



T. C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**STREPTOZOTOSİN İLE DİABETES MELLİTUS OLUŞTURULAN
RAT PANKREASLARINDA HİDROKSİTİROSOLÜN
NRF2 EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

Nurhilal ELCİYAR
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Meryem ÇAM

Düzce, 2020

Form:6

KABUL VE ONAY

Histoloji ve Embriyoloji Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan
“Streptozotosin İle Diabetes Mellitus Oluşturulan Rat Pankreaslarında Hidroksitirozolün Nrf2
Ekspresyonu Üzerine Etkisinin Araştırılması”

adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 24/01/2020

TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof. Dr. Meryem ÇAM
Düzce Üniversitesi
Başkan



Dr. Öğr. Üyesi Kayıhan KARAÇOR
Düzce Üniversitesi
Üye

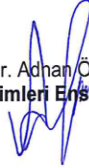


Dr. Öğr. Üyesi Tülin FIRAT
Abant İzzet Baysal Üniversitesi
Üye



Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun 20 / 02 / 2020 tarih ve 2020 / 95 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Adnan ÖZÇETİN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

09.03.2020

Nurhilal ELCİYAR



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca desteklerini esirgemeyen, derslerimden tez yazımına kadar bana yol gösteren, değerli bilgilerini benimle paylaşan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı ve danışman hocam sayın Prof. Dr. Meryem ÇAM'a; histoloji ve embriyoloji alanındaki tecrübelerini aktarıp, bana katkıda bulunan Dr. Öğr. Üyesi hocam sayın Kayıhan KARAÇOR'a; çalışmalarım sırasında farklı bakış açıları ve bilimsel katkılarıyla benden yardımlarını esirgemeyen, her konuda tecrübe ve önerilerinden faydalandığım, beni her zaman çalışmaya teşvik eden Dr. Öğr. Üyesi değerleri hocam Hakan SOYLU'ya şükranlarımı sunarım.

Hayvan deneylerimin yapım aşamasında bana teknik destek sağlayan Düzce Üniversitesi Deneysel Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi müdürü Dr. Öğr. Üyesi Ersin BEYAZÇİÇEK ve personellerine; özellikle deney sırasında karşılaştığım zorlukları aşmamda yardımını esirgemeyen sayın veteriner Ali GÖK hocama çok teşekkür ederim.

Yüksek lisansa başladığımdan beri her anımda yanımda olup manevi desteklerini benden esirgemeyen, çalışmalarına katkıda bulunan, birlikte çok zorlandığımız ama çok da eğlendiğimiz, sevgili arkadaşlarım Defne Rana OĞUZ, Semiha TÜRE ve Nurcan ŞAHAN'a güzel kalpleri için çok teşekkür ederim.

Hayatımın her anında olduğu gibi, bu yoğun tez dönemim süresince de büyük bir özveriyle beni destekleyen, her umutsuz anımda umudum olan ve dualarını benden esirgemeyen annem Saliha ELCİYAR'a; maddi manevi destekleri ve sevgisiyle bugünlere gelmemi sağlayan babam Tamer ELCİYAR'a; hayatıma ayrı bir renk katan kardeşim Oğuzhan ELCİYAR'a sevgi dolu teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, Düzce Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Komisyonu Başkanlığı tarafından DÜ 2019.04.01.907 numaralı proje ile desteklenmiştir

Nurhilal ELCİYAR

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ÖZET	1
ABSTRACT.....	2
1.GİRİŞ ve AMAÇ	3
1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç.....	3
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1.Pankreas.....	6
2.1.1. Pankreas anatomisi.....	6
2.1.2. Pankreas histolojisi.....	9
2.1.3. Pankreas embriyolojisi	13
2.1.4. Pankreas fizyolojisi	15
2.2. Diabetes Mellitus (DM).....	21
2.2.1. Diabetes mellitus'un sınıflandırılması	22
2.2.2. Streptozotosin (STZ) ile oluşturulan deneysel diyabet modelleri.....	25
2.3. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres	27
2.4. Nükleer Faktör Eritroid 2 (NFE2) ile İlişkili Faktör 2 (Nrf2)	31
2.6. Diyabet ve Nrf2	33
2.7. Hidroksitirosol (HT).....	35
2.8. Hidroksitirosol (HT) ve Nrf2.....	38
3. GEREÇ ve YÖNTEM	40
3.1. Deney Hayvanları.....	40
3.2. Deney Grupları	40
3.3. Diyabet Oluşturma Modeli	41
3.4. Hidroksitirosolün Hazırlanması.....	41
3.5. İntraperitoneal Enjeksiyon Uygulaması	42
3.6. Pankreas diseksiyonu.....	42
3.7. Işık Mikroskopik İncelemeler.....	43
3.7.1. Histolojik teknikler.....	45

3.7.2. İmmunohistokimyasal teknikler	46
4. BULGULAR.....	49
4.1. Vücut Ağırlığı ve Su Tüketim Profilleri.....	49
4.2. Kan Glukoz Düzeyleri.....	52
4.3. Histolojik Bulgular	54
4.4. İmmünohistokimyasal Bulgular	57
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	60
6. KAYNAKLAR	66
Dizin Kaynakları	75
EKLER	76
Ek-1/Etik Kurul Kararı	76
ÖZGEÇMİŞ	77

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Pankreas anatomisi genel görünüm	7
Şekil 2. Pankreas Anatomisi	7
Şekil 3. Pankreas genel histolojisi	9
Şekil 4. Pankreasın asinüs yapısı	10
Şekil 5. Pankreasın dış salgı (asinuslar) parçası ve iç salgı (Langerhans adacığı) bölümlerini gösteren mikroskop fotoğrafı	12
Şekil 6. Ventral-dorsal pankreatik tomurcukların oluşumu.....	14
Şekil 7. Ventral-dorsal pankreatik tomurcukların birleşimi.	14
Şekil 8. Proinsülin oluşum şeması	17
Şekil 9. İnsülin reseptörünün şematik görünümü	18
Şekil 10. β hücrelerinden insülin salgılanmasını uyararak glukoz metabolizması.....	19
Şekil 11. Bazal insülin sekresyonu şeması	20
Şekil 12. Bolus insülin sekresyonu şeması	20
Şekil 13. Tip 1 diabetes mellitus oluşum mekanizmasının gösterimi.	24
Şekil 14. Tip 2 diabetes mellitus oluşum mekanizmasının gösterimi	24
Şekil 15. Streptozotosinin kimyasal yapısı.....	25
Şekil 16. Serbest radikal ve reaktiflerin oluşumu	27
Şekil 17. Oksidatif stres oluşumu ve organizmaya verdiği hasarlar.....	28
Şekil 18. Diabetes mellitusta artan oksidatif stres mekanizmaları.	30
Şekil 19. Oksidatif stresin hiperglisemi ile bağlantısı	30
Şekil 20. Nrf2/HO-1 sinyal yolağı mekanizması.....	33
Şekil 21. Keap1-Nrf2 sistemi tarafından pankreas β hücre koruması	35
Şekil 22. Oleuropeinin β -glikozidaz enzimi ile hidrolizi	37
Şekil 23. Pankreas diseksiyonu. Ok ucu pankreas.....	42
Şekil 24. Fomaldehit içinde dokulara uygulanan fiksasyon işlemi	43
Şekil 25. Etüvde parafinle doku gömme işlemi.....	44
Şekil 26. Histolojik kesitler için hazırlanan parafin bloklar.	44
Şekil 27. Işık mikroskopik incelemeler için hazırlanan pankreas doku preparatları.....	48
Şekil 28. Deney hayvanlarının günlere göre ağırlık dağılımları	50
Şekil 29. Deney gruplarının açlık ağırlık dağılımları.	51
Şekil 30. Deney gruplarının haftalara göre su tüketim miktarları	51

Şekil 31. Grupların glukoz değerleri	53
Şekil 32. Grupların günlere göre glukoz değerleri	53
Şekil 33. Grupların 30. gün açlık glukoz değerleri.....	54
Şekil 34. Sıçanlarda STZ ile indüklenen diyabette HT'nin pankreas üzerine etkisi	55
Şekil 35. Sıçanlarda STZ ile indüklenen diyabette HT'nin pankreas üzerine etkisi.	56
Şekil 36. Deney gruplarının pankreas dokularında Nrf2 ekspresyonunun immüno histokimyasal fotomikrografları.	58
Şekil 37. HT uygulamasının Nrf2 ekspresyonu üzerindeki etkisi.....	59
Şekil 38. HT uygulamasının Nrf2 ekspresyonu üzerine hücresel oranı.	59



ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo 1. İnsan Langerhans adacıklarında bulunan hücre tipleri	11
Tablo 2. STZ ile deneysel diyabet oluşturma modelleri	26
Tablo 3. Diyabetik rat modeli, deney grupları, maddeler ve veriliş yolları	41
Tablo 4. Deney gruplarının ağırlık dağılımları	50
Tablo 5. Deney gruplarının kan glukoz değerleri	52



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ADA	:	Amerikan Diyabet Birliği
AP1	:	Aktive edici protein 1
ARE	:	Antioksidan yanıt elemanı
ATPaz	:	Adenozin trifosfataz
Ca⁺	:	Katalaz
cDNA	:	Komplementer (tamamlayıcı) DNA
Cl⁻	:	Clor
DEM	:	Dietil meleat
dL	:	Desilitre
DM	:	Diabetes Mellitus
ECHD	:	CNC homolojisine sahip eritroid hücre kaynaklı protein
EFSA	:	Avrupa Gıda Güvenliđi Kurumu
ER	:	Endoplazmik retikulum
EVOO	:	Sızma zeytinyağı
GDM	:	Gestasyonel Diabetes Mellitus
GLUT	:	Glukoz taşıyıcı
GLUT2	:	Glukoz taşıyıcı 2
GPxs	:	Glutasyon-peroksidaz
GSH	:	Glutasyon
GSIS	:	Glukoz uyarımlı insülin sekresyonu
GST	:	Glutasyon S-Transferaz
H⁺	:	Hidrojen
HCO₃⁻	:	Bikarbonat
HE	:	Hematoksilen-Eozin
HO-1	:	Hemeoksigenaz-1
HT	:	Hidroksitirosol
IRS	:	İnsülin reseptör substratları

iHC	:	İmmünohistokimya
iNOS	:	İndüklenebilir NO sentaz
ip	:	İntraperitoneal
K_{ATP}	:	ATP'ye duyarlı potasyum kanalı
Keap1	:	Kelch benzeri ECH ile ilişkili protein 1
LA	:	Langerhans adası
Maf	:	Muskulonörotik Fibrosarkom
MafF, MafG, MafK	:	Maf proteinleri
MSS	:	Merkezi sinir sistemi
Na⁺	:	Sodyum
Nad(P)H	:	Nikotinamid Adenin Dinükleik Fosfat
Nad(P)H NQO1	:	Nad(P)H Kinon Dehidrogenaz-1
NadH	:	Nikotinamid Adenin Dinükleosid
Neh	:	Nrf2-ECH homolojisi
NF- E2	:	Nükleer faktör eritroid 2
NF-κB	:	Nükleer faktör Kabba B
NIH	:	Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü
NO	:	Nitrik Oksit
Nrf2	:	Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör
O₂⁻	:	Süperoksit
OH	:	Hidroksil
ONOO⁻	:	Peroksinitrit
OS	:	Oksidatif stres
PDA	:	Pankreatikoduodenal arter
PP	:	Pankreatik Polipeptid
RNS	:	Reaktif azot türleri
ROS	:	Reaktif oksijen türleri
Rrdx	:	Peroksiredoksin
RS	:	Reaktif tür

sMaf	:	Küçük muskulonörotik fibrosarkom
SMA	:	Süperior Mezenterik arter
SOD	:	Süperoksit dismutaz
SOR	:	Serbest oksijen radikalleri
SR	:	Serbest radikal
STZ	:	Streptozotosin
T1DM	:	Tip 1 Diabetes Mellitus
T2DM	:	Tip 2 Diabetes Mellitus
U	:	Ünite
UPR	:	Katlatmamış protein tepkisi
VOO	:	Naturel birinci zeytinyağı
WHO	:	Dünya Sağlık Örgütü
µm	:	Mikrometre
µU	:	Mikroünite
ε	:	Epsilon
α	:	Alfa
β	:	Beta
γ	:	Gama
δ	:	Delta

ÖZET

STREPTOZOTOSİN İLE DİABETES MELLİTUS OLUŞTURULAN RAT PANKREASLARINDA HİDROKSİTIROSOLÜN NRF2 EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ

Nurhilal ELCİYAR

Yüksek Lisans Tezi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı Prof. Dr. Meryem ÇAM

Ocak 2020, 78 sayfa

Tip1 diabetes mellitus, Langerhans adacıklarında bulunan ve insülin üreten β hücrelerinin yıkımı sonucunda insülin üretme yeteneğini kaybettiği kronik bir hastalıktır. Bu çalışmanın amacı, streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş rat pankreas dokularında hidroksitirosolün, antioksidan metabolizmanın önemli proteinlerinden olan Nrf2'nin ekspresyonu üzerindeki etkisini belirlemektir. Hidroksitirosol, zeytin ve zeytinyağında bulunan oleuropeinin, başlıca parçalanma ürünü olan doğal-güçlü fenolik bir antioksidandır. Deneyde kullanılan hayvanlar kontrol, HT, STZ ve STZ+HT olmak üzere rasgele 4 gruba ayrıldı. Diyabet, intraperitoneal olarak tek doz (55 mg/kg) STZ enjeksiyonuyla indüklendi. STZ enjeksiyonundan 48 saat sonra kan glukoz değerleri ölçülerek ≥ 250 mg/dL olanlar diyabetik kabul edildi. HT ve STZ+HT grubuna 30 gün boyunca intraperitoneal olarak HT (10 mg/kg/gün) enjeksiyonu uygulandı. STZ grubu hayvanlarda yüksek kan şekere ek olarak vücut ağırlığında azalma, polifaji ve polidipsi gözlemlendi. STZ+HT grubu hayvanlarda istatistiksel olarak anlamlı olmayan kilo kaybıyla birlikte STZ grubuna oranla daha az su tüketimine rastlandı. STZ+HT grubu ratlar diyabetikti ancak kan glukoz düzeyleri anlamlı olmasa da bir miktar azaldı. Histolojik incelemelerde kontrol grubu adacık histolojisi, iyi biçimlendirilmiş; yuvarlak şekil, büyük boyut ve normal yapı sergilerken, diyabetik ratlar belirgin şekilde düzensiz ada sınırı ve adacık dejenerasyonu gösterdi. Diyabetik ratlarda hidropik dejenerasyon ile uyumlu olarak sitoplazmada berrak vakuollere sahip adacık hücreleri görülürken HT ile muamele edilen diyabetiklerde azalan tahribat gözlemlendi. İmmünohistokimyasal çalışmalar sonucunda HT ile muamele edilen diyabetik hayvanlarda Nrf2 ekspresyonunun STZ grubundakilere kıyasla daha az olduğu belirlendi. Bu STZ'nin, β hücrelerine zarar vermesine karşı, HT'nin koruyucu etkisi olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, Nrf2 ekspresyonunun, STZ'nin indüklediği T1DM'nin önlenmesinde HT'nin koruyucu ve antioksidan rolü olduğunu gösterdi.

Anahtar sözcükler: diyabet, hidroksitirosol, Nrf2, pankreas, streptozotosin.

ABSTRACT

EFFECT OF HYDROXYTYROSOL ON NRF2 EXPRESSION IN RAT PANCREASES WITH STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES MELLITUS

Nurhilal ELCİYAR

Master Thesis. Department of Histology and Embryology

Supervisor Prof. Dr. Meryem CAM

January 2020, 78 pages

Type 1 diabetes mellitus is a chronic disease in the islets of Langerhans, where it loses its ability to produce insulin as a result of the destruction of insulin-producing β cells. The aim of this study is to determine the expression changes of Nrf2, one of the important proteins of antioxidant metabolism, in the rat pancreas where diabetes was induced by streptozotocin. Hydroxytyrosol is a natural-strong phenolic antioxidant found in olive and olive oil, the major degradation product of oleuropein. The animals used in the experiment were randomly divided into 4 groups as control, HT, STZ and STZ+HT. Diabetes was induced intraperitoneally by single dose (55 mg/kg) streptozotocin injection. Blood glucose values were measured 48 hours after STZ injection and those with ≥ 250 mg/dL were considered diabetic. HT (10 mg/kg/day) injection was administered intraperitoneally to HT and STZ+HT groups for 30 days. In addition to high blood sugar, STZ group animals showed a decrease in body weight, polyphagia and polydipsia. These effects were not found in the control and HT groups. In the STZ+HT group, less water consumption was observed in the animals compared to the STZ group with non-statistically significant weight loss. STZ+HT group rats were diabetic but their blood glucose levels decreased slightly although not significant. Histological examination of the islet histology of the control group, well-formed; diabetic rats showed markedly irregular island border and islet degeneration, while the round shape exhibited large size and normal structure. Diabetic rats showed islet cells with clear vacuoles in the cytoplasm consistent with hydropic degeneration, whereas decreased damage was observed in HT-treated diabetics. As a result of immunohistochemical studies, it was determined that Nrf2 expression was lower in HT treated diabetic animals compared to STZ group. This indicates that STZ has a protective effect of HT against damage to β cells. As a result, demonstrated that Nrf2 expression had a protective and antioxidant role of HT in the prevention of STZ-induced T1DM.

Keywords: diabetes mellitus, hydroxytyrosol, Nrf2, pancreas, streptozotocin.

1.GİRİŞ ve AMAÇ

1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç

En iyi bilinen endokrin hastalıklardan olan diabetes mellitus (DM), reseptör hücrelerin insüline cevap vermemesinden veya insülin yetersizliğinden kaynaklanır. Farklı nedenlere bağlı olarak diyabet 4 gruba ayrılmaktadır. Bunlar tip 1 diabetes mellitus (insüline bağlı şeker hastalığı-T1DM), tip 2 diabetes mellitus (insüline bağlı olmayan şeker hastalığı-T2DM), diyabetin diğer spesifik tipleri ve gestasyonel diyabet olarak adlandırılır^{1,2}.

İnsanlarda meydana gelen Tip 1 diyabet, pankreasta bulunan ve insülin üreten β hücrelerinin otoimmün ve oksidatif strese (OS) bağlı bir süreç sonunda hasara uğraması sonrasında ortaya çıkmaktadır ve sonuç olarak hastalar, β hücrelerindeki hasara bağlı olarak değişen düzeylerde dışarıdan insülin hormonu desteğine ihtiyaç duymaktadırlar¹. Bu otoimmün bozukluk, genellikle çocukluk çağında birden ortaya çıkmakta ve bireyin insülin üretme yetisini ortadan kaldırmaktadır³.

Tip 2 diyabet ise çeşitli nedenlerden dolayı insüline duyarsızlığın azalması sonucunda oluşmaktadır. Genellikle 40 yaşından sonra görülme sıklığı artar. Diyabet hastalarının yüzde 90'dan fazlası Tip 2 olup, genellikle uygun diyet ve egzersizle kan glukozlarını dengede tutabilmektedirler¹.

Sonuç olarak diyabet, kanda yüksek glukoz ile karşımıza çıkar ve glukoz seviyesi o kadar yükselir ki, böbrekler glukozu atmaya başlar. Böylece poliüri gelişir. Diyabet tanısında idrarda glukoz araştırılmasının nedeni budur⁴. İdrar glukozu arttıkça, idrar miktarı ve su tüketimi de yüksek seviyelere ulaşır. Diyabette, vücut hücreleri, temel enerji maddesi olan glukozu kullanamazlar, bu yüzden yağları hücre solunumunda bir enerji kaynağı olarak kullanmak zorundadırlar¹. Hastalığın ileri aşamalarında yağların yıkımından gelen asidik (keton) ürünlerin kanda birikmesi, yaşamı tehlikeye düşürecek oranda düşük kan pH'sına yol açmaktadır¹. Diyabetik hastalar farklı şekillerde risk altındadır: ciltteki sinirlerin hasar görmesi nedeniyle sinir uçlarına kan dolaşımının yetersiz olması sinir rahatsızlıklarına, ağrıya ve uyuşmaya neden olabilir³.

Hidroksitirosol (HT); zeytin ve zeytinyağında bulunan, oleuropeinin başlıca parçalanma ürünü olan doğal-güçlü fenolik bir antioksidandır. HT antioksidan rolünü; serbest radikalleri doğrudan yakalayarak ya da antioksidan enzimlerle birleştirilmiş bir dizi tepkime aracılığıyla onları parçalayarak ortaya koymaktadır⁵.

Pankreasın sürekli sekretuar aktivitesi ve endojen antioksidan potansiyelinin olmaması nedeniyle β hücreleri serbest radikallere, endoplazmik retikulum (ER) hiperaktivitesine ve hasarlı mitokondriden kaynaklanan çeşitli stres türlerine kronik olarak maruz kalmaktadır⁶.

Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör (Nrf2), faz II metabolik ve antioksidan enzimler olmak üzere çeşitli genlerin ekspresyonunu düzenleyen ve dolayısıyla diyabet dahil olmak üzere oksidatif stres aracılı bozuklukların önlenmesinde önemli bir rol oynadığı için antioksidan yanıtın bir "ana düzenleyicisi" olarak kabul edilir⁷.

Daha önce yapılan çalışmalarla çeşitli dokularda HT'nin, Nrf2 ekspresyonunu etkilediği gösterilmiştir⁸ ancak HT ile muamele edilen diyabetik pankreastaki Nrf2 ekspresyonu değişimi doku düzeyinde araştırılmamış ve araştırılmayı bekleyen orijinal bir konudur.

Yukarıda verilen bilgiler doğrultusunda bu çalışmanın hipotezi;

Streptozotosin ile indüklenmiş diyabetik rat modeline hidroksitirosolün uygulanması, antioksidatif bir protein olan Nrf2 ekspresyonunu artırarak Langerhans adacıkları β hücrelerinde oluşan oksidatif stresi azaltır ve hücrelerin fonksiyon kaybını engeller.

Yukarıda verilen hipotez doğrultusunda bu çalışmanın amaçları, streptozotosin (STZ) indüklü diyabet rat modelinde;

- Hidroksitirosol uygulaması ile eş zamanlı olarak kan glukoz seviyesinin değerlendirilmesi,
- Hidroksitirosol uygulaması sonrasında pankreasın Langerhans adacıklarında antioksidatif cevabı düzenleyen genlerin transkripsiyonunu sağlayan Nrf2 proteininin doku düzeyinde immünohistokimyasal (İHC) olarak ekspresyon değişikliğinin araştırılmasıdır.

Bu çalışma ile aşağıdaki çıktılara ulaşılacaktır;

1. Hidroksitirosol uygulamasının, pankreasın Langerhans adacıklarında Nrf2 protein ekspresyonu üzerine etkisi ilk defa gösterilmiş olacaktır.
2. Diyabetik ratlara hidroksitirosol uygulaması sonrasında pankreasın Langerhans adacıklarında Nrf2 ekspresyonu ilk defa immünohistokimyasal olarak değerlendirilecektir.



2. GENEL BİLGİLER

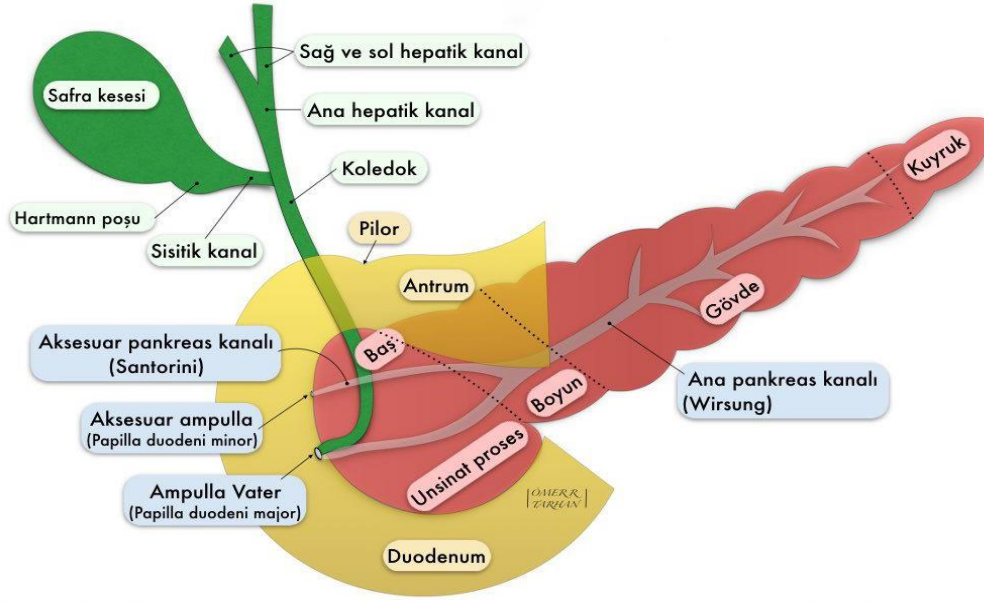
2.1.Pankreas

2.1.1. Pankreas anatomisi

Pankreas karın boşluğunun arka duvarında, duodenum ile dalak arasında uzanan; yumuşak, gri-pembe renkli ve çok sayıda lobdan oluşan retroperitoneal bir organdır⁹. Yetişkin bir insan pankreasının ortalama hacmi 72 cm³'tür (parankim; 44 cm³, yağ; 28 cm³)¹⁰, uzunluğu 12-20 cm, boyu 3-5 cm, genişliği 1-3 cm¹¹ ve ağırlığı 50-100 gram aralığındadır¹². Pankreasın şekli uzatılmış bir kanca veya çekice benzer. Makroskopik olarak caput (baş), collum (boyun), corpus (gövde) ve cauda (kuyruk) pankreatis olmak üzere 4 kısma ayrılabilir¹¹. Bu parçalar arasında kesin bir sınır yoktur¹² (Şekil 1.). Caput pankreas ön ve arkadan basık, C şeklinde bir parçadır ve duodenum kavisi içinde yer alır. Üst kısmı duodenum başı ile komşu iken diğer kısımları duodenumun önü ve arkasında kalır¹³. Collum pankreas yaklaşık 2 cm uzunluğundadır. Caput pankreas ile başlar ve sola, ön ve yukarı doğru uzanır ve corpus pankreasa bağlanır. Üst mezenterik damarların yanındadır. Periton ile kaplı ön yüz pilorun bitişiğindedir. Corpus pankreas üçgen prizma gibi görünür. Mide arka duvarının arkasında uzanır. Facias inferior, anterior ve posterior olmak üzere 3 yüzü; margo anterior, superior ve inferior olmak üzere de 3 kenarı vardır⁹. Cauda pankreas oldukça dardır ve dalak hilumuna uzanır¹³.

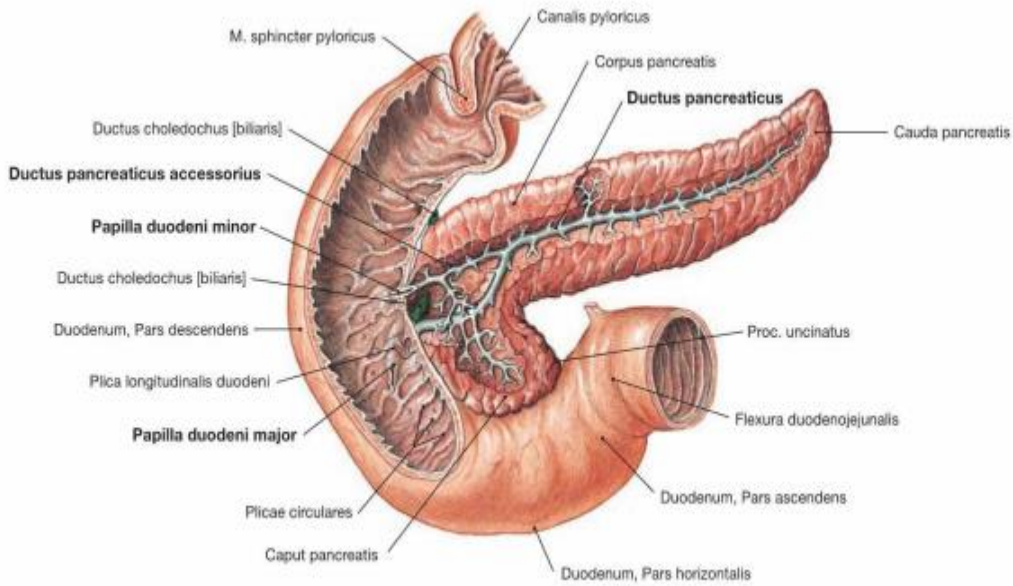
Pankreas yoğun bir kılcıl damar ağı tarafından ve endokrin hücreleri ekzokrin bileşeninden ayıran ince bir kollajen kapsül ile çevrilidir¹⁴. Pankreasın en önemli anatomik duktal yapıları;

1. Ana pankreas kanalı (Wirsung kanalı),
2. Vater'in papilla/majör papilla (Wirsung kanalının duodenuma açıldığı yerdeki kabarıklığıdır ve Ampulla Vater'i içerir.),
3. Aksesuar pankreas kanalı (Santorini kanalı) ve
4. Minör papilla (Santorini kanalının duodenuma açıldığı yerdeki kabarıklığıdır.)¹⁵.



Şekil 1. Pankreas anatomisi genel görünüm. ⁽¹⁾

Wirsung kanalı, cauda pankreastaki küçük lobüler kanalların birleşmesi ile oluşur¹². Bezin arka yüzü boyunca uzanır ve ortak safra kanalına bağlanır¹⁶. Bu birliğe hepatopankreatik ampulla (Vater'in ampullası) adı verilir ve ana duodenal papillada bulunur¹¹. Bir varyasyon olarak, insan pankreasının, bezin gelişimi sırasında mevcut olan dorsal pankreasın ana kanalının bağımsız bir distal bir parçası olan ve Santorini kanalı olarak da adlandırılan bir aksesuar kanalı oluşturabilir¹⁷. Bu kanal en sık minör duodenal papilla yoluyla duodenuma ya da vakaların % 30'unda ana pankreas kanalına akar⁹ (Şekil 2.).



Şekil 2. Pankreas Anatomisi. ⁽²⁾

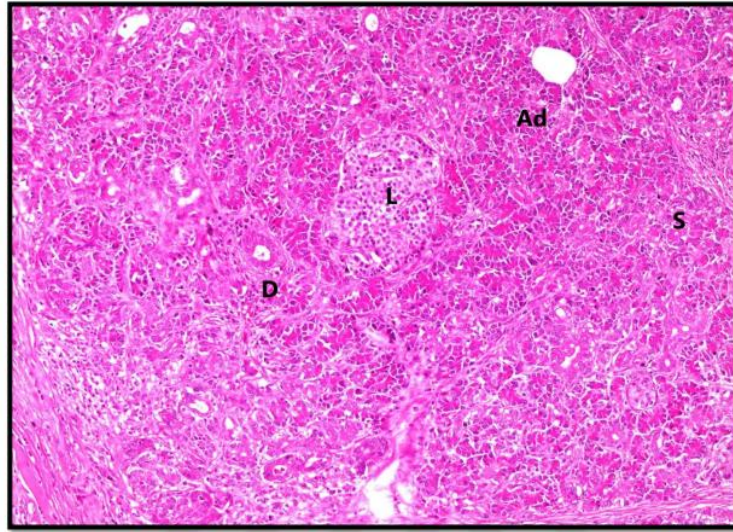
Pankreas kardiyak çıktının yaklaşık % 1'ini alır¹⁸. Pankreasın arter kanı, abdominal aortun 3 ana dalının ilk 2'sinden elde edilir: çölyak ve superior mezenterik arter (SMA). Pankreas başı 2 dal ile beslenir: bir anterior ve bir posterior¹². Anterior dal, çölyak arterin en sağ kolu olan ortak hepatik arterin bir dalı (gastroduodenal arter yoluyla) olan anterior superior pankreatikoduodenal arter (PDA) tarafından oluşturulur¹⁹. Anterior superior PDA, splenik arterin pankreas dalları ile anastomoz yapar. Posterior dal, gastroduodenal arterin en proksimal dalı olan posterior superior PDA tarafından oluşturulur. Anterior ve posterior superior PDA, her ikisi de SMA'dan kaynaklanan anterior ve posterior inferior PDA ile anastomoz yapar¹². Pankreasın venöz sistemi kanı portal vene boşaltır²⁰. Genel olarak, splenik ven kanı çok sayıda küçük gruptan toplar²¹. Venöz sistemde, arteriyel sistemdekinden tipik olarak daha düzensiz olan sayısız anastomoz vardır¹³.

Büyük lenfatik damarlar lenfleri bölgesel lenf düğümlerine taşır. Her biri karşılık gelen bir kan damarı grubuyla ilişkili 7 ana lenf damarı grubu vardır: superior damarlar, inferior damarlar, anterosuperior, anteroinferior, posterosuperior, posteroinferior pancreaticoduodenal damarlar ve gastroduodenal damarlar²². Pankreasın lenf düğümleri 2 ana grupta düzenlenir. İlk düğüm grubu yaklaşık olarak bezin dış çizgisi boyunca uzanır. Aort solunda, splenik hilusun (10) içinde ve üstünde yer alan splenik ve gastrosplenik düğümler ile splenik ve inferior pankreas arteri boyunca uzanan suprapankreatik (11) ve infrapancreatik (18) düğümler bulunur. Bu düğümler vücuttan ve pankreasın kuyruğundan lenf alır. İkinci ana düğüm grubu, abdominal aort ve gövdeleri, paraaortik (16), çölyak (9), superior mezenterik (14) ve orta kolik düğümlerle (15) ilişkilidir. Sonunda tüm lenfler sisterna şili ve torasik kanal yoluyla sol subklavyen vene boşalır¹².

Pankreas, sempatik, parasempatik ve afferent lifler tarafından innerve edilir¹². Sinir lifleri nörovasküler olarak pankreasın içine girer veya çıkar. Pankreas dokusu içinde bulunan kan damarlarını takip eder, kapillerlere ve endokrin hücrelere yakın biter/başlar²³. Hedef hücrelerle klasik sinapslar oluşturmazlar, ancak bir seferde birden fazla hedefi etkiledikleri ve nörotransmitterleri hücre dışı alana bıraktıkları salınım bölgelerine sahiptirler²⁴. Parasempatik sinir lifleri bezin salgısını artırırken, sempatik sinir lifleri tam tersi etki eder¹².

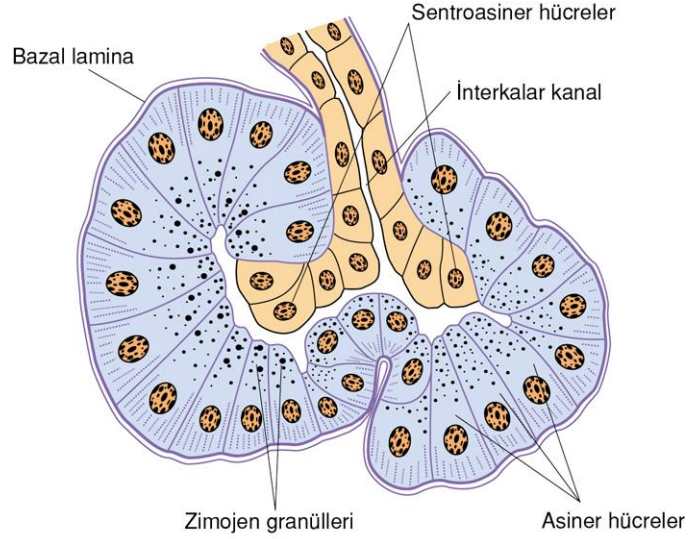
2.1.2. Pankreas histolojisi

Pankreas, metabolizma ve enerji kullanımını işlevinde merkezi role sahiptir. İşlevsel ve morfolojik olarak iki ayrı bileşenden oluşur: ekzokrin pankreas (asiner ve duktal hücreler) ve endokrin pankreas (Langerhans adacıkları) (Şekil 3.). Ekzokrin asiner hücreler; yağ, protein ve karbonhidratları parçalama özelliğine sahip (lipaz, proteinaz ve amilazlar) bir dizi sindirim enzimi üretir (günde yaklaşık 1200-1500 ml) ve pankreas kanallarına salgılar²⁵. Enzim üreten ekzokrin hücreler, konik biçimdedir ve merkezi bir lümen etrafında düzenlenerek asinus oluştururlar¹¹. Pankreas lobüllerinin her biri asinüslerden oluşur¹². Her bir asinüste iki hücre tipi mevcuttur: ilki pankreasın asıl hücreleri olan asiner hücreler, ikincisi ise doğrudan kanallarla ilişki olan sentro asiner hücrelerdir (Şekil 4.). Asinüs oluşturan hücrelerin çekirdekleri yuvarlak ve bazal sitoplazmaya yakın yerleşim gösterir. Hücrelerin apikal sitoplazması pankreatik enzim öncüllerini içeren zimmojen granüllerle doludur ve asidofil boyanır. Bazal kısım ise bazofiliktir bunun sebebi gER ve serbest ribozomların bol miktarda bulunmasıdır²⁶.



Şekil 3. Pankreas genel histolojisi (MÜTF B-3741-16, H&E, 100X) D: İnterlobüler duktus, Ad: Adiposit, L: Langerhans adacığı, S: Septa.⁽³⁾

Bir asinus, seröz özellikteki asiner hücrelerin enzimlerini apikal kutuplarından interkalar kanal adı verilen lümene salgılar¹². Bu interkalar kanallar asinusu interlobüler kanallara akan, intralobüler kanallara bağlar. Bu kanal sisteminin proksimal kısmı basit yassı epitel ile; distal kısım basit kübik epitel ile kaplıdır. Daha büyük interlobüler kanallar ve ana kanallar ise silindirik epitel ile döşelidir²⁵.



Şekil 4. Pankreasın asinüs yapısı.⁽⁴⁾

Sindirim enzimlerine ek olarak asinus kanallarının epitel hücreleri su ve midede bulunan asidik kimusu nötrale eden bikarbonat iyonları salgılar. Bunlar Wirsung kanalı tarafından duodenuma boşaltılır. Pankreasın salgıları hem hormonlar hem de vagal stimülasyon (parasempatik nervus vagus stimülasyonu) ile kontrol edilir²⁶. Parasempatik vagal sinir uçlarından ve enterik sinir sistemindeki diğer kolinerjik sinirlerden salgılanan asetilkolin sinirsel; duodenal mukozanın enteroendokrin hücrelerinin salgıladığı sekretin ve kolesistokinin ise hormonal regülasyonda rol oynar. Asetilkolin ve kolesistokinin, sindirim enzimlerinin salgılanmasını artırırken sekretin nötrleştirilmiş sıvının (bikarbonat iyonları ve su) salgılanmasına yol açar²⁷.

Endokrin pankreas, ekzokrin parankimde düzensiz dağılmış hücre düzeneklerine sahip Langerhans adacıklarından (LA) oluşur. Bu adacıklar genellikle küresel, soluk renkli, değişken büyüklükte epitel hücre kordonlarından oluşur. Kordonlar arasındaki zengin kılcal damar ağı, adacıklara özgü bir dolaşım oluşturur²⁸. Adacıklar en az beş tür hormon üreten, beş hücre tipinden oluşur: alfa (α) hücreleri glukagon, beta (β) hücreleri insülin, delta (δ) hücreleri somatostatin, PP (gama- γ) hücreleri pankreatik polipeptid ve epsilon (ϵ) hücreleri de grelin salgılar. Salgılanan hormonlar kan dolaşımı yoluyla kendi hedef organlarına ve dokularına taşınır¹¹ (Tablo 1.).

Tablo 1. İnsan Langerhans adacıklarında bulunan hücre tipleri. ⁽⁴⁾

Hücre Tipi	Miktar	Pozisyon	Üretilen Hormon	Hormonal İşlev
A	~%20	Genellikle	Glukagon	Glikojenoliz ve lipoliz yoluyla periferde elde edilen enerjinin glikojen ve yağ içinde depolanmasını sağlamak üzere çeşitli dokular üzerinde etki gösterir; kan glikoz içeriğini artırır
B	~%70	Merkezi bölge	İnsülin	Glikozun hücrelere girişini sağlamak üzere çeşitli dokular üzerinde etki gösterir ve kan glikoz içeriğinin azalmasını koşullar
D	<%5	Değişken	Somatostatin	Lokal parakrin etki ile diğer adacık hücre hormonlarının salıverilmesini inhibe eder
F	Nadir	Değişken	Pankreatik polipeptid	Yeterli yayın bulunmamaktadır

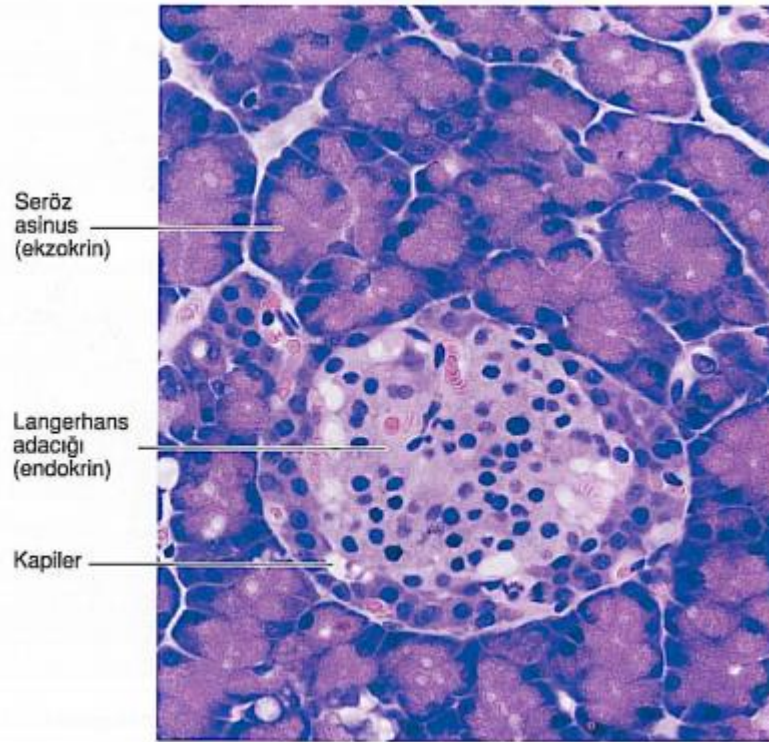
⁴⁾Langerhans adacıkları kan glikozunu arttıran ya da azaltan hormonları salgılayan çeşitli hücre tipleri içermektedir. Bu düzenek, vücut homeostazında önemli bir faktör olan kan glikoz derişimini net olarak kontrol etmektedir.

Rutin histolojik yöntemlerle pankreastaki adacıklar asiner kısımdan kolayca ayırt edilebilir, ancak adacığı oluşturan hücreleri birbirinden ayırmak çok zordur. Spesifik histolojik boyama prosedürleri veya hücreye özgü immünohistokimyasal yöntemler, hücreleri ayırt etmek için kullanılır ²⁶. Küçük endokrin hücrelerinin kümeleri ilk olarak Langerhans (1869) tarafından tarif edilmiştir:

- **α hücreleri:** adacık hücre popülasyonunun %15-20'sini oluşturan ve periferde lokalize olan polihedral hücrelerdir. Elektron mikroskop altında çekirdek yuvarlak ve çekirdek membranı kıvrımlı görünmektedir. Salgılayıcı granüllerin çapı yaklaşık 250 nm'dir ve elektron yoğun bir merkez ve küçük bir halo içerir. Düşük kan glukozuna karşılık glukagon üretmektedir ^{26,28}.
- **β hücreleri:** popülasyonun yaklaşık %70'ini oluşturan poligonal ve merkezi yerleşimli hücrelerdir. Salgı granülleri ortalama 300 nm çapa sahiptir ve kristalin merkez ile onu çevreleyen bir zar içerir. Granüler membran ve çekirdek arasındaki alan çok geniş olduğundan, β hücreleri adacıktaki diğer hücrelerden kolayca ayırt edilebilir. Artan kan glukozuna cevap olarak insülin salgılayarak kan glukozunu düşürür ^{28,29}.
- **δ hücreleri:** popülasyonun %5-10'unu oluşturan düzensiz şekilli, oval çekirdeğe sahip ve genellikle α hücre çevresinde bulunan hücrelerdir. Salgı granülleri ortalama 325 nm çapa sahiptir ve diğer adacık hücrelerine göre daha az elektron yoğun bir merkez içerir. α , β ve γ hücrelerinden; glukagon, insülin ve PP salgılanmasını inhibe eden somatostatin hormonu δ hücrelerinden salgılanır ^{26,28}.

- **γ hücreleri:** Nadir bulunan polihedral ve yassılaşılmış şekilli, oval çekirdeğe sahip hücrelerdir. Salgı granülleri ortalama 200 nm çapa sahiptir ve granül ile membran arasında parlak ve dar bir alan vardır. Salgısı olan pankreatik polipeptid (PP), pankreas enzimleri ile alkali salgıyı inhibe eder^{26,28}.

Bugün pankreasın endokrin kısmına geleneksel olarak Langerhans adacığı denir³⁰. Adacıkların çoğu küreseldir; ancak, düz veya uzun şekilli de olabilirler. Çapları 50 ila 500 µm arasındadır ve 100-200 µm ölçülerindeki adacıklar hacmin büyüklüğüne katkıda bulunur³¹. En fazla sayıda adacık corpus ve cauda da bulunabilir. Bir insanın pankreasında yaklaşık 1-2 milyon adacık vardır ve bu da pankreas kütlesinin% 1-2'sini oluşturur (Şekil 5.)³². Adacıklara ek olarak tek bir hücre/küçük bir adacık hücresi grubu, çoğunlukla duktal epitelde olmak üzere ekzokrin doku içinde rastgele dağılmış olarak bulunabilir³⁰. Adacık kollajen liflerle ekzokrin pankreastan ayrılır¹⁴. Adacıklar boyunca bulunan diğer hücreler perisitler, makrofajlar ve dendritik hücrelerdir¹².



Şekil 5. Pankreasın dış salgı (asinuslar) parçası ve iç salgı (Langerhans adacığı) bölümlerini gösteren mikroskop fotoğrafı. Asinuslarda bazofilik sitoplazmalı salgı hücreleri bulunur. Adacıkta farklı tiplerde iç salgı yapan hücreler görülür. PT boyası. Orta büyütme. ⁽⁴⁾

Langerhans adacıklarında bulunan hücre tipleri arasındaki yakın ilişkiler hücreden hücreye haberleşmeye ve bazı hormonların salgılanmasının diğer hormonlar tarafından doğrudan kontrol edilmesine izin verir²⁷. İnsülin ve glukagon, yoğun bir adacık içi damar ağı yoluyla doğrudan kan dolaşımına salınır ve kan glukoz seviyelerinin düzenlenmesinde önemli rol oynar³³.

2.1.3. Pankreas embriyolojisi

Anterior intestinin kaudal kısmından kaynaklanan endodermal hücreler gelişimin 4. haftasında pankreasın dorsal ve ventral tomurcuklarını oluşturur¹¹. Dorsal pankreas tomurcuğu daha erken belirerek dorsal mezenterin içinde hızla büyürken, ventral pankreas tomurcuğu ise ortak safra kanalının duodenuma girdiği bölge yakınında gelişir ve ventral mezenterin içinde hızla büyür. Dorsal tomurcuk daha büyüktür ve ventral tomurcuktan daha yukarıda yer alır⁹ (Şekil 6.).

Mide ve duodenumun embriyogenez sırasında dönüşü ventral tomurcuğun dorsale doğru ve embriyonun sağdan sola doğru kaymasına neden olur. Sonunda ventral tomurcuk dorsal tomurcuğunun alt arkasına yerleşir. Ventral tomurcuktan başın inferioru ve unsinat proses gelişirken; dorsal tomurcuktan cauda, corpus ve başın anterior kısmı oluşur³⁴. Daha sonra 7. gebelik haftasında, iki tomurcuk sıkıca kaynaşır³⁵. Duodenal segmentteki dorsal tomurcuğun kanalının bir kısmı atrofiye maruz kalırken, kanalın geri kalan kısmı, ventral tomurcuk kanalı ile birleşerek ana duodenal papillaya açılan ana pankreas kanalını (Wirsung kanalı) oluşturur. Dorsal tomurcuk kanalının duodenal segmenti gerilemediğinde, minor duodenal papilla yoluyla duodenuma açılan aksesuar pankreas kanalı (Santorini kanalı) adı verilen kısa bir kanal oluşur¹¹ (Şekil 7.).

Gebeliğin ikinci ve üçüncü ayında, pankreas parankimi farklılaşır¹¹. Ana pankreas kanallarından sekonder kanallar, bunlardan da pankreas lobüllerini drene eden küçük kanallar meydana gelir. Gebeliğin üçüncü ayında, bez; endokrin ve ekzokrin bölümlerine ayrılır. Örgütlenmiş küçük hücre grupları pankreas kanallarından ayrık durur³⁶. Ardından, yoğun kılcal damarlar ve bağ dokusu gelecekteki Langerhans adacıklarını oluşturan hücreleri çevreler¹¹. Adacıklar, ventral pankreas tomurcuğundan çıkan kısımda, özellikle de corpus ve caudada bulunur³⁷.

Fetal pankreasta, bu hücre popülasyonu 11 ila 13. hafta arasında en büyüktür ve insülin ve/veya glukagon üretebilen pankreas hücrelerinin yaklaşık % 30'unu içerir⁴⁰. Yetişkin pankreasta, her iki hormonu aynı anda üretebilen hücre popülasyonu % 2'den azdır⁴¹.

2.1.4. Pankreas fizyolojisi

Pankreas, endokrin ve ekzokrin fonksiyonu olan bir bezdir ve genel vücut homeostazı için kilit bir role sahiptir. İncelendiğinde, Langerhans adacıkları, hiperglisemiye cevap olarak insülin sekresyonundan sorumludur, bu nedenle glukoz homeostazisine katkıda bulunur⁴². Ekzokrin pankreas (asiner ve duktal hücreler) ise besin sindiriminde görevli su, iyon ve enzimlerden oluşan pankreatik sıvının salgılanmasını sağlar⁴³.

İnsan ekzokrin pankreasının asiner-duktal fonksiyonel üniteleri, normal sindirim prosesi için gerekli olan bikarbonat ve sindirim enzimleri bakımından zengin bir çözelti salgılar (yaklaşık 2 litre/gün)⁴⁴. Genel olarak asiner hücrelerin salgıları Na^+ , Cl^- ve H^+ 'dan zengin fakat az miktarda sıvı iken⁴⁵, duktal hücreler büyük miktarda sıvı ile birlikte esas olarak Cl^- ve HCO_3^- salgırlar. Bu alkalın ve enzim yönünden zengin pankreas sıvısı, daha sonra bikarbonat iyonlarının, mideden giren asidik kimusu nötralize edeceği ve pankreas enzimlerinin aktive olacağı duodenuma salgılanır⁴⁶. Bu karmaşık fizyolojik işlem, gıdanın normal fizyolojik sindirimini sağlar⁴⁴.

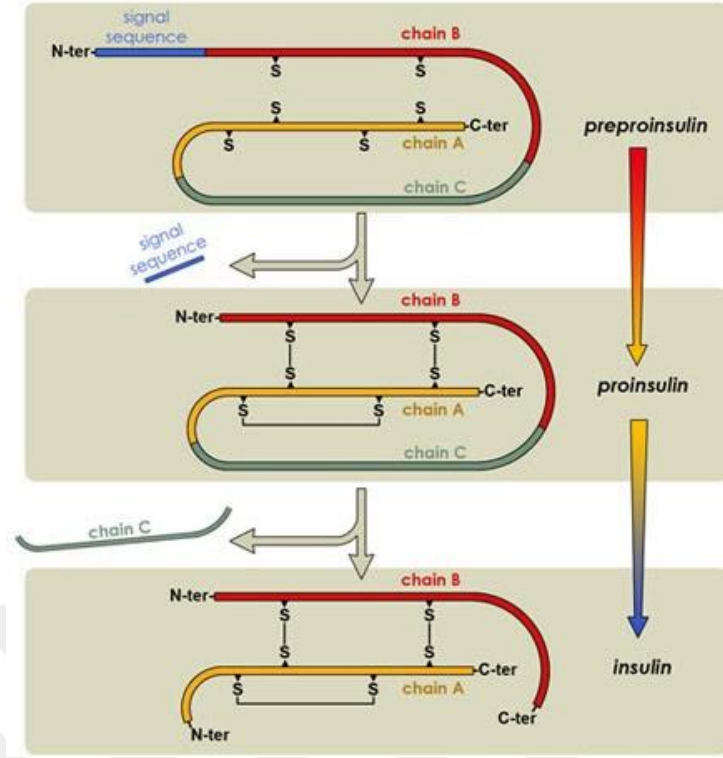
Pankreas adacıklarının 1869'da Langerhans tarafından tanımlanması ve daha sonra 1921-1922'de Banting ve Macleod tarafından insülinin keşfedilmesi, pankreasın sadece enzim üreten bir organ olmadığı bilincini uyandırdı³⁰. Langerhans adacıkları, toplam pankreas kütlelerinin %5'inden azını oluştursa da, bu oran insanlarda 1 milyardan fazla hücreyi temsil eder³³. İnsülin ve glukagon kan glukoz seviyelerini karşılıklı olarak modüle eder⁴⁷. Glukagon, glisemi normal açlık seviyelerinin altına düştüğünde hepatik glikojen yıkımını ve hepatik glukoz üretimini uyarmak için α hücreleri tarafından salgılanırken; insülin ise, yemeklerden sonra hiperglisemi gerçekleştiğinde hepatik glukoz çıkışını inhibe etmek ve özellikle karaciğer ve kasta glukoz alımını ve depolanmasını uyarmak için β hücreleri tarafından salgılanır⁴⁸. Ayrıca, insülin parakrin tarzda glukagon sekresyonunu inhibe ederken, glukagon insülin sekresyonunu stimüle eder⁴⁹.

Diyabette, insülin ve glukagon sekresyonunun kan glukoz düzeylerine ve parakrin düzenlemesine karşı bu normal karşıt tepkisi değiştirilerek, birlikte kronik hiperglisemiye katkıda bulunan, insülin eksikliği ve hiperglukagoneminin karakteristik iki hormonal durumu ortaya çıkar⁵⁰. İnsülinin az salgılanması ya da hedef hücrelerin insüline karşı tepkisiz kalması nedeni ile diyabet oluşur⁴⁷.

2.1.4.1. İnsülin

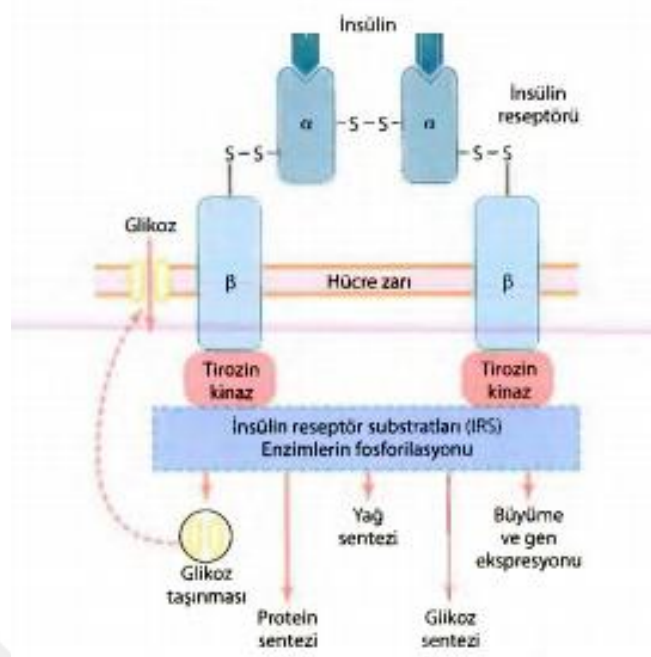
İnsülin küçük bir proteindir; insan insülini 5808 dalton moleküler ağırlığa sahiptir²⁷. Disülfid bağlantıları ile birbirine bağlanmış iki amino asit zincirinden oluşur. Bu iki amino asit zinciri birbirinden ayrıldığında, insülin molekülünün işlevsel etkinliği kaybolur⁵¹. İnsülin, β hücrelerinde hücre içi mekanizmalar ile sentezlenir. Sentez, insülin mRNA'sının, preproinsülini oluşturmak için endoplazmik retikulumla bağlı ribozomlar tarafından translasyonu ile başlar. Bu ilk preproinsülinin moleküler ağırlığı yaklaşık 11.500'dür. Ancak daha sonra endoplazmik retikulumda yaklaşık 9000 moleküler ağırlığa ve üç peptid zincirine (A, B ve C'den oluşan) sahip bir proinsülin oluşturmak için kesilir (Şekil 8.). Proinsülinin çoğu, disülfid bağlarıyla bağlanmış A ve B zinciri ile bağlanma peptidi adı verilen C zinciri peptidinden meydana gelen insülini oluşturmak için Golgi kompleksinde yeniden parçalanır. İnsülin ve C peptidi, salgı granüllerinde paketlenir ve eşit mol miktarlarında salgılanır^{27,51}. Nihai salgılanan ürünün yaklaşık yüzde 5 ila 10'u hala proinsülin formundadır. Proinsülin ve C peptidi hemen hemen hiç insülin aktivitesine sahip değildir. Bununla birlikte, C peptidi bir zar yapısına, büyük olasılıkla bir G protein-bağlı membran reseptörüne bağlanır ve en az iki enzim sisteminin; sodyum potasyum ATPaz ve endotel nitrik oksit sentazın aktivasyonunu sağlar.

Sağlıklı bir bireyde günlük yaklaşık 30-35 ünite (U) insülin salgılanır. İnsülin kana salındığında, neredeyse tamamen serbest formda dolaşır; ortalama olarak yaklaşık 6 dakika olan bir plazma yarı ömrüne sahiptir, bu nedenle esas olarak dolaşımdan 10 ila 15 dakika içinde temizlenir. İnsülinin hedef hücrelerdeki reseptörlerle birleşen kısmı dışında kalan bölümleri, başta karaciğer olmak üzere böbrek, kas ve daha az bir oranda olmak kaydıyla diğer birçok dokuda ünsilinaz enzimi tarafından parçalanır. Plazmadan bu hızlı uzaklaştırma gereklidir, çünkü zaman zaman insülin kontrol fonksiyonlarının açılması kadar hızlı bir şekilde kapatılması da önemlidir²⁷.



Şekil 8. Proinsülin oluşum şeması. Pankreasın β hücrelerinin Golgi aygıtında, birbirlerine disülfid bağıyla bağlanmış A ve B zincirlerinden oluşan insülin ve bağlayıcı peptidinden (C peptid) oluşan insan proinsülin molekülü. ⁽⁶⁾

Hedef hücreler üzerindeki etkilerini başlatmak için, insülin ilk önce yaklaşık 300.000 moleküler ağırlığa sahip bir membran reseptör proteinine bağlanır ve onu aktive eder. Sonraki etkilere neden olan, insülin yerine aktive edilmiş reseptördür. İnsülin reseptörü, disülfid bağlantıları ile bir arada tutulan dört alt birimden oluşur: tamamen hücre zarının dışında kalan iki α alt birimi ve zardan geçen ve hücre sitoplazmasına çıkıntı yapan iki β alt birimi. İnsülin, hücrenin dışındaki α alt birimleri ile bağlanır, ancak bunların β alt birimleri; aralarında kurulu bağlar sayesinde, otofosforile olur. Reseptörün β alt birimlerinin otofosforilasyonu, sırayla insülin-reseptör substratları (IRS) olarak adlandırılan bir grup da dahil olmak üzere diğer birçok hücre içi enzimin fosforilasyonuna neden olan bir tirozin kinazı aktive eder^{27,52} (Şekil 9.).



Şekil 9. İnsülin reseptörünün şematik görünümü. (7)

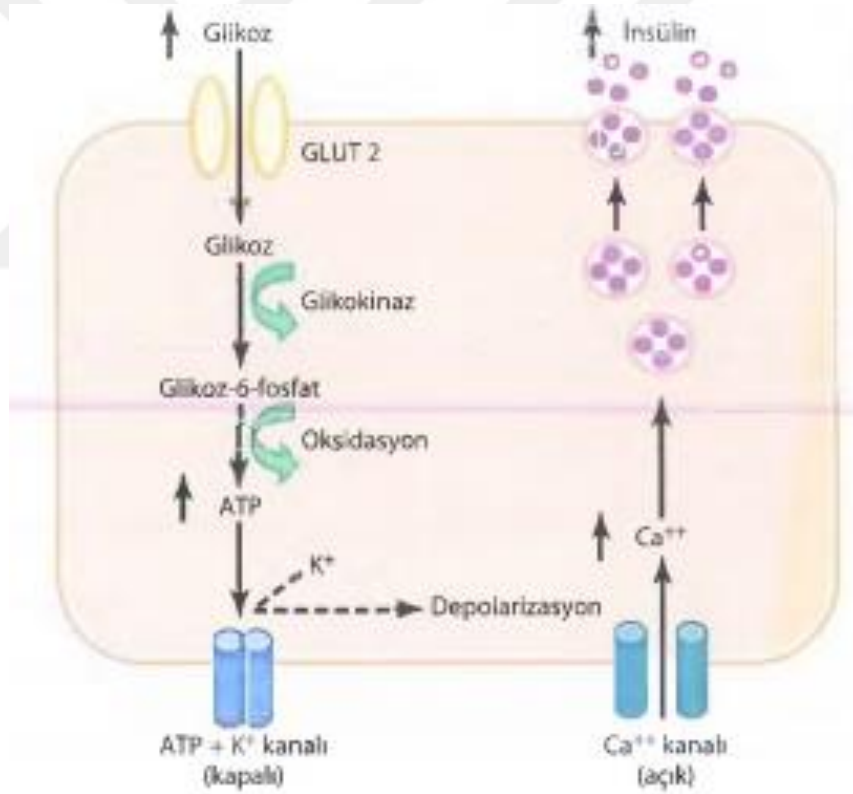
Sağlıklı bireylerde, endojen insülin sekresyonu 2 fazda gerçekleşir:

- 1) öğün başlangıcından 30 ila 45 dakika sonra en yüksek seviyeye ulaşan serum insülininde hızlı bir artış (bolus/prandial-tokluk), ki 1 ila 3 saat sonra bazal seviyelere döner; ve
- 2) insülinin daha düşük bir oranda sabit “düz çizgi” şeklinde salgılanması, buna bazal insülin salgılanması da denir.

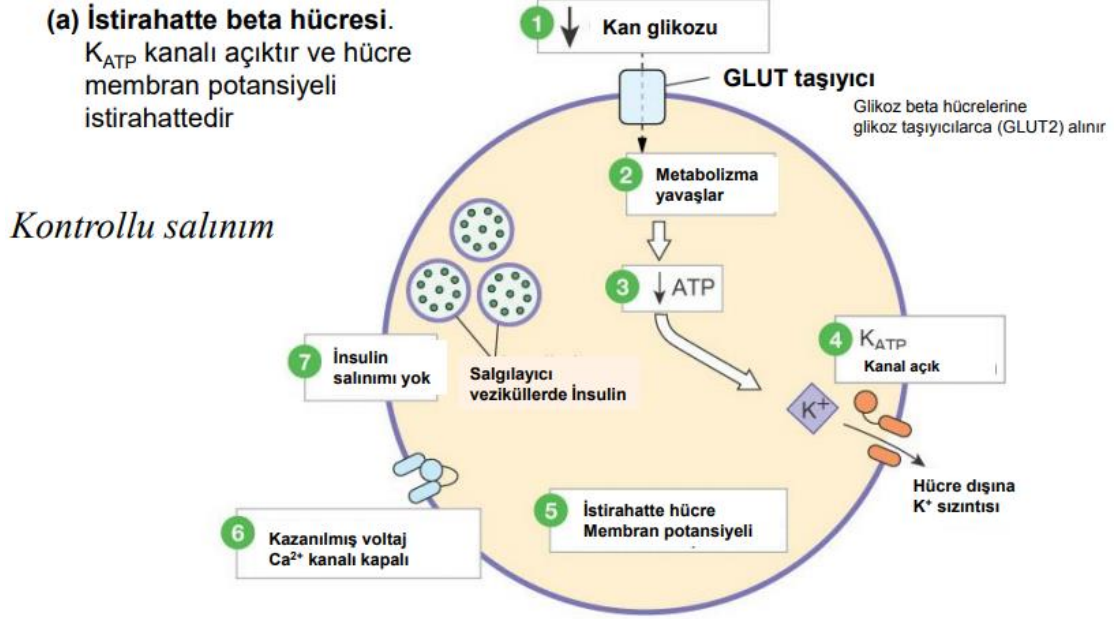
İnsülin etkisinin bazal bileşeni, glukagon ile birlikte, çevresel glukoz kullanımını eşzamanlı olarak modüle ederken aynı zamanda hepatik glukoz üretimini ayarlar⁵³. Fizyolojik olarak, bazal insülin hepatik glukoz çıkışına cevap olarak düşük seviyelerde sürekli olarak salınır (~5–15 µU/mL konsantrasyonları) ve diyabeti olmayan bireylerde normal plazma glukoz konsantrasyonunun ~80 ila 90 mg/dL (~4–5 mmol/L) olmasını sağlar. Bununla birlikte, glukoz konsantrasyonunu açlık seviyelerine döndüren bir yemeğe cevap olarak bolus (prandial) insülin salınır. Bu düzenleyici mekanizma kan şekeri düzeylerini dar bir aralıkta korur (~63–135 mg/dL [~3.5–7.5 mmol/L]). Tanım olarak açlık hiperglisemi; bazal insülin sekresyonu, açlık plazma glukoz konsantrasyonlarını normalleştirmek için artık yeterli olmadığında meydana gelir^{54,55}. İnsülin salınımı glukozun, β hücrelerine girmesiyle başlar. Glukoz β hücrelerine girdiğinde glukoz-6-fosfata dönüştürülür.

Bunu oluşturan ATP, K_{ATP} 'yi uyarır ve potasyumun hücreden dışarı çıkmasına izin verir. K_{ATP} kapalı olduğunda meydana gelen depolarizasyon olayı, voltaj kapılı Ca kanallarının açılmasına ve Ca'un hücreye girmesine neden olur. Bu olay insülin veziküllerini membrana doğru hareket ettirir, böylece insülin hücre dışına salınır⁵⁶ (Şekil 10-12).

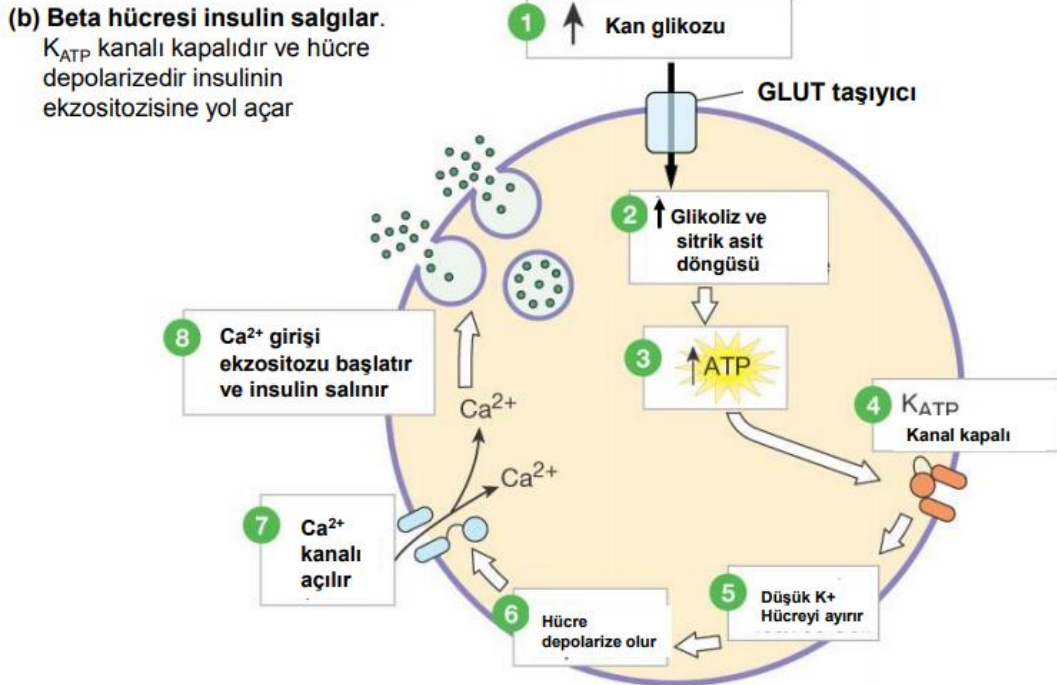
İnsülin, enerji bolluğu ile ilişkili bir hormondur: Diyetle enerji veren yiyecekler (özellikle de karbonhidratlar) bol miktarda olduğunda, insülin sekresyonu artar. İnsülin, karaciğerde glukoz tutulmasını, depolanmasını ve kullanılmasını sağlar. Ayrıca, aşırı glukozun yağ asitlerine dönüştürülmesini teşvik eder ve karaciğerdeki glukoneogenezi engeller. Yağ sentezini ve depolanmasını destekler. İnsülin eksikliği sırasında aşırı yağ kullanımı ketoz ve asidoza neden olur²⁷.



Şekil 10. β hücrelerinden insülin salgılanmasını uyarın glukoz metabolizması.⁽⁷⁾



Şekil 11. Bazal insülin sekresyonu şeması.⁽⁸⁾



Şekil 12. Bolus insülin sekresyonu şeması.⁽⁸⁾

2.2. Diabetes Mellitus (DM)

Kelime anlamı akıp giden ballı idrar olan diabetes mellitus, klinik belirtilere yol açan kronik hiperglisemi durumudur⁵⁷. Diyabet, insülinin az salgılanması ya da hedef hücrelerin insüline karşı duyarsız kalması nedeni ile oluşmaktadır. Sonuç olarak hastalarda kan glukoz düzeyi o denli yüksek olur ki, şeker hastasının böbrekleri glukoz atmaya başlar. Şeker hastalığı tanısında, idrarda glukoz aranmasının nedeni budur. İdrarda glukoz arttıkça, beraberinde su atımı da olacağından, idrar miktarında ve su içme isteğinde aşırı artışlar görülür¹. Glukozda uzun süreli bir artış, diyabette sekonder bozukluklarının en önemli nedenlerinden biridir ve anjiyopati, nöropati, retinopati, antioksidan savunma sisteminde eksiklik ve lipit profil bozuklukları gibi komplikasyonlara sebep olur⁵⁸. Diabetes mellitusta, vücut hücreleri, temel enerji maddesi olan glukozu alamadığından, hücre solunumu için enerji kaynağı olarak yağları kullanmak durumunda kalır. Bunun sonucunda hastalığın ileri aşamalarında yağların yıkımından gelen asidik ürünlerin kanda birikmesi, yaşamı tehlikeye düşürecek oranda düşük kan pH'sına yol açmaktadır¹.

İlk kez, eski Mısır Eber papirüsünde (M.Ö 1552), bol miktarda su içme, aşırı idrara çıkma gibi semptomlar içeren ve DM'ye benzeyen bir hastalıktan söz edilir⁵⁷. M.S 1. yüzyılda Arateus tarafından ilk kez diyabet terimi kullanılmış, buna ek olarak hastalanan kişinin kilo kaybetmesi ve titremesi nedeniyle "Eritici Hastalık" adını da almıştır²⁶. Hintli bir hekim olan Sushrut 5-6. yüzyılda karınca ve sineklerin, şeker hastalığına yakalanmış kişilerin idrarına yöneldiğini saptamıştır. Buna benzer veriler sonucunda İngiliz hekim Thomas Willis diyabetik idrarın şeker tadını tekrar keşfetmiştir⁵⁹. 1809 yılında ise John Rollo mellitus adını diyabet kelimesine eklemiştir. Aynı yüzyılda Fransız bilim insanı Claude Bernard pankreas ekstrelerinden insülini ayırıştırarak hastalığın tedavisinde kullanmıştır^{26,57}. 1922' de 'isletin' adını verdikleri insülin Banting ve Best tarafından pankreastan izole edilmiş ve ağır diyabet hastalarını hemen hemen normal bir yaşama kavuşturmuştur²⁷. Daha sonra bu moleküle Macleod tarafından insülin adı verilmiştir⁵⁷.

Amerikan Diyabet Birliği (ADA)'ne göre 2003 yılında belirlenen tanı ölçütlerine göre; Herhangi bir zamanda ölçülen kan glukozunun ≥ 200 mg/dL veya açlık kan glukozunun ≥ 126 mg/dL olarak belirlenmesine ek olarak poliüri, polidipsi, glukozüri, ketonüri ve açıklanamayan kilo kaybı DM olarak tanımlanır^{26,60}.

2.2.1. Diabetes mellitus'un sınıflandırılması

1979'da yapılan Diyabet Veri Grubu çalışmasına göre Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH), DM'yi iki gruba ayırdı: insüline bağımlı (T1DM) ve insüline bağımlı olmayan (T2DM). Bu gruplandırma yetersiz kalınca, 1997 yılında, ADA ve WHO, insüline bağımlı diyabet ve insüline bağımlı olmayan diyabet kavramlarını inceledi ve DM'yi bugün kabul edildiği gibi dört gruba ayırdı²:

- Tip 1 diyabet (pankreas β hücre destrüksiyonu)
- Tip 2 diyabet (insülin direnci ve β hücre insülin sekresyon bozukluğu)
- Diyabetin diğer spesifik tipleri (endokrinopatiler, ekzokrin pankreas hastalıkları, genetik sendromlar vs.)
- Gestasyonel diyabet (ilk defa gebelikte ortaya çıkan DM)

2.2.1.1. Tip 1 diabetes mellitus

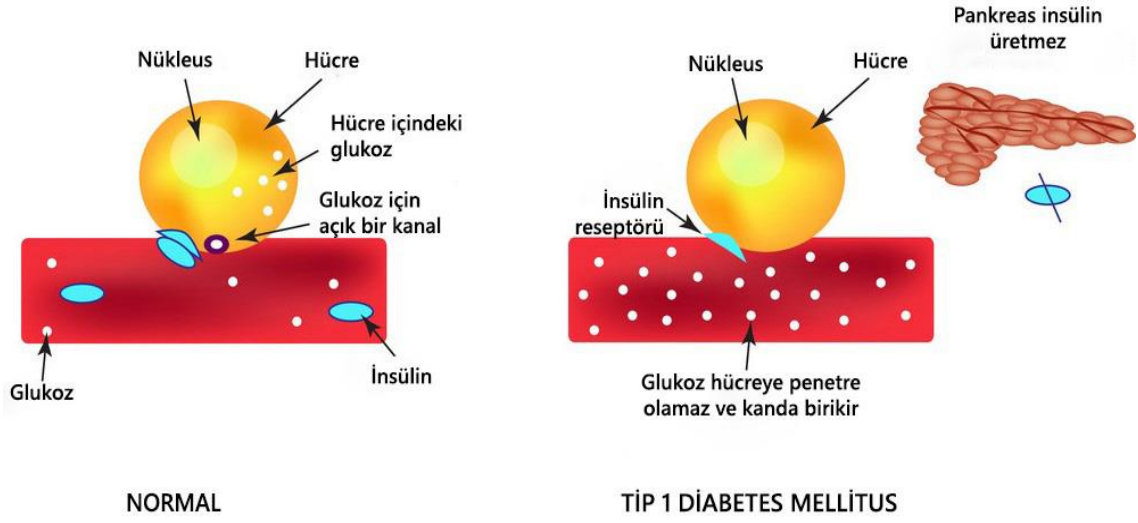
Tip 1 diabetes mellitus (insüline bağımlı şeker hastalığı), bağışıklık sistemi pankreas hücrelerini hedeflediğinde meydana gelen otoimmün bir hastalıktır¹. Bir başka deyişle T1DM, oto-reaktif T hücreleri tarafından adacıklardaki β hücrelerinin yabancı hücre olarak tanınmasını içeren bir otoimmün bozukluktur⁶¹. Kan glukozunun kronik olarak yükselmesi, sonunda ciddi hastalıklarla sonuçlanan doku hasarına yol açar⁶². Anahtar patafizyolojisi, azalan insülin salgılama kapasitesidir ve bu da ketoasidoz gelişme eğilimi gösteren hiperglisemiye neden olur⁶³. Vakaların çoğu, otoimmün aracılı β hücrelerin tahrip edilmesine atfedilirken (Tip1-a), küçük bir kısmı, β hücrelerin idiyopatik yıkım veya yetersizliğinden (Tip1-b) kaynaklanmaktadır⁶⁴. Bozukluk, daha çok çocukluk döneminde aniden ortaya çıkmakta ve kişinin insülin üretme yetisini ortadan kaldırmaktadır¹ (Şekil 13.). Bu durum, pro-inflamatuar sitokinlerin ve reaktif oksijen türlerinin serbest bırakılmasına yol açar. Sonuç olarak Langerhans adacıklarında β hücre yıkımı ve insülin salgılanma kaybı ortaya çıkar⁶¹. Ayrıca pro-inflamatuar sitokinler tarafından Jun kinaz yolağı aktive edilir ve oksidatif strese bağlı β hücre yıkımına dair bir kanıt ortaya koyar⁶⁵. Pro-apoptotik sinyalizasyon olaylarının aktivasyonu sonucu β hücre kitlesinin kaybı, T1DM gelişiminde bir sebep ve bir evre olarak giderek daha fazla kabul edilmektedir⁶⁶. Tedavi genelde günde birkaç kez insülin enjekte edilmesi ile yapılmaktadır. Yakın zamana değin, insülin hayvan pankreaslarından elde edilmekteydi, ancak genetik mühendislik, hormonu şifreleyen insan DNA'sının bakterilere yerleştirilmesini sağlayarak, daha ucuz bir kaynak oluşturmuştur^{1,67}.

Tip 1 diabetes mellitus, dünya genelinde toplam diyabet vakalarının %5-10'unu oluştururken, 20 yaş altı gençlerde %85'ini oluşturur⁶⁷. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda bu rakamlara yılbaşına ortalama 50.000 yeni tip 1 diyabetik hasta eklendiği görülmektedir. Yoğun insülin tedavisi ve sürekli subkutan insülin infüzyonu, Tip 1 diyabette metabolik kontrolü artırır, fakat aynı zamanda daha az diyet kısıtlaması ve fazla makrobesinlerin depolanan yağ dokusuna daha fazla dönüştürülmesinin bir sonucu olarak kilo alımını da teşvik edebilir⁶⁸.

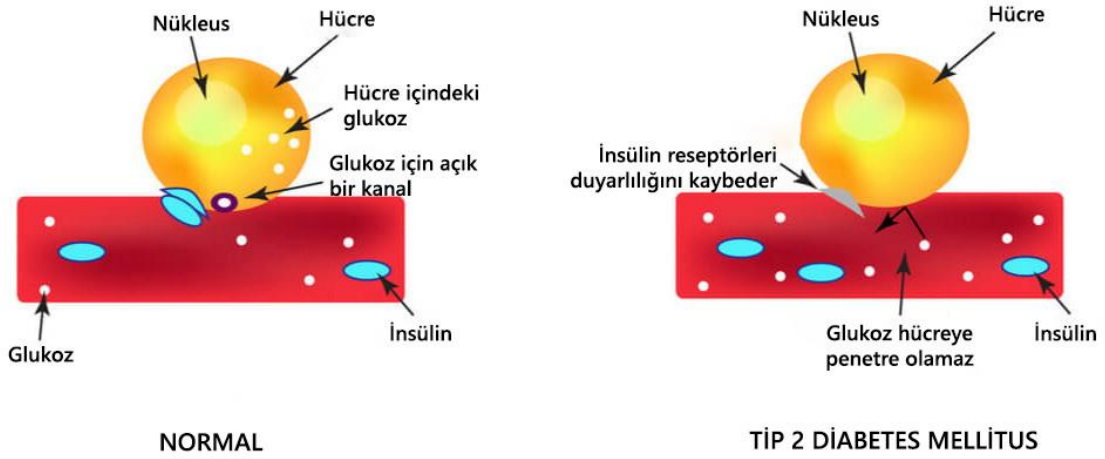
2.2.1.2. Tip 2 diabetes mellitus

Tip 2 diabetes mellitus (insüline bağımlı olmayan şeker hastalığı), β hücre bozulmasına bağlı olarak yeterli insülin salgılanamaması ya da insülin salgılanmasına rağmen hedef hücrelerde insülin duyarlılığının azalmasından kaynaklanmaktadır (Şekil 14.). Bu duyarsızlığın nedeni hedef hücrelerde insülin reseptörünün olmaması/reseptörde yapısal bozuklukların bulunmasıdır. Bunun sonucunda glukoz hücre içine taşınmaz, kanda birikmeye başlar ve insülin direnci olarak adlandırılan durum meydana gelir^{2,69,70}. T2DM genelde 40 yaşından sonra, ilerleyen yaşla birlikte görülme olasılığı artarak ortaya çıkmaktadır¹. Diyabet hastalarının %90'ından fazlası Tip II olup, çoğu egzersiz ve diyetle kan glukozlarını dengede tutabilmektedirler. Bu oran hem kadın hem de erkeklerde yetişkin nüfusun %8.3'üne eşittir. T2DM'nin birincil nedeni obezite ve yeterli fiziksel aktivite olmayışıdır. Çocuklarda T2DM gelişimi için risk faktörleri, birinci veya ikinci dereceden bir akrabada T2DM öyküsünün bulunmasıdır⁷⁰. Tip 2 diyabet hastalarında pankreasın caput bölgesi ve özellikle caput içindeki daha büyük adacıklar en belirgin β hücre kaybına maruz kalır¹². Son zamanlarda yapılan genetik bağlantı çalışmaları ve histolojik analizler, T2DM'li hastaların sağlıklı bireylerden anlamlı derecede daha az adacık β hücrelerine sahip olduğunu göstermiştir³³.

Tip 2 diyabet genellikle asemptomatiktir ve hiperglisemi, ciddi semptomlara neden olacak kadar şiddetli olmadığından uzun süre teşhis edilemez. Tip 1 diyabette olduğu gibi mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonların gelişme riski yoktur⁷¹. Karmaşık bir yapıya sahip T2DM, karaciğer, kas ve adipoz dokuda insülin duyarlılığının azalması ve β hücre metabolizma bozukluğu ile karakterizedir². T2DM'deki altta yatan moleküler mekanizma açıkça bilinmemekle birlikte obezite, hareketsizlik, hipertansiyon, dislipidemi, makrovasküler hastalıklar ve ailede diyabet öyküsü, tip 2 diyabet riskini arttırmaktadır⁷².



Şekil 13. Tip 1 diabetes mellitus oluşum mekanizmasının gösterimi. Normal bireylerde pankreas, glukozu hücrelere taşıyan insülin hormonu üretir. Aksine T1DM’li bireylerde bağışıklık hücreleri pankreastaki β hücrelerini yok eder. Pankreas insülin üretmediği için glukoz hücrelere giremez ve kanda birikmeye başlar. Sonuç olarak kan glukoz düzeyi artar. ⁽⁹⁾



Şekil 14. Tip 2 diabetes mellitus oluşum mekanizmasının gösterimi. Normal bireylerde pankreas, glukozu hücrelere taşıyan insülin hormonu üretir. Aksine T2DM’li bireylerde iki olasılık vardır: β hücre hasarına bağlı olarak yeterli insülin salgılanamaz 2. yeterli insülin salgılanmasına rağmen, hedef hücrelerde insülin duyarlılığı azalır. Bunların sonucunda hücelere daha az glukoz girer ve glukozun çoğu kanda birikerek kan glukoz düzeyini artırır. ⁽¹⁰⁾

2.2.1.3. Diyabetin diğer spesifik tipleri

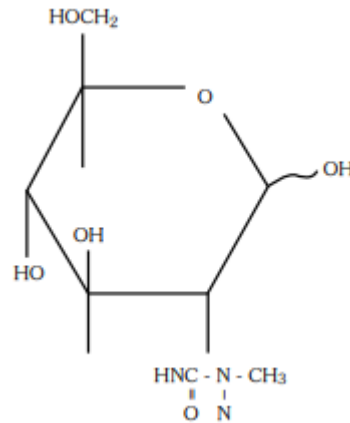
Geniş bir gruptur. Yüksek kan glukoz seviyelerini; kullanılan ilaçların yan etkileri veya pankreas dışı hastalıkların sonuçları gibi birçok spesifik nedenden kaynaklandığı bilinmektedir². İnsülin sekresyonundaki/etkisindeki genetik defektleri, pankreatit ve ekzokrin bozuklukları, hormon salgılayan tümörleri vs. içerir. Bazı vakalar glukokortikoid gibi ilaçların kullanılması sebebiyle oluşur. Bazı genetik sendromlar da (Klinefelter, Down) nadiren diyabetle bağlantılı olabilir.

2.2.1.3. Gestasyonel diabetes mellitus

Daha önce diyabet öyküsü olmayan gebe kadınların yüksek kan şekeri seviyesi geliştirmesi durumunda ortaya çıkar⁷⁰. GDM'nin anne ve bebek için olumsuz sonuçları olabilir. Açlık şekerinde, hamilelik öncesi veya hamilelik döneminde görülen artış ilk trimestırda (4-8. gebelik haftasında) intrauterin fetüs ölümlerine veya doğumsal anomalilere neden olabilir. Gestasyonel diabetes mellituslu kişilerin, doğumdan sonra yapılacak testlerle hangi tür diyabete sahip olduğu belirlenebilir⁷³. Gestasyonel diyabeti olan annelerin doğurduğu bebekler sıklıkla makrozomiktir⁷⁴.

2.2.2. Streptozotosin (STZ) ile oluşturulan deneysel diyabet modelleri

Streptozotosin, nitrosit grubu taşıyan alkilleyici bir kemoterapötik maddedir. Streptomyces achromogenes mantarından 1950 yılında izole edilmiştir⁷⁵ (Şekil 15.). Yapısı glukoza benzediği için STZ'in seçici toksisitesi, glukoz taşıyıcı 2 (GLUT2) yoluyla β hücrelerine alınması ile ortaya çıkar^{75,76}. DNA'nın alkilasyonunu sağlayarak hücre ölümüne yol açar⁷⁷.



Şekil 15. Streptozotosinin kimyasal yapısı.⁽¹¹⁾

Diyabeti indüklemek için ratlarda en yaygın kullanım yöntemi tek doz intraperitoneal (i.p.) 60-80 mg/kg'dır. Tek bir yüksek STZ dozuna alternatif olarak çok sayıda küçük STZ dozu da kullanılabilir (örneğin arka arkaya beş günde 40 mg/kg). Düşük doz STZ enjeksiyonunda, pankreas β hücrelerinin apoptozu uyarılırken, yüksek doz STZ nekroza neden olur^{76,78,79}. Erişkin sıçanlara yüksek tek doz (55-80mg/kg) i.p. veya intravenöz (i.v.) STZ uygulaması T1DM'ye, düşük ve tekrarlanan doz (5 gün, 40 mg/kg) STZ uygulaması ise inflamasyonla giden otoimmün T1DM'ye neden olur. Tek doz uygulaması, otoimmün diyabet modeli oluşturmaz. Neonatal sıçanlara (1. gün) tek doz i.p. veya i.v. yolla 100 mg/kg STZ uygulamasının ise T2DM'ye neden olduğu bildirilmiştir. 8-10 haftalık oldukları zaman bu ratlarda orta seviye kan glukoz yüksekliği oluşmaya başlar^{75,79-81} (Tablo 2.). Streptozotosin, tek doz enjeksiyondan birkaç saat sonra salgı granüllerinin sayısında çok az değişiklik meydana getirir ve sıklıkla STZ ile indüklenen nekrozun son aşamalarına giren β hücrelerinde hala birçok salgı granülü bulunur⁸². Streptozotosin uygulamasından 48 saat sonra, kuyruk veninden alınarak belirlenen kan glukoz seviyesi 200-300 mg/dL'den yüksek çıktığı takdirde ratlar diyabetik olarak kabul edilir⁷⁵.

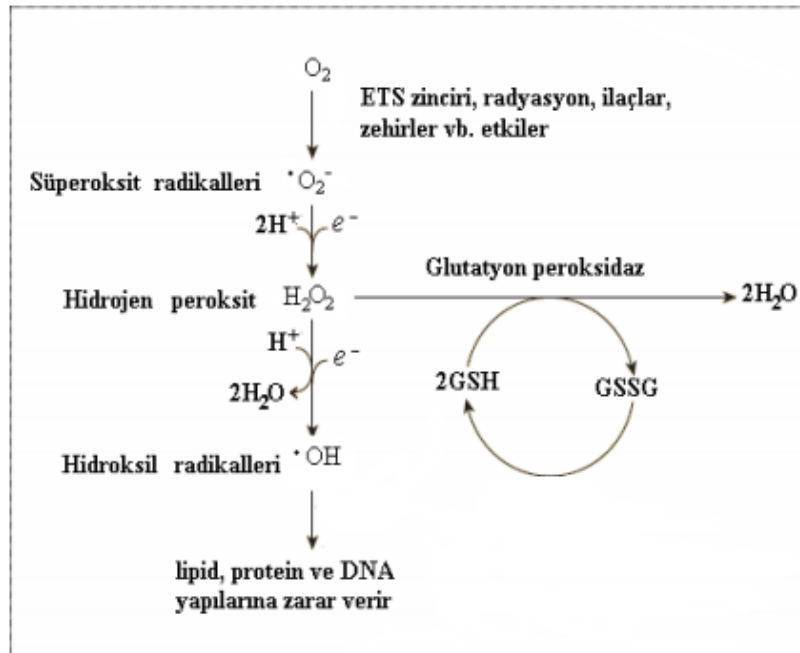
Tablo 2. STZ ile deneysel diyabet oluşturma modelleri.

Tek doz STZ enjeksiyonu	Tekrarlayan küçük dozlarda STZ enjeksiyonu
<ul style="list-style-type: none"> Erişkin sıçanlara tek doz (60-80 mg/kg) ip/iv. STZ enjeksiyonu nekroza neden olur → T1DM Tek doz STZ enjeksiyonu otoimmün diyabet oluşturmaz. Neonatal sıçanlara (1. gün) tek doz (100mg/kg) ip/iv. STZ enjeksiyonu → T2DM 	<ul style="list-style-type: none"> Erişkin sıçanlara tekrarlayan düşük doz (5 gün, 40mg/kg) ip/iv. STZ enjeksiyonu β hücre apoptozunu uyarır → İnflamasyon görülen otoimmün T1DM
<p>$\geq 200-250$ mg/dL kan glukoz düzeyi diyabet kabul edilir.</p>	

STZ sadece adacıklarda hasara neden olmaz. Aynı zamanda böbrek ve endotel hasarı da oluşturur⁸³. Streptozotosin, DNA hasarına neden olan bir alkilleyici maddedir. Bu nedenle, hayvanlarda karaciğer ve böbrek tümörlerinin oluşumunu indükleyebilir⁸⁴. STZ N- (Metilnitrosokarbamoil) - α -D-glukozamin yapısına sahiptir ve ışık görmeyen karanlık bir ortamda saklanmalıdır. Nötr pH'da hızlı şekilde çözündüğü için, optimum stabilite için ortam pH'sı 4-4,5 arasında olmalıdır⁸⁵. Pankreas β hücrelerinde biriken STZ, kimyasal olarak kararsız bir moleküldür ve bozulma döneminde toksik radikallere parçalanır. Streptozotosin molekülünün parçalanmasından kaynaklanan yüksek reaktif karbonyum radikalleri, serbest oksijen radikalleri (SOR) üretimini artırabilir. Bu yüksek oranda reaktif olan SOR'lar adacık endotelinde doğrudan veya dolaylı toksik etkiler gösterir ve β hücrelerinde nükleer DNA fragmantasyonuna aracılık eder⁸⁶.

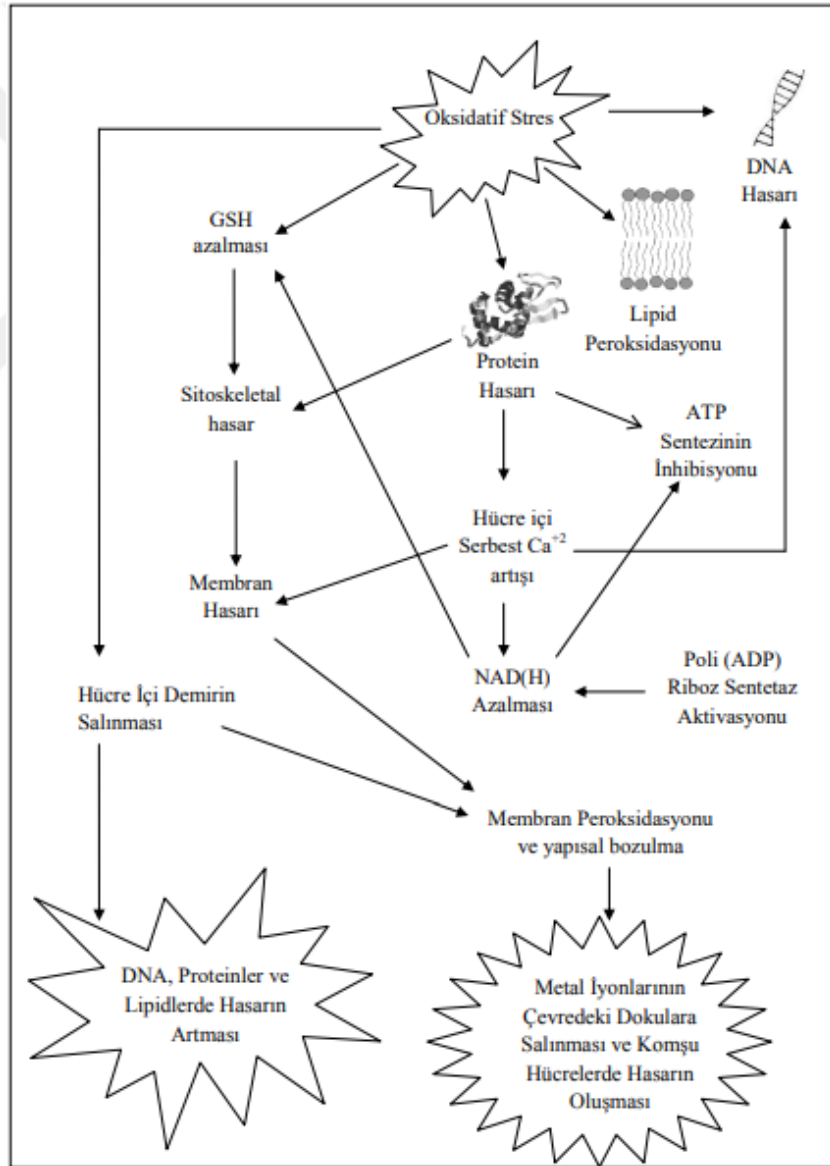
2.3. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Diyabet genellikle antioksidan savunma sisteminin zayıflaması ile ilişkilidir. Bu sistemin, reaktif oksijen türlerinde (ROS) artış, serbest radikal (SR) üretimi veya diyabetik komplikasyonların gelişimi ve ilerlemesi durumlarına karşı savunmada etkin bir rolü olduğu düşünülür⁸⁷. Yüksek reaktivite gruplarına veya nihai yörüngelerinde bir veya daha fazla elektron içeren moleküllere SR denir⁷⁶. Serbest radikaller pozitif, negatif veya nötr halde bulunabilir (Şekil 16.).



Şekil 16. Serbest radikal ve reaktiflerin oluşumu.⁽¹²⁾

Biyolojik sistemlerde, elektron transferiyle oluşan SR'ler, çoğunlukla hücre bileşenlerini etkiler ve yapılarını bozar. Bu bozunmalar sonucu reaktif türler (RS) ortaya çıkar ve oksidatif stres (OS) oluşumuna neden olurlar⁸⁸. Oksidatif stres 1970'ten beri çeşitli fizyolojik ve patolojik durumlarla ilişkilendirilmiştir (Şekil 17.). Reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif azot türleri (RNS) biyolojik sistemlerde hem faydalı hem de zararlı olabilir ve tek oksijen içerirler⁸⁹. Oksidatif stres; ROS ve RNS üretimi ile antioksidan mekanizmalar arasındaki dengesizlik durumudur. Bu reaktifler, süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), nitrik oksit (NO), hidroksil radikali (OH) ve peroksinitrit (ONOO⁻) olarak karşımıza çıkar. Bu RS'ler aerobik metabolizmanın doğal bir ürünü olarak, enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlar ile üretilir⁹⁰.



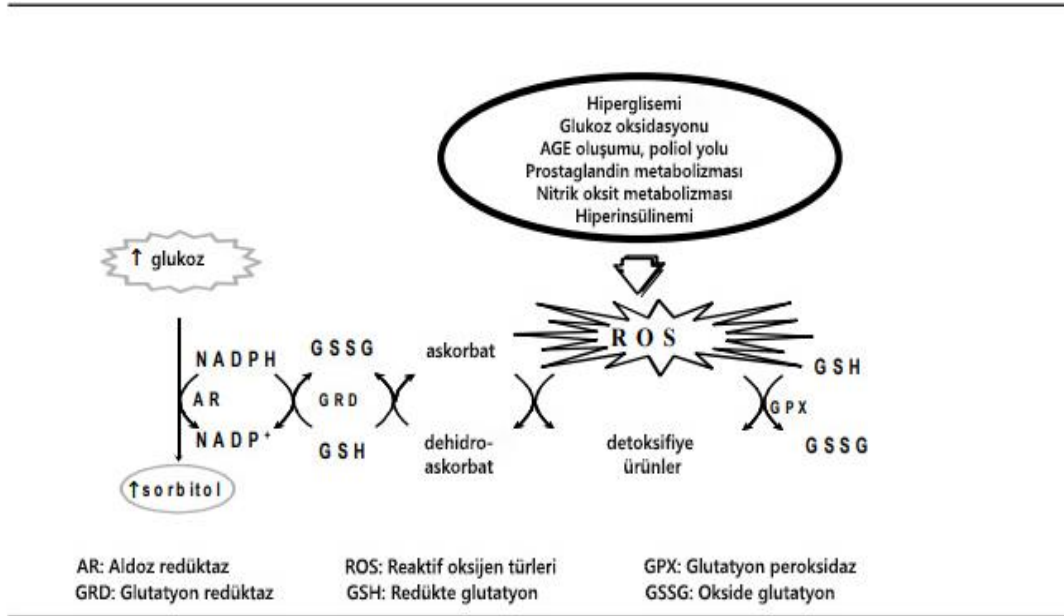
Şekil 17. Oksidatif stres oluşumu ve organizmaya verdiği hasarlar.⁽¹²⁾

Reaktif oksijen türleri, tamamen indirgenmemiş veya farklı elektronik dağılımlara sahip O_2 'i olan ve moleküler O_2 'den daha reaktif olan küçük biyolojik moleküllerdir. Konakçı savunması, hücre sinyalizasyonu, gen ekspresyonunun düzenlenmesi ve hücre farklılaşması gibi çeşitli fizyolojik işlevlerde ROS önemli roller oynar. Aslında, serbest radikallerin aşırı üretimi hücrel membran, protein, RNA ve DNA hasarı ile ve dolaylı olarak kanser, kardiyovasküler, inflamatuvar ve nörodejeneratif patolojiler gibi yaşlanma ve oksidatif stresle bağlantılı hastalıklarla ilişkilidir⁹¹.

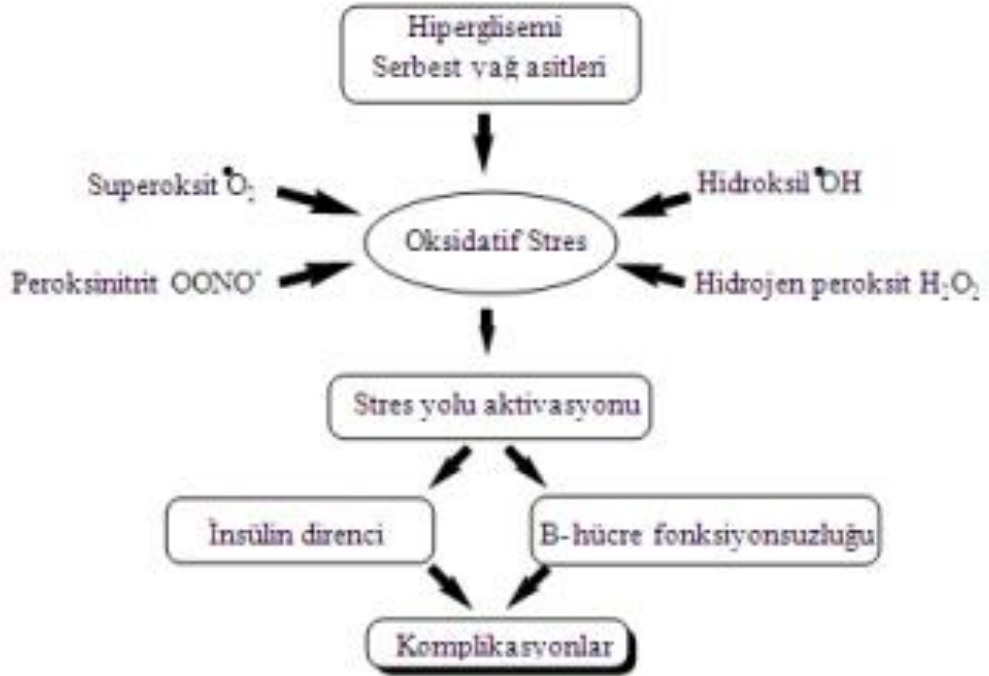
Üstelik pankreas β hücreleri, glutatyon peroksidaz aktivitesi gibi antioksidan enzimlerin gen ekspresyonu ve aktivitesinin azalmasına bağlı olarak ROS'un neden olduğu sitotoksik hasara karşı hassastırlar⁹² (Şekil 18.). Hem deneysel hem de klinik çalışmalardan elde edilen bulguların artması, oksidatif stresin, diabetes mellitusun başlangıcında ve hastalığın vasküler ve nörolojik komplikasyonlarının gelişiminde merkezi bir rol oynadığını göstermektedir⁹³. Sonunda, β hücre hasarı ve insülin sekresyonunun azalmasına neden olabilirler. Aynı zamanda artmış glukoz, oksidan üretimini arttırdığı ve antioksidan savunma sistemini ROS'un hücre içi oluşumu dahil olmak üzere çoklu mekanizmalarla bozduğu için, oksidatif stresin diyabette arttığı bilinmektedir. Reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi, antioksidan sisteminin dengesizliğine yol açar ve sonunda hücre ve doku hasarlarına neden olur⁹¹ (Şekil 19.).

İnsülin direnci sonucunda fazlaşan metabolik yüke uyum sağlamak için normal pankreatik adacıklar genellikle artan β hücre fonksiyonu ile cevap vermektedir. Gliko/lipotoksisite nedeniyle β hücrelerinin sürekli uyarılması, ER'de katlanmamış proteinlerin birikmesine ve ER stres/katlanmamış protein tepkisi (UPR) aracılı sinyalleşmeye yol açar.

Artan ER stresi ve oksidatif stres, bu organlar hala yüksek oranda protein sentezi ve sekresyonunu sürdürdüğü için karaciğer ve pankreasta artış gösteren hücre ölümü ile ilişkilidir⁹⁴. Oluşan doku hasarı NF- κ B transkripsiyon faktörü gibi bazı oksidan duyarlı hücre içi sinyal yollarını aktive edebilir. NF- κ B, inflamatuvar yanıtı düzenleyen ve her yerde bulunan bir transkripsiyon faktörüdür ve aşırı ekspresyonu, tip 1 diyabet ile ilişkili gibi görünmektedir⁹¹.



Şekil 18. Diabetes mellitusta artan oksidatif stres mekanizmaları. ⁽¹³⁾



Şekil 19. Oksidatif stresin hiperglisemi ile bağlantısı. ⁽¹²⁾

2.4. Nüklear Faktör Eritroid 2 (NFE2) ile İlişkili Faktör 2 (Nrf2)

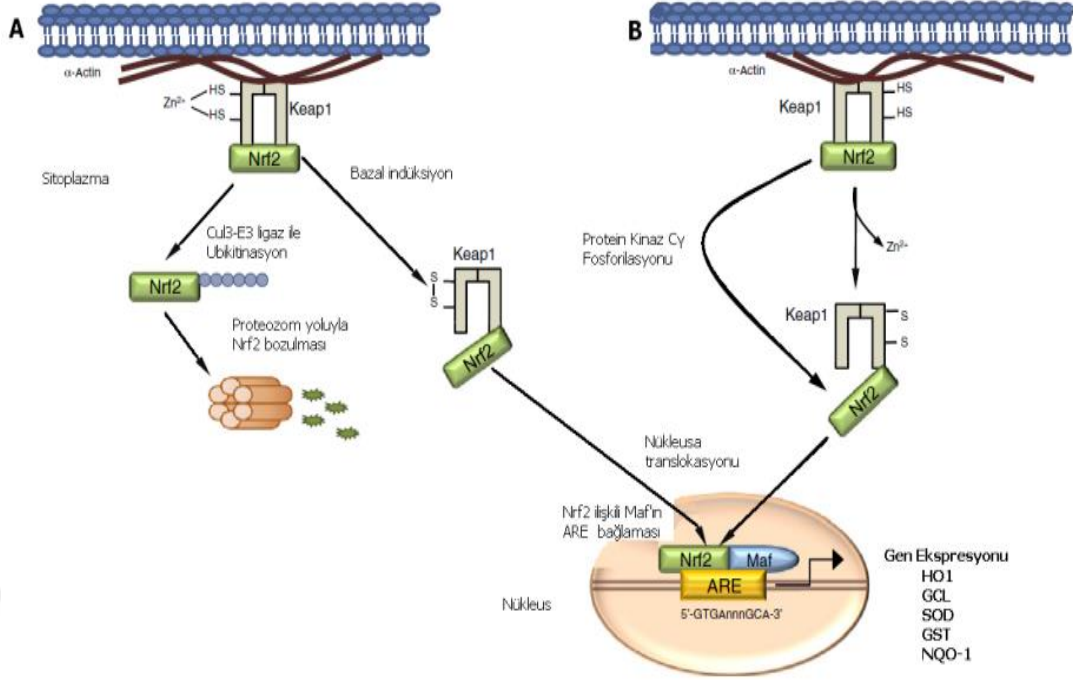
Nüklear faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf2), 1994 yılında β -globin lokusu kontrol bölgesinin tandem NF-E2 / AP1 tekrarına bağlanan ve bir transkripsiyonel aktivatörü kodlayan cDNA klonu olarak tanımlandı⁹⁴. Karmaşık bir hücrel savunma mekanizması, oksidatif stresi algıladıktan sonra antioksidan tepki reaksiyonunu aktive ederek hücreleri toksik radikallere maruz kalmaya karşı korur. Bu sistemde; Nrf2, antioksidan ve detoksifiye edici enzimlerin ekspresyonunu düzenleyen anahtar bir transkripsiyonel faktör olarak tanımlanmıştır⁹⁵. Nrf2 aktivitesi Cullin 3 bazlı E3 ubiquitin ligazın bir adaptör alt birimi olan Keap1 (Kelch benzeri ECH ile ilişkili protein 1) tarafından düzenlenir⁹⁶.

Nrf2 proteini, farklı dokularda farklı seviyelerde olmasına rağmen, bütün insan ve fare dokularının tüm bölgelerinde eksprese edilir. Nrf2, küçük muskulonörotik fibrosarkom (Maf) proteinleri olan MafF, MafG ve MafK ile heterodimer oluşturarak DNA'ya bağlanır⁹⁷. Maf ve Nrf2, faz II antioksidan enzimlerinin transkripsiyonunu başlatmak için Antioxidant Respond Element (Antioksidan Yanıt Elemanı- ARE) - DNA dizilerini tanıyabilmektedir. ARE, glutatyon S-transferaz (GST π), katalaz (Cat), glutatyon-peroksidaz (GPxs), hemeoksigenaz-1 (HO-1), peroksiredoksinler (Prdx) ve NAD(P)H kinon dehidrogenaz-1 (NQO1) gibi genleri düzenlemektedir⁹⁸. Nrf2'nin sitoprotektif mekanizmalar, ara metabolizma ve mitokondri fonksiyonu ile ilgili olanlar da dahil olmak üzere 200'den fazla geni düzenlediği bilinmektedir.

Nrf2 aktivasyonu karmaşıktır ve bir antioksidan savunma mekanizması olarak, sitoprotektif gen ekspresyonuna aracılık etmek için birkaç aşama gerektirir⁹⁹. Antioksidanlar, Nrf2'nin güçlü aktivatörleri olarak fonksiyon görürler. Metabolizasyon sonrasında, antioksidanlar Nrf2 aktivasyonunu tetikleyen az miktarda oksidatif stres üretirler. Nrf2, çok sayıda detoks ve antioksidan genlerinin ekspresyonunu düzenler ve antioksidan cevaba ek olarak, immun ve inflamatuvar yanıtlar, karsinogenez ve metastaz, bilişsel işlev bozukluğu ve bağımlılık davranışı gibi farklı süreçleri de kontrol eden genleri düzenlemektedir¹⁰⁰. Nrf2'nin protein yapısı, yedi domain içermektedir. Bunlar Nrf2-ECH homoloji (Neh) domainleri 1-7'den oluşur. Neh2 domaini Keap1 ile etkileşir ve ortaya çıkan Keap1 / Nrf2 kompleksi, Nrf2'nin transkripsiyonel aktivasyonuna aracılık eden oksidatif stres için hücrel bir sensördür¹⁰¹.

Nrf2 hücrelerde ana oksidatif stres tepkisini oluşturur. Bazal koşullar altında, Nrf2 sitoplazmada Keap1 proteinine bağlı haldedir. Keap1, Nrf2 negatif düzenleyicisi olarak görev yapar ve sitozolde bağdaştırıcı protein olan Culin 3 (Cul3)- bağımlı E3 ubiquitin ligaz tarafından Nrf2'yi hızlı bir şekilde ubiquitinasyon ve bozulmaya maruz bırakır ve böylece non-stres koşullar altında Nrf2'nin transkripsiyonel aktivitesini bastırır. Stres koşulları Keap1'i baskılayarak, Keap1 / Nrf2 kompleksinin ayrılmasına neden olur. Ayrılmanın ardından Nrf2 nükleusa transloke olur ve sMaf ve Jun proteinleriyle bir heterodimer oluşturur ve hücre savunma mekanizmasında görevli birçok antioksidan genin giriş promotor bölgesinde bulunan ARE (antioksidan yanıt elementi) dizilerine bağlanır ve reaktif türlere karşı hücresel savunmada önemli rollere sahip antioksidan enzimlerin ekspresyonunu indükler¹⁰²⁻¹⁰⁴. Böylece serbest radikalleri uzaklaştıran bu enzimler, güçlü bir antioksidan savunma mekanizması oluşturur. Hücresel redoks homeostazının tekrar sağlanmasının ardından, Keap1 nükleusa transloke olarak Nrf2'yi ARE'den ayırır ve Nrf2'nin baskılanmasına neden olur. Sonuç olarak Nrf2, oksidatif stresin sitotoksik etkilerine karşı primer hücresel savunma sistemi gibi davranır. Nrf2 / Keap1 sistemi, kanser, karaciğer toksisitesi ve inflamasyon gibi çeşitli hastalıklara karşı korunmaya katkıda bulunmaktadır¹⁰¹ (Şekil 20.).

Doğal olarak mevcut bileşikler tarafından Nrf2'nin aktivasyonu, diyabetin ve bununla ilişkili komplikasyonların patogenezeine karşı olumlu bir yaklaşımdır¹⁰⁵. Sulforafan, resveratrol, curcuminoidler ve epigallocatechin-3 gallat dahil olmak üzere birçok doğal ürünün, Nrf2'yi aktive ettiği ve hücresel fonksiyonları koruduğu bildirilmiştir¹⁰⁶. Ek olarak Hidroksitirozolün Nrf2 aktivasyonuna katkısı değerlendirildiğinde, Nrf2'nin nükleusa translokasyonunu aktive edebildiği ve böylece Nrf2 / ARE yolağının aktivasyonuna katkıda bulunabileceği gösterilmiştir^{107,108}.



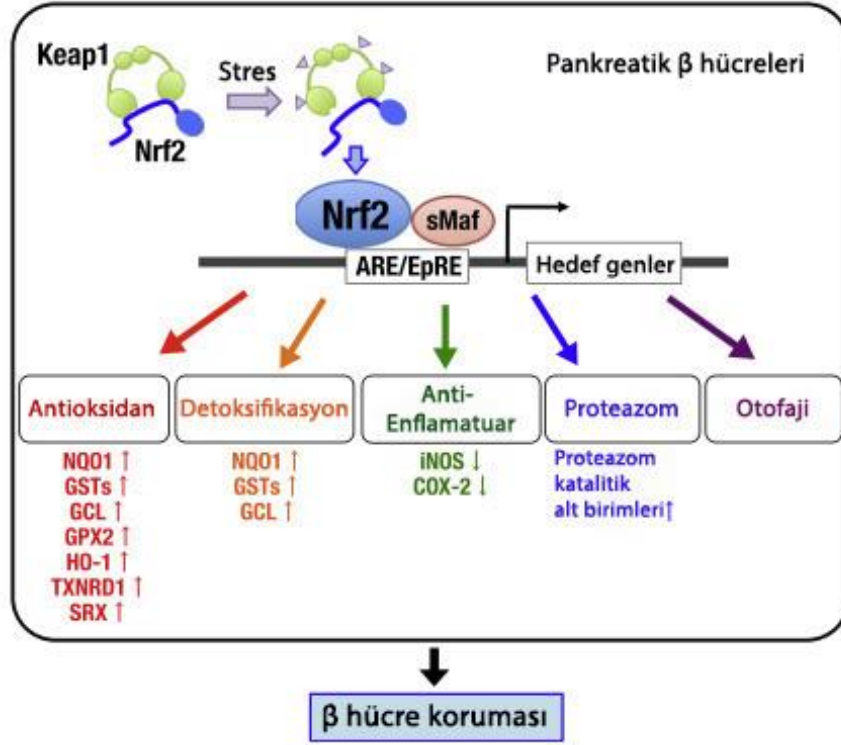
Şekil 20. Nrf2/HO-1 sinyal yolağı mekanizması. A) Normal şartlar altında (OS yokken): Keap1, aktin hücre iskeletine bağlanarak sitoplazmada Nrf2'yi alıkoyar. Nrf2 sürekli olarak Cullin 3 (Cul3) -Keap1 ubiquitin E3 ligaz kompleksi tarafından ubiquatine edilir ve proteazomda parçalanır. B) Oksidatif stres veya indükleyiciler altında: Nrf2, Keap1 baskılayıcısından ayrılarak nükleusa transloke olur ve ilgili sMaf proteinleri ile heterodimer oluşturur. Oluşan bu heterodimer ARE'ye bağlanarak hücresel savunmada önemli rolleri olan NAD(P)H, kinon oksidoredüktaz (NQO1), glutatyon S-transferaz (GST), hem oksijenaz-1 (HO-1) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonunu artırmaktadır. Nrf2: Nükleer faktör E2 ilişkili faktör 2; Keap1: Kelch benzeri ECH ile ilişkili protein 1; ARE: Antioksidan yanıt elementi. ⁽¹⁴⁾

2.6. Diyabet ve Nrf2

Nrf2, faz II metabolik ve antioksidan enzimler dahil olmak üzere çeşitli genlerin ekspresyonunun düzenlenmesinde, ROS / RNS aracılı hasarı bloke etmeye ek olarak, β hücre korunmasında hasarlara karşı kritik rol oynar^{7,109}. Langerhans adacıklarının antioksidan enzimleri zayıf bir şekilde eksprese ettiği ve düşük seviyeli antioksidan aktivitesini koruduğu bulgular, bize Langerhans adacıklarının oksidatif stresin, DM patogenezinde ve ilerlemesinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Pankreas β hücreleri kronik olarak serbest radikallerden, yanlış katlanmış proteinlerden, endoplazmik retikulum hiper aktivitesinden ve hasarlı mitokondriden kaynaklanan çeşitli stres tiplerine maruz kalırlar^{6,92,110-112}. Bu birikmiş stres, β hücre apoptozuna neden olur ve nihayetinde pankreasın bir bütün olarak işlev bozukluğuna yol açar¹¹³.

Antioksidan enzimlerin ekspresyon seviyelerinin genellikle pankreas β hücrelerinde düşük olması nedeniyle, pankreatik β hücrelerinin antioksidan enzimler/reaktiflerle tedavisinin, kemirgen diyabetik modellerde β hücrelerini OS'den kurtardığı rapor edilmiştir^{111,114,115}. Buna karşılık, Nrf2 geninin nakavt edilmesi, pankreas adacıklarındaki antioksidan enzim genlerinin ekspresyonunu azaltır^{116,117}. ROS ve RNS aracılı stres koşulları altında pankreas β hücrelerinde Nrf2'nin antioksidan fonksiyonlarını netleştirmek için, özellikle β hücrelerinde indüklenebilir NO sentazı (iNOS) aşırı eksprese eden transgenik fare hatları kullanılmıştır. İNOS transgenik farelerinin analizleri, Nrf2 indüksiyonunun, ROS / RNS aracılı β hücre hasarının yanı sıra β hücrelerinde ROS / RNS seviyelerini kuvvetle bastırdığını ve antioksidan enzim geni transkripsiyonunu düzenlediğini açıkça göstermiştir^{110,116}. Bu antioksidan işlevlerine ek olarak, Nrf2'nin birçok başka mekanizma yoluyla β hücre hasarını önlediği görülmektedir. Örneğin, Nrf2 indükleyici sülföraphane, sitokin aracılı iNOS ve COX-2 (siyogioksaz 2) indüksiyonunu kuvvetle bastırır ve böylece Nrf2'nin β hücrelerinde inflamasyonun baskılanmasına katkıda bulunduğunu gösteren β hücre hasarını iyileştirir¹¹⁸. Nrf2, β hücrelerinde otofajinin korunmasında da önemli rol oynar¹¹⁹. Nrf2, proteazom katalitik alt birimlerinin ekspresyonunu düzenler ve β hücrelerinde endoplazmik retikulum (ER) stres tepkisine katkıda bulunur¹²⁰.

Sonuç olarak Nrf2'nin doğal bileşiklerle aktive edilmesi, diyabetin patogenezinde rol oynayan hiperglisemi ile indüklenmiş OS'in ve bununla ilişkili komplikasyonların önlenmesinde umut veren bir yaklaşımdır. Nrf2 indüksiyonunun pankreatik β hücrelerinde RS hasarını önlediğini ve Keap1 / Nrf2 sisteminin pankreatik β hücrelerinin fizyolojik ve patolojik korunumu için önemli bir savunma yolu olduğu gösterilmiştir¹¹⁶ (Şekil 21.). Ayrıca Nrf2; karaciğer, iskelet kası ve pankreas β hücreleri gibi çoklu dokular dahil olmak üzere, diabetes mellitus başlangıcını önlemektedir¹¹⁷.



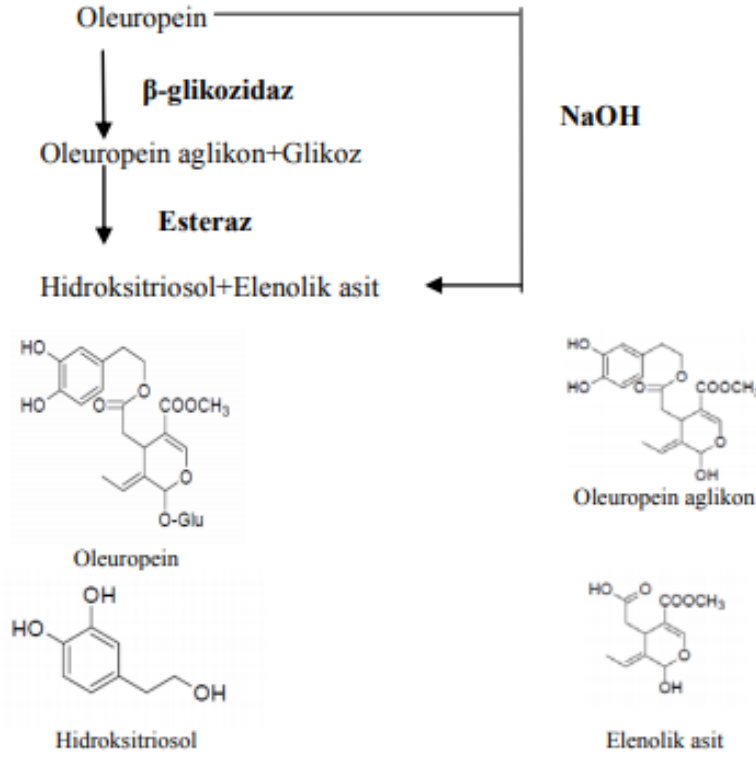
Şekil 21. Keap1-Nrf2 sistemi tarafından pankreas β hücre koruması. Stres aracılı Keap1 modifikasyonları, Nrf2'nin çekirdekte birikmesine ve sMaf proteinleriyle heterodimerize olmasına izin vererek Nrf2'yi stabilize eder. Nrf2-sMaf heterodimeri, cis etkili ARE/EpRE motiflerine bağlanır ve hedef gen ekspresyonunu indükler. Nrf2, antioksidan ve detoksifikasyon enzimlerinin ekspresyonunu artırır ve pankreas β hücrelerinde ROS seviyelerini azaltır. Nrf2 ayrıca, iNOS ve COX-2 dahil iltihapla ilgili gen ekspresyonunu da baskılar. Nrf2, proteasom ve otofaji dahil proteolitik sistemlerin korunmasına katkıda bulunur. Sonuç olarak, Keap1-Nrf2 sistemi pankreas β hücrelerini çeşitli gerilimlere karşı korur.⁽¹⁵⁾

2.7. Hidroksitirozol (HT)

Fenollerin aromatik çekirdeğindeki elektron delokalizasyonu, antioksidan etkilerinin ana nedenidir. Aslında, bu bileşikler serbest radikallerle reaksiyona girdiğinde, aromatik çekirdeğin rezonans etkisiyle stabilize olan yeni bir radikal meydana getirirler. Bu nedenle, radikal zincir reaksiyonlarından oluşan yayılma fazı engellenir ve ritim kaybının gelişmesi geciktirilir¹²¹. Fenoller arasında, Hidroksitirozol (3,4-dihidroksifeniletanol), ilginç antioksidan ve potansiyel faydalı özellikleri nedeniyle, yüksek katma değerli bir bileşik olarak göze çarpmaktadır⁶². Hidroksitirozol 154.16 g/mol moleküler ağırlığa ve feniletal alkol yapısına sahip olan bir amfipatik fenoldür. Uluslararası Saf ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) tarafından 3,4-dihidroksifeniletanol (DOPET), 3,4-dihidroksifenoletanol (3,4-DHPEA) veya 4-(2-Hidroksietil)-1,2-benzendiol olarak da adlandırılır¹²².

Zeytinyağında yaklaşık 1,9 mg/kg'lık bir konsantrasyonda bulunan HT en çok araştırılan fenolik bileşiklerden biridir¹²³. Bu bileşik, sızma zeytinyağında, çözünür fraksiyonda az miktarda bulunur. Hidroksitirozol zeytinlerin olgunlaşması, yağın depolanması ve sofralık zeytinlerin hazırlanması sırasında elde edilen oleuropeinin hidrolizi ile oluşur¹²⁴. Zeytinler yağlarını almak için işlendiğinde, polifenol bakımından zenginleştirilmiş üç farklı tabaka elde edilir: zeytin değirmeni atık suyu, prina ve zeytinyağı. Hidroksitirozolün amfipatik karakteri nedeniyle, bu üç faz; serbest bir formda, asetat formunda veya oleacein, verbascoside ve oleuropein gibi daha karmaşık bileşiklerin bir parçası olarak bulunabilir¹²². Ayrıca zeytin yapraklarında ve değişik konsantrasyonlarda farklı şarap türlerinde de bulunur (en çok kırmızı şarapta). Şaraptaki bu mevcudiyet mayalara ve bunların alkolik fermentasyonu sırasında tirozinden HT üretme kapasitelerine atfedilir^{125,126}. Aynı zamanda insanlarda endojen olarak sentezlenen bir dopamin metabolitidir¹²⁷. Bu nedenle, HT'ye maruz kalmak sadece alımından (EVOO, şarap) değil, aynı zamanda önemli derecede tüketilmiş bir oleuropein ve aglikondan kaynaklanmaktadır¹²⁶. Oleuropeinin bileşeni aglikon oluşturmak için glukozu kaybeder, daha sonra HT ve elenolik asite dönüşür^{62,128} (Şekil 22.).

Saf HT berrak, renksiz ve sıvı formdadır¹²⁹. Son yıllarda, polifenolik bileşikler bazı yaygın kronik hastalıkların önlenmesindeki etkinliklerinden dolayı büyük ilgi görmüştür. Polifenollerin, anti-enflamatuar, antioksidan, antialerjik, hepatoprotektif, antitrombotik, antiviral ve antikarsinojenik aktiviteler gibi ilginç biyolojik aktivitelere sahip olduğu bildirilmiştir. Hidroksitirozol (3,4-dihidroksifeniletanol), insan sağlığı üzerindeki potansiyel yararları ve antioksidan özellikleri nedeniyle, bu polifenoller arasında önemli bir yere sahiptir⁶². Yapılan çalışmalar, HT'nin kan-beyin bariyerini geçebileceğini ortaya çıkarmıştır¹³⁰. Hidroksitirozol, hidroksi izokromanları oluşturmak için aldehit ve keton gibi karbonil bileşikler ile reaksiyona girer. Zeytinyağı esas olarak 1-fenil-6,7-dihidroksi izokroman ve 1-(3'-metoksi-4'-hidroksi) fenil-6,7-dihidroksi izokroman içerir. Bu maddelerin seviyesi genel olarak düşüktür (8-1400 ng / kg) fakat HT ve karbonil bileşiklerin miktarına bağlı olarak değişir¹³¹. Yapılan çalışmalarda bu bileşiklerin hücre içine kolayca penetre olduğu, antioksidan özellik gösterdiği, lipid peroksidasyonunu önlediği, radikal yakaladığı ve hidrojen peroksit miktarını azaltarak OS'ye karşı hücreleri koruduğu¹³², aynı zamanda kalp damar hastalıklarında önemli rol oynayan platelet kümelenmesini azalttığı gösterilmiştir¹³³.



Şekil 22. Oleuropeinin β-glikozidaz enzimi ile hidrolizi. ⁽¹⁶⁾

Hem in vitro hem de in vivo modeller kullanarak yapılan birkaç çalışma, HT'nin; yararlı etkilerini ve antioksidan aktivitesini, kanser hücre büyümesinin inhibisyonu ve apoptoz indüksiyonu, kardiyovasküler ve nöronal korunma gibi çoklu biyolojik özellikleri olduğunu göstermiştir¹⁰⁷. Visioli ve arkadaşları HT'nin oleuropeine göre daha güçlü bir serbest radikal toplayıcı aktivitesini bildirmişlerdir¹³⁴. Hidroksitriosolün antioksidan aktivitesi β hücrelerini hasardan ve ölümden korur, bu da plazmadaki glukoz seviyesini azaltan insülin sekresyonunun artmasına neden olur⁵⁸. Hidroksitriosolün diyabetteki bu hipoglisemik etkisi üç şekilde açıklanabilir:

- 1) Pankreas hücrelerinin STZ tarafından arttırılmış ilerleyici hasardan korunması/ hücre yenilenmesinin arttırılması (oksovanadyum gibi diğer maddelere benzer şekilde)¹³⁵;
- 2) Tungstat gibi HT, insülinotropik etkileriyle insülin sekresyonunu artırabilir: HT, K_{ATP} kanallarını inhibe eder ve insülin sekresyonunda anahtar rol oynayan gerilime bağlı Ca kanallarını arttırır¹³⁶;
- 3) Oleuropein için daha önce yapılmış bir çalışmada tespit edildiği gibi HT de periferel glukoz alımını arttırır¹³⁷.

EVOO ve VOO uygulamasından/alımından sonra HT'nin doza bağı bir şekilde ve maksimum 5-30 dakikalık plazmatik konsantrasyonda biyoyararlı olduğuna dair güçlü kanıtlar vardır. Bu konsantrasyon hem sıçanlarda hem de insanlarda 1-2 dakikalık bir plazma yarı ömrüne sahiptir. Alındıktan sonra, HT'nin % 40'ından fazlası ince bağırsak ve kolon içine pasif taşıma yoluyla emilebilir¹²⁶. Hızlı bir emilim sürecine sahiptir ve alımdan yaklaşık 7 dakika sonra maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşır. Bir kez absorbe edildiğinde, hızla, bir antioksidan ve bir kardiyovasküler koruyucu olarak görev yapan lipoproteinlerin bir parçası olmaya başlayacaktır¹²² Fenolik biyoyararlanımın, yaş, hormonal durum veya cinsiyet gibi farklı faktörlerden etkilendiği iyi bilinmektedir^{138,139}. Ek olarak yapılan başka bir çalışma cinsiyetin, HT türevlerinin nihai biyoyararlanımı için kritik bir özellik olduğunu, HT'nin farklı oral uygulama biçimlerinin ardından bu bileşiğin dışı sıçanların vücudunda daha uzun süre kaldığı sonucuna varmıştır¹⁴⁰. Ayrıca, diğer çalışmalar, muhtemelen etanol ve dopaminerjik yollar arasındaki etkileşime bağı olarak, kırmızı şarap olarak tüketildiğinde HT'nin en yüksek idrar seviyelerine ulaştığını göstermiştir¹²².

Hidroksitirozolün Faz II reaksiyon enzimleri, aynı zamanda konjügasyon reaksiyonları olarak da adlandırılır ve plazmada tanımlanmış glukuronid ile sülfat metabolitlerini oluşturur¹⁴¹. Bunun sonucunda HT uygulamasından sonra insan plazmasında hem HT sülfat hem de HT asetat sülfat tespit edilmiştir. Ek olarak, HT ayrıca, absorbe edilmiş HT'nin bir kısmını hidroksile edilmiş fenilasetik asitlere dönüştüren bağırsak mikrobiyotası tarafından da yüksek oranda metabolize edilir¹²². HT atılımı ile ilgili olarak, bu bileşiğin alınan miktarlarının % 80'i idrarda geri emilir ve benzer şekilde yaklaşık % 90'ı da konjüge edilir¹²⁶. Hem HT hem de metabolitlerinin vücuttan tamamen atılması için gereken süre, insanlarda yaklaşık 6 saat, sıçanlarda ise yaklaşık 4 saattir¹²².

2.8. Hidroksitirozol (HT) ve Nrf2

Hidroksitirozol ile ilişkili en önemli faaliyetlerden biri ROS süpürücü rolüdür. Hidroksitirozol ve metabolitleri, hem hücre içi hem de hücre dışı ROS üretimini yok etmek için yüksek bir kapasiteye sahiptir¹⁴². Hücre dışı bir seviyede, HT ve türevleri, ROS'un zararlı etkilerini bloke ederek cilt hücrelerinde ROS süpürücü aktivite göstermiştir. Bu kapasite; ROS UV ışınımı/hem DNA zincirlerini kırabilen hem de genotoksisiteyi artırabilen peroksinitrit radikali tarafından üretildiğinde önemlidir.

Hücre içi HT ayrıca, özellikle süperoksit, hidrojen peroksit ve hipokloröz asit gibi serbest radikal moleküllerin yanı sıra metal bir şelatör gibi davranan olağanüstü bir ROS tutucu kapasitesine sahiptir¹⁴²⁻¹⁴⁵.

Bazı çalışmalar, Nrf2 ve JNK-p62 / SQSTM1'in modülasyonuna yol açan ARE gibi antioksidan yollarla ilgili HT için farklı etki mekanizmaları önermiştir^{146,147}. Hidroksitirosol ayrıca, Ppar γ koaktivatörü 1 α (PPARGC1 α) proteinini artırarak mitokondriyal biyogenez uyarıcı olarak da işlev görür¹⁴⁸. Benzer bir düzen, HT'ün hücreleri Akt ve ERK1 / 2'yi aktive ederek hidrojen peroksitin sitotoksik etkisine karşı koruduğu vasküler endotelial hücrelerde de (VEC) gözlenmiştir. Buna ek olarak, HT, Nrf2'nin ekspresyonunu ve nükleer translokasyonunu artırır, daha sonra bu tür DNA-onarım proteinleri veya faz II detoksifiye edici enzimler gibi antioksidan tepki elemanlarını kodlayan çoklu genlerin aktivasyonunu teşvik eder¹⁴⁹⁻¹⁵¹. Ancak bilim adamları çalışma insanlarda yapıldığında, HT'nin Nrf2'yi aktive edebileceğinin kanıtını henüz bulamadı, sonuç olarak bu mekanizmayı açıklığa kavuşturmak için daha fazla klinik çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır¹⁴⁹⁻¹⁵¹.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamız, Düzce Üniversitesi Deneysel Hayvanlar Etik Kurulu'ndan 2018/5/3 numaralı karar ile onay alınarak (Bkz: Ek-1) Düzce Üniversitesi Deneysel Hayvanlar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yürütüldü. Ayrıca Düzce Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 2019.04.01.907 proje numarası ile desteklendi.

3.1. Deneysel Hayvanlar

Çalışmada kullanılan deneysel hayvanlar Düzce Üniversitesi Deneysel Hayvanlar Merkezi'nden (DÜHAM) temin edildi. Hayvanlar çalışma başlayıncaya kadar ve çalışma süresince DÜHAM'da, standart koşullarda 12 saat aydınlık/karanlık döngüsüne uygun $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ oda ısısında, $60\pm 5\%$ nemli ortamda tutularak, ad libitum besin ve su ile beslendiler. Çalışmaya 28 adet 2-6 aylık ve 270 ± 30 gr ağırlığında sağlıklı erkek Wistar Albino sıçan ile başlandı ancak 1 sıçanın sebebi belirlenemeyen ölümü nedeniyle 27 örnek ile tamamlandı.

3.2. Deneysel Gruplar

Denekler rastgele seçilerek; Grup 1: Kontrol grubu (n=5), Grup 2: Diyabet kontrol grubu (STZ) (n=9), Grup 3: HT kontrol grubu (HT) (n=5), Grup 4: Tedavi grubu (STZ+HT) (n=9) olmak üzere 4 ayrı grup oluşturuldu. Deneye başlamadan önce sıçanlardan alınan kan örneği ile kan glukoz düzeylerine bakılarak normal değerlere sahip denekler çalışmaya alındı. Deneysel diyabet oluşturmak amacıyla Streptozotosin (STZ) (Sigma-S0130) kullanıldı. Gruplara ayrılan hayvanlara deney başlangıcında tek doz olmak üzere STZ, devamında ise 30 gün boyunca 10.00-12.00 saatleri arasında Tablo 3.'de belirtilen maddeler uygulandı. Grup 2 ve 4'ü oluşturan sıçanlara steril distile su (dH_2O) içerisinde eritilen STZ tek doz 55 mg/kg i.p. olarak enjekte edildi. STZ enjeksiyonundan 48 saat sonra, kuyruk ucundan alınan kan örneği ile elde edilen kan glukoz düzeylerine dayanarak diyabetik sıçan modelinin oluşturulması doğrulandı. Kan glukoz değerleri ≥ 250 mg/dL olan sıçanlar diyabetik kabul edildi. STZ+HT grubu sıçanlar diyabetik olarak kabul edildikten sonra hidroksitirosol (HT) (Cayman-70604) 30 gün süreyle, günde birer kez 10 mg/kg i.p. enjeksiyon yoluyla verildi. 30 günün sonunda hayvanlar, Ketamin (90 mg/kg) + Ksilazin (10 mg/kg) enjeksiyonu ile anestezi altına alınarak kurban edildi. Dokular %10'luk formaldehite alınıp tespit edildi.

Tablo 3. Diyabetik rat modeli, deney grupları, maddeler ve veriliş yolları

Grup No	Grup Adı	Verilen Maddeler	Verilen Miktar	Veriliş Şekli	Hayvan Sayısı
1	Kontrol Grubu	Salin	1 ml/kg	i.p.	5
2	Diyabet Kontrol	Streptozotosin (tek doz)	55 mg/kg	i.p.	9
3	HT Kontrol	Hidroksitirozol (30 gün)	10 mg/kg	i.p.	5
4	HT+STZ	Hidroksitirozol (30 gün) + Streptozotosin (tek doz)	10 mg/kg ve 55 mg/kg	i.p.	9

3.3. Diyabet Oluşturma Modeli

Deneysel diyabet oluşturmak amacıyla STZ kullanıldı. Diyabet oluşturulurken, STZ enjeksiyonundan 12 saat önce sıçanlar hiperglisemiye karşın aç bırakıldılar. Enjeksiyon öncesi sıçanlar tartılıp, açlık kan glukoz değerleri kuyruk ucundan lansetle elde edilen kandan ACCU-CHEK® Performa Nano cihazı kullanılarak ölçüldü. Ayrıca sıçanların vücut ağırlığına göre STZ çözelti miktarı hesaplandı. STZ çözeltisi; 9 ml steril distile su (dH₂O) içinde çözülerek hazırlandı. Tek doz 55 mg/kg STZ ip. olarak uygulandı. STZ enjeksiyonundan 48 saat sonra sıçanların kuyruk ucundan alınan kandan, kan glukoz değerleri ölçülerek diyabet tayini yapıldı. Kan glukoz değeri 250 mg/dL ve üzeri olan sıçanlar diyabetik kabul edildi.

3.4. Hidroksitirozolün Hazırlanması

Koruyucu rolünü öğrenmek amacıyla kullanılan hidroksitirozol toz halinde satın alındı (Cayman-70604). Toplam 1 gram olan stok hidroksitirozol 5 ml steril distile suda (dH₂O) çözüldü. Hazırlanan stok buzdolabında saklandı ve uygulama zamanına kadar ışıktan korundu. Stok hidroksitirozolden günlük 45 mg (225 µl) çözelti falkon tüpüne alındı ve üzerine 8775 µl dH₂O eklendi (9000 µl). Deney süresi boyunca her gün saat 10:00 ile 12:00 arasında deneklere enjeksiyon yapıldı.

3.5. İntraperitoneal Enjeksiyon Uygulaması

Sıçan uygun bir şekilde tutulduktan sonra, abdomen bölgesinin sağ veya sol alt kadranına insülin enjektörü ile 45 derecelik bir açıyla deriye girildi. Deri altında bir miktar ilerledikten sonra hafifçe itilerek, karın kasları geçildi. Bu işlem sırasında visseral organlara ve bezlere zarar verilmemesine dikkat edildi. Abdomen boşluğunda olduğunun doğrulanması için enjektör ucu hafifçe yukarı kaldırıldı (enjektör ucu serbest hareket ediyor olmalı) ve madde enjekte edildi.

3.6. Pankreas diseksiyonu

Ketamin (90 mg/kg) + Ksilazin (10 mg/kg) kullanılarak tüm sıçanlar uyutulduktan sonra karın bölgesi dikkatli bir şekilde açılarak pankreasları çıkarıldı. Çıkarılan pankreas örnekleri histolojik çalışmalar için %10'luk formaldehit içerisinde fiksasyon işlemleri için beklemeye alındı (Şekil 23.).



Şekil 23. Pankreas diseksiyonu. Ok ucu pankreas.

3.7. Işık Mikroskopik İncelemeler

1. Fiksasyon (Tespit);

1.1. Dokular %10'luk formaldehit ile yaklaşık 12-24 saat fikse edildi (Şekil 24.).

2. Dehidratasyon (Sudan kurtarma);

2.1. %70'lik ve %80'lik alkollerde sırayla 15'er,

2.2. İki farklı kaptaki %90'lık alkollerde 30'ar,

2.3. Üç farklı kaptaki %96'lık alkollerin ilk ikisinde 30'ar, sonuncusunda 45,

2.4. Asetonda 45 dakika süreyle bekletildi.

3. Şeffaflaştırma (Işığa karşı geçirgenlik artırılır);

3.1. Ksilol-1'de 10, Ksilol-2'de 20 dakika bekletildi.

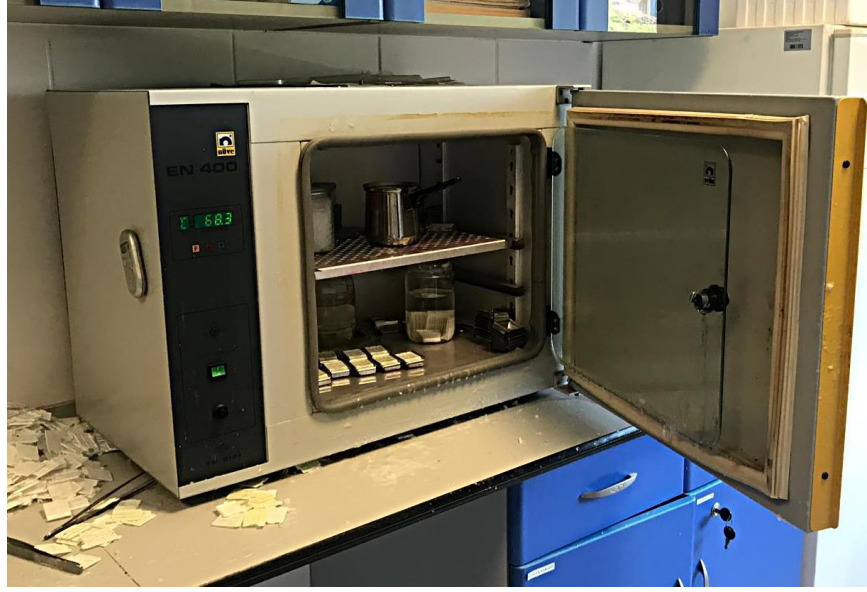
4. Gömme (Dokular ince kesitler alınabilmesi için parafine gömülür);

4.1. 75°C sıcaklıktaki etüvde. parafin-1, parafin-2 ve parafin-3 içinde sırasıyla 10. 20 ve 30'ar dakika bekletildi (Şekil 25.).

4.2. Takip edilen dokular metal base mold içerisinde parafine gömülerek etiketleme yapıldı (Şekil 26.).



Şekil 24. Fomaldehit içinde dokulara uygulanan fiksasyon işlemi. Dokuların canlı halleri ile tespit edilmesi ve çürüme/bozulmalarını önlemek için fiksatif maddeler ile sabitlenmesi gerekir.



Şekil 25. Etüvde parafınle doku gömme işlemi. 75°C'lik etüvde sıvılaştırmış parafın içinde dokular 1 saat bekletilir. Daha sonra dokular metal base mold içinde parafına gömülür.



Şekil 26. Histolojik kesitler için hazırlanan parafın bloklar.

Hazırlanan bloklardan Leica RM2245 mikrotom cihazı ile 4-5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Bu kesitlere genel dokuyu değerlendirmek için Hematoksilen-Eozin (HE) ve Gomori Trikrom boyaması; oksidatif stresi göstermek amacıyla da Nrf2 antikor ile immünohistokimyasal boyamalar yapıldı (Şekil 27.).

3.7.1. Histolojik teknikler

Histolojik incelemeler, hücre ve dokuların yapısal özelliklerinin, mikroskopik yöntemler yardımı ile gözlemlenebilir olmasını sağlar. Kullanılan özel boyalarla istenilen hücre içi ve/veya hücre dışı yapıların ayırt edilmesine ve tanımlanmasına olanak sağlar.

3.7.1.1. Hematoksilen-eozin boyaması

1. Deparafinizasyon;

- Doku dışı parafini eritmek için, parafin kesitler 75°C sıcaklıktaki etüvde 40,
- Doku içi parafini eritmek için ise ksilol-1 ve ksilol-2'de 15'er dakika bekletildi.

2. Hidratasyon;

- Kesitler %96'lık, %80'lik ve %70'lik etil alkollere sırayla 10'ar defa daldırıldı.
- Akan suda yıkandı.

3. Boyama;

- Hematoksilende 2 dakika bekletildi.
- Tekrar akan suda yıkandı.
- Diferansiyasyon için asit alkole 2 defa daldırıldı.
- Akan suda yıkandı.
- Amonyaklı suya 2 defa daldırıldı.
- Akan suda yıkandı.
- %70'lik etil alkole 10 defa daldırıldı.
- Eozine 10 defa daldırıldı ve akan suda yıkandı.

4. Dehidratasyon;

- %70'lik, %80'lik ve %96'lık etil alkollere sırayla 10'ar defa daldırıldı.

5. 1-2 dakika 75°C sıcaklıktaki etüvde kurutularak 10 dakika ksilolde bekletildi.

6. Ksiloldan çıkan ve oda sıcaklığında kuruyan lamlar entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı.

7. Işık mikroskobu ile incelendi (Olympus Cx41-AxioCam Zeiss).

3.7.1.2. Gomori trikrom boyaması

1. Deparafinizasyon;
 - Parafin kesitler 45 dakika 75°C sıcaklıktaki etüvde,
 - 30 dakika ksilolde deparafinize edildi.
2. Hidratasyon;
 - Kesitler %96'lık, %80'lik ve %70'lik etil alkollere sırayla 10'ar defa daldırıldı.
 - Akan suda yıkandı.
3. Boyama;
 - Bouin solüsyonunda 75°C sıcaklıktaki etüvde 30 dakika bekletildi.
 - 3 ayrı kapta bol su ile yıkandı.
 - Hematoksilende 1 dakika tutulduktan sonra 3 ayrı kapta bol su ile yıkandı.
 - Trikrom solüsyonunda 45 dakika bekletildi.
 - %0,5'lik asetik asitle diferansiye edildi.
 - Akan suda yıkandı.
4. Dehidratasyon;
 - %70'lik, %80'lik ve %96'lık etil alkollere sırayla 10'ar defa daldırıldı.
5. 1-2 dakika 75°C sıcaklıktaki etüvde bekletilerek kurutuldu.
6. Ksilolde 10 dakika bekletildi.
7. Oda sıcaklığında kuruyan lamalar entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı.
8. Işık mikroskobu ile incelendi (Olympus Cx41-AxioCam Zeiss).

3.7.2. İmmunohistokimyasal teknikler

İmmünohistokimya tekniği, bir hücre/dokuda bir antijen (protein) veya hücrenin araştırılmasıdır. Bu teknikte, çalışılan dokuda aranan antijenler; antikor uygulamasından sonra, antikorun antijene spesifik olarak bağlanması ile tanımlanabilir. Uygulama antikorların antijenleri tanımlayarak, tespit edilmesini sağlayan bir dizi adımdan oluşur.

3.7.2.1. Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) hazırlama

- 2,85 gram di sodyum hidrojen fosfat
- 16 gram sodyum klorür
- 0.8 gram potasyum dihidrofosfat

2 litre distile suda (dH₂O) çözülerek pH: 7,2 ile 7,4 arasında ayarlanır.

3.7.2.2. Sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi hazırlama

8 gram sodyum hidroksit 100 ml dH₂O içinde çözülerek NaOH hazırlanır.

3.7.2.3. Hidrojen peroksit (H₂O₂) çözeltisi hazırlama

%35'lik hidrojen peroksitten 70 ml %3'lük hidrojen peroksit hazırlamak için, 6 ml H₂O₂ 64 ml metanol ile karıştırılır.

3.7.2.4. Sitrik asit çözeltisi hazırlama

10 mM sitrik asit hazırlamak için; 2,10 gram sitrik asit, 900 ml dH₂O içinde çözülür, NaOH eklenerek pH:6'ya ayarlanır.

3.7.2.5. Nrf2 immün işaretleme

1. Poli L Lizinli lamlara alınan kesitler bir gece önceden 56°C'lik etüvde bekletildi.
2. Ertesi sabah deparafinizasyon için iki ayrı ksilolde 10'ar dakika bekletildi.
3. Daha sonra her birinde 5 dakika olmak kaydıyla %100, %90, %80, %70'lik etil alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi.
4. Kesitler distile suda 7 dakika çalkalandı.
5. Antijenik maskelenmenin giderilmesi amacıyla, kesitler 0.01 M sitrat tamponuna (pH:6.0) konularak mikrodalga fırında 4 ve 3 'er dakika 750 Watt'ta kaynatıldıktan sonra 20 dakika boyunca oda ısısında soğumaya bırakıldı.
6. Fosfat tamponlu tuz tamponunda (PBS; pH: 7.2-7.4) 2x5 dakika yıkandı.
7. Endojen peroksidaz aktivitesinin giderilmesi amacıyla kesitler %3'lük hidrojen peroksit ile 20 dakika inkübe edildikten sonra 3x5 dakika PBS ile yıkandı.
8. Kesitlerin etrafı hidrofobik kalemle (Pap-pen) çizildi.
9. Kesitler, oda sıcaklığında ve nemli ortamda özgül olmayan Immunoglobulin (Ig) bağlanmalarını önlemek amacıyla bloklama serumu ile 7 dakika muamele edildi.
10. Serumun fazlası alınarak kesitler, Nrf2 primer antikorları eklendi (Antikor PBS ile 1/300 oranında dilüe edildi).
11. Kontrol kesitlerine primer antikor yerine uygun izotip kontrol uygulandı.
12. Nrf2'li kesitler nem odasında +4°C'de gece boyu inkübe edildi.
13. Ertesi gün kesitler PBS ile üç defa beşer dakika yıkandı.
14. Daha sonra sırasıyla, 30 dakika biyotinlenmiş sekonder antikor ve 20 dakika AP-konjuge streptavidin kompleksi ile oda ısısında nemli ortamda inkübe edildi.

Her iki uygulama sonrasında da PBS ile 3 defa 5'er dakika yıkama yapıldı.

15. Sinyalleri geliştirmek için dokular 5 dakika Di Amino Benzidin (DAB) kromojeni ile muamele edildi ve disitle suda yıkandı (1500 ml DAB substrat + 75 ml DAB kromojen, 40 saniye).

16. Kesitlere Mayer's Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı (50 saniye).

17. Akan suda yıkanan kesitler her birinde 10 dip olmak kaydıyla %70, %80, %90'lık etil alkol serilerinden geçirildi.

18. %100'lük etil alkolde 4 dakika tutularak dehidrate edildi.

19. Ksilolde 10 dakika bekletildikten sonra oda sıcaklığında kuruyan lamlar entellan ile kapatıldı.

20. Işık mikroskobu ile incelendi (Olympus Cx41-AxioCam Zeiss).



Şekil 27. Işık mikroskopik incelemeler için hazırlanan pankreas doku preparatları.

3.7.2.6. İstatistiksel analiz

Deney gruplarına ait dokularda Nrf2 İHC boyanması pozitif olan hücre sayıları ve İHC boyanma yoğunlukları İmageJ (İmageJ, versiyon Java 1.8.0_112(64-bit), 2018, Ulusal Sağlık Enstitüleri, USA) programı ile tespit edildi. Daha sonra GraphPad Prism 8 (GraphPad Prism versiyon 8.0.2 (263), 2019, San Diego, California, USA) ile tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ve gruplar arası farklılıkta mixed-effect analysis testi kullanılarak istatistiksel analiz sonuçları belirlendi. $p \leq 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

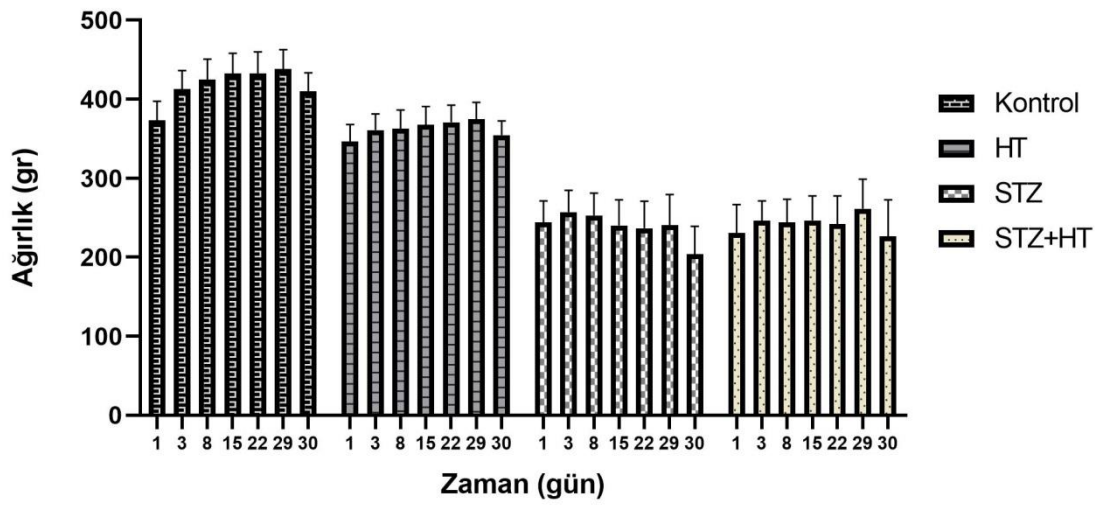
4.1. Vücut Ağırlığı ve Su Tüketim Profilleri

Deneyin 1, 3, 8, 15, 22, 29 ve 30. günlerinde tüm hayvanların vücut ağırlıkları ölçüldü ve gruplar one-way Anova testi ile değerlendirildi. Kontrol ve hidroksitirozol (HT) grubu hayvanların ölçülen vücut ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. Şekil 28.'de gösterildiği gibi, diyabetin başlatılması, diyabetik grupların hayvanlarının vücut ağırlığında önemli bir azalmaya yol açtı. Bunun sonucunda Streptozotosin (STZ) grubundaki hayvanlarda istatistiksel açıdan ileri derecede anlamlı bir düşüşün olduğu gözlemlendi ($p \leq 0,05$). STZ+HT grubundaki hayvanlarda ise 3 ve 7. günlerde bir düşüş olurken 14, 21 ve 28. günlerde istatistiksel açıdan anlamlı olmayan bir artış olduğu gözlemlendi. Her grubun 1. ve 30. günler arasındaki vücut ağırlık değerleri hesaplandı ve ortalama vücut ağırlık değerleri karşılaştırıldı (Tablo 4. - Şekil 28. ve Şekil 29.) Sonuçlar, HT tedavisinin STZ'nin neden olduğu vücut ağırlık düşüşünü engellediğini gösterdi.

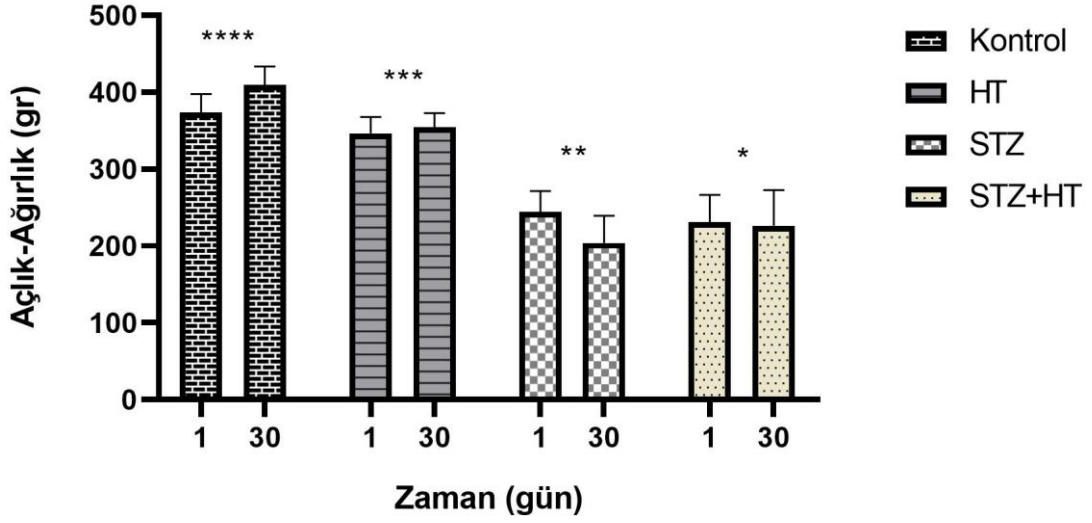
Diğer bir önemli kantitatif parametre, deney gruplarının ortalama günlük su tüketimlerinin değerlendirilmesidir. Deneyin ilk gününden son gününe kadar tüm grupların her gün düzenli olarak su tüketim miktarları ölçüldü ve diyabetik grupların su tüketim miktarının kontrol grubuna kıyasla önemli düzeyde artış gösterdiği belirlendi (Şekil 30.). Bu artış miktarları T1DM'nin önemli fizyopatolojik tanıları arasında bulunan polidipsiyi desteklemekteydi. Bununla birlikte STZ+HT grubuna ait hayvanların STZ grubundaki hayvanlara oranla su tüketimi belirgin şekilde azaldı. HT grubu sıçanlarda ise su tüketim miktarı hemen hemen kontrol grubunun su tüketimine eşitti.

Tablo 4. Deney gruplarının ağırlık dağılımları

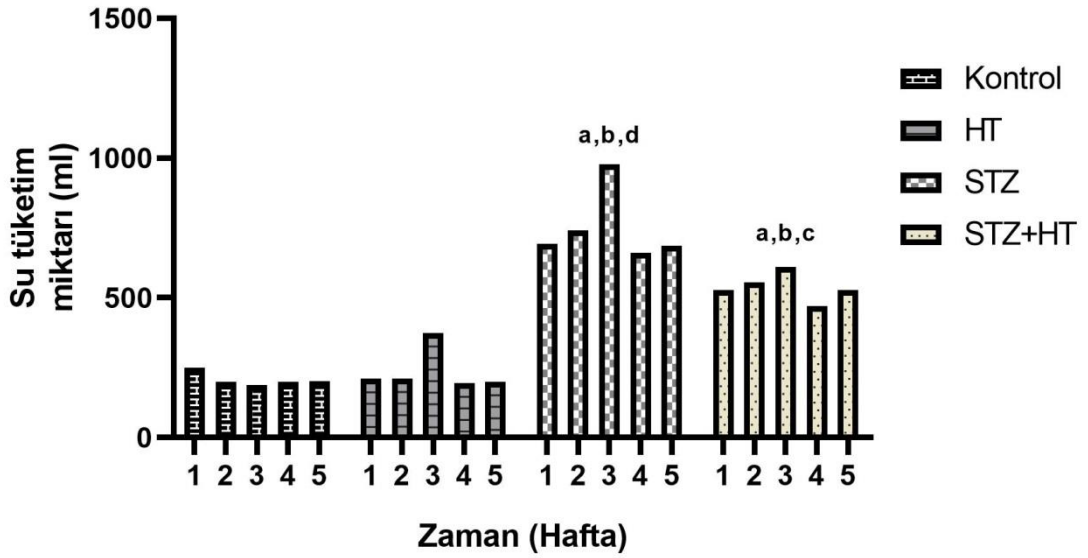
Günler	Kontrol	HT	STZ	STZ-HT
1.(Açlık)	373,4±21,56	246,4±19,18	244,2±25,50	230,8±33,71
3.	412,8±21,21	360,8±18,30	257,2±25,89	246,4±23,31
8.	424,8±23,13	362,6±21,14	252,8±26,71	244,3±27,37
15.	432,6±23,03	367,6±20,85	240,2±30,66	246,7±29,10
22.	432,6±24,60	370,6±19,60	236,7±32,29	242,1±33,67
29.	438±22,30	374,6±19,39	240,7±36,34	261,7±35,16
30.(Açlık)	409,8±21,09	354,4±16,30	203,8±33,44	226,6±43,08



Şekil 28. Deney hayvanlarının günlere göre ağırlık dağılımları ($p \leq 0,05$).



Şekil 29. Deney gruplarının açlık ağırlık dağılımları. * anlamlı olmayan ağırlık azalışını, ** anlamlı ağırlık azalışını, *** anlamlı olmayan ağırlık artışını, **** anlamlı ağırlık artışını göstermektedir ($p \leq 0,05$).



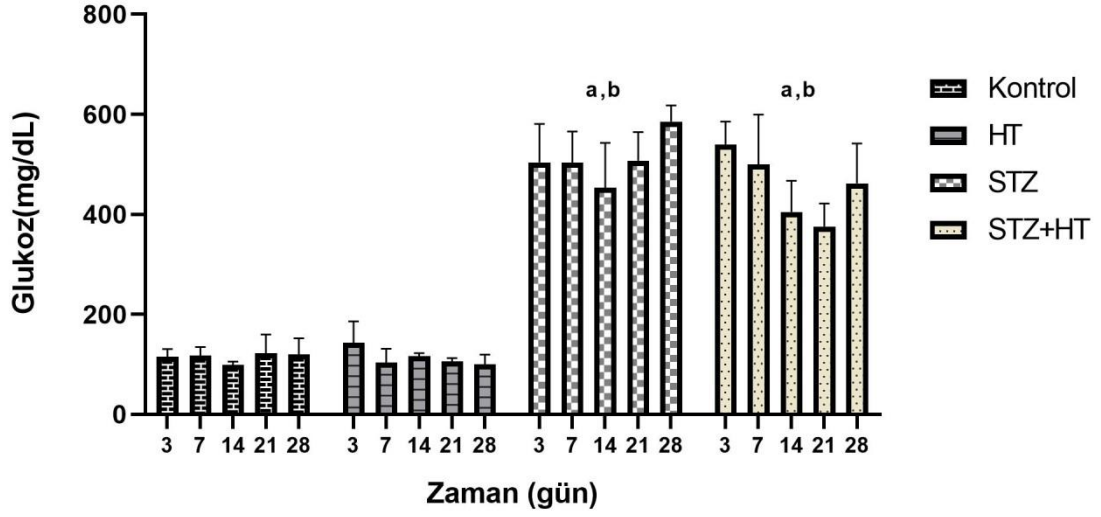
Şekil 30. Deney gruplarının haftalara göre su tüketim miktarları. **a:** kontrole göre, **b:** HT'ye göre, **c:** STZ'ye göre ve **d:** STZ+HT'ye göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir ($p \leq 0,05$).

4.2. Kan Glukoz Düzeyleri

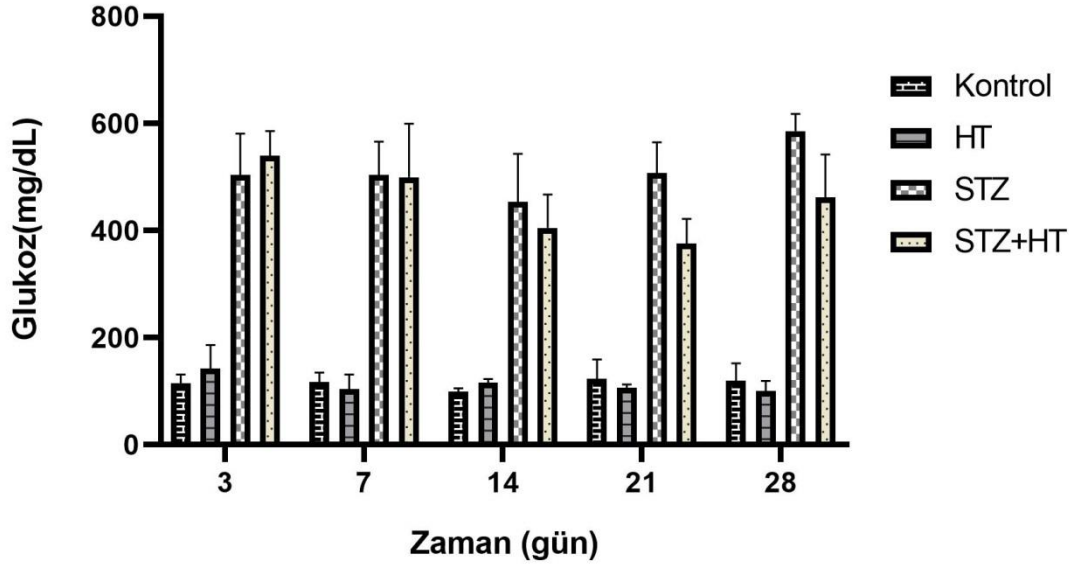
Diyabetin indüklenmesi, Şekil 31.'de gösterildiği gibi kan glukoz seviyesinde önemli bir artışa neden oldu. Hidroksitirosolün, STZ'nin indüklediği T1DM'yi önleyip önlemediğini değerlendirmek için kan glukozu 4 grupta periyodik olarak ölçüldü (3, 7, 14, 21, 28 ve 30. günlerde) ve gruplar kendi içlerinde one-way Anova testi ile değerlendirildi. Kontrol ve HT gruplarının kan glukoz seviyelerinde ilk günden son güne kadar belirgin bir fark gözlenmezken, STZ grubunda 48 saat sonra ölçülen (3. gün) kan glukoz seviyesi de dahil olmak üzere 30. güne kadar yapılan ölçümlerin tümünde yüksek glukoz seviyeleri gözlemlendi ($p \leq 0,05$). STZ-HT grubu da STZ grubuna benzer bir kan glukoz düzeyi sundu. HT tedavisi diyabetik sıçanlarda kan glukoz seviyelerini bir miktar düşürmesine rağmen bu düşüş istatistiksel açıdan anlamlı değildi. (Tablo 5. - Şekil 31-33.).

Tablo 5. Deney gruplarının kan glukoz değerleri

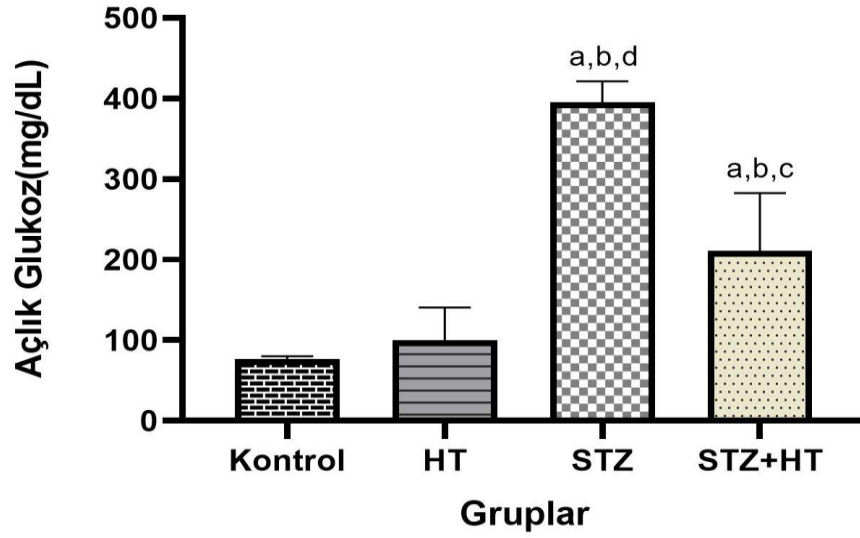
Günler	Kontrol	HT	STZ	STZ-HT
3. Gün	114,8±14,46	142,8±38,78	426,4±108,38	502,3±96,16
7. Gün	117,4±15,66	103,8±24,79	517,1±45,49	494,1±108,53
14. Gün	99,4±5,57	116±6,06	437,4±64,18	429,3±143,81
21. Gün	122,8±32,88	106±5,86	523,4±56,51	360,6±104,17
28. Gün	119,6±29,26	100,2±17,26	577,1±30,61	417,6±135,99
30. Gün (Açlık)	76,4±3,44	100,4±36,15	396,3±58,31	235,2±152,61



Şekil 31. Grupların glukoz değerleri. STZ enjeksiyonundan 48 saat sonra 3. gün kan glukoz seviyeleri ölçülerek diyabet oluşumu doğrulandı. **a:** kontrole göre, **b:** HT'ye göre, **c:** STZ'ye göre ve **d:** STZ+HT'ye göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir ($p \leq 0,05$).



Şekil 32. Grupların günlere göre glukoz değerleri ($p \leq 0,05$).



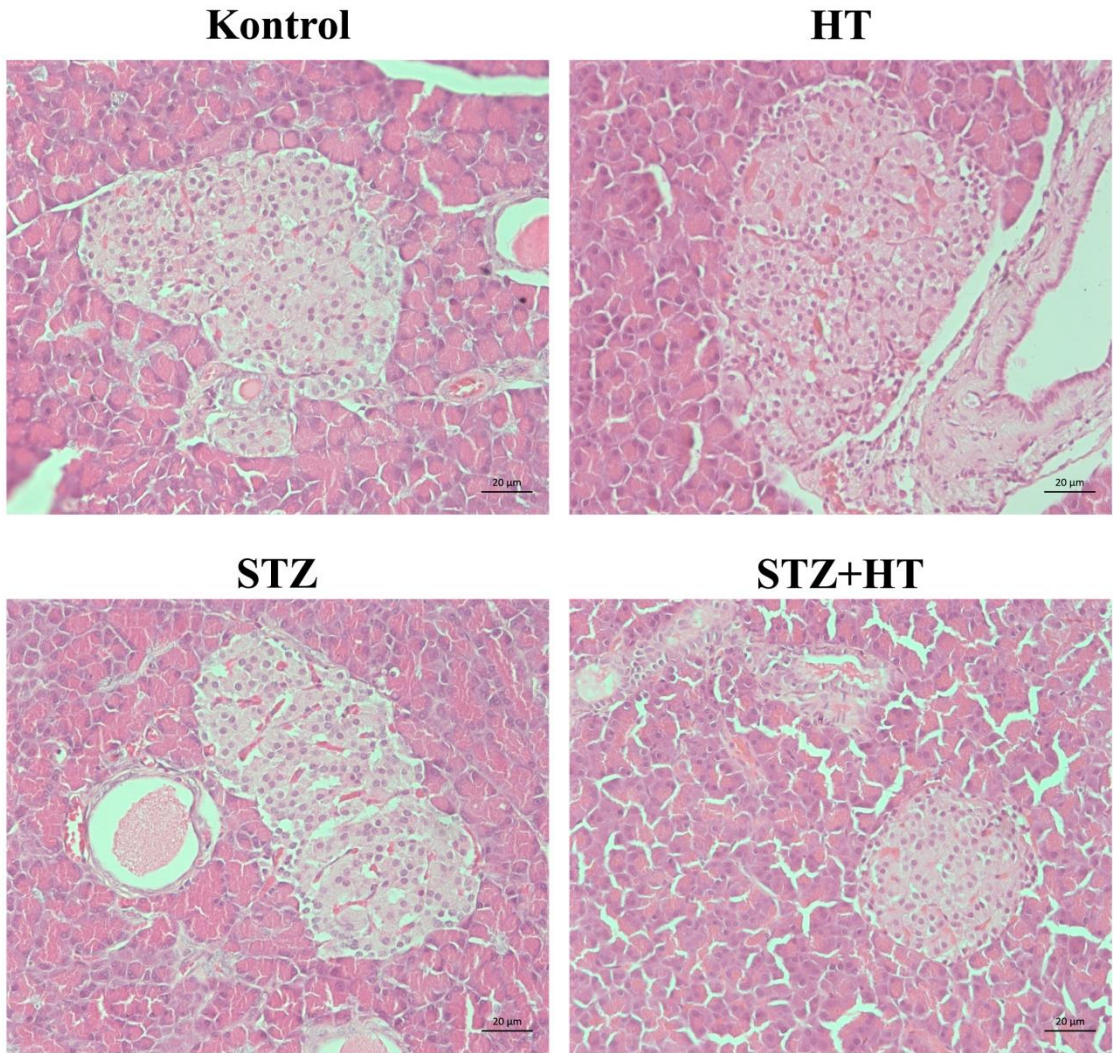
Şekil 33. Grupların 30. gün açlık glukoz değerleri. **a:** kontrole göre, **b:** HT'ye göre, **c:** STZ'ye göre ve **d:** STZ+HT'ye göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir ($p \leq 0.05$).

4.3. Histolojik Bulgular

Pankreas dokusunun histolojik analizi, STZ'nin β hücre yıkımına neden olduğunu gösterdi. Hematoksilen & eozin ve gomori trikrom boyamaları kullanılarak yapılan histopatolojik incelemelerde; kontrol, STZ, HT ve STZ+HT gruplarının ekzokrin kısımlarında hiçbir anormal durum gözlenmemesine karşın STZ ve STZ+HT gruplarının endokrin kısımlarında belirgin patolojiler görüldü. Normal kontrol sıçanlarında; Langerhans adacık (LA) morfoloji ve histolojisi, iyi biçimlendirilmiş yuvarlak şekil, büyük boyut ve normal yapı sergilerken, diyabetik sıçanlar yarı kantitatif analiz sonucu şişen çekirdeğe sahip hücreleriyle, belirgin şekilde düzensiz ada sınırı ve adacık dejenerasyonu gösterdi. Bununla birlikte STZ grubu sıçanların kontrol grubu sıçanlara kıyasla LA büyüklüğünde bir azalma ve adacık hücrelerinde belirgin tahribat gözlemlendi. Diyabetik ratlarda hidropik dejenerasyon ile uyumlu olarak sitoplazmada berrak vakuollere sahip adacık hücreleri görülürken HT ile muamele edilen diyabetiklerde azalmış tahribat gözlemlendi. Çoğu hücrenin özellikle perifer bölgesindekilerin sitoplazmik sınırları belirsiz ve dağınıktı. HT tedavisine 4 hafta maruz kalan diyabetik sıçanlar (10 mg/kg/gün) STZ sıçanlarına kıyasla adacıkların morfolojisini normalleştirdi. Ek olarak HT ile muamele edilmiş diyabetik sıçanlar, hücre yenilenmesinin yanı sıra hücre sayısının arttığını ve normal sıçanlara benzer adacık morfolojisine sahip olduğunu gösterdi.

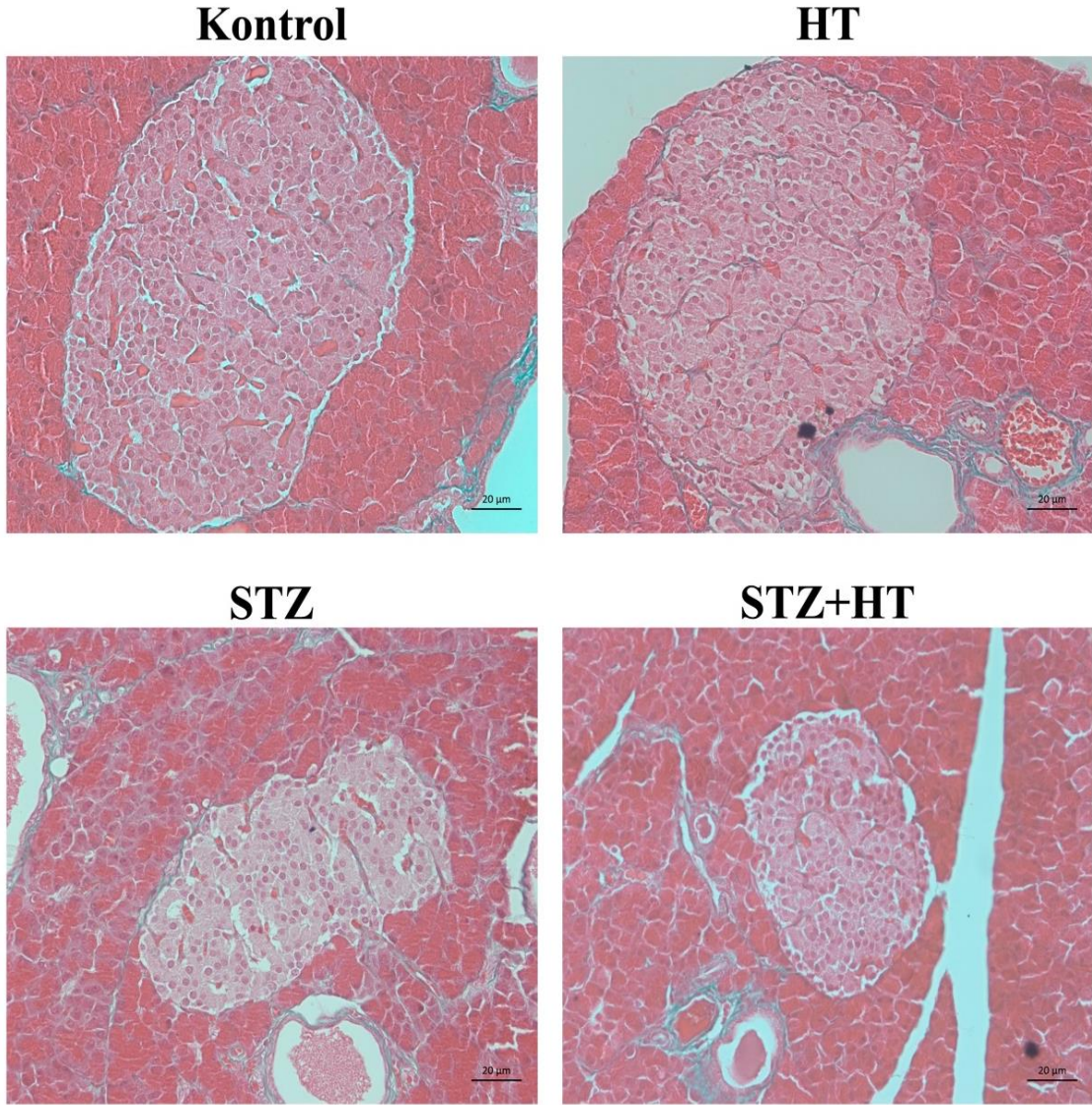
Bu sıçanlar hala diyabetikti ancak kan glukoz düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı olmasa da bir miktar azaldı (Şekil 34,35.). Bu, STZ'nin, pankreas β hücrelerine zarar vermesine karşı HT'nin koruyucu etkisi olduğunu göstermektedir. Bunların yanında HT ile tedavi edilen sıçanlar, kontrol sıçanlarına benzer normal histoloji gösterdi.

Hematoksilen & Eozin



Şekil 34. Sıçanlarda STZ ile indüklenen diyabette HT'nin pankreas üzerine etkisi. Her grupta bulunan sıçanlardan elde edilen pankreas dokuları 30 günlük tedaviden sonra H&E ile boyandı ve ışık mikroskobu altında incelendi (H&E, büyütme: x 40, skala bar: 50 μ).

Gomori Trikrom



Şekil 35. Sıçanlarda STZ ile indüklenen diyabette HT'nin pankreas üzerine etkisi. Her grupta bulunan sıçanlardan elde edilen pankreas dokuları 30 günlük tedaviden sonra gomori trikrom ile boyandı ve ışık mikroskobu altında incelendi (Gomori Trikrom, büyütme: x 40, skala bar: 50 µ).

4.4. İmmünohistokimyasal Bulgular

Oksidatif stres, STZ'in indüklediği DM'de indükleyici bir rol oynar. Bu çalışmada HT'nin antioksidan mekanizmasını değerlendirmek için immünojenik olarak Nrf2 ekspresyonunu değerlendirdik. Olympus Cx41 mikroskopunda 40x objektif kullanılarak elde edilen görüntüler AxioCam Zeiss görüntüleme sistemi aracılığı ile bilgisayara aktarıldı ve ölçümler Zeiss bilgisayar programı kullanılarak yapıldı.

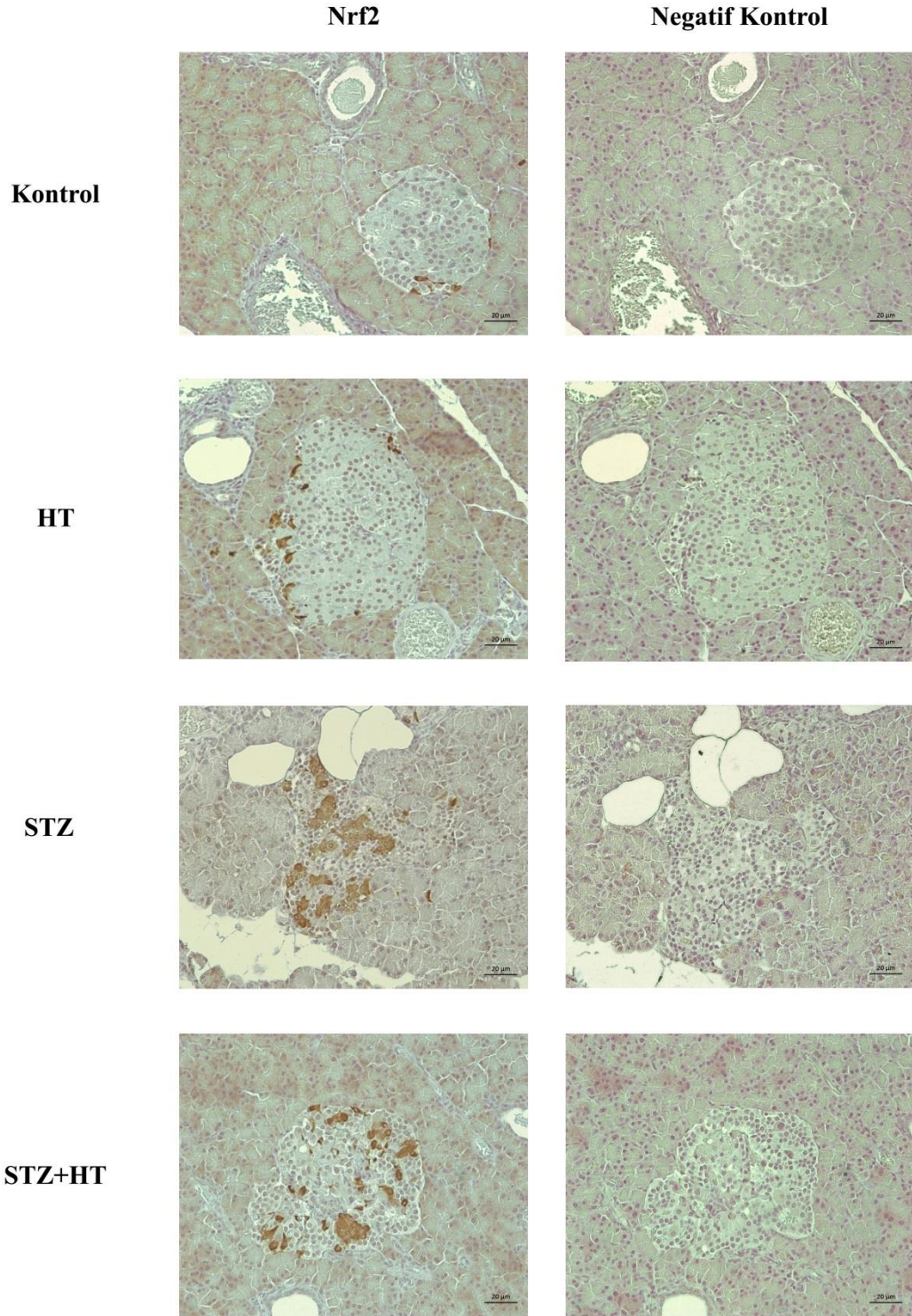
Langerhans adacık alanı ve Nrf2 işaretli alanların ölçülmesiyle, % Nrf2 boyalı hücre alanı; adacık hücreleri ve Nrf2 boyalı hücrelerin sayılması ile % Nrf2 boyalı hücre sayısı belirlendi. Bu değerler her gruptan Nrf2 işaretli hücre alanı ve Nrf2 işaretli hücre sayısı için sırayla 40 ve 3 Langerhans adacığı üzerinden aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\% \text{ Nrf2 işaretli hücre alanı} = \frac{\text{Nrf2 işaretli Langerhans adacığı alanı}}{\text{Total Langerhans adacığı alanı}} \times 100$$

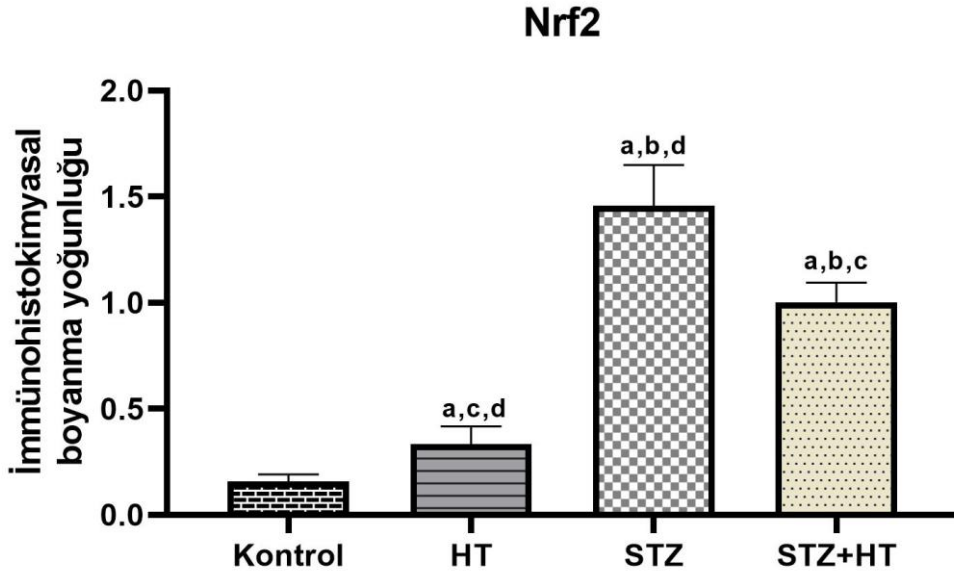
$$\% \text{ Nrf2 işaretli hücre sayısı} = \frac{\text{Nrf2 işaretli Langerhans adacığı hücre sayısı}}{\text{Total Langerhans adacığı hücre sayısı}} \times 100$$

Elde edilen sonuçlar HT'nin, STZ'nin neden olduğu β hücre hasarını indükleyen OS oluşumunu azalttığını gösterdi. Bunun sonucunda HT ile muamele edilen diyabetik hayvanlarda Nrf2 ekspresyonunun STZ grubundakilere kıyasla daha az olduğu belirlendi (Şekil 36-38.). Bunlar, Nrf2 ekspresyonunun, STZ'nin indüklediği T1DM'nin önlenmesinde HT'nin koruyucu ve antioksidan rolü olduğunu gösterdi.

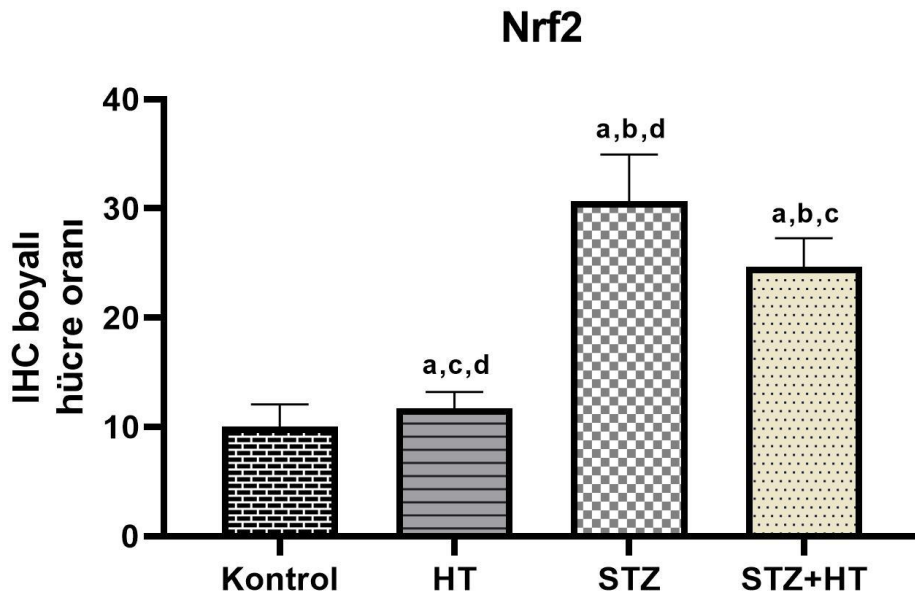
İmmünohistokimyasal Boyama



Şekil 36. Deney gruplarının pankreas dokularında Nrf2 ekspresyonunun immünohistokimyasal fotomikrografları. Koyu kahverengi boyama Nrf2 ekspresyonunu gösterir (x40, skala bar: 50 μ).



Şekil 37. HT uygulamasının Nrf2 ekspresyonu üzerindeki etkisi. Adacık başına immünopozitif hücreler için miktar tayini için her gruptan hayvan kesitleri analiz edildi (n=4). **a:** kontrole göre, **b:** HT'ye göre, **c:** STZ'ye göre ve **d:** STZ+HT'ye göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir ($p \leq 0,05$).



Şekil 38. HT uygulamasının Nrf2 ekspresyonu üzerine hücresel oranı. **a:** kontrole göre, **b:** HT'ye göre, **c:** STZ'ye göre ve **d:** STZ+HT'ye göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir ($p \leq 0,05$).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Diyabet, popülasyonda hızlı bir artış gösteren, karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmalarını etkileyen ve hatta ölüm riski taşıyan kronik bir metabolik hastalıktır. Diabetes mellitus insülinin az salgılanması ya da hedef hücrelerin insüline karşı tepkisiz kalması nedeni ile oluşmaktadır. İstatistiksel veriler göz önüne alındığında, dünyada ve ülkemizde ekonomik açıdan diyabetin neden olduğu sorunlar oldukça büyüktür. Diyabet, anjiyopati, nöropati, retinopati, nefropati gibi komplikasyonlara sebep olur. Günümüzde ilaç ve insülin enjeksiyon tedavileri her ne kadar kullanılıyor olsa da komplikasyonları azaltmak ve diyabetik hastalara dahi iyi koşullar sunmak için alternatif tedavilerin araştırılıp desteklenmesi gerekmektedir^{1,26,28,58}.

Bu amaçla yapılan araştırmada, STZ uygulanarak DM oluşturulan rat pankreaslarında HT'nin muhtemel koruyucu rolü ve Nrf2 ekspresyonu üzerine etkisi histolojik ve immünohistokimyasal açıdan değerlendirildi.

Günümüzde sıçanlarda deneysel diyabet oluşturmak için kullanılan kimyasal ajanların başında alloksan ve STZ gelmektedir. Alloksan ve STZ'nin etkisi, kemirgen tipine, ajanın veriliş yoluna ve hayvanın açlık durumuna göre değişiklik gösterir. Kemoterapötik alkilatör olarak kullanılan ve aynı zamanda bir antimikrobiyal madde olan STZ'nin, Rakieten ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada diabetojenik etki gösterdiği belirlenmiş ve β hücrelerinin nekrozuna bağlı olarak DM oluşumuna neden olduğu gözlenmiştir^{75,152,153}. Deney hayvanlarına çoklu düşük dozlarda STZ verildiğinde bağışıklık mekanizmasına etki ederek; aksine tek bir yüksek doz olarak verildiğinde ise DNA alkilasyonuna neden olarak β hücrelerine zarar verdiği tespit edilmiştir¹⁵⁴. Oluşan zarar sonucunda Langerhans adacıklarındaki β hücrelerinin yıkımı ve insülin salgılanmasının kaybı ortaya çıkmaktadır⁶¹.

STZ ile yapılan çalışmalarda diyabetik hayvanların kontrol grubuna göre ilerleyen günlerde vücut ağırlığının anlamlı derecede azaldığı belirlenmiş ve aynı zamanda diyabetiklerde hücre içine azalan glukoz alımı sonucunda meydana gelen hipergliseminin, renal glukoz eşığının aşılmasına ve poliüriye, bunun da hipotalamustaki susama merkezini aktif hale getirerek polidipsiye neden olduğu

bulunmuştur^{26,155-160}. Buna ek bazı çalışmalarda STZ enjeksiyonundan 48 saat sonra diyabetik hayvanların kontrol grubuna oranla daha yüksek kan glukoz seviyesine (≥ 250 mg/dL) ve azalmış insülin miktarına sahip oldukları gösterilmiştir^{159,161-164}. 2007'de yaptıkları bir çalışmanın sonucuna göre Arulselvan ve Subramanian diyabetik hayvanların su tüketiminin diğer hayvanlara oranla önemli derecede arttığını bildirmişlerdir¹⁶⁵. Biz de yaptığımız çalışmada STZ grubundaki hayvanların kontrol grubuna kıyasla ölçülen vücut ağırlıklarında istatistiksel açıdan anlamlı bir düşüşün olduğunu, buna karşın STZ+HT grubu hayvanlarının ikinci haftadan itibaren anlamlı olmasa da kilo aldığını, diyabetik hayvanları diğer gruplarla karşılaştırdığımızda su tüketiminde belirgin bir artış olduğunu ve benzer şekilde diyabetik hayvanların kan glukoz seviyesinin diğer gruplara göre artmış olduğunu gözlemledik (Şekil 28-30.).

Biyolojik sistemlerde, elektron transferiyle oluşan serbest radikaller, çoğunlukla hücre bileşenlerini etkileyerek yapılarını bozar. Bu bozunmalar sonucu reaktif türler (RS) ortaya çıkar ve oksidatif stres (OS) oluşumuna neden olurlar⁸⁸. Vücuttaki OS koşullarının kan glukoz regülasyonundaki bozulma ile orantılı olduğu belirtilmiştir⁹². Yapılan çalışmalarda pankreas β hücrelerinde, OS'nin solunum zincirini inhibe ettiği ve glukoz metabolizmasına bağlı enzim aktivitesini baskıladığı, ATP üretiminin azalmasına ve insülin salınımının bozulmasına yol açtığı bildirilmiştir^{166,167}. Glukoz uyarımlı insülin sekresyonu (GSIS), yüksek glukoz aracılı oksidatif stres ile baskılanır. Eş zamanlı olarak, OS, MafA ve PDX-1 transkripsiyon faktörlerinin seviyesini baskılayarak farelerin pankreas β hücrelerinde insülin gen ekspresyonunu azaltır. Bu bulgular OS'in pankreas β hücresi fonksiyonunu bozduğunu göstermektedir¹¹⁰. Buna karşılık, OS'in pankreas β hücrelerinden insülin salınımını uyardığını gösteren kanıtlarda mevcuttur. Örneğin, hidrojen peroksitin GSIS'ı uyardığı bildirilmektedir^{168,169}. DEM ve sulfuraphane'nin aracılık ettiği elektrofilik stresler pankreas β hücrelerinden insülin salgılanmasını kolaylaştırır^{168,170}.

Aksine, antioksidan reaktifler GSIS'ı baskılamaktadır^{168,171}. Bu bulgular oksidatif ve elektrofilik streslerin pankreas β hücrelerinin insülin sekresyonunu uyardığını göstermektedir¹⁷². Bizim çalışmamız OS'in β hücre fonksiyonunu bozarak insülin salınımını azalttığı ve buna bağlı olarak plazma glukoz seviyesini artırdığı çalışmalarını destekleyen sonuçlar sundu.

Redoks duyarlı transkripsiyon faktörü Nrf2, oksidatif strese cevaben hücre sağkalımının önemli bir düzenleyicisi olarak görev yapar. Bu nedenle, Nrf2 oksidatif strese bağlı hastalıklara karşı koymak için terapötik bir hedef olarak kabul edilir¹⁷³. Nrf2 sinyal yolunun indüklenmesinin, pankreas β hücrelerinin fonksiyon bozukluğuna karşı hücrel korumanın temel bir mekanizması olabileceği gösterilmiştir¹¹⁰.

Oksidatif stres kaynaklı pankreas β hücre hasarının üstesinden gelmek için, antioksidan enzimlerin ve antioksidan reaktiflerin aşırı ifadesi, kemirgen diyabet modellerinde test edilmiştir. Antioksidan reaktifler, pankreas adacıklarından insülin salgılanmasını ve kemirgen diyabetik modellerde pankreas β hücresi hasarını iyileştirir. Bu bulgular, antioksidan enzimlerin artırılmasının, pankreas β hücresi koruması için faydalı bir strateji olabileceğini göstermektedir¹¹⁰. Li ve arkadaşları honokiölün, pankreas β hücrelerini, hem Tip 2 DM sıçanlarında hem de INS-1 hücrelerinde Nrf2 / ARE yolağını aktive ederek yüksek glukoz ve aralıklı hipoksiye bağlı oksidatif hasara karşı koruduğunu bildirmiştir¹⁷⁴. Zhang ve arkadaşları linderanın, STZ ile muamele edilmiş INS-1 hücrelerinde Nrf2 sinyal yolunun aktivasyonunu arttırdığını ve Nrf2'nin inhibisyonunun, linderanın STZ ile indüklenen ROS üretimine ve hücre apoptozisine karşı koruyucu etkilerini önemli ölçüde tersine çevirdiğini ortaya koymuştur¹⁷⁵. Başka bir çalışmada farelere oral CDDO-Im uygulamasının, pankreas β hücrelerinin çekirdeğinde Nrf2'yi güçlü bir şekilde stabilize ederek birikmesine sebep olduğunu göstermiştir¹¹⁶. Yapılan bir diğer çalışmada Nrf2 iNOS ve COX-2 (siyogioksaz 2) indüksiyonunu kuvvetle bastırarak β hücrelerinde inflamasyonun baskılanmasına katkıda bulunduğunu gösteren β hücre hasarını iyileştirmiştir¹¹⁸. Buna karşılık, Nrf2 geninin nakavt edilmesinin, pankreas adacıklarındaki antioksidan enzim genlerinin ekspresyonunu azalttığı bulunmuştur^{116,117}.

Yaptığımız çalışmada immünohistokimyasal boyamalar ile elde ettiğimiz bulgular, HT'nin, STZ'nin neden olduğu β hücre hasarını indükleyen OS oluşumunu azalttığını gösterdi. Bunun sonucunda HT ile muamele edilen diyabetik hayvanlarda Nrf2 ekspresyonunun STZ grubundakilere kıyasla daha az olduğu belirlendi. Bunlar, Keap1 / Nrf2 sisteminin aktivasyonunun glukoz homeostazının korunmasına ve DM'nin başlangıcı ve/veya ilerlemesinin baskılanmasına katkıda bulunduğuna dair biriken kanıtları destekledi. Nrf2'nin önemi, kan şekeri seviyelerinin ve diyabetik komplikasyonların düzenlenmesi için terapötik bir hedef olarak artmaktadır.

Geçtiğimiz birkaç yılda, polifenolik maddeler, oldukça yaygın bazı kronik hastalıkları önleme potansiyelleri nedeniyle geniş bir ilgi görmüştür. Aslında, polifenollerin antiinflamatuvar, antioksidan, antialerjik, hepatoprotektif, antitrombotik, antiviral ve antikarsinojenik aktiviteler gibi ilginç biyolojik aktivitelere sahip olduğu bildirilmiştir⁶². Fenoller arasında HT, ilginç antioksidan ve potansiyel faydalı sağlık özellikleri nedeniyle, katma değeri yüksek bir bileşik olarak bulunur. Hidroksitirozol immünolojik tepkinin azaltılması, insan eritrositlerinin hidrojen peroksit, anti-enflamatuvar, antitrombotik ve hipokolesterolemiklerin neden olduğu oksidatif hasara karşı korunması gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir⁵⁸. Hidroksitirozolün antioksidan aktivitesi pankreas hücrelerini hasardan ve ölümden korur, bu da plazmadaki glukoz seviyesini azaltan insülin sekresyonunun artmasına neden olur⁵⁸. Bizim çalışmamız da HT'nin β hücrelerini hasardan koruyucu etkiye sahip olduğunu gösterdi. Ayrıca HT ratlarda antiinflamatuvar, antitrombotik ve hipokolesterolemik etkilerin sebep olduğu oksidatif hasara karşı immünolojik yanıtın down regülasyonunu sağlayan çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir¹³⁰. Yapılan çalışmaların sonucunda hidroksitirozolün hücre içine kolayca penetre olduğu, antioksidan özellik gösterdiği, lipit peroksidasyonunu önlediği, radikalleri yakaladığı ve hidrojen peroksit miktarını azaltarak oksidatif strese karşı hücreleri koruduğu, aynı zamanda kalp damar hastalıklarında önemli rol oynayan platelet kümelenmesini azalttığı gösterilmiştir^{132,133}.

Aunon-Calles ve arkadaşları (2013), saf HT'nin toksikolojik etkilerini değerlendirmek için bir çalışma yapmıştır. Bu çalışma, HT'nin 13 hafta boyunca günde 5 kez 5, 50 ve 500 mg/kg/gün dozlarında oral olarak uygulanmasının herhangi bir mikro ve makroskopik değişikliğe veya ölüme yol açmadığını bildirmiştir. Bu nedenle, 500 mg/kg/gün dozlarında hiçbir olumsuz etkinin gözlenmediği sonucuna varmışlardır¹⁷⁶. Ek olarak, bir diğer çalışma sonucuna göre, HT fizyolojik konsantrasyonda in vitro modellerde kullanıldığında hiçbir genotoksik ve mutajenik etki belirtisi gözlemlenmemiştir¹⁷⁷. Hidroksitirozolün subkronik toksisitesini belirlemek için hayvan modellerinde yapılan son çalışmalardan biri Heilman ve arkadaşlarına (2015) aittir. Bu yazarlar H35 (% 35 a/a HT) adlı bir öz kullanmışlar. Bu özü, arka arkaya 90 gün boyunca 125, 250 ve 500 mg HT / kg / gün dozlarında dişi ve erkek Wistar sıçanlarına oral gavaj yoluyla uygulamışlar ve toksikolojik olarak anlamlı bir etki bulamamışlardır¹⁷⁸.

2011'de Avrupa Gıda Güvenliđi Kurumu (EFSA) oksidatif hasara ve iltihaplanmaya karşı koruma sağlamak ve kardiyovasküler hastalık ve insülin direnci/diyabet riskini azaltmak için HT (5 mg/gün) veya türevlerinin tüketilmesini önermiştir¹⁷⁹.

Hamden ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışma; diyabetik sıçanlara saflaştırılmış HT verilmesinin, plazmadaki glukoz seviyesinde bir düşüşe, renal süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAD) glutasyon peroksidazda (GPx) bir artışa neden olduğu ve karaciğer ve böbrek toksisitesine karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir⁶². Bir diğer çalışmada, moleküler/hücresele düzeyde, HT'nin hem kas hem de yağ hücrelerinde glukoz alımını arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca HT ile tedavi, insülin sinyalleşmesinde rol oynayan çok önemli bir protein olan Akt seviyelerini artırmış^{180,181}. Son olarak Jamai ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışma sonucuna göre; oleuropein ve HT'nin, her biri 8 ve 16 mg/kg şeklinde iki farklı dozda, test farelerinin tümü için önemli hipoglisemik, hipolipidemik ve antioksidan etkilere sahip olduğunu göstermiş. Elde edilen serum glukoz verileri, Olea europaea özütlerinde oral oleuropein ve HT uygulamasının, özellikle 16 mg/kg b.w.'da alloksan kaynaklı diyabetik sıçanlarda önemli hipoglisemik etkiler ürettiğini açıkça göstermektedir¹⁸². Yaptığımız çalışmada biz de HT'nin oksidatif stresi hafiflettiği, belirgin hipoglisemik etki gösterdiği ve deneysel bir diyabet modelinde antioksidan savunma sistemini geliştirdiğini gösteren sonuçlarla bu çalışmaları destekledik.

Bu çalışma, HT'nin sıçanlarda STZ ile indüklenen DM üzerindeki etkisini değerlendirmek için tasarlanmıştır. Deney gruplarının periyodik olarak kan glukoz düzeyleri ölçüldü. Pankreas dokularının histopatolojik incelemesi yapıldı. STZ ile muamele edilen sıçanlar, vücut ağırlığında önemli bir azalma gösterirken; su tüketimi, idrar ve kan glukoz seviyelerinde önemli bir artış gösterdi. Hidroksitirosolün 30 günlük bir süre boyunca tatbik edilmesi, STZ+HT grubundaki hayvanların kan glukoz seviyelerinde, su tüketim ve idrar miktarlarında istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma sağladı. Hidroksitirosolün STZ ile indüklenen diyabete karşı koruyucu etkisi, histopatolojik inceleme ile de doğrulandı. STZ ve STZ+HT gruplarının endokrin kısımlarında belirgin patolojiler görüldü. Bununla birlikte STZ grubu sıçanların kontrol grubu sıçanlara kıyasla Langerhans adalarının büyüklüğünde bir azalma ve adacık hücrelerinde belirgin tahribat gözlemlendi.

Normal kontrol sıçanlarında; Langerhans adacık morfoloji ve histolojisi, iyi biçimlendirilmiş yuvarlak şekil, büyük boyut ve normal yapı sergilerken, diyabetik sıçanlar belirgin şekilde düzensiz ada sınırı ve adacık dejenerasyonu gösterdi. Diyabetik ratlarda hidropik dejenerasyon ile uyumlu olarak sitoplazmada berrak vakuollere sahip adacık hücreleri görülürken HT ile muamele edilen diyabetiklerde azalmış tahribat gözlemlendi. HT tedavisine 4 hafta maruz kalan diyabetik sıçanlar (10 mg/kg/gün) STZ sıçanlarına kıyasla adacıkların morfolojisini normalleştirdi. Bunların yanında HT ile tedavi edilen sıçanlar, kontrol sıçanlarına benzer normal histolojiye sahipti. İmmünohistokimyasal bulgular sonucunda HT ile muamele edilen diyabetik hayvanlarda Nrf2 ekspresyonunun STZ grubundakilere kıyasla daha az olduğu belirlendi. Bu çalışmanın sonuçları, STZ'nin indüklediği T1DM'nin önlenmesinde HT'nin koruyucu ve antioksidan aktiviteye sahip olduğunu ve oksidatif stresi baskılayarak Nrf2 ekspresyonunu azalttığını gösterdi. Sonuç olarak hidroksitirosol kullanımının diabetes mellitusta koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir.

6. KAYNAKLAR

1. Campbell, N. A. & Reece, J. B. *in Campbell Biology*. (Pearson Education, 2011).
2. Bağış, G. Diyabetik Ratlarda Ardiç (*Juniper Communis L*) Yağının Antidiyabetik Etkisinin Histopatolojik, İmmünohistokimyasal ve Biyokimyasal Olarak Araştırılması. (Van Yüzüncüyıl Üniversitesi, 2019).
3. Roizen, M. F. & Oz, M. C. *YOU: The Owner's Manual*. (Beyaz Balina, 2005).
4. Grossman, H. Y., Brink, S. & Hauser, S. T. Self-efficacy in adolescent girls and boys with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Care* **10**, 324–329 (1987).
5. Kedechi, S. *et al.* Antioxidant effect of hydroxytyrosol on human sperm quality during in vitro incubation. *Andrologia* **49**, 1–5 (2017).
6. Hartley, T., Brumell, J. & Volchuk, A. Emerging roles for the ubiquitin-proteasome system and autophagy in pancreatic β -cells. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **296**, (2009).
7. Bhakkiyalakshmi, E. *et al.* Therapeutic potential of pterostilbene against pancreatic beta-cell apoptosis mediated through Nrf2. *Br. J. Pharmacol.* **171**, 1747–1757 (2014).
8. Valenzuela, R. *et al.* Molecular adaptations underlying the beneficial effects of hydroxytyrosol in the pathogenic alterations induced by a high-fat diet in mouse liver: PPAR- α and Nrf2 activation, and NF- κ B down-regulation. *Food Funct.* **8**, 1526–1537 (2017).
9. Van Hoe, L. & Claikens, B. The Pancreas: Normal Radiological Anatomy and Variants. 19–68 (1999) doi:10.1007/978-3-642-58380-3_3.
10. Saisho, Y. *et al.* Pancreas volumes in humans from birth to age one hundred taking into account sex, obesity, and presence of type-2 diabetes. *Clin. Anat.* **20**, 933–942 (2007).
11. Henry, B. M. *et al.* Development of the human pancreas and its vasculature — An integrated review covering anatomical, embryological, histological, and molecular aspects. *Annals of Anatomy* (2019) doi:10.1016/j.aanat.2018.09.008.
12. Dolenšek, J., Rupnik, M. S. & Stožer, A. Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets* **7**, (2015).
13. Olmsted, W. W. The Exocrine Pancreas: Biology, Pathobiology, and Diseases. *Radiology* vol. 161 446–446 (1986).
14. In, P. & Marichal, M. The Islets of Langerhans Editorial Board : Edited by Iqbal Grewal. 791 (2010) doi:10.1007/978-90-481-3271-3.
15. Flati, G. & Andrén-Sandberg, Å. A. Wirsung and santorini: The men behind the ducts. *Pancreatology* **2**, 4–11 (2002).
16. Prasanna, L. C., Rajagopal, K. V., Thomas, H. R. & Bhat, K. M. R. Accessory pancreatic duct patterns and their clinical implications. *J. Clin. Diagnostic Res.* **9**, AC05–AC07 (2015).
17. Reichert, M. & Rustgi, A. K. Pancreatic ductal cells in development, regeneration, and neoplasia[The Journal of Clinical Investigation2011].pdf. **121**, 4572–4578 (2011).
18. Lewis, M. P. N., Reber, H. A. & Ashley, S. W. Pancreatic blood flow and its role in the pathophysiology of pancreatitis. *J. Surg. Res.* **75**, 81–89 (1998).
19. Ecksteini, F. Surgical Radiologm Anatomy. *Imaging* **10**, 429–438 (1994).
20. Wharton, G. K. The blood supply of the pancreas, with special reference to that of the islands of Langerhans. *Anat. Rec.* **53**, 55–81 (1932).
21. Meyers, M. A. & Oliphant, M. Abdomen : Normal and Pathologic. **261**, 2011 (2011).
22. O'Morchoe, C. C. C. Lymphatic system of the pancreas. *Microsc. Res. Tech.* **37**, 456–477 (1997).
23. Ushiki, T. & Watanabe, S. Distribution and ultrastructure of the autonomic nerves in the mouse pancreas. *Microsc. Res. Tech.* **37**, 399–406 (1997).

24. Rodriguez-Diaz, R. & Caicedo, A. Novel Approaches to Studying the Role of Innervation in the Biology of Pancreatic Islets. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **42**, 39–56 (2013).
25. Anatomy, G. & Content, H. The Exocrine and Endocrine Pancreas : Embryology and Histology. 1–2 (1999).
26. Çolak, S. Tip 1 Diyabet Oluşturan Sıçanlarda Liken Ekstraktlarının Pankreas Üzerine Etkileri. (Atatürk Üniversitesi, 2012).
27. Hall, J. E. *Guyton ve Hall Textbook of Medical Physiology*. (Elsevier Inc., 2011).
28. Abay, N. F. Streptozotosin ile diyabet oluşturulan farelerde selenyum ve taurinin pankreas üzerine etkisinin ışık ve elektron mikroskopik düzeyde incelenmesi. (Istanbul Üniversitesi, 2008).
29. Stenberg, S. *Histoloji for Pathologist*. (Raven Pres. Ltd, 1992).
30. Pour, P. M. & Batra, S. K. Are Islet Cells the Gatekeepers of the Pancreas ? *Pancreatology* **2**, 440–448 (2002).
31. Buchwald, P. *et al.* Quantitative Assessment of Islet Cell Products : Estimating the Accuracy of the Existing Protocol and Accounting for Islet Size Distribution. **18**, 1223–1235 (2009).
32. Article, R. New markers for pancreatic islets and islet cell tumors. **15**, (2002).
33. Zhou, Q. & Melton, D. A. Review Pancreas regeneration. (2018).
34. Tadokoro, H., Takase, M. & Nobukawa, B. Development and Congenital Anomalies of the Pancreas. **2011**, (2011).
35. Richarda, R. & Rizzo, M. Congenital ties of the and Biliary Abnormali- Pancreas Tree in. 49–68 (1995).
36. Rivas-carrillo, J. D., Okitsu, T., Tanaka, N. & Kobayashi, N. Pancreas Development and -Cell Differentiation of Embryonic Stem Cells. 1573–1578 (2007).
37. Wang, X. *et al.* Regional Differences in Islet Distribution in the Human Pancreas - Preferential Beta-Cell Loss in the Head Region in Patients with Type 2 Diabetes. **8**, 1–9 (2013).
38. Yuan, Z. *et al.* Heterotopic pancreas in the gastrointestinal tract. **15**, 3701–3703 (2009).
39. Jennings, R. E. *et al.* Development of the Human Pancreas From Foregut to Endocrine Commitment. doi:10.2337/db12-1479.
40. Riedel, M. J., Asadi, A., Wang, R. & Ao, Z. Immunohistochemical characterisation of cells co-producing insulin and glucagon in the developing human pancreas. 372–381 (2012) doi:10.1007/s00125-011-2344-9.
41. Jeon, J., Correa-medina, M., Ricordi, C., Edlund, H. & Diez, J. A. Endocrine Cell Clustering During Human Pancreas Development. **57**, 811–824 (2009).
42. Henquin, J. C. The dual control of insulin secretion by glucose involves triggering and amplifying pathways in β -cells. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **93**, S27–S31 (2011).
43. Arsenijevic, T., Perret, J., Van Laethem, J. L. & Delporte, C. Aquaporins involvement in pancreas physiology and in pancreatic diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 1–14 (2019).
44. Bernd, N. & Giovanni Appendino. Spices: The Savory and Beneficial Science of Pungency. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **159**, 1–77 (2007).
45. Petersen, O. H. Section 2 Physiology and Pathophysiology of Pancreatic Functions Physiology of Acinar Cell Secretion - Composition of Pancreatic Acinar Juice.
46. Argent, B. E., Gray, M. A., Steward, M. C. & Case, R. M. *Cell Physiology of Pancreatic Ducts. Physiology of the Gastrointestinal Tract* vol. 2 (Elsevier Inc., 2012).
47. Westermeier, F. *et al.* Cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase is expressed in α - cells from human and murine pancreas. 166–175 (2020) doi:10.1002/jcp.28955.
48. Röder, P. V, Wu, B., Liu, Y. & Han, W. Pancreatic regulation of glucose homeostasis. (2016) doi:10.1038/emm.2016.6.
49. Svendsen, B. *et al.* Insulin Secretion Depends on Intra-islet Glucagon Insulin Secretion Depends

- on Intra-islet Glucagon Signaling. *CellReports* **25**, 1127-1134.e2 (2018).
50. Unger, R. H. susceptibility. 15–17 (1966).
 51. Champe, P., Harvey, R. & Ferrier, D. *Lippincott's Illustrated Biokimya*. (LIPPINCOTT WILLIAMS&WILKINS, 2007).
 52. Dogan, A., Celik, I. & Kaya, M. S. Author's Accepted Manuscript. *J. Ethnopharmacol.* (2015) doi:10.1016/j.jep.2015.10.034.
 53. Niswender, K. D. Basal Insulin : Physiology , Pharmacology , and Clinical Implications. **5481**, 16–26 (2015).
 54. Bonadonna, R. C., Stumvoll, M., Fritsche, A., Muggeo, M. & Ha, H. Second-Phase β -Cell Secretion in the Offspring of Studies With a Minimal Model to Assess β -Cell Function. **52**, (2003).
 55. Freeman, J. S. Insulin Analog Therapy : Improving the Match With Physiologic Insulin Secretion. **109**, 26–36 (2009).
 56. Champe, P. & Harvey, R. *Biokimya*. (Nobel Tıp Kitabevleri, 1997).
 57. Bilous, R. & Donnelly, R. *Dişabet El Kitabı*. (Istanbul Tıp Kitabevi, 2013).
 58. Ahangarpour, A., Sayahi, M. & Sayahi, M. The antidiabetic and antioxidant properties of some phenolic phytochemicals: A review study. *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* **13**, 854–857 (2019).
 59. Banting, F. G., Best, C. H., Collip, J. B., Campbell, W. R. & Fletcher, A. A. Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus: preliminary report. 1922. *C. Can. Med. Assoc. J. = J. l'Association medicale Can.* **145**, 1281–1286 (1991).
 60. Orhan, Y. & Sencer, E. *Endokrinoloji, metabolizma ve beslenme hastalıkları*. (Nobel Tıp Kitabevi, 2001).
 61. Piganelli, J. D. & Delmastro, M. M. Oxidative stress and redox modulation potential in type 1 diabetes. *Clin. Dev. Immunol.* **2011**, (2011).
 62. Hamden, K., Allouche, N., Damak, M. & Elfeki, A. Hypoglycemic and antioxidant effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol from olive mill waste in vitro and in rats. *Chem. Biol. Interact.* **180**, 421–432 (2009).
 63. De Ferranti, S. D. *et al.* Type 1 diabetes mellitus and cardiovascular disease a scientific statement from the american heart association and american diabetes association. *Circulation* **130**, 1110–1130 (2014).
 64. Garcia-Contreras, M., Brooks, R. W., Boccuzzi, L., Robbins, P. D. & Ricordi, C. Exosomes as biomarkers and therapeutic tools for type 1 diabetes mellitus. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **21**, 2940–2956 (2017).
 65. Kaneto, H. *et al.* Involvement of oxidative stress in the pathogenesis of diabetes. *Antioxidants Redox Signal.* **9**, 355–366 (2007).
 66. Watson, D. & Loweth, A. C. Oxidative and nitrosative stress in β -cell apoptosis: Their contribution to β -cell loss in type 1 diabetes mellitus. *Br. J. Biomed. Sci.* **66**, 208–215 (2009).
 67. Maahs, D. M., West, N. A., Lawrence, J. M. & Mayer-Davis, E. J. Epidemiology of type 1 diabetes. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **39**, 481–497 (2010).
 68. Kahkoska, A. R., Mayer-Davis, E. J., Hood, K. K., Maahs, D. M. & Burger, K. S. Behavioural implications of traditional treatment and closed-loop automated insulin delivery systems in Type 1 diabetes: applying a cognitive restraint theory framework. *Diabet. Med.* **34**, 1500–1507 (2017).
 69. Kara, İ. Streptozotosin ile dişabet oluşturulmuş sıçanların alfa lipik asidin testis dokularına etkisinin histolojik yönden incelenmesi. (Selcuk Universitesi, 2010).
 70. Tao, Z., Shi, A. & Zhao, J. Epidemiological Perspectives of Diabetes. *Cell Biochem. Biophys.* **73**, 181–185 (2015).
 71. Zimmet, P., Cowie, C., Ekoe, J.-M. & Shaw, J. Classification of Diabetes Mellitus and Other

- Categories of Glucose Intolerance. *Int. Textb. Diabetes Mellit.* (2003)
doi:10.1002/0470862092.d0101.
72. Edition, F. The Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. 24–30 (1980).
 73. Diabetes, D. O. F. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **34**, (2011).
 74. Watkins, P. J. *ABC of Diabetes*. (London : BMJ Books, 2003).
 75. Erbaş, O. Experimental diabetes model. *Istanbul Bilim Univ. Florence Nightingale J. Med.* **1**, 40–42 (2015).
 76. Baswan, D. A. . Trans-sinamaldehyt'in Diyabet Modelindeki Antidiyabetik ve Pankreas Koruyucu Etkilerinin Araştırılması. (Erciyes Üniversitesi, 2017).
 77. Mythili, M. D., Vyas, R., Akila, G. & Gunasekaran, S. Effect of Streptozotocin on the ultrastructure of rat pancreatic islets. *Microsc. Res. Tech.* **63**, 274–281 (2004).
 78. Patel, R. *et al.* Mechanism of exocrine pancreatic insufficiency in streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1084**, 71–88 (2006).
 79. Malaisse, W. J. & Sener, A. Animal models of diabetes. *Source B. Model. Biomed. Res.* 651–656 (2008) doi:10.1007/978-1-59745-285-4_67.
 80. Portha, B., Levacher, C., Picon, L. & Rosselin, G. Diabetogenic effect of streptozotocin in the rat during the perinatal period. *Diabetes* **23**, 889–895 (1974).
 81. Yu, W. J. *et al.* Insulin restores neuronal nitric oxide synthase expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci.* **68**, 625–634 (2000).
 82. Fischer, L. J. & Rickert, D. E. Pancreatic islet-cell toxicity. (1975).
 83. Valentovic, M. A., Alejandro, N., Betts Carpenter, A., Brown, P. I. & Ramos, K. Streptozotocin (STZ) diabetes enhances benzo(a)pyrene induced renal injury in Sprague Dawley rats. *Toxicol. Lett.* **164**, 214–220 (2006).
 84. Kazumi, T., Yoshino, G., Fujii, S. & Baba, S. Tumorigenic Action of Streptozotocin on the Pancreas and Kidney in Male Wistar Rats. *Cancer Res.* **38**, 2144–2147 (1978).
 85. Öntürk, H. & Özbek, H. Deneysel diyabet oluşturulması ve kan şekeri seviyesinin ölçülmesi. *Genel Tıp Derg* **17**, 231–236 (2007).
 86. Jang, Y. Y., Song, J. H., Shin, Y. K., Han, E. S. & Lee, C. S. Protective effect of boldine on oxidative mitochondrial damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacol. Res.* **42**, 361–371 (2000).
 87. Barbosa, N. B. V. *et al.* Dietary diphenyl diselenide reduces the STZ-induced toxicity. *Food Chem. Toxicol.* **46**, 186–194 (2008).
 88. Altan, N., Sepici Dinçel, A. & Koca, C. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres. *Türk Biyokim. Derg.* **31**, 51–56 (2006).
 89. Rahal, A. *et al.* Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay. *Biomed Res. Int.* **2014**, (2014).
 90. Turrens, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* **552**, 335–344 (2003).
 91. Roh, S. S. *et al.* Allium hookeri root protects oxidative stress-induced inflammatory responses and β -cell damage in pancreas of streptozotocin-induced diabetic rats. *BMC Complement. Altern. Med.* **16**, 1–10 (2016).
 92. Lenzen, S., Drinkgern, J. & Tiedge, M. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic. Biol. Med.* **20**, 463–466 (1996).
 93. Niedowicz, D. M. & Daleke, D. L. The role of oxidative stress in diabetic complications. *Cell Biochem. Biophys.* **43**, 289–330 (2005).
 94. Moi, P., Chan, K., Asunis, I., Cao, A. & Kan, Y. W. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the β -globin locus control region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 9926–9930 (1994).

95. Kubo, Y. *et al.* Role of Nrf2 in Fracture Healing: Clinical Aspects of Oxidative Stress. *Calcif. Tissue Int.* **105**, 341–352 (2019).
96. Guan, Y. *et al.* Effects of PP2A/Nrf2 on experimental diabetes mellitus-related cardiomyopathy by regulation of autophagy and apoptosis through ROS dependent pathway. *Cell. Signal.* **62**, 109339 (2019).
97. Kimura, M. *et al.* Additions and Corrections: Molecular basis distinguishing the DNA binding profile of Nrf2-Maf heterodimer from that of Maf homodimer. *J. Biol. Chem.* **290**, 10644 (2015).
98. Thimmulappa, R. K. *et al.* Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Res.* **62**, 5196–5203 (2002).
99. Kaspar, J. W., Niture, S. K. & Jaiswal, A. K. Antioxidant-induced INrf2 (Keap1) tyrosine 85 phosphorylation controls the nuclear export and degradation of the INrf2-Cul3-Rbx1 complex to allow normal Nrf2 activation and repression. *J. Cell Sci.* **125**, 1027–1038 (2012).
100. van Roon-Mom, W. M. C. *et al.* Mutant huntingtin activates Nrf2-responsive genes and impairs dopamine synthesis in a PC12 model of Huntington's disease. *BMC Mol. Biol.* **9**, (2008).
101. Carmona-Aparicio, L. *et al.* Overview of Nrf2 as therapeutic target in epilepsy. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 18348–18367 (2015).
102. Gasiorsek, J. J. & Blank, V. Regulation and function of the NFE2 transcription factor in hematopoietic and non-hematopoietic cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 2323–2335 (2015).
103. Dinkova-Kostova, A. T. *et al.* Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 11908–11913 (2002).
104. Gregg, E. W. *et al.* Changes in diabetes-related complications in the United States, 1990-2010. *N. Engl. J. Med.* **370**, 1514–1523 (2014).
105. Jiang, T. *et al.* The protective role of Nrf2 in streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Diabetes* **59**, 850–860 (2010).
106. Ungvari, Z. *et al.* Resveratrol confers endothelial protection via activation of the antioxidant transcription factor Nrf2. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **299**, 18–24 (2010).
107. Peng, S., Zhang, B., Yao, J., Duan, D. & Fang, J. Dual protection of hydroxytyrosol, an olive oil polyphenol, against oxidative damage in PC12 cells. *Food Funct.* **6**, 2091–2100 (2015).
108. Pei, Z. *et al.* and Molecular Changes in the Rat Myocardium. 169–175 (2007) doi:10.1002/tox.
109. Yang, B. *et al.* Deficiency in the nuclear factor E2-related factor 2 renders pancreatic β -cells vulnerable to arsenic-induced cell damage. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **264**, 315–323 (2012).
110. Uruno, A., Yagishita, Y. & Yamamoto, M. The Keap1-Nrf2 system and diabetes mellitus. *Arch. Biochem. Biophys.* **566**, 76–84 (2015).
111. Grankvist, K., Marklund, S., Sehlin, J. & Täljedal, I. B. Superoxide dismutase, catalase and scavengers of hydroxyl radical protect against the toxic action of alloxan on pancreatic islet cells in vitro. *Biochem. J.* **182**, 17–25 (1979).
112. Statements, P. Ceriello A. New Insights on Oxidative Stress and Diabetic Complications May Lead to a 'Casual' Antioxidant Therapy. *Diabetes Care* **26**, 1589–1596 (2003).
113. Theodore, M. *et al.* Multiple nuclear localization signals function in the nuclear import of the transcription factor Nrf2. *J. Biol. Chem.* **283**, 8984–8994 (2008).
114. Kaneto, H. *et al.* Beneficial effects of antioxidants in diabetes: Possible protection of pancreatic β -cells against glucose toxicity. *Diabetes* **48**, 2398–2406 (1999).
115. Nature Volume 294 issue 5837 1981 [doi 10.1038%2F294158a0] Grankvist, Kjell; Marklund, Stefan; Täljedal, Inge-Bert -- Superoxide dismutase is a prophylactic against alloxan diabetes.pdf.
116. Yagishita, Y. *et al.* Nrf2 protects pancreatic β -cellss from oxidative and nitrosative stress in diabetic model mice. *Diabetes* **63**, 605–618 (2014).
117. Uruno, A. *et al.* The Keap1-Nrf2 System Prevents Onset of Diabetes Mellitus. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 2996–3010 (2013).

118. Song, M. Y. *et al.* Sulforaphane protects against cytokine- and streptozotocin-induced β -cell damage by suppressing the NF- κ B pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **235**, 57–67 (2009).
119. Li, W. *et al.* Targeting Nrf2 by dihydro-CDDO-trifluoroethyl amide enhances autophagic clearance and viability of β -cells in a setting of oxidative stress. *FEBS Lett.* **588**, 2115–2124 (2014).
120. Lee, S. *et al.* Involvement of the Nrf2-proteasome pathway in the endoplasmic reticulum stress response in pancreatic β -cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **264**, 431–438 (2012).
121. Cuvelier, M. E., Richard, H. & Berset, C. Comparison of the Antioxidative Activity of Some Acid-phenols: Structure-Activity Relationship. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**, 324–325 (1992).
122. Robles-Almazan, M. *et al.* Hydroxytyrosol: Bioavailability, toxicity, and clinical applications. *Food Res. Int.* **105**, 654–667 (2018).
123. Rodríguez-Morató, J. *et al.* Potential role of olive oil phenolic compounds in the prevention of neurodegenerative diseases. *Molecules* **20**, 4655–4680 (2015).
124. Charoenprasert, S. & Mitchell, A. Factors influencing phenolic compounds in table olives (*Olea europaea*). *J. Agric. Food Chem.* **60**, 7081–7095 (2012).
125. Ramirez-Tortosa, C. *et al.* Hydroxytyrosol supplementation modifies plasma levels of tissue inhibitor of metalloproteinase 1 in women with breast cancer. *Antioxidants* **8**, 1–11 (2019).
126. de Pablos, R. M., Espinosa-Oliva, A. M., Hornedo-Ortega, R., Cano, M. & Arguelles, S. Hydroxytyrosol protects from aging process via AMPK and autophagy; a review of its effects on cancer, metabolic syndrome, osteoporosis, immune-mediated and neurodegenerative diseases. *Pharmacol. Res.* **143**, 58–72 (2019).
127. Gallardo-Fernández, M., Hornedo-Ortega, R., Cerezo, A. B., Troncoso, A. M. & García-Parrilla, M. C. Melatonin, protocatechuic acid and hydroxytyrosol effects on vitagenes system against alpha-synuclein toxicity. *Food Chem. Toxicol.* **134**, 110817 (2019).
128. Bobak, M. & Leon, D. A. Pregnancy outcomes and outdoor air pollution: An ecological study in districts of the Czech Republic 1986-8. *Occup. Environ. Med.* **56**, 539–543 (1999).
129. Xu, X., Xu, X., Ding, H., Wang, X. & Wang, X. Acute effects of total suspended particles and sulfur dioxides on preterm delivery: A community-based cohort study. *Arch. Environ. Health* **50**, 407–415 (1995).
130. Covas, M. I. *et al.* Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated by olive oil phenolic compounds in humans. *Free Radic. Biol. Med.* **40**, 608–616 (2006).
131. Bayram, B. & Özçelik, B. Zeytinyağının Biyoaktif Bileşenleri ve Sağlık Üzerine Yararları. **10**, 77–84 (2012).
132. Zeh, M., Lorenz, P., Kreutzmann, P. & Schönfeld, P. Hydroxy-1-aryl-isochromans: Protective compounds against lipid peroxidation and cellular nitrosative stress. *Redox Rep.* **13**, 23–30 (2008).
133. Togna, G. I., Togna, A. R., Franconi, M., Marra, C. & Guiso, M. Olive Oil Isochromans Inhibit Human Platelet Reactivity. *J. Nutr.* **133**, 2532–2536 (2003).
134. Visioli, F., Bellomo, G. & Galli, C. Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**, 60–64 (1998).
135. Ramachandran, B., Ravi, K., Narayanan, V., Kandaswamy, M. & Subramanian, S. Protective effect of macrocyclic binuclear oxovanadium complex on oxidative stress in pancreas of streptozotocin induced diabetic rats. *Chem. Biol. Interact.* **149**, 9–21 (2004).
136. Silvestre, R. A., Egidio, E. M., Hernández, R. & Marco, J. Tungstate stimulates insulin release and inhibits somatostatin output in the perfused rat pancreas. *Eur. J. Pharmacol.* **519**, 127–134 (2005).
137. Gonzalez, M. *et al.* Hypoglycemic activity of olive leaf. *Planta Med.* **58**, 513–515 (1992).
138. de Bock, M. *et al.* Olive (*Olea europaea* L.) Leaf Polyphenols Improve Insulin Sensitivity in Middle-Aged Overweight Men: A Randomized, Placebo-Controlled, Crossover Trial. *PLoS One* **8**, (2013).

139. de Bock, M. *et al.* Human absorption and metabolism of oleuropein and hydroxytyrosol ingested as olive (*Olea europaea* L.) leaf extract. *Mol. Nutr. Food Res.* **57**, 2079–2085 (2013).
140. Domínguez-Perles, R., Auñón, D., Ferreres, F. & Gil-Izquierdo, A. Gender differences in plasma and urine metabolites from Sprague–Dawley rats after oral administration of normal and high doses of hydroxytyrosol, hydroxytyrosol acetate, and DOPAC. *Eur. J. Nutr.* **56**, 215–224 (2017).
141. Rubió, L. *et al.* A new hydroxytyrosol metabolite identified in human plasma: Hydroxytyrosol acetate sulphate. *Food Chem.* **134**, 1132–1136 (2012).
142. Zwane, R. E., Parker, A., Kudanga, T., Davids, L. M. & Burton, S. G. Novel, biocatalytically produced hydroxytyrosol dimer protects against ultraviolet-induced cell death in human immortalized keratinocytes. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 11509–11517 (2012).
143. Manna, C. *et al.* Biological effects of hydroxytyrosol, a polyphenol from olive oil endowed with antioxidant activity. *Adv. Exp. Med. Biol.* **472**, 115–130 (2000).
144. Granados-Principal, S. *et al.* Hydroxytyrosol ameliorates oxidative stress and mitochondrial dysfunction in doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats with breast cancer. *Biochem. Pharmacol.* **90**, 25–33 (2014).
145. Granados-Principal, S. *et al.* Hydroxytyrosol inhibits growth and cell proliferation and promotes high expression of sfrp4 in rat mammary tumours. *Mol. Nutr. Food Res.* **55**, 117–126 (2011).
146. Bayram, B. *et al.* A diet rich in olive oil phenolics reduces oxidative stress in the heart of SAMP8 mice by induction of Nrf2-dependent gene expression. *Rejuvenation Res.* **15**, 71–81 (2012).
147. Zou, X. *et al.* Stimulation of GSH synthesis to prevent oxidative stress-induced apoptosis by hydroxytyrosol in human retinal pigment epithelial cells: Activation of Nrf2 and JNK-p62/SQSTM1 pathways. *J. Nutr. Biochem.* **23**, 994–1006 (2012).
148. Zhu, L. *et al.* Hydroxytyrosol protects against oxidative damage by simultaneous activation of mitochondrial biogenesis and phase II detoxifying enzyme systems in retinal pigment epithelial cells. *J. Nutr. Biochem.* **21**, 1089–1098 (2010).
149. Zrelli, H. *et al.* Hydroxytyrosol induces proliferation and cytoprotection against oxidative injury in vascular endothelial cells: Role of Nrf2 activation and HO-1 induction. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 4473–4482 (2011).
150. Visioli, F. Xenobiotics and human health: A new view of their pharma-nutritional role. *PharmaNutrition* **3**, 60–64 (2015).
151. Crespo, M. C. *et al.* One-week administration of hydroxytyrosol to humans does not activate Phase II enzymes. *Pharmacol. Res.* **95–96**, 132–137 (2015).
152. Akça, M. & Çeltik, M. N. Kemirgenlerde Diabetes Mellitus Modelleri. *Gr. Anal.* **28**, 104–105 (2007).
153. Lenzen, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* **51**, 216–226 (2008).
154. Papaccio, G., Pisanti, F. A., Latronico, M. V. G., Ammendola, E. & Galdieri, M. Multiple low-dose and single high-dose treatments with streptozotocin do not generate nitric oxide. *J. Cell. Biochem.* **77**, 82–91 (2000).
155. Bolkent, S., Bolkent, S., Yanardag, R. & Tunali, S. Protective effect of vanadyl sulfate on the pancreas of streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **70**, 103–109 (2005).
156. Ek, A. Ş. İ. M. Ş. *et al.* Kedi ve Köpeklerde Diabetes Mellitus. **1**, 23–28 (2008).
157. Eleazu, C. O., Iroaganachi, M., Okafor, P. N., Ijeh, I. I. & Eleazu, K. C. Ameliorative potentials of ginger (*Z. officinale* Roscoe) on relative organ weights in streptozotocin induced diabetic rats. *Int. J. Biomed. Sci.* **9**, 82–90 (2013).
158. Hidaka, S. *et al.* Hypoleptinemia, but not hypoinsulinemia, induces hyperphagia in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Neurochem.* **77**, 993–1000 (2001).
159. Kanter, M., Uysal, H., Karaca, T. & Sagmanligil, H. O. Depression of glucose levels and partial restoration of pancreatic β -cell damage by melatonin in streptozotocin-induced diabetic rats. *Arch. Toxicol.* **80**, 362–369 (2006).

160. Yanardağ, R., Bolkent, Ş., Tabakoğlu-Oğuz, A. & Özsoy-Saçan, Ö. Effects of Petroselinum crispum extract on pancreatic B cells and blood glucose of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biol. Pharm. Bull.* **26**, 1206–1210 (2003).
161. Akbarzadeh, A. *et al.* Induction of diabetes by Streptozotocin in rats. *Indian J. Clin. Biochem.* **22**, 60–64 (2007).
162. Manna, P., Sinha, M. & Sil, P. C. Protective role of arjunolic acid in response to streptozotocin-induced type-I diabetes via the mitochondrial dependent and independent pathways. *Toxicology* **257**, 53–63 (2009).
163. Rjasekaran, S., Sivagnanam, K. & Subramanian, S. Antioxidant effect of Aloe vera gel extract in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Pharmacol. Reports* **57**, 90–96 (2005).
164. Thulesen, J., Ørskov, C., Holst, J. J. & Poulsen, S. S. Short term insulin treatment prevents the diabetogenic action of streptozotocin in rats. *Endocrinology* **138**, 62–68 (1997).
165. Arulselvan, P. & Subramanian, S. P. Beneficial effects of *Murraya koenigii* leaves on antioxidant defense system and ultra structural changes of pancreatic β -cells in experimental diabetes in rats. *Chem. Biol. Interact.* **165**, 155–164 (2007).
166. Rebelato, E., Abdulkader, F., Curi, R. & Carpinelli, A. R. Low doses of hydrogen peroxide impair glucose-stimulated insulin secretion via inhibition of glucose metabolism and intracellular calcium oscillations. *Metabolism.* **59**, 409–413 (2010).
167. Rebelato, E., Abdulkader, F., Curi, R. & Carpinelli, A. R. Control of the intracellular redox state by glucose participates in the insulin secretion mechanism. *PLoS One* **6**, (2011).
168. Pi, J. *et al.* Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* **56**, 1783–1791 (2007).
169. Saadeh, M. *et al.* Reactive oxygen species stimulate insulin secretion in rat pancreatic islets: Studies using mono-oleoyl-glycerol. *PLoS One* **7**, (2012).
170. Fu, J. *et al.* Divergent effects of sulforaphane on basal and glucose-stimulated insulin secretion in β -cells: Role of reactive oxygen species and induction of endogenous antioxidants. *Pharm. Res.* **30**, 2248–2259 (2013).
171. Leloup, C. *et al.* Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose-induced insulin secretion. *Diabetes* **58**, 673–681 (2009).
172. Rhee, S. G. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science (80-.)*. **312**, 1882–1883 (2006).
173. Cheng, X., Siow, R. C. M. & Mann, G. E. Impaired redox signaling and antioxidant gene expression in endothelial cells in diabetes: A role for mitochondria and the nuclear factor-E2-related factor 2-Kelch-like ECH-associated protein 1 defense pathway. *Antioxidants Redox Signal.* **14**, 469–487 (2011).
174. Li, C. guang *et al.* Honokiol protects pancreatic β cell against high glucose and intermittent hypoxia-induced injury by activating Nrf2/ARE pathway in vitro and in vivo. *Biomed. Pharmacother.* **97**, 1229–1237 (2018).
175. Zhang, H. *et al.* Linderane protects pancreatic β cells from streptozotocin (STZ)-induced oxidative damage. *Life Sci.* **233**, 116732 (2019).
176. Auñon-Calles, D., Canut, L. & Visioli, F. Toxicological evaluation of pure hydroxytyrosol. *Food Chem. Toxicol.* **55**, 498–504 (2013).
177. Auñon-Calles, D., Giordano, E., Bohnenberger, S. & Visioli, F. Hydroxytyrosol is not genotoxic in vitro. *Pharmacol. Res.* **74**, 87–93 (2013).
178. Heilman, J. *et al.* Toxicological evaluation of an olive extract, H35: Subchronic toxicity in the rat. *Food Chem. Toxicol.* **84**, 18–28 (2015).
179. EFSA. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865), maintenance of normal blood HDL cholesterol concentrations (ID 1639), mainte. *EFSA J.* **9**, 2033 (2011).
180. Wang, N., Liu, Y., Ma, Y. & Wen, D. *Hydroxytyrosol ameliorates insulin resistance by*

modulating endoplasmic reticulum stress and prevents hepatic steatosis in diet-induced obesity mice. Journal of Nutritional Biochemistry vol. 57 (Elsevier Inc, 2018).

181. Dirra, R. & Sakamoto, K. Modulation of adipogenesis, lipolysis and glucose consumption in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes by hydroxytyrosol acetate: A comparative study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **440**, 576–581 (2013).
182. Jemai, H., Feki, A. E. L. & Sayadi, S. Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 8798–8804 (2009).



Dizin Kaynakları





1. Pankreas Anatomisi, Embriyolojisi, Gelişimi, Tarhan Ömer R., <https://www.turkcerrahi.com/makaleler/pankreas/pankreas-anatomisi-embriyolojisi-gelisimi/>, Erişim tarihi: 15 Ocak 2020.
2. Paulsen F, Waschke J. Sobotta Atlas of Human Anatomy: Internal Organs. 2010;207.
3. Akbas G., Pankreas duktal adenokarsinomlarında stromal komponente yönelik uygulanan immunhistokimyasal belirteçlerin prognoz ve tedavideki yeri, T.C. Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, İstanbul 2018.
4. Mescher, A.L., Junqueira Temel Histoloji Konu ve Atlas 2017: Güneş tıp kitapevleri, 2003. P.329,423.
5. Moore K. L., Persaud T.V.N., Torchia M. G., The developing human clinically oriented embryology, 2016, p. 220-219.
6. İnsülin, <http://arthurdent.blogcu.com/insulin/1015925>, Erişim Tarihi: 21 Ocak 2020.
7. Hall JE. Guyton ve Hall Textbook of Medical Physiology. 12. Editio. Elsevier Inc.; 2011. 939–953 p.
8. Altıntaş A., Pankreas Yapısı-Görevleri ve Pankreas Hastalıkları Fizyopatolojisi, file:///C:/Users/cerke/Desktop/6.%20Pankreas%20MUTLAKA%20OKU.pdf, Erişim Tarihi: 21 Ocak 2020.
9. Type 1 Diabetes Symptoms, <https://www.diabetessolutions.ml/2019/02/type-1-diabetes-symptoms.html>, Erişim tarihi: 27 Aralık 2019.
10. Type 2 Diabetes Symptoms, <https://www.diabetessolutions.ml/2019/02/type-2-diabetes-symptoms.html>, Erişim tarihi: 27 Aralık 2019.
11. Erbaş O. Experimental diabetes model. Istanbul Bilim Univ Florence Nightingale J Med. 2015;1(1):40–2.
12. Aggöl Ahmet G., Diyabetli ratlarda zeytinyağı ekstrelerinin etkilerinin incelenmesi, T.C. Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılık Biyokimya Anabilim Dalı, Erzurum 2012.
13. Atalay M, Laaksonen DE. Diabetes, oxidative stress and physical exercise. J Sport Sci Med. 2002;1(1):1–14.
14. Carmona-Ramírez I, Santamaría A, Tobón-Velasco JC, Orozco-Ibarra M, González-Herrera IG, Pedraza-Chaverri J, et al. Curcumin restores Nrf2 levels and prevents quinolinic acid-induced neurotoxicity. J Nutr Biochem, 2013;24(1):14–24.
15. Uruno A, Yagishita Y, Yamamoto M. The Keap1-Nrf2 system and diabetes mellitus. Arch Biochem Biophys. 2015;566:76–84.
16. Gökçen Y, Uyla V. Doğal Bir Antimikrobiyel: Oleuropein. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Derg. 2011;25(1):131–42.

EKLER

Ek-1/Etik Kurul Kararı

DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU BAŞKANLIĞI
ETİK KURUL BAŞVURU KARARI

Prof. Dr. Meryem ÇAM tarafından kurulumuza sunulan "Streptozotosin İle Diabetes Mellitus Oluşturulan Rat Pankreaslarında Hidroksitirozolün Nrf2 Ekspresyonu Üzerine Etkisinin Araştırılması" isimli araştırma başvuru projesi etik yönden değerlendirilmiş olup; yönergemiz ilkelerine göre proje etiği açısından "UYGUN OLDUĞUNA" oy birliği / oy çokluğu ile karar verilmiştir.

Toplantı Tarihi: 07/11/2018	Karar No: 2018/5/3	
UNVAN, ADI, SOYADI, GÖREVİ	KARAR	İMZA
Doç. Dr. Ertuğrul KAYA Başkan	UYGUNDUR	
Dr. Öğr. Üyesi Murat KABAKLIOĞLU Başkan Vekili		Toplantıya katılmamıştır.
Ali GÖK Veteriner	UYGUNDUR	
Prof. Dr. Şerif DEMİR Üye	UYGUNDUR	
Doç. Dr. Şengül CANGÜR Üye	UYGUNDUR	
Dr. Öğr. Üyesi Akif KETEN Üye		Toplantıya katılmamıştır.
Dr. Öğr. Üyesi Meral KEKEÇOĞLU Üye	UYGUNDUR	
Dr. Öğr. Üyesi Pınar GÖÇ RASGELE Üye	UYGUNDUR	
Dr. Öğr. Üyesi Emel ÇALIŞKAN Üye		Toplantıya katılmamıştır.
İzzet GÜÇLÜ Üye	UYGUNDUR	
Merve UĞUR Üye	UYGUNDUR	

Düzce Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu
Düzce Üniversitesi, Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi,
Konuralp Yerleşkesi, Merkez, 81620, Düzce.
0380 5421416 – Dahili: 4171 Faks: 0380 5421302

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Nurhilal ELCİYAR

Doğum Tarihi : 01.08.1993

Uyruğu : T.C.

Medeni Durumu : Bekar

e-mail : nhelciyar@gmail.com

Kişisel Açıklama : 2016 yılında Kilis 7 Aralık Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünden mezun oldum. 2013 yılında Düzce Üniversitesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalına bağlı PCR (Real Time PCR) Laboratuvarı, CBC (Kan sayımı, koagülasyon, seroloji, sedimentasyon) Laboratuvarı, Mikrobiyoloji (Besiyeri hazırlama, boyamalar, kültür ekimleri, değerlendirme, antibiyogram) Laboratuvarı, Parazitoloji Laboratuvarı stajı yaptım. 2014-2015 eğitim döneminde Erasmus programı ile Almanya Johannes Gutenberg Universität Mainz'da 1 yıl eğitim aldım.

EĞİTİM VE ÖĞRETİM

Ocak 2017-Ocak 2020

Uzmanlık

Düzce Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Eylül 2012-Haziran 2016

Lisans

Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi,
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Eylül 2016-Haziran 2019

Önlisans

Anadolu Üniversitesi, Açıköğretim Fakültesi,
Sağlık Kurumları İşletmeciliği

Eylül 2007-Haziran 2011

Lise

Düzce Cumhuriyet Anadolu Lisesi

KİŞİSEL BECERİLER

Yabancı Diller

İngilizce Almanca

ANLAMA		KONUŞMA		YAZILI ANLATIM
Dinleme	Okuma	Karşılıklı Konuşma	Sözlü Anlatım	
A2	B1	A2	A2	B1
A2	A2	A2	A2	A2

KURSLAR/SEMİNERLER

1. Biyometroloji ve Moleküler Biyoloji Çalıştayı - Yıl:2018 - Süre: 1 Gün, TÜBİTAK UME
2. Pedagojik Formasyon Eğitimi - Yıl: 2016 - Süre: 180 Gün, Kilis 7 Aralık Üniversitesi
3. 21. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi - Yıl:2014 - Süre: 5 Gün, Karadeniz Teknik Üniversitesi
4. 1. Türkiye Biyologlar Platformu İş, İstihdam, Kariyer Buluşması Konferansı - Yıl:2014 - Süre: 1 Gün, TSC Yönetim Sistemleri Akademisi
5. 20. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi - Yıl:2013 - Süre: 4 Gün, Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi
6. Sağlık Hizmeti Sunumunda Kalite Yaklaşımı ve ISO 9001:2008 Kalite Yönetim Sistemi Temel Eğitimi - Yıl:2013 - Süre: 2 Gün, Bülent Ecevit Üniversitesi
7. ISO 13485:2003 Tıbbi Cihaz ve Medikal Ürünlerde Kalite Yönetim Sistemi Eğitimi - Yıl:2013 - Süre: 2 Gün, Bülent Ecevit Üniversitesi
8. Sağlık Hizmeti Sunumunda Tehlike Belirleme ve Risk Değerlendirme - Yıl:2013 - Süre: 2 Gün, Bülent Ecevit Üniversitesi
9. Sağlık Hizmeti Sunumunda ve Hastane Hizmetlerinde Kalite Standartları Eğitimi - Yıl:2013 - Süre: 2 Gün, Bülent Ecevit Üniversitesi
10. Bilgisayar Kullanımı (Bilgisayar İşletmenliği-Operatör) - Yıl:2012 - Süre: 42 Gün, T.C. Milli Eğitim Bakanlığı Hayat Boyu Öğrenme Genel Müdürlüğü