunan biyoaktif maddelerin, antioksidan kapasitenin artırılması ve dolayısıyla savunma sisteminin güçlendirilmesine farklı dokularda büyük katkı sağladığını göstermiştir. Oleuropeinin çeşitli ajanlara (CCl₄, doksorubisin, gentamisin) karşı antioksidan rolü olduğu pek çok çalışmada belirtilmiştir (Andreadou ve ark., 2007; Domitrovic ve ark., 2012; Tavafi ve ark., 2012). Ancak diyabetik sıçanlardaki etkisi tam olarak aydınlatılamamıştır.

DNA'nın yapısal değişimi, yaşlanma (Fraga ve ark., 1990), yangısal hastalıklar (Ames, 1983) ve karaciğer hastalıkları (Sipowicz ve ark., 1997) gibi çeşitli komplikasyonlardan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Oksidatif DNA hasarının koroner kalp hastalıkları, kanser gibi yaşlanmaya bağlı patojenik dejeneratif hastalıklar ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda 8-OHdG gibi oksidatif DNA hasar belirteçlerinin diyabetik hastalarda da arttığı tespit edilmiştir (Dandona ve ark., 1996).

Şekil 4.11'de verilen grafik incelendiğinde, diyabet grubu 8-OHdG konsantrasyonu kontrol grubuna göre anlamlı yükselerek ($p < 0.001$) oksidatif hasarın DNA glikozilaz düzeyini aştığı görülmektedir. Buna karşın, ekstrakt ve infüzyon uygulanmış diyabetik gruplarda ise, 8-OHdG konsantrasyonunun, kontrol grubu düzeylerinde olduğu dikkat çekmektedir ($p < 0.001$). Kendall ve ark., (2009) sağlıklı erkek ve kadın bireylere kapsül ve sıvı zeytin ekstraktı uygulaması sonucu, 8-OHdG konsantrasyonunda plasebo kontrol grubuna göre azalma olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada (Budiyanto ve ark., 2000) Ultraviyole-B (UVB) hasarlı deride, DNA hasarınının, direkt göstergesi olan CPD ve 6-4PP oluşumunu ve ayrıca ROT tarafından direkt göstergesi olan 8-OHdG üretiminin, zeytin yağının topikal

kullanımı ile çok az engellendiği gösterilmiştir. Benzer şekilde, Sumiyoshi ve Kimura (2010), yaptıkları çalışmada, oral olarak uyguladıkları zeytin yaprağı ekstraktının ve saf Oleuropeinin kronik UVB-indüklü deri hasarında Ki-67 ve 8-OHdG-pozitif hücre sayısındaki artışı durdurduğunu, aynı zamanda melanin granül alanı ve matriks metalloproteinaz-13 (MMP-13) ekspresyonunu azalttığını bildirmişlerdir. HeLa hücrelerinin saf zeytin yağı ile 4 saat inkübasyonu sonrasında H₂O₂ ile stres koşullarında nükleer DNA hasarı oluşumunun tamamen inhibe edildiği, ancak bu etkinin mitokondriyal DNA üzerinde etkili olmadığı rapor edilmiştir (Erol ve ark., 2012). Mevcut çalışmada kullanılan OLE'nin, oksidatif DNA hasar belirteci olan 8-OHdG konsantrasyonunu azaltmada etkili olduğu sonucu, yukarıdaki literatürlerle uygunluk arz etmektedir. Yapılan literatür taramalarında, OLE ile ilgili diyabetik oksidatif DNA hasar çalışmasına rastlanamamıştır. Bu yüzden karşılaştırma etkin olarak yapılamamaktadır. OLE'nin diyabet sonucu artan oksidatif strese karşı serbest radikalleri aktif bir şekilde ortadan kaldırarak etkisizleştirdiği anlaşılmaktadır. OLE'nin, DNA'nın bu oksidatif hasarına karşı koruyucu ve/veya DNA glikozilaz enzim ekspresyonunu up-regüle ederek fonksiyon gösterdiği düşünülmektedir.

Diyabetteki hiperglisemi karaciğer, böbrek ve hemapoetik sistem elemanları gibi bazı dokularda hasara neden olmaktadır (Sabu ve ark., 2002). Diyabetin karaciğer üzerindeki etkileri genellikle hepatositlerde hipertrofi ve otofajik vakuollerin görülmesi gibi ultrastrüktürel değişikliklerdir. Hepatositlerin nükleusu genellikle genişlemiş bazen de irregüler konturlu ve intranükleer inklüzyonlar içeren bir görünümde izlenmektedir. Ayrıca hepatositlerde azalmış glikojen granülleri ve az gelişmiş granüllü endoplazmik retikulum gibi sitoplazmik değişiklikler görülür (Kume ve ark., 2004). Bu literatür verilerine paralel olarak, bu çalışmada da karaciğerin histopatolojisinde diyabete bağlı olarak hepatositlerde nekroz, vakuoler ve hidropik dejenerasyon ile sinüzoidlerde dilatasyon izlendi (Şekil 4.13). Kontrol grubundaki sıçanlarda normal karaciğer parankim alanları ve portal alanlar görüldü (Şekil 4.12). Diyabet grubunda ki bulgulara benzer olarak, Çarlıoğlu ve ark., (2014)'da diyabetik sıçanların hepatositlerinde yaygın dejenerasyon izlemişlerdir. Orta ve şiddetli sinüzoidal dilatasyon ve sitoplazmik vakuoller ile hafif şiddette odaksal nekroz alanları rapor etmişlerdir. Bunun yanı sıra, Domitrovic ve ark., (2012) CCl₄ toksikasyonunda masif karaciğer nekrozu sonucu Oleuropein uygulamasıyla NF-κβ, TNF-α, COX-2 gibi inflamasyon cevapları

azalttığını, kaspaz-3 aktivasyonunu engelleyerek histopatolojik bulguları iyileştirdiğini rapor etmişlerdir. Bu literatür bildirişleri yapılan bu çalışmadaki bulgularla paralellik arz etmektedir. Bu çalışmada, OLE ile tedavi edilen diyabetik gruplarda kontrol grubuna benzer histolojik özellikler görülmüştür. Ancak çok nadir perisinüzoidal hücrelerde artış ve sinüzoidal fokal mononükleer hücre infiltrasyonları izlenmiştir (Şekil 4.14). OLE gruplarında gerçekleşen hafif seyirli sinüzoidal fokal mononükleer hücre infiltrasyonlarının sebebinin artan PC düzeylerinden olduğu düşünülmektedir. Yine Pan ve ark., (2008) diyabette şiddetli lipit peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve oksidatif DNA hasarı oluştuğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada, OLE'nin muhtemelen hepatositlerin hücre bütünlüğünü korumasına yardımcı olarak, dejeneratif ve nekrotik değişiklikleri azalttığı düşünülmektedir.

Diyabet grubunda pankreas dokusunun ışık mikroskopi incelemesinde Langerhans ve asinus çekirdeklerindeki şiddetli dejeneratif ve nekrotik değişiklikler ile adacıklardaki atrofi, STZ'nin beklenen patolojik bulguları arasındadır (Çizelge 4.8; Şekil 4.16). Abdul-Hamid ve Moustafa (2013), diyabetik sıçanların pankreas dokusunda hem ekzokrin hem de endokrin bölümlerinde vakuolasyon ve azalmış β -hücreleri izlemişlerdir. Bazı asinilerde sitoplazmik vakuolizasyon ve piknotik nükleuslar olduğu fokal asiner hasarlar rapor etmişlerdir. Benzer şekilde, Ku ve ark., (2009) tarafından diyabetik sıçanların pankreas dokularında STZ'nin diyabetik ajan özelliğinden dolayı β -hücrelerinin kaybedildiği, ayrıca dokuda dejenerasyonların olduğu belirtilmektedir. Literatür bulguları çalışmada elde edilen diyabet grubu sonuçları olan dejeneratif ve nekrotik değişiklikler ile benzerlik göstermektedir. Bu çalışmada, diyabette görülen şiddetli dejeneratif ve nekrotik değişiklikler ile adacıklardaki atrofi, OLE tedavisi sonucu azalmıştır. OLE uygulanan grupların Langerhans adacığindeki hücrelerde dejeneratif ve nekrotik değişiklikler hafif olarak izlenmiştir. Bununla birlikte kontrol grubuna yakın histolojik görüntü tespit edilmiştir (Şekil 4.17).

Kullanımının pratik ve kolay olduğu için çalışmada ev tipi ekstraksiyon olan infüzyon grubuna ayrı bir bakış yapılacak olursa, kan glukoz düzeyini D+50 ve D+100 grubu ile aynı derecede düşürdüğü, HbA_{1c} düzeyinde OLE grupları ile benzer seviyeye düşürdüğü, α -Amilaz ve α -Glukozidaz'ın, OLE gruplarına yakın ve diyabet grubuna göre etkin aktiviteye sahip olduğu, serum enzimlerinin kontrolünde etkili olduğu, GSH

düzeşini yükselttiği, antioksidan savunmaya yardımcı olduğu, oksidatif DNA hasarına karşı etkili olduğu ve karaciğerde histopatolojik bulguları azalttığı görölmektedir. Bu bulgular doğrultusunda evde kullanımının mümkün ve faydalı olabileceği düşünölmektedir.

Sonuç olarak; Diyabette OLE'nin kan glukoz kontrolünde etkili olduğu ve bu etkinin 25 mg/kg dozunda daha etkin olduğu görölmüşür. OLE'nin, karbonhidratların sindirim enzimleri olan, α -amilaz ve α -glukozidazı inhibe ederek ve/veya bu enzimlerin gen ekspresyonlarını down regüle ederek, kan glukoz düzeyinin düşürölmesinde etkili olduğu düşünölmektedir. Bunun yanında, bir yan etkisinin olmadığı düşünölürse antidiyabetik ilaçlara karşı iyi bir alternatif fitoformölasyon olabilir.

Özellikle Oleuropeinin ve yanısıra hidroksitirozol ve tirozolün muhtemelen üzerinde barındırdığı -OH grupları sayesinde ve OLE'de bulunan diğer fenolik bileşiklerle birlikte sinerjik etkilerinden dolayı oksidatif stresi baskılayarak güçlü bir antioksidan olduğu ve savunma sistemini kuvvetlendirdiği anlaşılmışür.

Hepatositlerde patolojik bulguları azalttığı ve Langerhans adacık hücrelerinde atrofiyi engellediği görölmektedir. Bunun yanında, OLE tedavisi ya kısmi olarak β -hücre rejenerasyonunu sağlamış ve/veya hasarlanmamış β -hücrelerinde insülin ekspresyonunu up-regüle ederek kısmi olarak insülin salımını arttırmış olabilir.

Ayrıca, OLE'nin, oksidatif DNA hasarına karşı koruyucu ve/veya DNA glikozilaz enzim ekspresyonunu up-regüle ederek fonksiyon gösterdiği düşünölmektedir.

Kısaca, Oleuropeinin kan glukoz seviyesini düşürdüğu, antioksidan kapasiteyi güçlendirdiği, karaciğerde dejeneratif ve nekrotik etkilere karşı koruyucu bir rol oynadığı ve özellikle oksidatif DNA hasarına karşı önleyici olduğu göz önüne alındığında, terapötik etkisinin kuvvetli olduğu anlaşılmaktadır.

Zeytin yapraklarının infüzyon olarak kullanımı, redoks dengelerini yükseltmede, antioksidan parametreleri iyileştirmede, DNA ve karaciğer koruyucu etkileri gibi olumlu sonuçları olduğu görölmüşür. Bu grup ve ekstraksiyon grubunda elde edilen sonuçlar birbirleriyle paralellik arz etmektedir.

Bu çalışma ile birlikte, zeytin yaprağının bu etkilerinin daha iyi ve kapsamlı ortaya konulabilmesi için, özellikle farmokognozi ve gen ekspresyon çalışmalarının da yapılmasının yararlı olabileceği düşünölmektedir. Ayrıca, zeytin yapraklarının ucuz ve

kolay elde edilebilir bir hammadde olduğu düşünöldüğünde, kullanımı multifaktöriyel olarak önemlidir.

KAYNAKLAR

- Abdul-Hamid, M., Moustafa, N., 2013. Protective effect of curcumin on histopathology and ultrastructure of pancreas in the alloxan treated rats for induction of diabetes. *The Journal of Basic & Applied Zoology*, **66** (4): 169-179.
- Abe, R., Beckett, J., Abe, R., Nixon, A., Rochier, A., Yamashita, N., Sumpio, B., 2011. Olive oil polyphenol Oleuropein inhibits smooth muscle cell proliferation. *Olive Oil Polyphenol Oleuropein Inhibits Smooth Muscle Cell Proliferation*, **41**: 814-820.
- Abo-Youssef, A. M. H., Messiha, B. A. S., 2013. Beneficial effects of *Aloe vera* in treatment of diabetes: Comparative in vivo and in vitro studies. *Bulletin of Faculty of Pharmacy*, **51**: 7-11.
- Abraham, L., Kierszenbaum, M. D., 2006. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi*. Çeviri: Demir, R., Palme Yayıncılık, Yay. No: 398, Ankara.
- Adler, V., Yin, Z., Fuchs, S. Y., Benezra, M., Rosario, L., Tew, K. D., Pincus, M. R., Sardana, M., Henderson, C. J., Wolf, C. R., Davis, R. J., and Ronai, Z., 1999. Regulation of JNK signaling by GSTp. *The EMBO Journal*, **18**: 1321-1334.
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, **105**: 121-126.
- Al-Azzawie, H., F., Alhamdani, M., S., 2006. Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Sciences*, **78**: 1371-1377.
- American Diabetes Association, 2004. Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, **27** (1): 5-10.
- American Diabetes Association, 2014. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care*, **37** (1): 14-80.
- Ames, B. N., 1983. Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science*, **221**: 1256-1264.
- Amiot, M. J., Fleuriet, A., Macheix, J. J., 1989. Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation. *Phytochemistry*, **28**: 67-70.
- Andreadou, I., Iliodromitis, E. K., Mikros, E., Constantinou, M., Agalias, A., Magiatis, P., Skaltsounis, A. L., Kamber, E., Tsantili-Kakoulidou, A., Kremastinos, D. T., 2006. The olive constituent oleuropein exhibits anti-ischemic, antioxidative, and hypolipidemic effects in anesthetized rabbits. *Journal of Nutrition*, **136**: 2213-2219.

- Andreadou, I., Sigala, F., Iliodromitis, E. K., Papaefthimiou, M., Sigalas, C., Aligiannis, N., Savvari, P., Gorgoulis, V., Papalabros, E., Kremastinos, D. T., 2007. Acute doxorubicin cardiotoxicity is successfully treated with the phytochemical oleuropein through suppression of oxidative and nitrosative stress. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **42**: 549-558.
- Anwar, M. M., Meki, A. M. R., 2003. Oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats: effects of garlic oil and melatonin. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **135**: 539-547.
- Ashcroft, F. C., Gribble, F. M., 1998. Correlating structure and function in ATP-sensitive K⁺ channels. *Trends in Neuroscience*, **21**: 288-294.
- Babior, B., M., 2000. Phagocytes and oxidative stress. *The American Journal of Medicine*, **109**: 33-34.
- Babu, P. V., Sabitha, K.E., Shyamaladevi, J. S., 2006. Therapeutic effect of green tea extract on oxidative stress in aorta and heart of streptozotocin diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions*, **162**: 114-120.
- Baker, E. N., Blundell, T. L., Cutfield, J. F., Dodson, E. J., Dodson, G. G., Hodgkin, D. M., Hubbard, R. E., Isaacs, N. W., Reynolds, C. D., Sakabe, K., Sakabe, N., Vijayan, N. M., 1988. The structure of 2Zn pig insulin crystals at 1.5 Å resolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences*, **319**: 369-456.
- Ball, S. G., 2007. Vasopressin and disorders of water balance: the physiology and pathophysiology of vasopressin. *Annals of Clinical Biochemistry*, **44**: 417-431.
- Bancroft, S. D., Stevens, A., 1982. *Theory and Practice of Histological Techniques*. Second edition. Churchill Livingstone, Edinburgh. 395-400.
- Banerji, M., Lebovitz, H., 1989. Insulin sensitive and insulin resistant variants in IDDM. *Diabetes*, **38**: 784-792.
- Barber, R., D., Donohue, T., J., 1998. Pathways for transcriptional activation of a glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase gene. *Journal of Molecular Biology*, **280**: 775-784.
- Bellastella, A., Bizzarro, A., Colella, G., Bellastella, G., Sinisi, A. A., De Bellis, A., 2012. Subclinical diabetes insipidus. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, **26**: 471-483.

- Benzie, I. F., 2000. Evolution of antioxidant defence mechanisms. *European Journal of Nutrition*, **39**: 53-61.
- Beutler, E., Duron, O., Kelly, B.M., 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, **61** (5): 882-888.
- Beutler, E., 1971. *Red Cell Metabolism Manual Of Biochemical Methods*. Academic Press, London. 68.
- Beyer, R., E., 1992. An analysis of the role of coenzyme Q in free radical generation and as an antioxidant. *Biochemistry and Cell Biology*, **70**: 390-403.
- Blundell, T., Dodson, G., Hodgkin, D., Mercola, D., 1972. Insulin: the structure in the crystal and its reflection in chemistry and biology. *Advances in Protein Chemistry*, **26**: 279-402.
- Bokov, A., Chaudhuri, A., Richardson, A., 2004. The role of oxidative damage and stress in aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, **125**: 811-826.
- Bourquelot, E., Vintilesco, J., 1908. Sur l'oleuropeine, nouveau principe de nature glucosidique retire de l'olivier (*Olea europaea* L.). *Comptes Rendus*, **147**: 533-535. <https://archive.org/stream/comptesrendusheb147acad#page/533/mode/1up>
- Briante, R., Patumi, M., Limongelli, S., Febbraio, F., Vaccaro, C., Di Salle, A., La Cara, F., Nucci, R., 2002a. Changes in phenolic and enzymatic activities content during fruit ripening in two Italian cultivars of *Olea europaea* L. *Plant Science*, **162**: 791-798.
- Briante, R., La Cara, F., Febbraio, F., Patumi, M., Nucci, R., 2002b. Bioactive derivatives from oleuropein by a biotransformation on *Olea europaea* leaf extracts. *Journal of Biotechnology*, **93**: 109-119.
- Brosius, F. C., 2008. New insights into the mechanisms of fibrosis and sclerosis in diabetic nephropathy. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, **9**: 245-254.
- Brownlee, M., 2005. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*, **54**: 1615-1625.
- Buchanan, T. A., Xiang, A., Kjos, S. L., Watanabe, R., 2007. What is gestational diabetes? *Diabetes Care*, **30** (2): 105-111.

- Budiyanto, A., Ahmed, N. U., Wu, A., Bito, T., Nikaido, O., Osawa, T., Ueda, M., Ichihashi, M., 2000. Protective effect of topically applied olive oil against photocarcinogenesis following UVB exposure of mice. *Carcinogenesis*, **21** (11): 2085-2090.
- Büyükleblebici, O., Karagül, H., 2012. Streptozotosin ile deneysel olarak diyabet oluşturulan ratlarda kromun biyokimyasal etkileri. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.*, **18** (1): 21-26.
- Cabrera, O., Berman, D. M., Kenyon, N. S., Ricordi, C., Berggren, P. O., Caicedo, A., 2006. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103** (7): 2334-2339.
- Cardinali, A., Cicco, N., Linsalata, V., Minervini, F., Pati, S., Pieralice, M., Tursi, N., Lattanzio, V., 2010. Biological activity of high molecular weight phenolics from olive mill wastewater. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**: 8585-8590.
- Casirola, D. M., Ferraris, R. P., 2006. alpha-Glucosidase inhibitors prevent diet-induced increases in intestinal sugar transport in diabetic mice. *Metabolism*, **55** (6): 832-841.
- Ceriello, A., 2005. Postprandial hyperglycemia and diabetes complications: is it time to treat? *Diabetes*, **54**: 1-7.
- Champe, P. C., Harvey, R. A., Denise, R. F., 2007. *Lippincott's Illustrated Reviews Serisinden: Biyokimya*. Editör: E., Ulukaya. 3. Baskı. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul. 335.
- Chance, B., Sies, H., Boveris, A., 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*, **59**: 527-605.
- Cheng, A. Y. Y., Fantus, I. G., 2005. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Canadian Medical Association Journal*, **172** (2): 213-226.
- Cheng, D. M., Kuhn, P., Poulev, A., Rojo, L. E., Lila, M. A., Raskin, I., 2012. *In vivo* and *in vitro* antidiabetic effects of aqueous cinnamon extract and cinnamon polyphenol-enhanced food matrix. *Food Chemistry*, **135**: 2994-3002.

- Chung, M. H., Kasai, H., Jones, D. S., Inoue, H., Ishikawa, H., Ohtsuka, E., Nishimura, S., 1991. An endonuclease activity of *Escherichia coli* that specifically removes 8-hydroxyguanine residues from DNA. *Mutation Research*, **254** (1): 1-12.
- Chung, M. H., Ki, H. S., Ohtsuk, E., Kasai, H., Yamamoto, F., Nishimura, S., 1991. An endonuclease activity in human polymorphonuclear neutrophils that removes 8-hydroxyguanine residues from DNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **178** (3): 1472-1478.
- Ciulla, T. A., Amador, A. G., Zinman, B., 2003. Diabetic retinopathy and diabetic macular edema. *Diabetes Care*, **26** (9): 2653-2664.
- Columella, L. I., *De Re Rustica Libri XII Et Liber De Arboribus*. V. Bölüm, VIII. Paragraf, 223. Sayfa.
- Committee Report, 1998. The Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus: Report on the Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, **21** (1): 5-19.
- Cruess, W. V., Alsberg, C. L., 1934. The bitter glucoside of the olive. *Journal of the American Chemical Society*, **56**: 2115-2117.
- Çarlıoğlu, A., Akdeniz, D., Alkan, R., Uz, E., Haltas, H., Turgut, F., Uysal, S., 2014. Diyabetik ratlarda karaciğer, böbrek ve pankreas hasarında zofenoprilin etkisi. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*, **23** (2): 118-124.
- Dandona, P., Thusu, K., Cook, S., Snyder, B., Makowski, J., Armstrong, D., Nicotera, T., 1996. Oxidative damage to DNA in Diabetes Mellitus. *Lancet*, **347**: 444-445.
- Dat, J., Vandenameele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Breusegem, F., 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **57**: 779-795.
- Davies, K. J., 1995. Oxidative stress: the paradox of the aerobic life. *Biochemical Society Symposia*, **61**: 1-31.
- DeFronzo, R. A., Bonadonna, R. C., Ferrannini, E., 1992. Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes Care*, **15** (3): 318-368.
- De Muro, P., Faedda, R., Fresu, P., Masala, A., Cigni, A., Concas, G., Mela, M. G., Satta, A., Carcassi, A., Sanna, G. M., Cherchi, G. M., 2004. Urinary transforming growth factor-beta 1 in various types of nephropathy. *Pharmacological Research*, **49**: 293-298.

- (DCCTRG) The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1993. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *The New England Journal of Medicine*, **329**: 977-986.
- Di Benedetto, R., Vari, R., Scazzocchio, B., Filesi, C., Santangelo, C., Giovannini, C., Matarrese, P., D'Archivio, M., Masella, R., 2007. Tyrosol, the major extra virgin olive oil compound, restored intracellular antioxidant defences in spite of its weak antioxidative effectiveness. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, **17**: 535-545.
- Drira, R., Chen, S., Sakamoto, K., 2011. Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Life Sciences*, **89**: 708-716.
- Domitrovic, R., Jakovac, H., Marchesi, V. V., Sain, I., Romic, Z., Rahelic, D., 2012. Preventive and therapeutic effects of oleuropein against carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. *Pharmacological Research*, **65**: 451-464.
- Doroshov, J. H., Locker, G. Y., Myers, C. E., 1980. Enzymatic defenses of the mouse heart against reactive oxygen metabolites. *Journal of Clinical Investigation*, **65**: 128-135.
- Dröge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Review*, **82**: 47-95.
- Eidi, A., Eidi, M., Esmaeili, E., 2006. Antidiabetic effect of garlic (*Allium sativum* L.) in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine*, **13**: 624-629.
- Eidi, E., Eidi, M., Darzi, R., 2009. Antidiabetic effect of *Olea europaea* L. in normal and diabetic Rats. *Phytotherapy Research*, **23**: 347-350.
- El-Demerdash, F. M. Yousef, M., El-Naga, N. I. A., 2005. Biochemical study on the hypoglycemic effects of onion and garlic in alloxan-induced diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology*, **43**: 57-63.
- Enzo Life Sciences Ltd., DNA damage ELISA kiti, ADI-EKS-350.
- Erol, Ö., Arda, N., Erdem, G., 2012. Phenols of virgin olive oil protects nuclear DNA against oxidative damage in HeLa cells. *Food and Chemical Toxicology*, **50**: 3475-3479.
- Esmaeili-Mahani, S., Rezaeezadeh-Roukerda, M., Esmaeilpoura, K., Abbasnejada, M., Rasoulianb, B., Sheibani, V., Kaeidi, A., Hajjalizadeh, Z., 2010. Olive (*Olea*

- europaea* L.) leaf extract elicits antinociceptive activity, potentiates morphine analgesia and suppresses morphine hyperalgesia in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **132**: 200-205.
- Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A., Grodsky, G. M., 2002. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocrine Reviews*, **23** (5): 599-622.
- Fang, J., Sawa, T., Akaike, T., Maeda, H., 2002. Tumor-targeted delivery of polyethylene glycol-conjugated D-amino acid oxidase for antitumor therapy via enzymatic generation of hydrogen peroxide. *Cancer Research*, **62**: 3138-3143.
- Fawcett, D. W., 1986. *Bloom and Fawcett: A textbook of histology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 652-684.
- Fleming, I., Buse, R., 2001. Vascular cytochrome P450 in the regulation of renal function and vascular tone: EDHF, superoxide anions and blood pressure. *Nephrology Dialysis Transplantation*, **16**: 1309-1311.
- Flemmig, J., Kuchta, K., Arnhold, J., Rauwald, H. W., 2011. *Olea europaea* leaf (Ph.Eur.) extract as well as several of its isolated phenolics inhibit the gout-related enzyme xanthine oxidase. *Phytomedicine*, **18**: 561-566.
- Flohe, L., Ötting, F., 1984. SOD assays. *Methods in Enzymology*, **105**: 93-101.
- Floyd, R. A., 1990. The role of 8-hydroxyguanosine in carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **11**: 1447-1450.
- Fox, G. N., Sabovic, Z., 1998. Chromium picolinate supplementation for diabetes mellitus. *The Journal of Family Practice*, **46** (1): 83-86.
- Fraga, C. G., Shigenaga, M. K., Park, J., Deaanan, P., Ames, B. N., 1990. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **87**: 4533-4537.
- Frank, R. N., 2004. Diabetic retinopathy. *The New England Journal of Medicine*, **350**: 48-58.
- Gaeta, L. M., Tozzi, G., Pastore, A., Federici, G., Piemonte, F., 2002. Determination of superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in blood of healthy pediatric subject. *Clinica Chimica Acta*, **322** (1): 117-120.

- Gardner, D. G., Shoback, D., 2011. *Greenspan's Basic and Clinical Endocrinology*. 9th edition, San Francisco, CA, ISBN: 978-0071622431.
- Gate, L., Paul, J., Ba, O. N., Tew, K. D., Tapiero, H., 1999. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Blamed Pharmacother*, **53** (4): 169-180.
- Gilbert, D., L., Colton, C., A., 1999. *Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An Inter Disciplinary Approach*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Gonzalez, M., Zarzuelo, A., Gamez, M. J., Utrilla, M. P., Jimenez, J., Osuna, I., 1992. Hypoglycemic activity of olive leaf. *Planta Medica*, **58**: 513-515.
- Gribble, F. M., Reimann, F., 2003. Sulphonylurea action revisited: the post-cloning era. *Diabetologia*, **46** (7): 875-891.
- Gunton, J. E., Delhanty, P. J., Takahashi, S., Baxter, R. C., 2003. Metformin rapidly increases insulin receptor activation in human liver and signals preferentially through insulin-receptor substrate-2. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **88**: 1323-1332.
- Gupte, R. S., Floyd, B. C., Kozicky, M., George, S., Ungvari, Z. I., Neito, V., Wolin, M. S., Gupte, S. A., 2009. Synergistic activation of glucose-6-phosphate dehydrogenase and NAD(P)H oxidase by Src kinase elevates superoxide in type 2 diabetic, Zucker fa/fa, rat liver. *Free Radical Biology & Medicine*, **47**: 219-228.
- Guyton, A. C., Hall, J. E., 1996. *Tıbbi fizyoloji*. Editör Çavuşoğlu, H., Nobel tıp kitap evleri, Yay. No: 9, Ankara.
- Halliwell, B., 1974. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase: solutions to the problem of lung with oxygen. *New Phytologist*, **73**: 1075-1086.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., 1995. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine*, **18** (1): 125-126.
- Hamden, K., Allouche, N., Damak, M., El Feki, A., 2009. Hypoglycemic and antioxidant effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol from olive mill waste in vitro and in rats. *Chemico-Biological Interactions*, **180**: 421-432.
- Harris, M. I., 1998. Diabetes in America: epidemiology and scope of the problem. *Diabetes Care*, **21** (3): 11-14.

- Hayes, J. E., Allen, P., Brunton, N., O'Grady, M. N., Kerry, J. P., 2011. Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid. *Food Chemistry*, **126**: 948-955.
- Hayes, J. D., Pulford, D. J., 1995. The glutathione S-transferase supergene family regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, **30**: 445-600.
- Hegde, S. V., Adhikari, P., Nandini, M., D'Souza, V., 2013. Effect of daily supplementation of fruits on oxidative stress indices and glycaemic status in type 2 diabetes mellitus. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, **19**: 97-100.
- Henderson, J. R. Daniel, P. M., 1979. A comparative study of the portal vessels connecting the endocrine and exocrine pancreas, with a discussion of some functional implications. *Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognate Medical Sciences*, **64** (4): 267-275.
- Home, P. D., Pacini, G., 2008. Hepatic dysfunction and insulin insensitivity in type 2 Diabetes Mellitus: A critical target for insulin-sensitizing agents. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, **10** (9): 699-718.
- Hotamisligil, G. S., 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, **444**: 860-867.
- Howell, S. L., Tyhurst, M., Duvefelt, H., Andersson, A., Hellerström, C., 1978. Role of zinc and calcium in the formation and storage of insulin in the pancreatic beta-cell. *Cell and Tissue Research*, **188** (1): 107-118.
- Hultcrantz, R., Glaumann, H., Lindberg, G., Nilsson, L. H., 1986. Liver investigation in 149 asymptomatic patients with moderately elevated activities of serum aminotransferases. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, **21**: 109-113.
- IDF (International Diabetes Federation), 2013. *IDF Diabetes Atlas*, Sixth edition. Edt. Guariguata, L., Nolan, T., Beagley, J., Linnenkamp, U., Jacqmain, O., ISBN: 2-930229-85-3. online version of IDF Diabetes Atlas: www.idf.org/diabetesatlas
- Imai, H., Nakagawa, Y., 2003. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radical Biology and Medicine*, **34**: 145-169.

- Imani, H., Tabibi, H., Najafi, I., Atabak, S., Hedayati, M., Rahman, L., 2014. Effects of ginger on serum glucose, advanced glycation end products and inflammation in peritoneal dialysis patients. *Nutrition*, **NUT 9431**: 10.1016/j.nut.2014.11.020
- Irudayaraj, S. S., Sunil, C., Duraipandiyan, V., Ignacimuthu, S., 2012. Antidiabetic and antioxidant activities of *Toddalia asiatica* (L.) Lam. leaves in streptozotocin induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **143**: 515-523.
- Jemai, H., Bouaziz, M., Feki, I., El Feki, A., Sayadi, S., 2008. Hypolipidemic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. *Chemico-Biological Interactions*, **176**: 88-98.
- Jemai, H., El Feki, A., Sayadi, S., 2009. Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57** (19): 8798-8804.
- Jin, L., Xue, H., Jin, L., Li, S., Xu, Y., 2008. Antioxidant and pancreas-protective effect of aucubin on rats with streptozotocin-induced diabetes. *European Journal of Pharmacology*, **582**: 162-167.
- Kahn, C. R., 1994. Banting Lecture. Insulin action, diabetogenesis, and the cause of type II diabetes. *Diabetes*, **43**: 1066-1084.
- Kakkar, R., Kalra, J., Mantha, S.V., Prasad, K., 1995. Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetic rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **151**: 113-119.
- Kamata, H., Honda, S., Maeda, S., Chang, L., Hirata, H., Karin, M., 2005. Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell*, **120**: 649-661.
- Kanter, M., Uysal, H., Karaca, T., Özdemir, H., 2006. Depression of glucose levels and partial restoration of pancreatic β -cell damage by melatonin in streptozotocin-induced diabetic rats. *Archives of Toxicology*, **80**: 362-369.
- Karihtala, P., Soini, Y., 2007. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, **115**: 81-103.
- Karkkainen, M. J., Pertrova, T., 2000. Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Oncogene*, **19**: 5598-5605.

- Kasai, H., Crain, P. F., Kuchino, Y., Nishimura, S., Ootsuyama, A., Tanooka, H., 1986. Formation of 8-hydroxyguanine in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair. *Carcinogenesis*, **8**: 1849-1851.
- Kawasaki, F., Matsuda, M., Kanda, Y., Inoue, H., Kaku, K., 2005. Structural and functional analysis of pancreatic islets preserved by pioglitazone in db/db mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, **288** (3): 510-518.
- Kendall, M., Batterham, M., Obied, H., Preznler, P. D., Ryan, D., Robards, K., 2009. Zero effect of multiple dosage of olive leaf supplements on urinary biomarkers of oxidative stress in healthy humans. *Nutrition*, **25**: 270-280.
- Kern, T. S., 2007. Contributions of inflammatory processes to the development of the early stages of diabetic retinopathy. *Experimental Diabetes Research*, **2007**: 1-14.
- Kim, Y. M., Jeong, Y. K., Wang, M. H., Lee, W. Y., Rhee, H. I., 2005. Inhibitory effect of pine extract on alpha-glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. *Nutrition*, **21** (6): 756-761.
- Komaki, E., Yamaguchi, S., Maru, I., Kinoshita, M., Kakehi, K., Ohta, Y., Tsukada, Y., 2003. Identification of anti- α -Amylase components from olive leaf extracts. *Food Science and Technology Research*, **9** (1): 35-39.
- Kovacic, P., Jacintho, J., D., 2001. Mechanisms of carcinogenesis: Focus on oxidative stress and electron transfer. *Current Medicinal Chemistry*, **8**: 773-796.
- Koyuturk, M., Ozsoy-Sacan, O., Bolkent, S., Yanardag, R., 2005. Effect of glurenorm on immunohistochemical changes in pancreatic beta cells of rats in experimental diabetes. *Indian Journal of Experimental Biology*, **43** (3): 268-271.
- Kraegen, E. W., Clark, P. W., Jenkins, A. B., Daley, E. A., Chisholm, D. J., Storlien, L. H., 1991. Development of muscle insulin resistance after liver insulin resistance in high-fat-fed rats. *Diabetes*, **40**: 1397-1403.
- Krentz, A. J., Clough, G., Byrne, C. D., 2007. Interactions between microvascular and macrovascular disease in diabetes: pathophysiology and therapeutic implications. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, **9** (6): 781-791.
- Kroll, P., Rodrigues, E. B., Hoerle, S., 2007. Pathogenesis and classification of proliferative diabetic vitreoretinopathy. *Ophthalmologica*, **221**: 78-94.

- Ku, Y. P., Jin, M., Kim, K. H., Ahn, Y. J., Yoon, S. P., You, H. J., Chang, I. Y., 2009. Immunolocalization of 8-OHdG and OGG1 in pancreatic islets of streptozotocin-induced diabetic rats. *Acta histochemica*, **111**: 138-144.
- Kume, E., Fujimura, H., Matsuki, N., Ito, M., Aruga, C., Toriumi, W., Kitamura, K., Doi, K., 2004. Hepatic changes in the acute phase of streptozotocin (SZ)-induced diabetes in mice. *Experimental and Toxicologic Pathology*, **55** (6): 467-480.
- Kurt, İ., 2003. Glikozile hemoglobin (HbA_{1c}) ölçümü ve diabetes mellitusun uzun dönem glisemik kontrolünde kullanılması. *Gülhane Tıp Dergisi*, **45** (4): 387-395.
- Kuzuya, T., Nakagawa, S., Satoh, J., Kanazawa, Y., Iwamoto, Y., Kobayash, Nanjo, K., Sasaki, A., Seino, Y., Ito, C., Shima, K., Nonaka, K., Kadowaki, T., 2002. Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*, **55**: 65-85.
- Laakso, M., 1999. Hyperglycemia and cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Diabetes*, **48**: 937-942.
- Lee, J. W., Choi, A. H., Ham, M., Kim, J. W., Choe, S. S., Park, J., Lee, G. Y., Yoon, K. H., Kim, J. B., 2011. G6PD up-Regulation Promotes Pancreatic β -Cell Dysfunction. *Endocrinology*, **152**: 793-803.
- Lee-Hung, S., Zhang, L., Huang, P., L., Chang, Y., T., Huang, P., L., 2003. Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1infection and OLE treatment. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **307**: 1029-1037.
- Levine, R., L., Garland, D., Oliver, C., N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A., G., Ahn, B. W., Shaltiel, S., Stadtman, E. R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, **186**: 464-478.
- Levine, S., A., Kidd P., M., 1986. *Antioxidant adaptation: Its role in free radical pathology. Biocurrents Division*. Allergy Research Group, San Leandro, California. 376.
- Limaye, P. V., Raghuram, N., Sivakami, S., 2003. Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **243**: 147-152.
- Loizzo, M. R., Lecce, G. D., Boselli, E., Menichini, F., Frega, N. G., 2011. Inhibitory activity of phenolic compounds from extra virgin olive oils on the enzymes

- involved in diabetes, obesity and hypertension. *Journal of Food Biochemistry*, **35**: 381-399.
- Lowry, O. H., Rosebrough, W. I., Farr, A. L., Randall, R. J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**: 265-275.
- Lu, S. C., 1998. Regulation of hepatic glutathione synthesis. *Seminars in Liver Disease*, **18**: 331-343.
- Maechler, P., Jornot, L., Wollheim, C. B., 1999. Hydrogen peroxide alters mitochondrial activation and insulin secretion in pancreatic beta cells. *Journal of Biological Chemistry*, **274** (39): 27905-27913.
- Makni, M., Fetoui, H., Gargouri, N. K., Garoui, E. M., Zeghal, N., 2011. Antidiabetic effect of flax and pumpkin seed mixture powder: effect on hyperlipidemia and antioxidant status in alloxan diabetic rats. *Journal of Diabetes and Its Complications*, **25**: 339-345.
- Mari, M., Cederbaum, A. I., 2001. Induction of catalase, alpha and microsomal Glutathione S-Transferase in CYP2E1 overexpressing HepG2 cells and protection against short-term oxidative stress. *Hepatology*, **33**: 652-661.
- Maritim, A. C., Sanders, R. A., Watkins, J. B., 2003. Effects of α -lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **14** (5): 288-294.
- Marnett, L. J., 2000. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, **21**: 361-370.
- Martin, W. F., Armstrong, L. E., Rodriguez, N. R., 2005. Dietary protein intake and renal function. *Nutrition & Metabolism*, **2**: 1-9.
- Mason, R. M., Wahab, N. A., 2003. Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, **14**: 1358-1373.
- Maxwell, S. R. J., Thomason, H., Sandler, D., Leguen, C., Baxter, M. A., Thorpe, G. H. G., Jones, A. F., Barnett, A. H., 1997. Antioxidant status in patients with uncomplicated insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *European Journal of Clinical Investigation*, **27**: 484-490.
- McCord, J. M., 1993, Human disease, free radicals and the oxidant antioxidant balance, *Clinical Biochemistry*. **26**: 357-651.

- McCord, J. M., Fridovich, I., 1969. Superoxide Dismutase. An enzymic function for erythrocyte (Hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*, **244**: 6049-6055.
- McDorman, K. S., Pachkowski, B. F., Nakamura, J., Wolf, D. C., Swenberg, J. A., 2005. Oxidative DNA damage from potassium bromate exposure in long-evans rats is not enhanced by a mixture of drinking water disinfection by-products. *Chemico-Biological Interactions*, **152** (2-3): 107-117.
- Meister, A., Larsson, A., 1989. *The metabolic basis of inherited disease*. Editors: Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D., Sixth edition, New York, McGraw Hill, 855-868.
- Miura, T., Koide, T., Ohichi, R., Kako, M., Usami, M., Ishihara, E., Yasuda, N., Ishida, H., Seino, Y., Tanigawa, K., 1998. Effect of acarbose (alpha-glucosidase inhibitor) on disaccharase activity in small intestine in KK-Ay and ddY mice. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, **44** (3): 371-379.
- Miwa, K., Nakamura, J., Hamada, Y., Naruse, K., Nakashima, E., Kato, K., Kasuya, Y., Yasuda, Y., Kamiya, H., Hotta, N., 2003. The role of polyol pathway in glucose-induced apoptosis of cultured retinal pericytes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, **60**: 1-9.
- Miyake, Y., Yamamoto, K., Tsujihara, N., Osawa, T., 1998. Protective effects of lemon flavonoids on oxidative stress in diabetic rats. *Lipids*, **33** (7): 689-695.
- Mohagheghi, F., Bigdeli, M. R., Rasoulianb, B., Hashemi, P., Pour, M. R., 2011. The neuroprotective effect of olive leaf extract is related to improved blood-brain barrier permeability and brain edema in rat with experimental focal cerebral ischemia. *Phytomedicine*, **18**: 170-175.
- Mooradian, A. D., Thurman, J. E., 1999. Glucotoxicity: potential mechanisms. *Clinics in Geriatric Medicine*, **15**: 255.
- Moskang, J. O., Carlsen, H., Myhrstad, M. C., Blomhoff, R., 2005. Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **81**: 277-283.
- Murakami, K., Kondo, T., Kawakami, Y., 1989. Impairment of glutathione metabolism in erythrocytes from patients with diabetes mellitus. *Metabolism*, **38**: 753-758.

- Murphy-Ullrich, J. E., Poczatek, M., 2000. Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, **11**: 59-69.
- Mysliwiec, M., Balcerska, A., Zorena, K., Mysliwska, J., Lipowski, P., Raczynska, K., 2008. The role of vascular endothelial growth factor, tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 in pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetic Research and Clinical Practice*, **79**: 141-146.
- Naba, I., Yoshikawa, H., Sakoda, S., Itabe, H., Suzuki, H., Kodama, T., Yanagihara, T., 2000. Onion-bulb formation after a single compression injury in the macrophage scavenger receptor knockout mice. *Experimental Neurology*, **166** (1): 83-89.
- Nathan, D. M., Turgeon, H., Regan, S., 2007. Relationship between glycosylated haemoglobin levels and mean glucose levels over time. *Diabetologia*, **50**: 2239-2244.
- Niwa, A., Tajiri, T., Higashino, H., 2011. Ipomoea batatas and Agaricus blazei ameliorate diabetic disorders with therapeutic antioxidant potential in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, **48** (3): 194-202.
- Nourooz-Zadeh, J., Rahimi, A., Tajaddini-Sarmadi, J., Tritschler, H., Rosen, P., Halliwell, B., Betteridge, D. J., 1997. Relationships between plasma measures of oxidative stress and metabolic control in NIDDM. *Diabetologia*, **40**: 647-653.
- Oldfield, J., E., 1987. The two faces of selenium. *Journal of Nutrition*, **117**: 2002-2008.
- Opara, E. C., Abdel-Rahman, E., Soliman, S., Kamel, W. A., Souka, S., Lowe, J. E., Abdel-Aleem, S., 1999. Depletion of total antioxidant capacity in type 2 diabetes. *Metabolism*, **48**: 1414-1417.
- Owerbach, D., Bell, G. I., Rutter, W. J., Brown, J. A., Shows, T. B., 1981. The insulin gene is located on the short arm of chromosome 11 in humans. *Diabetes*, **30**: 267-270.
- Paglia, D., E., Valentine, W., N., 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, **70** (1): 158-169.
- Pallant, J., 2001. *SPSS Survival manual*. Open University Press. Philadelphia, 242.

- Pan, H. Z., Zhang, H., Chang, D., Li, H., Sui, H., 2008. The change of oxidative stress products in diabetes mellitus and diabetic retinopathy. *British Journal of Ophthalmology*, **92**: 548-551.
- Panizzi, L., Scarpati, M.L., Oriente, E.G., 1958. *Ricerca Scientifica*, **28**: 994.
- Panizzi, L., Scarpati, M. L., Oriente, E. G., 1960. Structure of oleuropein bitter glycoside with hypotensive action of olive oil. Note II. *Gazzetta Chimica Italiana*, **90**: 1449-1485.
- Pérez-Bonilla, M., Salidoa, S., van Beek, T. A., Linares-Palomino, P. J., Altarejos, J., Noguera, M., Sánchez, A., 2006. Isolation and identification of radical scavengers in olive tree (*Olea europaea*) wood. *Journal of Chromatography A*, **1112** (1-2): 311-318.
- Pessin, J. E., Saltiel, A. R., 2000. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, **106**: 165-169.
- Pratico, D., 2001. Lipid peroxidation in mouse models of atherosclerosis. *Trends in Cardiovascular Medicine*, **11** (3-4): 112-116.
- Pryor, W., A., 1986. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetime, and reactions. *Annual Review of Physiology*, **48**: 657-667.
- Radi, R., Tan, S., Prodanov, E., Evans, R., A., Parks, D., A., 1992. Inhibition of Xanthine Oxidase by uric acid and its influence on superoxide radical production. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1122**: 178-182.
- Rakieten, N., Rakieten, M. L., Nadkarni, M. V., 1963. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin. *Cancer Chemotherapy Reports*, **29**: 91-98.
- Randox Lab. Ltd., 1996. *Ransod Süperoxide Dismutase Enzim Kiti, Ransel Glutathione Peroxidase Enzim Kiti*.
- Riddle, M., 2000. Combining sulfonylureas and other oral agents. *American Journal of Medicine*, **108** (6A): 15-22.
- Rinderknecht, H., Wilding, P., Haverback, B. J., 1967. A new method for the determination of alpha-Amylase. *Experientia*, **23** (10): 805.
- Rizzi, R., Caroli, A., Bolla, P., Acciaioli, A., Pagnacco, G., 1988. Variability of reduced glutathione levels in massese ewes and its effect on daily milk production. *Journal of Dairy Research*, **55**: 345-353.

- Ross, M. H., Kaye, G. I., Pawlina, W., 2002. *Histology A Text and Atlas*. 4. Edition, Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 532-548.
- Ryan, D., Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., Lavee, S., 2002. Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Scientia Horticulturae*, **92**: 147-176.
- Ryle, A. P., Sanger, F., Smith, L. F., Kitai, R., 1955. The disulphide bonds of insulin. *Biochemical Journal*, **60** (4): 541-556.
- Sabu, M. C., Smitha, K., Kuttan, R., 2002. Anti-diabetic activity of green tea polyphenols and their role in reducing oxidative stress in experimental diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, **83** (1-2): 109-116.
- Said, G., 2007. Diabetic neuropathy. *Nature Clinical Practice Neurology*, **3** (6): 331-340.
- Saravanan, G., Ponmurugan, P., 2011. Ameliorative potential of S-allyl cysteine on oxidative stress in STZ induced diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions*, **189**: 100-106.
- Satake, S., Moore, M. C., Igawa, K., Converse, M., Farmer, B., Neal, D. W., Cherrington, A. D., 2002. Direct and indirect effects of insulin on glucose uptake and storage by the liver. *Diabetes*, **51**: 1663-1671.
- Sato, H., Genet, C., Strehle, A., Thomas, T., Lobstein, A., Wagner, A., 2007. Anti-hyperglycemic activity of a TGR5 agonist isolated from *Olea europaea*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **362**: 793-798.
- Saxena, R., Madhu, S. V., Shukla, R., Prabhu, K. M., Gambhir, J. K., 2005. Postprandial hypertriglyceridemia and oxidative stress in patients of type 2 diabetes mellitus with macrovascular complications. *Clinica Chimica Acta*, **359**: 101-108.
- Schafer, F. Q., Buettner, G. R., 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology & Medicine*, **30**: 1191-1212.
- Schreck, R., Meier, B., Mannel, D. N., Droge, W., Bauerle, P. A., 1992. Dithiocarbamate as potent inhibitors of nuclear factor $\kappa\beta$ activation in intact cells. *The Journal of Experimental Medicine*, **75**: 1181-1194.

- Servili, M., Selvaggini, R., Esposto, S., Taticchi, A., Montedoro, G. F., Morozzi, G., 2004. Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography A*, **1054**: 113-127.
- Shao, J., Iwashita, N., Ikeda, F., Ogihara, T., Uchida, T., Shimizu, T., Uchino, H., Hirose, T., Kawamori, R., Watada, H., 2006. Beneficial effects of candesartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, on beta-cell function and morphology in db/db mice, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **344** (4): 1224-1233.
- Singh, I., Mok, M., Christensen, A. M., Turner, A. H., Hawley, J. A., 2008. The effects of polyphenols in olive leaves on platelet function. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, **18**: 127-132.
- Sipowicz, M. A., Chomarat, P., Diwan, B. A., Anver, M. A., Awasthi, Y. C., Ward, J. M., Rice, J. M., Kasprzak, K. S., Wild, C. P., Anderson, L. M., 1997. Increased oxidative DNA damage and hepatocyte overexpression of specific cytochrome P450 isoforms in hepatitis of mice infected with *Helicobacter hepaticus*. *American Journal of Pathology*, **4**: 933-941.
- Soler-Rivas, C., Espin, J., C., Wichers, H., J., 2000. Oleuropein and related compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **80**: 1013-1023.
- Somova, L., I., Shode, F., O., Mipando, M., 2004. Cardiotonic and antidysrhythmic effects of oleanolic and ursolic acids, methyl maslinate and uvaol. *Phytomedicine*, **11**: 121-129.
- Stam, M. R., Danchin, E. G., Rancurel, C., Coutinho, P. M., Henrissat, B., 2006. Dividing the large glycoside hydrolase family 13 into subfamilies: towards improved functional annotations of alpha-amylase-related proteins. *Protein Engineering, Design & Selection*, **19** (12): 555-562.
- Standring, S., 2008. *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice*. 40th Edition. Churchill Livingstone. ISBN: 978-0-443-06684-9
- Stettler, C., Allemann, S., Juni, P., Cull, C. A., Holman, R. R., Egger, M., Krähenbühl, S., Diem, P., 2006. Glycemic control and macrovascular disease in types 1 and 2 diabetes mellitus: Meta-analysis of randomized trials. *American Heart Journal*, **152** (1): 27-38.

- Stevens, M. J., Lattimer, S. A., Kamijo, M., Van, H. C., Sima, A. A., Greene, D. A., 1993. Osmotically induced nerve taurine depletion and the compatible osmolyte hypothesis in experimental diabetic neuropathy in the rat. *Diabetologia*, **36**: 608-614.
- Stupans, I., Kirlich, A., Tuck, K. L., Hayball, P. J., 2002. Comparison of radical scavenging effect, inhibition of microsomal oxygen free radical generation, and serum lipoprotein oxidation of several natural antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**: 2464-2469.
- Suckale, J., Solimena, M., 2008. Pancreas islets in metabolic signaling--focus on the beta-cell. *Frontiers in Bioscience*, **13**: 7156-7171.
- Sumiyoshi, M., Kimura, Y., 2010. Effects of olive leaf extract and its main component oleuropein on acute ultraviolet B irradiation-induced skin changes in C57BL/6J mice. *Phytotherapy Research*, **24**: 995-1003.
- Sun, Y., Oberley, L. W., Li, Y., 1988. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry*, **34** (3): 497-500.
- Suzuki, S., Hinokio, Y., Komatu, K., Ohtomo, M., Onoda, M., Hirai, S., 1999. Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to diabetic complications. *Diabetes Research and Clinical Practice*, **45**: 161-168.
- Szkudelski, T., 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in β cells of the rat pancreas. *Physiological Research*, **50** (6): 537-546.
- Szweda, L. I., Stadtman, E. R., 1992. Iron-catalyzed oxidative modification of glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*, structural and functional changes. *The Journal of Biological Chemistry*, **267** (5): 3096-3100.
- Tabak, O., Gelisgen, R., Erman, H., Erdenen, F., Muderrisoglu, C., Aral, H., Uzun, H., 2011. Oxidative lipid, protein, and DNA damage as oxidative stress markers in vascular complications of Diabetes Mellitus. *Clinical & Investigative Medicine*, **34** (3): 163-171.
- Tancrède, G., Rousseau-Mignerot, S., Nadeau, A., 1983. Long-term changes in the diabetic state induced by different doses of streptozotocin in rats. *British Journal of Experimental Pathology*, **64** (2): 117-123.

- Tavafi, M., Ahmadvand, H., Toolabi, P., 2012. Inhibitory effect of olive leaf extract on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Iranian Journal of Kidney Diseases*, **6** (1): 25-32.
- The Expert Committee, 2002. Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, **25** (1): 5-20.
- The International Expert Committee, 2009. International Expert Committee Report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*, **32**: 1327-1334.
- Tibaldi, J., 2008. Preserving Insulin Secretion in Type 2 Diabetes Mellitus. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism*, **3** (2): 147-159.
- Tibaldi, J., 2009. Importance of Postprandial glucose levels as a target for glycemic control in type 2 diabetes. *Southern Medical Journal*, **102** (1): 60-66.
- Tiwari, A. K., Rao, J. M., 2002. Diabetes mellitus and multiple therapeutic approaches of phytochemicals: Present status and future prospects. *Current Science*, **83**: 30-38.
- Tomas, E., Lin, Y., Dagher, Z., Saha, A., Luo, Z., Ido, Y., Ruderman, N. B., 2002. Hyperglycemia and insulin resistance: Possible mechanisms. *Annals New York Academy of Sciences*, **967**: 43-51.
- Tomlinson, D. R., Gardiner, N. J., 2008. Glucose neurotoxicity. *Nature Reviews Neuroscience*, **9** (1): 36-45.
- Trevan, J. W., 1927. The error of determination of toxicity. *Proceedings of the Royal Society* (London), Series B **101**: 483-514.
- Urso, M., L., Clarkson, P., M., 2003. Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation. *Toxicology*, **189**: 41-54.
- Ünsal, A., 2006. *Ölmez Ağacın Peşinde-Türkiye’de Zeytin ve Zeytinyağı*, Yapı Kredi Yayınları, İstanbul, 288.
- Vina, J., Borras, C., Gomez-Cabrera, M. C., Orr, W. C., 2006. Role of reactive oxygen species and (phyto)estrogens in the modulation of adaptive response to stress. *Free Radical Research*, **40**: 111-119.
- Visioli, F., Bellosta, S., Galli, C., 1998. Oleuropein, the bitter principle of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages. *Life Sciences*, **62** (6): 541-546.

- Visioli, F., Poli, A., Gall, C., 2002. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Medicinal Research Reviews*, **22** (1): 65-75.
- Visioli, F., Romani, A., Mulinacci, N., Zarini, S., Conte, D., Vincieri, F. F., Galli, C., 1999. Antioxidant and other biological activities of olive mill waste waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47** (8): 3397-3401.
- Von Sonntag C., 2006. *Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair: A Chemical Perspective*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York. 505.
- Wagle, A., Jivraj, S., Garlock, G. L., Stapleton, S. R., 1998. Insulin regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase gene expression is rapamycin-sensitive and requires phosphatidylinositol 3-kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, **273** (24): 14968-14974.
- Wainstein, J., Ganz, T., Boaz, M., Bar Dayan, Y., Dolev, E., Kerem, Z., Madar, Z., 2012. Olive leaf extract as a hypoglycemic agent in both human diabetic subjects and in rats. *Journal of Medicinal Food*, **15**: (7) 1-6.
- Weinbrenner, T., Fito, M., de la Torre, R., Saez, G. T., Rijken, P., Tormos, C., Coolen, S., Albaladejo, M. F., Abanades, S., Schroder, H., Marrugat, J., Covas, M. I., 2004. Olive oils high in phenolic compounds modulate oxidative/antioxidative status in men. *Journal of Nutrition*, **134**: 2314-2321.
- Westermann, D., Van Linthout, S., Dhayat, S., Dhayat, N., Schmidt, A., Noutsias, M., Song, X. Y., Spillmann, F., Riad, A., Schultheiss, H. P., Tschöpe, C., 2007. Tumor necrosis factor-alpha antagonism protects from myocardial inflammation and fibrosis in experimental diabetic cardiomyopathy. *Basic Research in Cardiology*, **102**: 500-507.
- Whitelaw, B., Gayle, C., 2011. Gestational Diabetes. *Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine*, **21**: 41-46.
- Whiteman, M., Hong, H. S., Jenner, A., Halliwell, B., 2002. Loss of oxidized and chlorinated bases in DNA treated with reactive oxygen species: implications for assessment of oxidative damage in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **294**: 883-889.
- Wolff, SP., 1993. Diabetes Mellitus and free radicals: Free radicals, transition metals and oxidative stress in the etiology of Diabetes Mellitus and complications. *British Medical Bulletin*, **49** (3): 642-652.

- World Health Organization (WHO), Diabetes Mellitus. Report of a WHO study group. Technical Report Series 727, Geneva, 1985.
- Wu, L. L., Chiou, C. C., Chang, P. Y., Wu, J. T., 2004. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clinica Chimica Acta*, **339**: 1-9.
- Xia, E., Rao, G., Remmen, H. V., Heydari A. R., Richardson, A., 1994. Activities of antioxidant enzymes in various tissues of male fischer 344 rats are altered by food restriction. *Journal of Nutrition*, **125**: 195-201.
- Young, I. S., Woodside, J. V., 2001. Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, **54**: 176-186.
- Yue, D. K., Mc Lennan, S., Fisher, E., Heffernan, S., Capogreco, C., Ross, G. R., Turtle, J. R., 1989. Ascorbic acid metabolism and polyol pathway in diabetes. *Diabetes*, **38**: 257-261.
- Zhang, Z., Apse, K., Pang, J., Stanton, R. C., 2000. High glucose inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase via cAMP in aortic endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, **275** (51): 40042-40047.
- Zochodne, D. W., 2007. Diabetes Mellitus and the peripheral nervous system: manifestations and mechanisms. *Muscle Nerve*, **36** (2): 144-166.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Antalya'da doğdu. İlk ve ortaokulu Antalya'da tamamladı. 2003 yılında Antalya Karatay Süper Lisesi'nden mezun oldu. Aynı yıl Gazi Üniversitesi Kastamonu Eğitim Fakültesi Fen Bilgisi Öğretmenliği Bölümünü kazandı. 2005 yılında Süleyman Demirel Üniversitesi'nin aynı bölümüne yatay geçiş yaptı ve 2007 yılında bu bölümden mezun oldu. 2009 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Eğitim Fakültesi İlköğretim Bölümü'nde Arş. Gör olarak çalışmaya başladı. Aynı yılda, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü İlköğretim ABD'nde Lisansüstü eğitimine başladı. Aynı bölümden 2011 yılında yüksek lisans derecesini aldı. Halen Yüzüncü Yıl Üniversitesi Eğitim Fakültesi İlköğretim Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır.