

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**TİMOKİNON’UN STREPTOZOTOSİN
İLE OLUŞTURULAN TİP 1 DİYABETTE
DAMAR HASARI ÜZERİNE ETKİSİ**

YÜKSEL LİSANS TEZİ

SÜMEYRA SELCEN YONCA

2015

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans standartlarına uygun bulunmuştur.



Prof. Dr. Engin ŞAHNA

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı

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

Doç.Dr. Selçuk İLHAN



Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Doç.Dr. Selçuk İLHAN

Prof. Dr. Hakan PARLAKPINAR

Prof. Dr. Engin ŞAHNA



TEŞEKKÜR

Çalışmalarında ve tezimin hazırlanmasında bana yardımcı olan, bilgi ve tecrübesiyle bana araştırmacılığı, sistemli ve düzenli çalışmayı öğreten değerli danışmanım Doç. Dr. Selçuk İLHAN'a; çalışmalarında ve yüksek lisans eğitimim süresince beni yönlendiren anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Engin ŞAHNA'ya; tezimin fikir aşamasında bana yol gösteren Prof. Dr. M. Kaya ÖZER'e; tez sürecinde her zaman yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen ailelerime; eşim Kenan YONCA'ya ve çok değerli kızım Hatice Mina YONCA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tezimin hazırlanmasında finansman desteği sağlayan Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (FÜBAP)'ne teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLO LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
KISALTMALAR LİSTESİ	viii
1.ÖZET	1
2.ABSTRACT	3
3.GİRİŞ	5
3.1.Diabetes mellitus	6
3.1.1.Tanım	6
3.1.2.Sıklık	7
3.1.3.Sınıflandırılması	7
3.1.4.Tanı kriterleri	9
3.1.5.Diyabette patofizyolojik süreç	9
3.1.5.1.Tip-1 DM patogenezi	9
3.1.5.2.Tip-2 DM patogenezi	11
3.1.7.1.Alloksan	14
3.1.7.2.Streptozotosin (STZ)	15
3.2.Timokinon	16
3.2.1.TQ'nun etkileri	17
3.2.1.1.Antihiperlipidemik ve antihiperkolesterolemik etkisi	17
3.2.1.2. Antioksidatif etkisi	17
3.2.1.3. Antitümoral ve antikanserojenik etkisi	18
3.2.1.4. Analjezik ve antiinflamatuvar etkisi	19
3.2.1.5. Antimikrobiyal etkisi	19
3.2.1.6. İmmünomodülatör etkisi	20
3.2.2. Timokinon ve diyabet	21
3.3. Matriks Metalloproteinazlar	24
3.3.1. MMP-9	27

3.4. Endotelyal progenitör hücreler	29
3.5. Endotelyal disfonksiyon, NO ve eNOS	31
4. GEREÇ VE YÖNTEM	34
4.1. Denekler ve bakım	34
4.2. STZ ile diyabet oluşturma	34
4.3. Deney protokolü	35
4.3.1. Gruplar	35
4.3.2. Kan basıncı ölçümleri	35
4.3.3. Kan glukoz düzeyi ölçümleri	35
4.4. Cerrahi uygulamalar	36
4.5. İn vitro deneyler	36
4.6. Biyokimyasal analizler	37
4.6.1. MMP-9 ölçümleri	37
4.7. İmmünohistokimyasal analizler	38
4.8. İstatistiksel analiz	41
4.9. Kullanılan Kimyasallar	41
5. BULGULAR	42
5.1. Kan Basıncı ölçümleri	42
5.2. Kan glukoz düzeyi ölçümleri	42
5.3. MMP-9 ekspresyonu:	43
5.4. İzole Organ Çalışmaları:	44
5.4.1. Phe kasılma cevapları	44
5.4.1.1. Phe doz-cevap eğrisi	44
5.4.1.2. Phe EC50 ve Emax değerleri	45
5.4.2. Ach gevşeme cevapları	45
5.4.2.1. Ach doz-cevap eğrisi	45
5.4.2.2. Ach EC50 ve Emax değerleri	46
5.5. eNOS immünreaktivitesi	47
5.5.1. CD-34 immünreaktivitesi	48
6. TARTIŞMA	51
7. KAYNAKLAR	59
8. ÖZGEÇMİŞ	69

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Histolojik Takip İşlem Basamakları	38
Tablo 2. İmmünohistokimyasal boyama prosedürü.	40
Tablo 3. Deney başında ve sonunda sistolik kan basıncı ölçümleri .	42
Tablo 4. Deney sonunda aortik dokudan MMP-9 Ölçümleri	43
Tablo 5. Tüm gruplarda Fenilefrin doz-cevap eğrisi EC50 ve Emax değerleri.	45
Tablo 6. Tüm gruplarda Ach EC50 ve Emax değerleri.	46
Tablo 7. eNOS immünreaktivitesi.	47
Tablo 8. CD34 immünreaktivitesi.	49

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	TQ'nun kimyasal yapısı	16
Şekil 2.	TQ'un OGTT üzerine etkisi ($p < 0.05$)	22
Şekil 3.	Matriks metalloproteinaz zincir yapısı	25
Şekil 4.	MMP'lerin aktivasyon kaskadı	27
Şekil 5.	Matriks metalloproteinaz-9	28
Şekil 6.	Kemik iliğinden EPH'lerin mobilizasyonu	30
Şekil 7.	Deney başında ve deney sonunda kan glukoz düzeyleri	43
Şekil 8.	Fenilefrin doz cevap eğrisi	44
Şekil 9.	Ach doz-cevap eğrisi	46
Şekil 10.	eNOS immünreaktivitesi; Kontrol grubu	47
Şekil 11.	eNOS immünreaktivitesi; STZ grubu	48
Şekil 12.	eNOS immünreaktivitesi; TQ grubu	48
Şekil 13.	CD34 immünreaktivitesi; Kontrol grubu	49
Şekil 14.	CD34 immünreaktivitesi; STZ grubu	50
Şekil 15.	CD34 immünreaktivitesi; TQ grubu	50

KISALTMALAR LİSTESİ

Ach	: Asetilkolin
ADA	: Amerikan diyabet birliği
Ang	: Anjiyotensin 2
CAT	: Katalaz
DM	: Diabetes mellitus
DM	: Diabetes mellitus
DSÖ	: Dünya sağlık örgütü
ECM	: Ekstrasellüler matriks
Enos	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
EPH	: Endotelyal progenitör hücreler
ET	: Endotelin
GSH-px	: Glutasyon peroksidaz
IL	: İnterlökin
MMP	: Matriks metalloproteinaz
Nnos	: Nöronal nitrik oksit sentaz
NO	: Nitrik oksit
NS	: Nigella sativa
Phe	: Fenilefrin
SKB	: Sistolik kan basıncı
STZ	: Streptozosin
Tq	: Timokinon
Upa	: Ürokinaz-tip plazminojen aktivatörü

1. ÖZET

Diyabet tüm dünyada prevalansı artmakta olan kronik metabolik bir hastalıktır. Diyabetin önemli komplikasyonlarından biri endotel disfonksiyonudur. Timokinon (TQ), antioksidan, antihiperlipidemik, antidiyabetik, antiinflamatuvar, gastroprotektif, hepatoprotektif gibi birçok yararlı özelliğe sahiptir. Bu çalışmanın amacı, TQ'nun streptozotosin ile oluşturulan diyabet modelinde vasküler etkilerini araştırmaktır.

Diyabet oluşturmak için tek doz intraperitoneal STZ (50mg/kg) enjeksiyonu yapıldı. TQ uygulanan gruplardaki sıçanlara, STZ enjeksiyonundan 3 gün sonra başlanarak 3 hafta boyunca her gün ağızdan 80 mg/kg TQ verildi. Ratların kan basıncı ölçümleri (sistolik kan basıncı) başlangıç ve deney sonunda kuyruktan indirekt tail cuff yöntemi ile yapıldı. Biyokimyasal, histopatolojik ve farmakolojik incelemeler için kan ve torasik aorta örnekleri alındı.

Kan basınçları kontrol, STZ, STZ+TQ grupları arasında farklı değildi (sırasıyla 102.56 ± 4.31 , 103.20 ± 5.74 , 105.20 ± 2.09). İzole sıçan torasik aortasında, submaksimal fenilefrin (Phe) uygulaması sonrası, asetilkolin (Ach) uygulaması ile elde edilen gevşeme doz-cevap eğrisinde gruplar arasında fark yoktu. TQ, Phe EC₅₀ değerlerini kontrol grubuna göre anlamlı oranda azalttı (Kontrol, STZ, STZ+TQ grubunda sırasıyla; 6.91 ± 0.18 , 6.88 ± 0.22 , 6.54 ± 0.22). Gruplar arasında eNOS immunreaktivitesinde anlamlı bir değişim olmadığı tespit edildi (Kontrol, STZ, STZ+TQ grubunda sırasıyla; 0.28 ± 0.09 , 0.31 ± 0.07 , 0.26 ± 0.05). STZ uygulaması sonrası 3. Günde, STZ uygulanan gruplarda kan glukozu anlamlı oranda arttı (Kontrol, STZ, STZ+TQ grubunda sırasıyla; 119.50 ± 7.88 , 388.25 ± 49.59 , 398.11 ± 65.16). 3 hafta sonunda ise sadece STZ grubunda

başlangıç değerine göre glukoz düzeylerinde anlamlı oranda artış bulundu (Kontrol, STZ, STZ+TQ grubunda sırasıyla; 100.20 ± 11.05 , 480.50 ± 62.80 , 412.20 ± 51.50). Torasik aortada, STZ ve STZ+TQ uygulamaları MMP-9 enzim düzeylerini anlamlı oranda azalttı (Kontrol, STZ, STZ+TQ grubunda sırasıyla; 15.47 ± 3.80 , 2.63 ± 2.13 , 3.30 ± 0.73). STZ uygulamasının, CD34 düzeylerinde TQ ilavesiyle önlenemeyen anlamlı artışa neden olduğu tespit edildi (Kontrol, STZ, STZ+TQ grubunda sırasıyla; 0.13 ± 0.05 , 1.75 ± 0.55 , 0.15 ± 0.05).

Mevcut bulgulara göre, TQ, STZ aracılı diyabette eNOS aktivitesini ve asetilkolin gevşeme yanıtlarını etkilemeden, kasılma duyarlılığı üzerine azaltıcı etkiye neden olabilir. Ayrıca, bu modelde, TQ uygulamasının kan glukozundaki progresif artışa önleyici etki oluşturabileceği ve bu etkinin MMP-9 aracılığını içermediği fakat progenitör hücre belirteci olan CD34 hücrelerinin de müdahil olduğu bir süreçle ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: CD34, diyabet, MMP-9, STZ, timokinon

2. ABSTRACT

Effect of thymoquinon on vascular damage caused by streptozotocin-induced type-1 diabetes

Diabetes is a chronic metabolism disorder with increasing prevalence worldwide. The most complication of diabetes is endothelial dysfunction. Thymoquinone (TQ) has many beneficial effects such as antioxidant, anticancerogenic, antihyperlipidemic, antidiabetic, antiinflammatory, gastroprotective, hepatoprotective. The aim of this study is to investigate the vascular effects of TQ in STZ-induced diabetes model.

STZ was injected intraperitoneally at a single dose of 50 mg/kg to induce diabetes. The rats in TQ treated groups were given TQ (80 mg/kg body weight) once a day orally by using intragastric intubation for 3 weeks starting 3 days after STZ injection. Blood pressure of rats (systolic blood pressure) were performed by the indirect tail cuff method from the queue of rat at initial and end of experiment. Blood and thoracic aorta samples were obtained for biochemical, histopathological and pharmacological investigation.

Blood pressure was not different between groups control, STZ and STZ+TQ (102.56 ± 4.31 , 103.20 ± 5.74 , 105.20 ± 2.09 respectively). At isolated rat thoracic aorta, there is no difference between relaxation dose-response curve for Ach after application of submaximal dose of Phe. TQ significantly reduced to phe EC₅₀ values compared to the control group (Control, STZ, STZ+TQ groups respectively; 6.91 ± 0.18 , 6.88 ± 0.22 , 6.54 ± 0.22). It was determined that there was no significant change in eNOS immunoreactivity between the groups (Control, STZ, STZ+TQ groups respectively; 0.28 ± 0.09 , 0.31 ± 0.07 , 0.26 ± 0.05). At the

third day after application of STZ, blood glucose in STZ-treated group increased significantly (Control, STZ, STZ+TQ groups respectively; 119.50 ± 7.88 , 388.25 ± 49.59 , 398.11 ± 65.16). At the end of three weeks, only glucose levels were significantly increased compared to baseline in the group STZ (Control, STZ, STZ+TQ groups respectively; 100.20 ± 11.05 , 480.50 ± 62.80 , 412.20 ± 51.50). In Thoracic aorta, STZ and STZ + TQ applications has reduced significantly the levels of MMP-9 enzyme (Control, STZ, STZ+TQ groups respectively; 15.47 ± 3.80 , 2.63 ± 2.13 , 3.30 ± 0.73). It was determined that STZ application causes to increase level of CD34 which could prevent by adding of TQ (Control, STZ, STZ+TQ groups respectively; 0.13 ± 0.05 , 1.75 ± 0.55 , 0.15 ± 0.05).

According to available evidence, TQ may cause to reducing effect on contraction sensitivity without affecting the Enos activity and relaxation response to acetylcholine in STZ-induced diabet model. In addition, in this model, it may be suggest that TQ has preventive effects on progressive increases of blood glucose without involving the MMP-9 enzyme which may involve the progenitor cell markers CD34 that thought to be associated with a process.

Keywords: CD34, diabetes, MMP-9, STZ, thymoquinone

3. GİRİŞ

Diabetes mellitus (DM), organizmadaki insülin sentezi yetersizliği veya insüline karşı direnç oluşumundan kaynaklanan, yüksek kan glukozu ile karakterize olan ve uzun dönemde mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlarla seyreden metabolik bir hastalıktır. Yapılan klinik ve deneysel çalışmalarda, diyabetin, aterosklerotik hastalıklar ve özellikle koroner kalp hastalığı (KKH) açısından yatkınlık oluşturan önemli bir faktör olduğu gösterilmiştir. Periferik damar hastalığı, koroner arter hastalığı ve serebrovasküler hastalık gibi aterosklerotik komplikasyonlar, diyabetik hastalarda en sık morbidite ve mortalite nedenleridir (1).

Timokinon (TQ) ($C_{10}H_{12}O_2$, 2-izopropil-5-metil 1, 4-benzokinon) çörek otundan % 18.4 ile % 24 oranlarında elde edilebilen önemli bir aktif maddedir (2). Çörek otu tohumu ve bileşenlerinin antitümoral (3), antiülserojenik (4), antibakteriyel (5), antikanserojenik (6), hipoglisemik (3, 7), antioksidan (8), bağışıklık sistemini güçlendirici (9), antienflamatuar ve analjezik (10) etkilerinin olduğu rapor edilmiştir.

Hayvanlar üzerinde yapılan araştırmalar TQ'nun hipoglisemik (3, 7, 11-12) ve antidiyabetik (13) etkiye sahip olduğunu ortaya koymaktadır. TQ'nun β hücre fonksiyonu üzerindeki etkileri henüz çok çalışılmamış olmakla birlikte insülin salınımını arttırmak yoluyla glukoz utilizasyonunda artış ve glukoneogenezin engellenmesi ile kan glukoz seviyesini azalttığı bildirilmiştir (2, 13). TQ tarafından diyabet kaynaklı oksidatif stresin azaltıldığı ve β hücre yapısının korunduğu ve bu sebeplerle β hücrelerinin yapısal olarak oksidatif strese karşı korunmasında fayda olacağı belirtilmektedir.(14). TQ'nun diyabetteki bu

iyileştirici etkileri TQ'nun serbest radikalleri toplayıcı ve sitoprotektif özelliklerine bağlanmaktadır (12, 15).

Literatür araştırmalarında diyabette hiperglisemiye bağlı olarak gelişen damar hasarında TQ'nun koruyucu etkisi ile ilgili mevcut verinin sınırlı olduğu gözlemlendi. Bu çalışmada da diyabette hiperglisemiye bağlı olarak gelişen damar hasarında TQ'nun koruyucu etkisine muhtemel katılımcı faktörlerin araştırılması amaçlandı.

Bu amaçla vasküler düz kas ve endotelial fonksiyonun değerlendirildiği izole organ banyosu çalışmalarıyla birlikte, immünohistokimya yöntemiyle endotelial nitrik oksit sentaz (Enos) enzimi ve CD34 hücre yoğunluğu ve ELİZA metoduyla matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9) enzim yoğunlukları ölçüldü.

3.1. Diabetes mellitus

3.1.1. Tanım

DM günümüz insanının yaşam şartlarından dolayı tüm dünyada hızla yayılan, yüksek mortalite ve morbidite riski taşıyan, yaşam boyu sürekli izlem ve tedavi gerektiren, akut ve kronik komplikasyonları sebebiyle hastanın yaşam kalitesini düşüren kronik metabolik bir hastalıktır.

DM, kendine özgü hümmoral ve dokusal değişimlerle karakterize, klinik tablo ve patogenez açısından heterojen, kronik hiperglisemi tablosuyla seyreden bir metabolizma hastalığıdır. Bu hiperglisemik durumun temelinde, genetik ve çevresel etkenler bulunmaktadır. Hiperglisemi pankreas hücrelerinin salgıladığı insülin yokluğuna veya insülin etkisine zıt etkenlerin fazlalığına bağlı olarak ortaya çıkar (16). Hastalığın seyri sırasında hiperglisemik hiperosmolar

nonketotik koma, hipoglisemi, ketoasidoz gibi akut komplikasyonların yanı sıra nefropati, nöropati, retinopati, ateroskleroz gibi kronik komplikasyonlar gelişmekte ve dünyada her yıl binlerce kişi diyabetin komplikasyonlarından ölmektedir (17, 18).

3.1.2. Sıklık

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün 2007 yılında yayınladığı raporda dünya nüfusunun yaklaşık % 6.4'ünde diyabetin görülmekte olduğu ve birçok ülkede son 20 yılda görülme sıklığının ikiye katlandığı belirtilmiştir. Türkiye'de 35 yaş üstü nüfustaki görülme sıklığı % 11,3 olarak bildirilmiştir ve görülme sıklığı açısından kadın ve erkek arasında anlamlı bir fark yoktur (19). Türkiye Diyabet Epidemiyolojisi Çalışması (TURDEP) sonuçlarına göre, ülkemizde 20 yaş ve üzeri bireylerde diyabet prevalansı % 7,2'dir. Tüm diyabetlilerin % 80'inden fazlası tip-2 diyabetlidir ve bozulmuş glukoz toleransı prevalansı da % 6,7'dir (20).

3.1.3. Sınıflandırılması

DM için güncel olarak DSÖ ve Amerikan Diyabet Birliği (ADA)'nin kabul ettiği iki sınıflandırma mevcuttur (21).

Yeni Sınıflama

- A. Tip-1 DM (İnsülin bağımlı DM);
 - a. Otoimmün
 - b. idiyopatik
- A. Tip-2 DM;
 - a. Obez olmayan (metabolik kontrol için insülin gerektiren (DM)
 - b. Obez (İnsülin gerektirmeyen DM)
- B. Diğer spesifik DM tipleri (endokrin bozukluklar, genetik sendromlarda görülen DM, pankreas rahatsızlıkları, ilaç ve kimyasallara bağlı insülinopatiler)

Tip-1 DM: Hastaların % 90'ında otoimmün (Tip-1A), % 10 kadarında nonotoimmün (Tip-1B) β -hücre yıkımı ve mutlak bir insülin eksikliği söz konusudur. Tip-1A diyabette genetik olarak yatkın kişilerde çevresel faktörler (virüs, toksin vb) tarafından otoimmünite uyarılır ve progresif beta hücre yıkımı başlar. Beta hücrelerin oranı rezervi % 80-90 azaldığında klinik olarak DM şikayetleri ortaya çıkar. Tip-1B DM ise otoimmünite haricinde farklı nedenlerle insülin yetersizliği sonucunda oluşur (22).

İnsülin; pankreastaki Langerhans adacıklarının β -hücrelerinden salgılanan, 51 aminoasitlik bir proteindir. Başlıca görevi glukozun hücre içersine alınmasını sağlamaktır. Glikojen yapımını arttırırken, glukoneogenezi azaltmaktadır. Glukoz kanda arttığında glikojen sentezini arttırarak glukozun depozisyonunu sağlayarak kanda glukozu düşürür. İnsülin lipolizi tetiklerken, lipojenezi inhibe eder (23).

En başta kan glukoz düzeyi olmak üzere, insülin seviyesini etkileyen pek çok etken vardır. Kan glukoz düzeyinin yüksek olması insülin sekresyonunu arttırır. Lösin ve arginin gibi bazı aminoasitler de insülin salınımını uyarmaktadırlar. Diyabet tedavisinde kullanılan sülfonil üre ve glinid grubu ilaçlar etkilerini insülinin salınımını arttırarak gösterirler. Ayrıca oral glukoz alımında insülin düzeyinin intravenöz glukoz yüklemesine göre daha fazla olduğu bildirilmiştir. Bu durum, sindirim sisteminde yol alan glukozun bağırsak hormonlarını etkileyerek insülin sekresyonuna etki ettiğini göstermektedir (23).

Tip-2 DM: Daha büyük sıklıkla görülen, başlangıçta insülin gereksinimi olmadan kontrol edilebilen, genetik yatkınlığın söz konusu olduğu, daha çok 30 yaş üstünde görülen fakat obezite artışının sonucu olarak çocukluk ve adolasan çağlarında da ortaya çıkabilen diyabet türüdür. Hastalar sıklıkla obez ya da

kiloludur. Bu hastalarda insüline karşı direnç gelişmiş ya da insülin sekresyonunda azalma meydana gelmiştir (16, 22)

3.1.4. Tanı kriterleri

ADA ve Avrupa Diyabet Yönetim Grubu (EDPG) tarafından 1998 yılında tanı kriterleri belirlenmiş; daha sonra 2006 yılında revize edilerek yeniden yayınlanmıştır. ADA'nın yeni tanı kriterlerinde açlık kan glukozu 126 mg/dl olarak güncellenmiştir (22).

3.1.5. Diyabette patofizyolojik süreç

İnsülin yokluğu, yetersizliği veya insülin reseptörlerinin insüline karşı direnç oluşturmaları DM oluşumunun en önemli nedenleridir. Bu olayların etiyolojik sebepleri henüz tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte diyabetin genetik ve çevresel etkilerin sonucu geliştiği kabul edilmiştir.

Tip-1 ve Tip-2 diyabette etiyolojiye bakıldığında net bir hiperglisemik durum mevcuttur. Oluşan hiperglisemik tablo ve birlikte oluşan metabolik bozukluklar diyabette glikoz metabolizmasının önemli katılımını göstermektedir. Ayrıca diyabetik durumda, plazma lipit ve proteinlerinin katabolizması ve sonuçta lipit yıkım ürünü olan ketonların çabuk şekilde eliminasyonunun yapılamaması sonucu ketoasidozis oluşması, lipit ve protein metabolizmasının da önemli katılımına işaret eder.

3.1.5.1. Tip-1 DM patogenezi

Progresif beta hücre yıkımının bulunduğu, insüline bağımlı tedavi gerektiren diyabet formudur. Otoimmün başlangıçlı bir hastalık olup, çoğunlukla

çocukluk ve genç erişkin döneminde tanı konulur. Nadiren ileri yaşlarda da tanı konur. Daha çok kış aylarında klinik belirti vermekle birlikte küçük yaş gruplarında her mevsimde gözlenebilir (1).

Tanı anında (pankreasın histopatolojik analizinde β hücre adacıklarının makrofaj ve lenfosit tarafından infiltre olduğu bir insülinitis oluşumu gözlenmiştir. Ayrıca adacık hücrelerine karşı bağışıklık sistemi aktivasyonu gösterilmiştir. Yaklaşık %90 hastada otoantikorlar mevcuttur. Fakat otoantikorların beta hücre hasarına hücre sel immünite kadar katılımcı olmadığı düşünülmektedir. Diyabet tanısı alan bir kısım hastalarda başka otoimmün hastalıkların varlığı da tespit edildiğinden diyabet patogenezinde immün sistemde meydana gelen bir bozukluğun rol alabileceği ileri sürülmektedir (24).

Tip-1 DM iki ana başlıkta incelenebilir: idiyopatik ve immün başlangıçlı DM.

a. *İmmün başlangıçlı DM:* Beta hücrelerinde hücre sel aracılı otoimmün yıkım sonucu gelişir. Patofizyolojisinde adacık hücre otoantikorları (ICA), glutamat dekarboksilaz otoantikorları (GADA), insülin otoantikorları (İAA) ve tirozin-fosfat IA-2 ve IA-2b otoantikorlarıdır (1).

Tip-1 diyabetiklerin birinci derece akrabalarında beta hücre otoimmünite prevalansı, aile öyküsü bulunmayan okul çocuklarına kıyasla 3-5 misli, genel topluma göre ise 20 misli daha yüksektir (1).

Hastalıkta birinci belirti bazı hastalarda ketoasidoz olarak görünmekte iken diğerlerinde infeksiyon veya başka stres etkenlerinin mevcudiyetinde çabuk ilerleyen tehlikeli glikoz yüksekliği mevcuttur. İleri evrede insülin salınımı çok

azalmış veya tükenmiştir. Nihayetinde C-peptid seviyeleri saptanamayacak düzeye gerilemiştir.

b. *İdiyopatik DM*: Tip1 diyabetin bazı formlarının etyolojisi bilinmez. Kalıcı insülinopeniye rağmen otoimmunitenin kanıtı da mevcut değildir. Hastalar çoğunlukla Afrika-Asya bölgelerinde saptanmaktadır. Genetik temelli olup, epizodlar halinde ketoasidozis ve epizodlar arasında değişken seviyede insülin yetmezliği saptanmaktadır.

3.1.5.2. Tip-2 DM patogenezi

Diyabetli hastaların % 90-95'i bu sınıfa girmektedir. İlerleyen yaşlarda ortaya çıkar ve insüline bağımlılık yoktur. Semptomlar yavaş yavaş gelişir. Günümüzde yetişkin başlangıçlı diyabet olarak adlandırılır (25).

Son yıllarda tip-2 diyabetin, patofizyolojisi yoğun olarak çalışılmıştır ve çoğu popülasyonda benzerdir. Patofizyolojisinde genetik yatkınlıkla birlikte çevresel etkenler de suçlanmaktadır (26).

Tip-2 DM'nin temeli tam anlaşılmamış olup ana olarak üç baskın mekanizma ileri sürülmüştür (26):

- a) *İnsüline duyarlılıkta azalma/ insülin direnç,*
- b) *Röralif insülin yetmezliği ve beraberinde beta hücreleri fonksiyonlarında kayıp (insülinin azlığı),*
- c) *Karaciğer glukoneogenezinde artış.*

Yeni çalışmalarda Tip-2 DM gelişiminde farklı bir görüş olarak ana problemin hiperinsülinemi olduğu ve insüline karşı direncin hiperinsülinemiden kaynaklandığı hipotezi ileri sürülmüştür. Buna göre; santral sinir sisteminin bazı

bölgelerinde (ventromedial hipotalamus, eminensia media gibi) oluşan değişikliklerin beslenme, ısı dengesi ve sempatik aktivite gibi otonom işlevleri düzenleyen nöropeptid-Y gibi bazı nöroregulator peptidlerin aşırı üretimini uyarmaları sonucu vagus sinirinin aktive edilmesi ve devamında insülin salgısının artırılmasının söz konusu olabileceği ileri sürülmektedir. Bundan başka sağlıklı kişiler üzerinde gerçekleştirilen çalışmalarda insülin direncine sebep olarak uzun süreli fizyolojik öglisemik hiperinsülineminin sebep teşkil edebileceği gösterilmiştir (27).

β hücreleri, lipid metabolizması ve kası ilgilendiren metabolik olaylarda katılımcı moleküllerle ilişkili genler, DM patogenezinde sorumlu tutulmak için aday olabilecek genlerdir (28).

Diyabette lipid peroksidasyonundaki artış oksidatif stresin artmasına ve hücresel hasar oluşmasına neden olur. β hücrelerinde etkin bir antioksidan sistemin bulunmaması bu hücrelerin diğer hücelere göre oksidatif strese daha duyarlı olmasına neden olmaktadır (29).

Süperoksit (O_2^-) ve diğer serbest oksijen radikalleri (SOR) sabit hücresel metabolizma ürünleridirler (30, 31). SOR ile antioksidan savunma mekanizması arasında kritik bir denge vardır (32). Oksidatif stres gelişimi için bu radikallerin yapımında bir artma veya yıkımlarında bir azalma gibi dengeyi bozucu bir patolojik durum gerekmektedir. Bu kritik dengenin serbest oksijen radikalleri lehinde bozulması oksidatif stres olarak adlandırılır. Süperoksit normal olarak hızlı bir şekilde sağlıklı dokulardan Süperoksit dismutaz (SOD) tarafından temizlenmektedir (33). Süperoksit tarafından damarlarda protein kinaz C (PKC) aktivasyonu üzerinden vazokonstriksiyon olduğu gösterilmiş (34) ve bu etkinin

süperoksit tarafından araşidonik asitin nonenzimatik oksidasyonu yoluyla üretilen izoprostanlar tarafından olabileceği ileri sürülmüştür.

3.1.6. DM'nin komplikasyonları

DM oluşumu sonrasında hastalığın ana özelliği olan hiperglisemi ve başka kimyasal reaksiyonların sonucunda meydana gelen toksik bileşiklere bağlı olarak akut ve kronik komplikasyonlar gelişmektedir (35).

Hipoglisemi, laktik asidoz, ketoasidoz (diyabetik koma), hiperglisemik nonketotik koma, bakteri/mantar enfeksiyonları diyabetin akut komplikasyonlarıdır. Kronik komplikasyonlar makrovasküler ve mikrovasküler olmak üzere iki alt başlıkta incelenir. En sık görülen mikrovasküler komplikasyonlar retinopati, nöropati, nefropati; makrovasküler komplikasyonlar ise aterosklerozda hızlanma, koroner arter hastalığı, diyabetik ayak ve impotensir. (22, 36).

3.1.7. Deneysel diyabet modelleri

Yüksek morbidite ve mortaliteye sahip olan ve yaşam kalitesini oldukça düşüren diyabet hastalığının patogenezi ve komplikasyonları hakkında araştırma yapmak için deneysel hayvan modelleri sıklıkla kullanılmaktadır. İnsanlar üzerinde yapılması mümkün olmayan çalışmalarda deney hayvanlarının kullanılması istatistiksel değerlendirme yapılabilecek sayıda denekle çalışılabilmesine, patolojiye genetik olarak uygun türlerin seçilebilmesine, değişkenlerin standardizasyonunun sağlanmasına ve terapötik yaklaşımların denenmesine olanak oluşturmaktadır. Bazı hayvan modelleri patolojik özellikler

bakımdan insandaki hastalığa ne kadar benzese de o hastalığı tam olarak temsil ettiği söylenemez (37).

Deneyisel diyabet modelleri arasında kimyasal ajanların kullanılması sonucu oluşan diyabetik modeller, diyet değişikliği sonucu oluşan diyabetik modeller, genetik modifikasyon ile oluşturulan diyabetik modeller ve cerrahi müdahale sonucu oluşan diyabetik modeller sayılabilir (37).

Bilimsel metodolojideki gelişmelerle birlikte pankreas-insülin arasındaki ilişki ortaya konulmuş, pankreatektomi yöntemi dışında, pankreasın ve beta hücrelerinin spesifik toksinler ile harap edilmesi sonucu diyabet modeli oluşturulabileceği gösterilmiştir. Alloksan, streptozotosin ve çinko şelatörleri diyabet oluşturmak için kullanılan kimyasallardır (38).

3.1.7.1. Alloksan

Alloksan (2,4,5,6-tetraoxyprimidine; 2,4,5,6-pyrimidinetetrone) ürik asit türevi olan antineoplastik bir ajandır. Genellikle monohidrat tuzu halinde bulunur. Hidrofiliktir ve suda kolayca erir. Toz hali 2-8 °C’de, solüsyon hali ise 4 °C’nin altında saklanmalıdır (39). Alloksan genellikle insüline bağımlı tip-1 diyabet oluşturmak için kullanılmaktadır (40).

Alloksan genellikle serum fizyolojik veya distile su içerisinde çözündürülerek uygulanır. Bunun yanısıra sitrat tamponu (pH: 3-4,5) da bu amaçla kullanılabilir (41). Alloksan diyabetojenik etki için subkutan(sc), intraperitonel (ip) ve intravenöz (iv) uygulanabilir (40). Alloksan dozu deney hayvanının türü, cinsi, yaşı, beslenme özellikleri ve kilosuna göre değişkenlik gösterir. Ratlarda periton içi 120mg/kg dozda üç gün üst üste uygulama yapılır.

Son uygulamadan sonraki üçüncü günde, bir gece önce aç bırakılan hayvanlarda sabah açlık kan şekeri ölçümü yapılır ve açlık kan şekeri düzeyi 250 mg/dL'nin üzerinde olanlar diyabet kabul edilir. (42). Başka bir yöntemle göre tek doz halinde 150 mg/kg alloksan uygulaması yapılır. Alloksan uygulaması sonrası pankreastan yoğun insülin salgılanır. Ölümcül olabilen hipoglisemiyi önlemek amacıyla 4-6 saat 15-20 mL % 20'lik glukoz çözeltisi ip olarak uygulanır. Daha sonra 24 saat süreyle %5'lik glukoz çözeltisi içme suyuna ilave edilir. İki hafta sonrasında hayvanların açlık kan şekeri düzeyleri ölçülür, 200-260 mg/dL düzeyinde olanlar diyabet kabul edilir (43, 44).

3.1.7.2. Streptozotosin (STZ)

Antineoplastik, neoplastik ve diyabetojenik özellikleri olan; streptomycetes achromogenes tarafından sentezlenen; 2-Deoxy-2-([(methylnitrosoamino) carbonyl]amino)-D-glucopyranose yapısında olan geniş spektrumlu bir antibiyotiktir (39). Işıktan etkilenir ve -20 °C'de saklanmalıdır. Nötral pH'da hızla bozunduğu için pH'sı 4-4,5 olan sitrat tamponunda çözülmeli, ışıktan korunarak hemen uygulanmalıdır (37). Pankreasın beta hücrelerinde harabiyet oluşturarak insülin bağımlı tip 1 ve insüline bağımlı olmayan tip-2 diyabet oluşturmak amacıyla kullanılır. Alloksana göre daha geniş bir doz aralığı vardır. Yetişkin sıçanlarda tip 1 diyabet oluşturmak için iv 40-60 mg/kg tek doz halinde uygulanabilir. Yenidoğan sıçanlarda bu doz ip veya iv 100mg/kg'dır (40). Doz aralığı daha geniş bir şekilde (35-80 mg/kg) de kullanılabilir (45, 46). STZ'nin ip ve sc uygulamaları için de iv uygulamaya benzer doz aralıkları vardır (47).

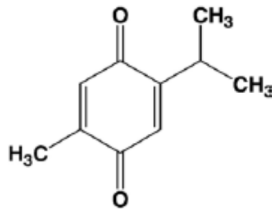
Tip-2 diyabet elde etmek için STZ yenidoğan hayvanlara doğumdan sonraki ilk hafta ve özellikle birinci veya ikinci günlerde uygulanmaktadır. Uygulamaya bağlı olarak gelişen pankreastaki hasarın sonraki günlerde rejenere olduğu ve tip-2 diyabete benzeyen bir tablonun oluştuğu gözlemlenmiştir.(48). Bu yöntem tip-2 diyabet oluşturulmada en çok tercih edilen kimyasal yöntem olmuştur (40).

Tip-2 diyabet oluşturmada diğer bir yöntem ise, STZ uygulamasından 15 dk önce NAD'ı parsiyel koruyucu dozda uygulayarak oluşturulur.(49-50). Bu şekilde oluşan diyabet modelinin tip-2 diyabeti iyi taklit ettiği ve insülinotropik ajanların araştırılmasında avantajlı olacağı bildirilmektedir (49).

STZ kullanılarak tip-2 diyabet oluşturma'nın diğer bir yolu da, yüksek fruktozlu (51-52) veya yüksek yağlı (53, 54) diyet ile bir süre beslenme sonucu STZ enjeksiyonudur.

3.2. Timokinon

TQ ($C_{10}H_{12}O_2$, 2-izopropil-5-metil 1,4-benzokinon), Ranunculacea (Düğün çiçeğigiller) familyasının Nigella sativa türü olan çörek otunun uçucu yağından elde edilmektedir (55, 56). Çörek otu uçucu yağının en önemli bileşeni olup % 18,4-24 oranında bulunmaktadır (2).



Thymoquinone (TQ)

Şekil 1. TQ'nun kimyasal yapısı (2)

3.2.1. TQ'nun etkileri

3.2.1.1. Antihiperlipidemik ve antihiperkolesterolemik etkisi

Obezite ve vücut yağ miktarındaki artış hiperleptinemiye, hipertrigliseridemiye ve hiperkolesterolemiye neden olmaktadır (57, 58). TQ 6 hafta süreyle 50 mg/kg dozda gavaj yoluyla ratlara uygulanmış ve bunun sonucunda hem standart diyet ile hem de yüksek yağlı diyet ile beslenmede canlı ağırlıklarında düşüşe sebep olduğu gözlemlenmiştir.(59). TQ'nun besin alımını azaltıcı etkiye sahip olduğu ve çörek otu yağının 6. haftadan itibaren canlı ağırlığını düşürdüğü bildirilmektedir (60). TQ'nun canlı ağırlığını, total kolesterolü, trigliseridi, düşük dansiteli lipoprotein düzeyini azalttığı bildirilmektedir (61-63).

3.2.1.2. Antioksidatif etkisi

Ortaklanmamış elektrona sahip olan atom, atom grupları veya moleküller bu elektron sebebiyle oldukça kararsız bir yapı gösterirler. Serbest radikal olarak adlandırılan bu yapılar lipid, karbonhidrat, protein gibi moleküllerle etkileşerek daha kararlı duruma gelmeye çalışırlar. Bu etkileşim hücre hasarı oluşumuna neden olur. Bu durum başta kardiyovasküler rahatsızlıklar olmak üzere kanser gibi pek çok hastalığın temelini oluşturur (9).

Şu ana kadar yapılan birçok araştırmada TQ'nun farklı mekanizmalar ile antioksidan etki gösterdiği belirlenmiştir. TQ'nun hidroksil radikalleri ve süperoksit radikal anyonunu içinde barındıran pek çok reaktif oksijen türlerinde temizleyicisi etkinlik gösterdiği bildirilmiştir (64, 65). Ayrıca 5-hidroksieikosa-tetraenoik asiti ve 5-lipooksigenaz ürünlerinin oluşumunu inhibe ettiği

gösterilmiştir (66). Doksorubisin ile indüklenmiş nefropatide TQ uygulaması lipid peroksidasyonunu baskılayarak antioksidan etki oluşturmuş, nefropatiyi önlemiştir (8). TQ ve sentetik tertbutilhidroquinon (TBHQ)'un antioksidan özellikleri karşılaştırılmış ve TQ'un süperoksit anyon temizleyicisi olarak daha aktif olduğu gösterilmiştir. Her iki maddenin de antioksidan prooksidan etkileri olduğu, konsantrasyonlarına bağlı olarak demire bağlı mikrozomal lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği belirtilmiştir (65).

3.2.1.3. Antitümoral ve antikanserojenik etkisi

Kanser oluşumunun temel nedeni, hücrelerin sürekli ve kontrolsüz çoğalmasıdır. Sebep olarak da hücrelerin çoğalmasını, farklılaşmasını ve hücre döngüsünü kontrol eden genlerde meydana gelen değişiklikler gösterilmektedir. Yapılan pekçok in vitro ve in vivo araştırmada çörek otu tohumlarının ve TQ'nun antitümoral etkinliği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar TQ'nun kolorektal kanser (67) , neoplastik keratinositler (68), göğüs ve yumurtalık adenokarsinomu (69), neoplastik keratinositler (68), insan osteosarkomu (70), fibrosarkoma, akciğer karsinomu, prostat kanseri (6) gibi pek çok kanser çeşidinde hücrelerin proliferasyonu üzerine inhibitör etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. TQ ve ditimokinon hücre G1 fazında iken apoptozisi tetikleyerek sitotoksik etkinlik gösterir. Hücre büyümesinin durdurulmasını ise p53'ün gen ekspresyonu ile protein ekspresyonunu arttırarak ve anti-apoptotik Bcl-2 proteinini inhibe ederek sağlanmaktadır (68).

3.2.1.4. Analjezik ve antiinflamatuvar etkisi

İnflamasyonun akut ve kronik fazlarının devamlılığı başlıca iki mediatör tarafından sağlanır. Bunlar siklooksijenaz (COX) ve lipooksijenaz (LO) enzimleridir. LO yolunda lökotrienler (LT), COX yolunda ise prostaglandinler (PG); sentez edilmektedir. PG ve LT ile alerji ve inflamasyonda görev almaktadırlar.

TQ, araşidonik asit mekanizmasında hem LO hem de COX yolunu baskılayarak antiinflamatuvar etkinlik göstermektedir (71). TQ'nun polimorf nükleer lökositlerden olan 5-lipooksijenazı ve 5-hidroksi eikosa tetra enoik asit üretimini inhibe ettiği bildirilmekte ve inflamatuvar hastalıkların tedavisinde etkin olarak kullanılabileceği söylenmektedir (66). Farelerde allerjik hava yolu inflamasyonu modelinde ise TQ, PGD₂ ve COX₂'yi inhibe ederek antiinflamatuvar etkinlik göstermiştir (72).

3.2.1.5. Antimikrobiyal etkisi

TQ ve Timohidrokinon (THQ)'un antibakteriyel, antifungal, antiviral ve antihelminitik olmak üzere antimikrobiyal özellikleri olduğu rapor edilmiştir. *Staphylococcus aureus*'un TQ'ya karşı duyarlılık gösterdiği ve TQ'nun 3 µg/ml dozunda bakteri üremesinde durdurucu, 6 µg/ml dozunda ise bakteriler üzerinde öldürücü etkili olduğu bildirilmiştir. Aynı duyarlılık THQ'da ise TQ dozunun yaklaşık 100 katı fazla dozda görülmüştür. Diğer gram-negatif bakterilerin duyarlılığının daha az olduğu bildirilmiştir (5). Çörek otu uçucu yağının antimikrobiyal özelliği araştırılırken bu özelliğinin TQ kaynaklı olduğu belirtilmiştir (73). TQ'nun eter ekstresinin antifungal etkinliği ile deride bulunan

mantar enfeksiyonu tedavi edilmiş ve halk arasında çörek otunun kullanımını desteklemiştir (74).

3.2.1.6. İmmünomodülatör etkisi

Bağışıklık, doğal bağışıklık ve kazanılmış bağışıklık olarak iki gruba ayrılabilir. Doğal bağışıklık makrofajlar, doğal katil hücreler (natural killers), granülositler gibi spesifik olmayan hücreleri kapsar. Kazanılmış bağışıklık ise, antijen spesifik antikor salgılayan B hücreleri aracılı bağışıklığı, CD4+ ve CD8+ T hücreleri aracılı hücresel bağışıklığı kapsar (75). CD8+ hücreleri kanserli ya da enfeksiyonlu bölgede litik etki gösterirken, CD4+ hücreleri bağışıklık cevabının düzenlenmesi ile görevlidir.

Yapılan çalışmalarda çörek otunun ve TQ'nun immün sistem üzerinde etkili olduğu gösterilmiş; CD4+ hücreleri, CD8+ hücreleri ve doğal katil hücrelerini arttırdığı belirtilmiştir (9, 76, 77). Swamy ve Tan tarafından 2000 yılında yapılan bir çalışmada çörek otu yağının T hücreleri üzerinde çoğaltıcı etkiye sahip olduğu, fakat B hücreleri üzerinde etkisiz olduğu vurgulanmıştır. Bu bulgular sonucunda çörek otu yağının ana bileşenlerinin T hücre aracılı hücresel bağışıklığı artırırken diğer bileşenlerinin B hücre aracılı humoral bağışıklığı baskıladığını göstermektedir (9). TQ'nun hücresel bağışıklığı arttırıcı etkisinin kısmen de olsa antiinflamatuvar etkisiyle bağlantılı olduğu (9); inflamasyonlu ve otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği ortaya koyulmuştur. Bu hastalıkların tedavisinde makrofajlarda üretilen NO miktarının azaltarak etki gösterdiği bulunmuştur. TQ, lipopolisakkarit (LPS) ile uyarılan makrofajların supernatantlarındaki nitrit üretiminde azaltıcı etki göstermiş ve periton

makrofajlarında bulunan indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) protein seviyesinde de konsantrasyona bağı olarak azaltıcı etki göstermiştir (78).

3.2.2. Timokinon ve diyabet

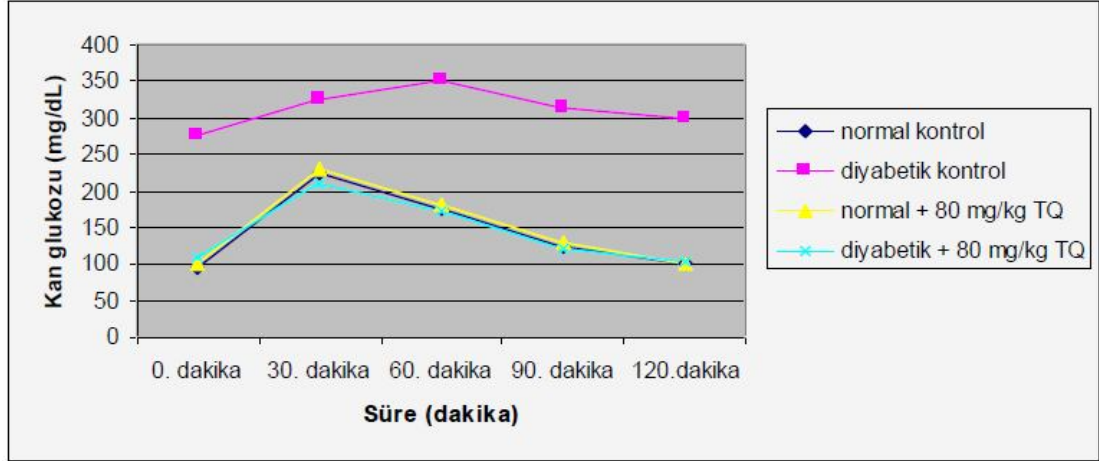
DM'nin patogenezi ve oral hipoglisemik ajanlarla kontrol altına alınması uzun süre araştırılan bir konu olmuştur (79). Deneysel olarak indüklenmiş hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda TQ'nun hipoglisemik etkileri araştırılmıştır. TQ'nun hipoglisemik etkinlik göstermesinin nedeninin kısmi olarak hepatik glukoneogenez yolu ile olabileceği bildirilmiştir (80).

Hawsawi ile arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada intraperitoneal yolla TQ verilmiş ve TQ'nun glikoz düzeylerini düşürdüğünü gösterilmiştir (11). Bir diğer çalışmada STZ-NA indüklenmiş ratlarda TQ'un karbonhidrat metabolizmasında rol alan enzimler ve hiperglisemik durum üzerindeki etkileri araştırılmış ve TQ verilen diyabetik farelerde plazma glukoz seviyelerinde önemli bir azalma; insülin seviyelerinde ise önemli bir artma bildirilmiştir (2). Tek doz STZ enjeksiyonu ile oluşturmuş tip-1 diyabetli ratlara gavaj ile 50 mg/kg dozunda 4 haftalık TQ muamelesi sonrasında TQ'nun yüksek oranda serum glukoz düzeyini düşürdüğü; düşük olan serum insülin konsantrasyonunu ise yükselttiği bildirilmiştir (14).

Buna karşı olarak nondiyabetik ratlarda 50 mg/kg/gün dozda gavaj ile verilen TQ'nun diyabetlilerdekinin tersine kontrol grubunda plazma insülininin seviyesini düşürdüğü ve kan glukoz düzeyini yükselttiği de bildirilmiştir (59).

Pari ve arkadaşları yaptıkları bu çalışmada Du vignaud ve Karr (1925) metoduna göre oral glukoz tolerans testi uygulamışlardır. Gece açlığı sonrası 0. dakikada kan glukoz düzeyleri ölçülmüş, daha sonra farelere 2 mg/kg dozda oral

yoldan glukoz çözeltisi uygulanmışlardır. Uygulama sonrası 30., 60., 90., ve 120. dakikalarda kan glukoz düzeyleri tekrar ölçülmüştür. Yapılan çalışma sonucunda TQ verilen diyabetik farelerin glukoz toleranslarının normal farelere benzerlik gösterdiği, en fazla glukoz konsantrasyonu düşüşünün ise 80 mg/kg dozda TQ verilen farelerde olduğu gözlenmiştir (Şekil 2) (2).



Şekil 2. TQ'un OGTT üzerine etkisi ($p < 0.05$)

Fararh ve arkadaşları tarafında 2005 yılında yapılan bir çalışmada da TQ'nun açlık kan glukoz düzeyini önemli ölçüde düşürdüğü gösterilmiştir (13).

Kan glukoz düzeyi hemostazında en önemli rolü karaciğer üstlenmiştir. Diyabetik durumda, insülin eksikliği veya yetersizliğine bağlı olarak heksokinaz ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitelerinde azalma görülmüştür. TQ insülin salınımını arttırmasıyla her iki enzimin de hepatik dokulardaki aktivitesini arttırır. Böylece glukozun hücrel biyosentezde kullanımı artar, kan glukoz düzeylerinde ise dikkat çekici bir düşüş gözlemlenir (2).

Glukojenez yolu ile hepatik dokudaki glukoz üretimi hiperglisemiye katkıda bulunmaktadır. DM'ta glukojenezin artmasında ise glukoz-6-fosfataz, fosfoenol pirüvatkarboksikinaz (PEPCK), fruktoz 1,6-bisfosfataz vb. önemli

enzimlerin üretimlerindeki artışın etkili olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda TQ'nun bu enzimlerin aktivitelerini düşürdüğü gösterilmiştir. Bu durum, TQ'nun insülin sekresyonunu ve glukozun dokulardaki kullanımını artırarak karaciğerdeki glukoz sentezini düşürerek, bozulmuş karbohidrat metabolizmasını iyileştirici etkinlik oluşturabileceği fikrini desteklemektedir (2).

Glukoz ve proteinlerin üzerinde bulunan amino asitlerin enzimatik olmayan ve yavaş meydana gelen reaksiyonlar sonucunda glikozile proteinler oluşur. Erişkinlerde kandaki hemoglobinin % 97'si HbA₁'dir. HbA₁'in HbA_{1a}, HbA_{1b} ve HbA_{1c} olmak üzere üç formu mevcuttur. En çok bulunanı ise HbA_{1c}'dir. DM'ta hiperglisemi nedeniyle proteinlerin glikolizlenme miktarında ciddi artış gösterir. Hemoglobinin glikolizlenmesi iki basamakta meydana gelir ve geri dönüşümlü bir reaksiyondur. Glikolize hemoglobinin oluşum hızı glukoz miktarının artışı ile doğru orantılı olarak yükselir. Glikolize hemoglobin, son 120 günlük süreçteki ortalama gliseminin klinik olarak yararlı bir göstergesidir. Glikozile hemoglobin ölçümleri HbA_{1c} ile yapılmaktadır ve sonuç total Hb yüzdesi olarak gösterilir (81, 82). HbA_{1c} geçmiş 2 veya 3 aylık süreçteki ortalama kan glukoz seviyesi ile doğru orantılıdır ve kısa süreli iniş çıkışlar hakkında bilgi vermez. Yani hipoglisemik atakları göstermemekle birlikte uzun süreli kontrolü değerlendirmede önemli bir yere sahiptir (2). Yapılan çalışmalarda TQ'nun HbA_{1c} yüzdesini önemli derecede düşürdüğü gözlenlenmiştir. Buna göre, TQ'nun insülin salınımında artışa sebep olarak uzun süreli yüksek glukozun kontrolünde ciddi bir etkisinin olduğu düşünülebilir (2, 13).

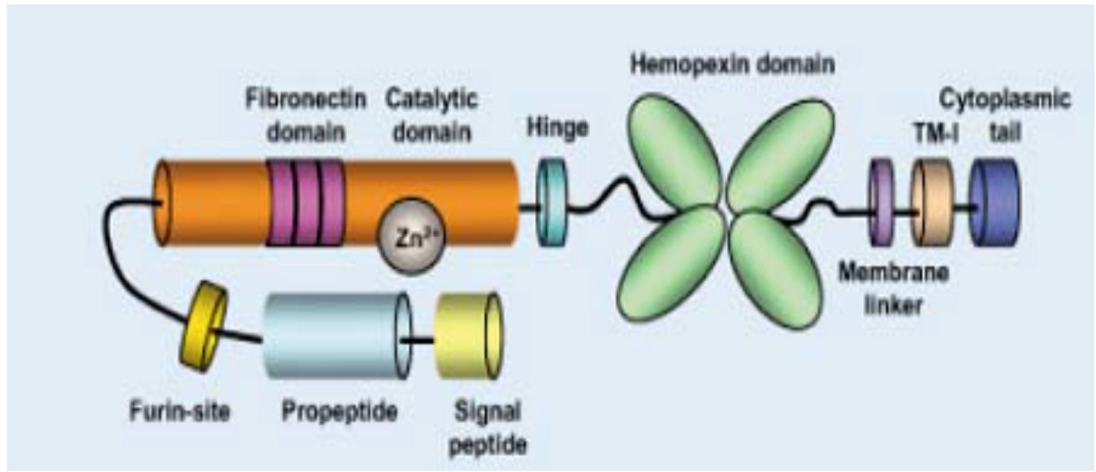
3.3. Matriks Metalloproteinazlar

Matriks metalloproteinazlar (MMP) ekstrasellüler matriksi (ECM) yıkıma uğratan Ca^{++} ve Zn^{++} bağımlı, nötral bir endopeptidaz grubudur. Birçok fizyolojik ve patolojik süreçte rol alırlar. Bu enzimler anjiogenez, morfogenez, ECM'in turnoveri, doku remodelingi ve gelişimde önemlidir. MMP'ler yara iyileşmesi, ovulasyon, embriyonik gelişim, kemik remodelingi gibi pek çok fizyolojik olaylarda görev alır. Bununla birlikte MMP'lerin hücre migrasyonu, apoptozis, invazyon ve proliferasyonunda görev aldığı bilinmektedir (83, 84).

Fizyolojik olayların gerçekleşmesi sırasında MMP'ler ile onların spesifik endojen doku inhibitörleri (TIMP'ler) arasında bir denge söz konusudur ve normal dokudan düşük düzeyde eksprese edilirler (85). Bu denge MMP lehine döndüğünde; yani MMP aktivitesinin artması durumunda matriksin kontrolsüz olarak yıkımı başlar ve birçok patolojik sürece zemin hazırlanır. MMP'nin etkilediği patolojik olaylar arasında en başta kanser ve ateroskleroz olmak üzere artrit, nefrit, peridontal hastalık, gastrointestinal ülser, kornea ülseri, deri ülseri, nörolojik hastalık, Alzheimer hastalığı, multipl skleroz, karaciger fibrozu, fibrotik akciğer hastalığı, amfizem, kan beyin bariyerinin yıkılmasını sayabiliriz (86).

Yeni üyelerin bulunması ile sürekli olarak genişleyen MMP ailesinin bu güne kadar 66 üyesi klonlanmış ve sekanslanmıştır (87-89). Bu üyelerin 23 tanesinin insanda sentezlendiği gösterilmiştir (83). MMP'ler primer yapısı, substrat spesifitesi ve hücre lokalizasyonuna göre kollajenazlar, jelatinazlar, stromelisinler, membran tipi MMP'ler ve diğerleri olmak üzere başlıca 5 gruba ayrılırlar (87, 90)

MMP'ler yapısal olarak incelendiğinde; sinyal peptit bölgesi, amino terminal propeptit bölgesi ve katalitik bölgeden oluşur. Katalitik bölgenin aktif merkezinde çinko atomu ve çinko atomuna bağlı korunmuş sistein aminoasiti bulunur. Aynı zamanda çinko-bağlayıcı bölüm ve korunmuş metiyonin aminoasiti de içerir. Katalitik domain ek olarak yapısal bir Zn^{++} iyonu ve 2-3 Ca^{++} iyonu içerir. Bu bölge stabilite ve enzimatik aktivitenin oluşması için gereklidir (83, 84, 91) (Şekil 3).



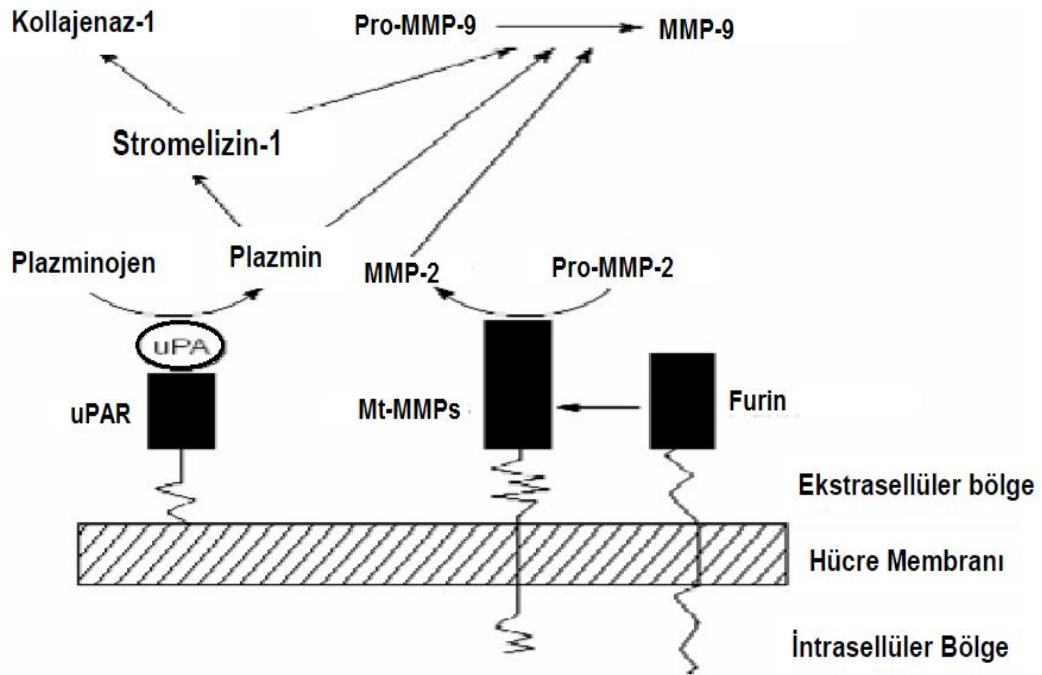
Şekil 3. Matriks metalloproteinaz zincir yapısı

Bazı MMP üyelerine genel yapıya ilave olarak farklı kısımlar yer alır. Jelatinaz sınıfında bulunan MMP-2'nin jelatin ve 9 kollajen etkileşimi için gereklilik gösteren C-terminal hemopeksin benzeri, fibronektin benzeri bölümden oluşur. Bu hemopeksin benzeri bölüm substrat spesifitesinin belirlenmesinde kilit özellik gösterir. Bunun yanısıra jelatinazlarda hemopeksin benzeri bölüm ile katalitik bölge arasında proline zengin bir bölüm vardır (83, 84, 91).

MMP'lerin matriks degradasyonu yapabilmesi için proteolitik kırılma ile aktif formlarına dönüşmesi gerekir. Stepwise aktivasyonu, Mt-MMP'ler aracılı

hücre yüzeyinde aktivasyon ve intrasellüler aktivasyon olmak üzere üç aktivasyon mekanizması söz konusudur (83).

Furin tarafından aktif formuna dönüşebilen birkaç üyenin dışında inaktif zimogenler halinde hücreden salınırlar. Salınan bu proMMP'ler civalı bileşikler, reaktif oksijen ve denatüranları gibi proteolitik olmayan ajanlar tarafından ve proteinazlar tarafından in vitro olarak da aktif hale getirilirler. Bu aktivasyon stepwise aktivasyon olarak adlandırılır ve tüm durumlarda Cyn-Zn⁺² (sistein swich) etkileşiminin yok edilmesi şarttır (83, 92). Bununla birlikte aktive olan MMP'ler de diğer proMMP'leri aktive edebilir. Bu duruma örnek; membran bağımlı Mt-MMP'lerin hücre yüzeyinde pro-MMP-2 enzimlerini aktive edebilmesidir (83, 84, 91). MMP'lerin bazı üyeleri ise intrasellüler olarak aktive edilebilir. Bu duruma örnek stromelizin (MMP-11) golgi ile ilişkili subtilisin benzeri proteinaz tarafından aktivasyonudur. Aktivasyon sırasında aminotermal propeptidler ayrılır (91, 93). MMP'lerin temel fizyolojik aktivatörü plazmindir. Çeşitli hücrelerde (endotel hücresi, monosit-makrofaj, düz kas hücresi) eksprese edilen ürokinaz-tip plazminojen aktivatörü (uPA)'nın aktif formunun plazminojeni plazmine dönüştürdüğü ve oluşan plazminin pro-MMP'leri aktive ettiği kabul edilmektedir (94).



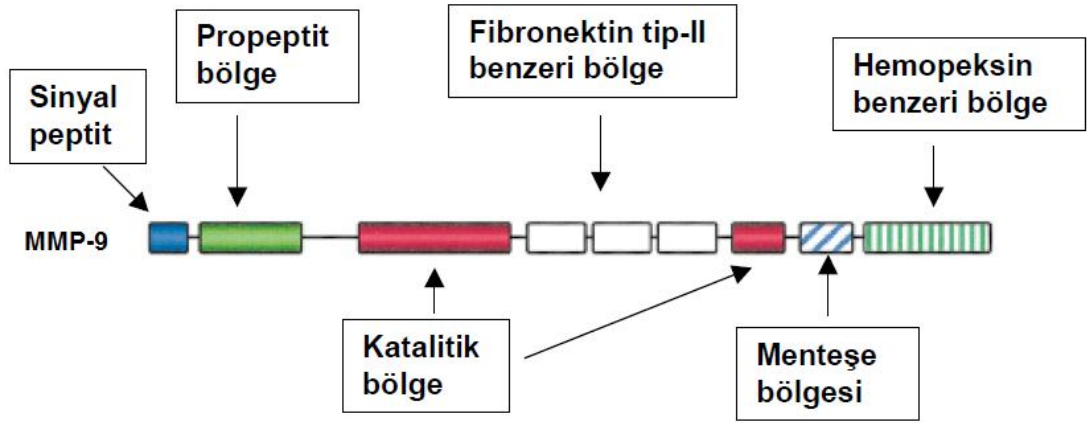
Şekil 4. MMP'lerin aktivasyon kaskadı (83, 95).

Deneysel ateroskleroz modelleri ile yapılan çalışmalarda arterial hasarı takiben meydana gelen düz kas hücre proliferasyonu sırasında damar duvarında uPA ekspresyonunun ileri düzeyde arttığı belirtilmiştir (96). Buna dayanarak MMP'leri aktif hale getiren uPA'nın aterosklerotik süreçte önemli rol oynadığı kabul edilmiştir. Plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1), uPA üzerinde inhibitör etki gösterir. Böylelikle MMP'lerin plazminojen aracılı aktivasyonunu engeller (94).

3.3.1. MMP-9

MMP-9 (Jelatinaz B), Sapota ve Dancemicz tarafından ilk olarak 1974 yılında polimorfonükleer lökositlerden salgılanan bir jelatinolitik enzim olarak tanımlanmıştır (Şekil 3). Yapılan sonraki çalışmalarda 92 kDa'luk bir molekül halinde sentez edildiği gösterilmiştir. Bu molekül önce 87 kDa'lık inaktif bir

moleküle daha sonra da 82 kDa veya 83 kDa'luk aktif bir moleküle dönüşmektedir. 47kDa ile 67 kDa arasında değişen aktif formları da mevcuttur. MMP-9'un aktivasyonu sonucunda denatüre kollajen ve jelatin, tip IV ve V kollajen ve elastini de içeren pek çok ekstrasellüler matriks elemanı yıkılabilir. MMP-9 yapıcı MMP-2'ye çok fazla benzerlik gösterir. Farklılıkları substrat düzeyindeki bir maddeden ortaya çıkar. MMP-9 kazeine karşı spesifik etki gösterirken MMP-2 de bu spesifite görülmez (97).



Şekil 5. Matriks metalloproteinaz-9 (92)

MMP ailesinin en büyük üyesi MMP-9'dur. Sinyal peptidi, propeptit bölgesi, çinko atomu bağlayıcı bölüm, COOH-terminal hemopeksin benzeri bölüm olmak üzere 7 bölümden oluşur. Ayrıca katalitik bölüm ve hemopeksin benzeri bölüm arasında proline zengin bağlayıcı bölge yer alır. C-terminal hemopeksin benzeri bölüm substrat spesifitesini belirlemede anahtar rolü oynar. Fibronektin benzeri bölüm kollajen ve jelatinlere bağlanmayı kolaylaştırır (91).

Diyabetik retinopatisi olan hastaların ve hayvan modellerinin retina vitreusları içerisinde MMP-9 ve MMP-2 düzeylerinde artışlar gözlenmiştir (98). Aterosklerotik plak gelişimi sırasında, sitokin ve büyüme faktörlerini stimüle eden

gen transkripsiyonunda, zimojen aktivasyonunda ve MMP aktivitesinde artış görülmektedir (83).

3.4. Endotelyal progenitör hücreler

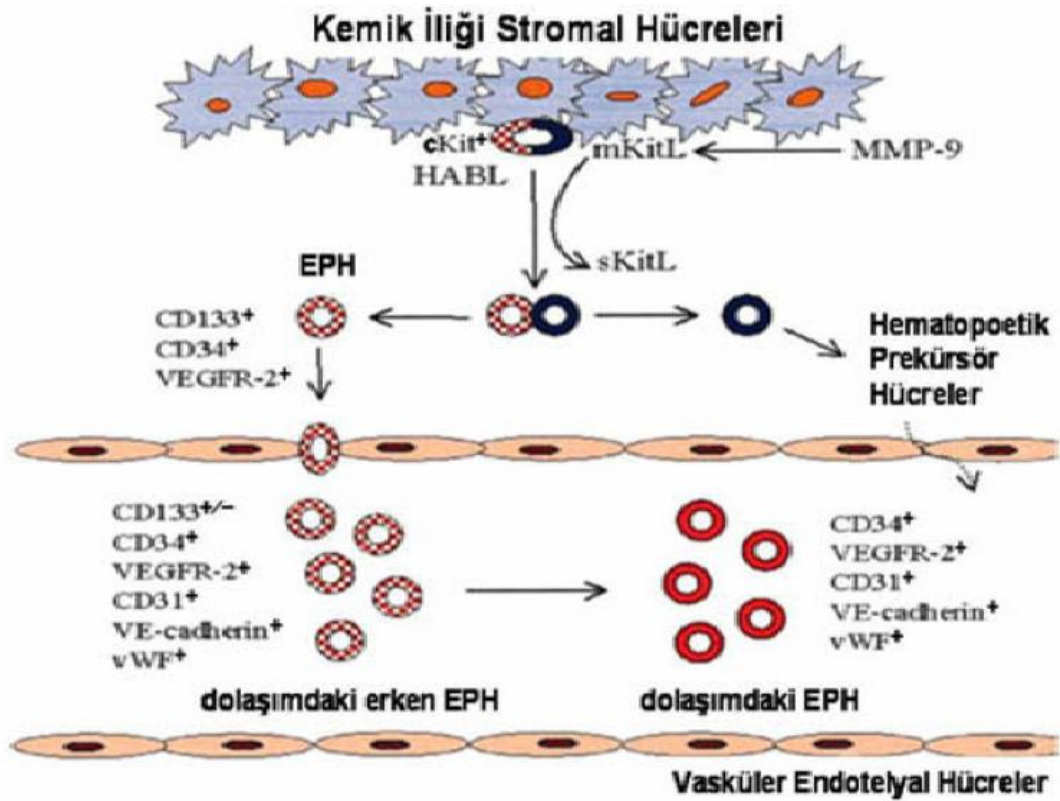
Endotelyal progenitör hücreler (EPH) kemik iliğinde olgunlaşırlar ve dolaşıma katılırlar. Damar hasarının bulunduğu kısımlarda yoğunlaşarak hasarın tamirinde önemli görev alırlar. Postnatal süreçte de fonksiyonlarını devam ettirdikleri kanıtlanmıştır.

Anjiyogenez; endotel hücrelerinin bölünme yeteneklerine bağlı olarak çoğalması, daha sonra da taşınarak yeni kapiller oluşturması olarak tanımlanır. Vaskülogenez ise dolaşımda var olan hücre öncüllerinin (EPH), önceden bulunan herhangi bir damardan köken almadan, olgunlaşmış endotel hücresine dönüşmesi ile damar meydana getirmesidir. Vaskülojenezin sadece embriyonik dönemde yeni damar oluşumunda görev aldığı sanılmaktaydı. Fakat yapılan çalışmalar, kemik iliği kaynaklı hemotopoietik progenitör hücrelerin sadece embriyonik dönemde değil, postnatal süreçte de endotel hücrelerine dönüşebildiğini; iskemi sonrası oluşan endotel hasarını tamir ederek yeni kapiller oluşumunda bizzat rol aldığını göstermiştir (99, 100).

EPH, hematopoetik kök hücreler ile ve endotel hücreler ile aynı bir takım hücre yüzey belirteçlerini taşımaktadırlar. Daha önceki çalışmalarda EPH'lerde VEGFR-2 ve CD34'ün bulunduğu gösterilmiştir (101).

Yetişkin sağlıklı bireylerin damar sistemlerinde endotelyal hücrelerin çoğalma hızı daha yavaştır ($t_{1/2} \sim 3$ yıl) (102). Standart şartlarda dolaşımdaki EPH'ler dolaşımdaki tüm hücrelerin $\sim \% 0,01$ 'idir. Sağlıklı yetişkinde EPH'ler endotelyal hücrelerin bütünlüğünde onarıcı etkinlik gösterebilmektedirler (103).

EPH'ler kemik iliğinde depo edililer ve bu depo gerektiği durumlarda dolaşıma EPH sağlayan bir rezervuar vazifesi görür. Doku iskemisi ve sonucunda meydana gelen doku hasarı EPH'lerin dolaşım sistemine katılmalarına sebebiyet veren en önemli nedendir. Bu gibi durumlarda hasar alan dokulardan salınan medyatörler kemik iliğinde bulunan EPH'nin öncüllerini stimüle ederek EPH'lere dönüşümüne katkı sağlarlar (104). Kemik iliğinde meydana gelen EPH'ler birtakım proteinler ve mediatörler (Matriks metalloproteinaz-9, NO, sKitL) aracılığı ile kemik iliğinin vasküler bölgesine geçerler ve çoğalırlar (105) (Şekil 6). Bütün bunlarla birlikte eNOS aktivitesinin de EPH'lerin kemik iliğinden mobilizasyonunda önemli görev aldığı düşünülmektedir (106).



Şekil 6. Kemik iliğinden EPH'lerin mobilizasyonu

Dolaşımda bulunan EPH düşüklüğünün kardiyovasküler hastalıkların oluşumuna neden olabilecek endotelin tamir kapasitesinde azalması ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (107). Yapılan başka bir çalışmada koroner arter hastalarındaki EPH miktarının düştüğü ve göç etme yeteneklerinin bozulduğu bildirilmiştir (108, 109). Koroner arter hastalarındaki buna benzer durumların tip-2 diyabetli hastalarda meydana gelmesi beklenen bir durumdur (110).

Diyabetik nefropati üzerine yapılan bir çalışmada diyabetin böbrek dokusundaki CD34 düzeylerinde artışa neden olduğu gösterilmiştir (111).

3.5. Endotelial disfonksiyon, NO ve eNOS

Endotel, fonksiyonları hakkındaki bilgilerimiz arttıkça, önemi ve üzerindeki araştırma sayısı çok fazla artan bir “organ”dır. Endotel tarafından salgılanan birçok madde içinde nitrik oksit (NO), bazı prostaglandinler ve endotelin, kan basıncını direkt veya indirekt etkileyebilen önemli moleküllerdir. Endotelial disfonksiyon geniş kapsamlı bir terimdir ve NO üretiminde bozulma ve/veya endotel-kaynaklı Endotelin1 (ET-1), anjiyotensin ve oksidanlar gibi gevşeme ve kasılma faktörlerinde dengesizliği ifade eder (112).

NO insanda iyi tanımlanmış bir endotel-kaynaklı gevşetici faktördür. NO'nun, L-arjininden nitrik oksit sentaz (NOS) aracılığı ile üretildiği ve insanda birçok dokuda sinyal aşırımından sorumlu olduğu bulunmuştur (113, 114). NO endotelyumdan, komşu damar düz kaslarına nüfuz eder ve burada cGMP oluşumunu uyarak kan damarlarını genişletir (115). NO'nun vücutta başlıca kardiyovasküler sistem olmak üzere, santral ve periferik sinir sistemi, immun sistem ve inflamasyonda rolü olduğu gösterilmiştir (116).

NOS'un nöronal (nNOS veya NOS 1), sitokinle-indüklenen (iNOS veya NOS 2) ve endotelial (eNOS veya NOS 3) olmak üzere üç ayrı izotipi tanımlanmıştır (117). Bunlardan nNOS ve eNOS izotipleri hücrede yapısal olarak aktif halde iken, iNOS düzeyi ve aktivitesindeki artış ortamda sitokinlerin bulunmasına bağlıdır. Endotel hücrelerinde eNOS aktivitesi sonucu üretilen NO, endotel tabakası altındaki düz kas dokusuna difüzyon ile ulaşır ve gevşemeye yol açarak vasküler tonusun ve kardiyovasküler homeostazın düzenlenmesinde önemli rol oynar (118). Endotelden NO salıverilmesini sağlayan başlıca fizyolojik faktörler sürtünme stresi (shear stress), asetilkolin (Ach), bradikinin, endotelin, P maddesi, histamin ve vazopressindir (119, 120). eNOS ayrıca trombositlerde ve megakaryoblastik hücrelerde de gösterilmiştir (121). Trombosit agregasyonu sırasında salıverilen NO, agregasyonu önleyici etki gösterir (122).

Güçlü bir vazodilatatör olan NO, endotelial hücrelerden bazal ve/veya uyarılmış olarak salınır ve arteriyal kan basıncı ile kan akımının düzenlenmesinde önemli rol oynar (123). Esansiyel hipertansiyonlu hastalarda yapılan çeşitli çalışmalarda, bu hastalarda plazma NO düzeylerinin ve NO metabolitleri (NOx)'nin üriner atılımının sağlıklı deneklere göre azaldığı gösterilmiştir (124, 125). Sağlıklı organizmada vasküler sistemde NO oluşmasında temel unsur endotelial hücrede ifade olan NOS enzimidir ve bu enzimin çeşitli L-arjinin analogları kullanılarak inhibe edilmesi mümkündür. NOS'un inhibisyonu L-arjinin analogları veya NOS enzimlerinin kofaktörlerinin etkilenmesi ile sağlanmaktadır N^o-nitro-L-arjinin metil ester (L-NAME), N^o-monometil-L-arjinin (L-NMMA), N^o-nitro-L-arjinin (L-NNA) ve benzeri L-arjinin analogları NO sentezini inhibe eden maddelerdir (126, 127). L-NMMA, L-NNA ve L-

NAME NOS enzimini kompetitif olarak inhibe etmektedirler. Son iki bileşik kronik NOS inhibisyonu modelinde en çok kullanılan bileşiklerdir. İlk sentez edilen L-NMMA tüm NOS isoformlarına benzer oranda selektivite gösterir. L-NNA ve L-NAME daha sonra sentez edilen birleşiklerdendir ve NOS enzimini nonselektif olarak inhibe eder. L-NMMA genellikle akut NOS inhibisyonu çalışmalarında kullanılmaktadır (128).

Endotel parlak yüzeyli, kaygan ve vazodilatasyona eğimli bir yapıdır. Fakat diyabet ve diğer vasküler risk faktörleri mekanik, hemodinamik ve şimik etkileri sonucu endotel yapısında hasar meydana getirirler (129). Endotel bağımlı vazodilatasyon oluşmasında ve sağlıklı endotele ait diğer koruyucu fizyolojik özelliklerin düzenlenmesinde rol alan ve endotel hücrelerinde eNOS aktivitesi sonucu üretilen NO, kemik iliğinden EPH'lerin salınımını artırır ve yara bölgesinde oluşan iskemide stomal hücrelerden oluşan faktör salınımına neden olur. Diyabetli hastalarda hem stomal hücrelerden oluşan faktörün hem de EPH'lerin üretimindeki bozukluklar yara iyileşmesinde gecikmelere neden olur (130).

4. GEREÇ VE YÖNTEM

Projemizde planladığımız diyabetik süre 42 gün olmasına karşın, ratlarda genel durumda bozulma ve yiyecek alımında aşırı düşme nedeniyle 21. Günde Etik Kurul'a bilgi verilerek deney sonlandırıldı.

4.1. Denekler ve bakım

Bu çalışmanın deneysel protokolü Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulunun 29.01.2014 tarihli ve 37 no'lu onayı doğrultusunda yapıldı. Araştırmada 220-260 gr ağırlığında Spraque-Dawley cinsi erkek ratlar (n=24) kullanıldı. Ratlar İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi (İNÜ-DEHÜM)'den elde edildi. Deney, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi (FÜDAM)'da gerçekleştirildi. Ratlar standart şartlarda (12 saat günışığı, 12 saat karanlık, havalandırmalı, sabit ısı odalarda) barındırıldı.

4.2. STZ ile diyabet oluşturma

0,1 M sitrat buffer içerisinde (pH: 4.5) çözündürülen STZ (50 mg/kg) intraperitoneal olarak tek doz halinde uygulandı. Kontrol gruplarına aynı hacimde sitrat buffer uygulandı. 72 saat sonunda plazma glukoz düzeyleri ölçüldü ve açlık kan glukoz düzeyi 250 mg/dl üzerinde olan ratlar diyabet olarak kabul edilerek bu çalışmada kullanıldı (STZ sonrası 3. günde kan glukozu doğrulama zamanı çalışmanın 0. günü olarak tanımlandı).

4.3. Deney protokolü

4.3.1. Gruplar

Ratlar her bir grupta 8 rat olacak şekilde üç gruba ayrıldı (n=24).

1.Grup: 21 gün boyunca gavaj ile 1 ml mısır yağı, normal su ve yem verildi (Kontrol grubu).

2.Grup: STZ ile tip 1 diyabet oluşturulan ratlara 21 gün boyunca gavaj ile 1 ml mısır yağı, normal su ve yem verildi (STZ grubu).

3.Grup: STZ ile tip 1 diyabet oluşturulan ratlara 21 gün boyunca gavaj ile 1 ml mısır yağı içerisinde çözündürülmüş TQ (80 mg/kg/gün), normal su ve yem verildi (STZ+TQ grubu).

4.3.2. Kan basıncı ölçümleri

Bilinci açık ratların kan basıncı ölçümleri (sistolik kan basıncı) kuyruktan indirekt tail cuff yöntemi ile yapıldı (MAY BPHR 9610-PC TAIL-CUFF Indirect Blood Pressure Recorder, Ankara, Türkiye) Tüm gruptaki Ratların kan basıncı ölçümleri 0. ve 21. günlerde yapıldı. Alınan kan basıncı değerleri bilgisayara kaydedildi. Her ratdan 5 ölçüm alındı ve ortalamaları hesaplandı.

4.3.3. Kan glukoz düzeyi ölçümleri

Tüm grupta kan şekeri ölçümü 0. ve 21. günlerde yapıldı. Deneklerin kuyruk venlerinden kan alınarak glukometre (On call® plus, Acon) ile kan glukoz düzeyi ölçümü yapılmıştır.

4.4. Cerrahi uygulamalar

Deney sonunda, denekler dekapite edilerek kan örnekleri alındı. Daha sonra çabuk bir biçimde abdomen ve toraks orta hattın açıldı. Torasik aorta diafragmanın üzerinden başlayarak arkus aortaya doğru diseke edilerek çıkarıldı ve soğuk krebs solüsyonu içine alındı. Torasik aorta çevre bağ ve destek dokularından dikkatlice temizlenerek arkusa yakın uçtan 4 mm boyunda halka halinde kesildi.

4.5. İn vitro deneyler

Hazırlanan 4 mm boyundaki torasik aorta halkaları, lümeninden birbirine paralel iki paslanmaz çengel geçirilerek içerisinde 37°C'ta ısıtılmış ve % 95 O₂ + % 5 CO₂ karışımı ile gazlandırılan Krebs-Ringer bikarbonat solüsyonu bulunan 10 ml'lik izole organ banyosuna asıldı. Alt çengel izole organ banyosunun tutma kısmına tutturulacak üst çengel de izometrik kasılma cevaplarını kaydetmek için force-displacement transducerlerine (FDT 0.5) bağlandı. Kayıtlar Biopac marka (Model 36) multirecoreder ile yapıldı. İzole organ banyosuna asılan torasik aorta halkaları 2 gramlık istirahat gerimi altında 1 saat boyunca dengelendi. İzole organ banyosundaki Krebs-Ringer bikarbonat solüsyonu metabolik son ürünlerin birikimini önlemek için her 15 dakikada bir taze solüsyonla yenilendi. İn vitro torasik aorta çalışmaları endotel varlığında çalışıldı. Phe (10^{-9} - 10^{-4} M) artan konsantrasyonlarda kümülatif verilmiştir ve her dozda kasılma platoları net bir şekilde görülmeden diğer doza geçilmemiştir. Endotele bağımlı gevşeme cevapları almak için Ach (10^{-9} - 10^{-4} M) dokulara 1.5 saatlik dengeye gelme periyodundan sonra artan dozlarda kümülatif olarak verilmiştir. Emax değerleri

için 80 mmol/L KCl ile elde edilen kasılma cevabı referans alınarak % kasılma cevabı olarak ifade edildi.

4.6. Biyokimyasal analizler

4.6.1. MMP-9 ölçümleri

Cerrahi prosedür sırasında elde edilen aortun bir kısmı % 0,9'luk soğuk (+4°C) sodyum klorür (NaCl) ile yıkandı ve kurutma kâğıdı ile kurutuldu. Daha sonra dokular homojenizatör ile (Ultra TurraxType T25-B, IKA Labortechnik, Germany) 0,01M'lık PBS çözeltisi içinde (1; 9,w; v), 16000 rpm'de 3 dakika homojenize edildi. Homojenizasyon bir buz kabının içerisinde gerçekleştirildi. Homojenat 5000xg'de 1 saat (+4°C'de) santrifüjlenerek süpernatantları ayrıldı ve analiz zamanına kadar -80°C'de bekletildi. MMP-9 düzeyleri süpernatantta uygun metodla tayin edildi.

MMP-9 düzeyleri, rat ELISA kiti (Elabscience, katalog no; E-EL-R0624) kullanılarak, kit prosedürüne uygun olarak doku örneklerinde çalışıldı. Absorbanslar ELX800 ELISA okuyucusunda spektrofotometrik olarak 450 nm'de okutuldu. Plate yıkamalarında ise otomatik yıkayıcı olarak Bio-tek ELX50 (BioTek Instruments, USA) kullanıldı. Sonuçlar ng/mL olarak belirtildi. Doku MMP-9 sonuçları sulandırma oranı göz önüne alınarak dilüsyon faktörü ile çarpılarak hesaplandı. Ölçüm aralığı 0,78- 50 ng/mL, minimum ölçülebilir düzeyi 0,47 ng/mL idi.

4.7. İmmünohistokimyasal analizler

Cerrahi prosedür sonrası alınan aort dokuları % 10'luk formaldehit solüsyonu içerisinde tespit edildi. Musluk suyu altında yıkama yapılarak formaldehit uzaklaştırıldı. Yıkanan dokular rutin histolojik takip serilerinden (Tablo 1) geçirilerek dehidrate edildi. Dehidratasyondan sonra ksilolde parlatılıp parafine (P3558-1kg Sigma-Aldrich Paraplast Embedding Media, U.S.A) gömüldü. Parafin bloklardan 5-6 µm kalınlığında kesitler rodajlı ve polilizinli lamlara alındı.

Tablo 1. Histolojik Takip İşlem Basamakları

SIRA	İŞLEM	SÜRE
1	% 70 Alkol	2 saat
2	% 80 Alkol	1.5 saat
3	% 96 Alkol	30 dakika
4	% 96 Alkol	30 dakika
5	% 100 Alkol	30 dakika
6	% 100 Alkol	30 dakika
7	Alkol + Ksilol	15 dakika
8	Ksilol I	10 dakika
9	Ksilol II	20 dakika
10	Yumuşak parafin + Ksilol	45 dakika
11	Yumuşak parafin	1 saat
12	Yumuşak parafin – Sert parafin	1.5 saat
13	Sert Parafin	3 saat
14	Gömme	

Aort dokusunda eNOS ve CD34 immünreaktivitesinin belirlenmesi için Avidin-Biotin-Peroksidaz Kompleksi yöntemi uygulandı. (Tablo 2).

Polilizinli lamlara soğutulmuş parafin bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Ksilol ile deparafinizasyon ve şeffaflaştırma işleminden sonra dokular azalan dereceli alkol serilerinden geçirilip Endojen peroksidaz aktivitesini

önlemek için H₂O₂ bloker (TA-125-HP Lot No: HP18180, Hydrogen Peroxide Block, Thermo Scientific) ile muamele edildi. Antigen retrieval için sitrat tampon solüsyonunda pH: 6'da mikrodalga fırında (750W) 12 dakika kaynatıldı. Zemin boyasını engellemek için 5 dakika Ultra V Block (TA-125-UB, Ultra V Block, Thermo Scientific) solüsyonu uygulamasından sonra primer antikorlar (PA1334 Lot No: 0131012223499, Polyclonal Anti-CD34 Antibody, Boster Immunoleader; PA1712-1 Lot No: 01714jd011231, Polyclonal Anti-NOS3Antibody, Boster Immunoleader) damlatılan dokular 60 dakika etüvde inkübe edildi. Etüvden çıkarılan dokular, PBS (P4417-100TAB, Phosphate Buffered Saline, Sigma Aldrich) ile yıkandı. 30 dakika nemli ve karanlık ortamda oda ısısında sekonder antikor (TP-060-BN, Biotinylated Goat Anti-Poliyvalent (anti-mouse / rabbit IgG), Thermo Scientific) ile inkübe edildi. PBS ile yıkanan dokular Horse Radish Peroksidaz (HRP) (TS-060-HR, Streptavidin Peroxidase, Thermo Scientific,) enzimi ile 30 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildikten sonra PBS içerisine alındı.

Tablo 2. İmmünohistokimyasal boyama prosedürü.

SIRA	İŞLEM	SÜRE
1	Ksilol I	10 dakika
2	Ksilol II	10 dakika
3	Ksilol III	10 dakika
4	% 100 Alkol	10 dakika
5	% 96 Alkol	10 dakika
6	% 80 Alkol	10 dakika
7	Distile su	5 dakika
8	Mikrodalga	7+5 dakika
9	Oda ısısında soğutma	20 dakika
10	PBS	3x5 dakika
11	H ₂ O ₂	10 dakika
12	PBS	3x5 dakika
13	UV blok	5 dakika
14	Primer antikor	60 dakika
15	PBS	3x5 dakika
16	Sekonder antikor	30 dakika
17	PBS	3x5 dakika
18	Streptavidin Peroksidaz	20 dakika
19	PBS	3x5 dakika
20	AEC	5 dakika
21	Distile su	5 dakika
22	Mayer's hematoksilen	10 saniye
23	Çeşme suyu	5 dakika
24	Özel kapatma maddesi ile kapatma	

Dokulara AEC (3-Amino-9-ethyl carbazole) substrat solüsyonu (TA-060-HA, AEC Substrate System, Thermo Scientific) damlatıldı. Reaksiyon ışık mikroskopunda görüntü sinyali alındıktan sonra bütün dokularda eş zamanlı olarak distile su ile sonlandırıldı. Mayer's hematoksilen ile zıt boyaması yapıldı. Distile su ile yıkanan preparatlar kapatma solüsyonu (Large Volume Vision Mount, TA-125-UG, Lab Vision Corporation, USA) ile kapatıldı.

Pozitif kontrol olarak meme dokusu kullanıldı. Negatif kontrol olarak kullanılan dokularda ise primer antikor yerine PBS kullanıldı, diğer basamaklarda herhangi bir değişiklik yapılmadı. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda (Novel N-800M x20) incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı.

İmmünohistokimyasal boyanmanın değerlendirilmesinde; immünre aktivitenin yaygınlığı (0.1: <% 25, 0.4: % 26-50, 0.6: % 51-75, 0.9: % 76-100) ve şiddeti (0: yok, +0.5: çok az, +1: az, +2: orta, +3: şiddetli) esas alınarak histoskor oluşturuldu (Histoskor= yaygınlık x şiddet).

4.8. İstatistiksel analiz

Elde edilen veriler ortalama±standart hata (SH) olarak belirtildi. Ortalamalar arasındaki farkların istatistiksel anlamlılık düzeylerini belirlemek için “Origin 5.0” paket istatistik programları kullanıldı. İstatistiksel farklar bağımsız gruplarda “one-way ANOVA” testi ile hesaplandı. Aynı grubun farklı zaman noktalarındaki değerleri arasındaki fark değerlendirmek için “paired student-t test” kullanıldı. Elde edilen sonuçların yorumlanmasında $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.9. Kullanılan Kimyasallar

Fenilefrin, Asetilkolin, STZ (Sigma Aldrich Inc. St. Louis, MO. A.B.D), Timokinon (Sigma Aldrich Inc. St. Louis, MO. A.B.D), CD34 (Boster Biological Technology Co., Cat No: PA1334)‘dan satın alındı.

5. BULGULAR

5.1. Kan Basıncı ölçümleri

Deneyin 0. ve 21. Gününde yapılan sistolik kan basıncı ölçümleri sonucunda gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi (Tablo 3).

Tablo 3. Deney başında ve sonunda sistolik kan basıncı ölçümleri .

Gruplar	Deney başlangıcı sistolik kan basıncı ölçümü	Deney sonu sistolik kan basıncı ölçümü
Kontrol (n=8)	105,28±5,23	102,56±4,31
STZ (n=8)	101,70±2,05	103,20±5,74
STZ+TQ (n=8)	106,41±4,35	105,20±2,09

Veriler ortalama±standart sapma (Ort±SS) olarak ifade edilmiştir.

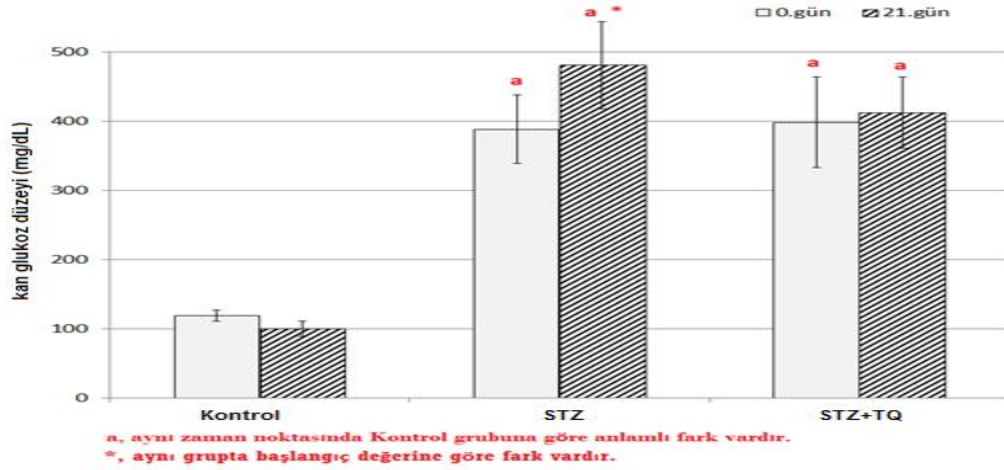
Kontrol : 21 gün boyunca gavaj ile 1 ml mısır yağı verildi.
STZ : 21 gün boyunca gavaj ile 1 ml mısır yağı verildi.
STZ+TQ : 21 gün boyunca gavaj ile 1 ml mısır yağı içerisinde çözündürülmüş TQ (80 mg/kg/gün) verildi

5.2. Kan glukoz düzeyi ölçümleri

Kan glukoz düzeyi ölçümleri deneyin başında ve 21. gününde yapıldı.

Bulunan değerler kontrol, STZ, STZ+TQ grupları için sırayla deney başında 119.50±7.88, 388.25±49.59, 398.11±65.16; deney sonunda ise 100.20±11.05, 480.50±62.80, 412.20±51.50 olarak bulunmuştur (Şekil 7).

Veriler ortalama±standart sapma (Ort±SS) olarak ifade edildi. a, aynı zaman diliminde kontrol grubuna göre anlamlı farklılık vardır (independent t test); *, grup içi iki zaman dilimi arasında anlamlı fark vardır (paired t test). (a, p<0.001; b, *, p=0,05)



Şekil 7. Deney başında ve deney sonunda kan glukoz düzeyleri

Kontrol : 21 gün boyunca gavaj ile 1 ml mısır yağı verildi.
STZ : 21 gün boyunca gavaj ile 1 ml mısır yağı verildi.
STZ+TQ : 21 gün boyunca gavaj ile 1 ml mısır yağı içerisinde çözündürülmüş TQ (80 mg/kg/gün) verildi

Deney başında kan glukoz düzeyleri açısından STZ grubu ve STZ+TQ grupları ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı ($p<0.001$). Deney sonunda da STZ ve STZ+TQ grupları glukoz değerlerinin, kontrol grubundan anlamlı oranda yüksek olduğu tespit edildi ($p<0.001$).

5.3. MMP-9 ekspresyonu:

Deney sonunda alınan torasik aort dokuları üzerinde MMP-9 düzeylerine bakıldı. STZ ve STZ+TQ gruplarının MMP-9 değerlerinde kontrol grubuna göre anlamlı oranda azalma tespit edildi (Tablo 4).

Tablo 4. Deney sonunda aortik dokudan MMP-9 Ölçümleri

Gruplar	MMP-9 (ng/ml)
Kontrol (n=8)	15,47±3,80
STZ (n=8)	2,63±2,13 a
STZ+TQ (n=8)	3,30±0,73 a

Kontrol : 21 gün boyunca gavaj ile 1 ml mısır yağı verildi.
STZ : 21 gün boyunca gavaj ile 1 ml mısır yağı verildi.
STZ+TQ : 21 gün boyunca gavaj ile 1 ml mısır yağı içerisinde çözündürülmüş TQ (80 mg/kg/gün) verildi

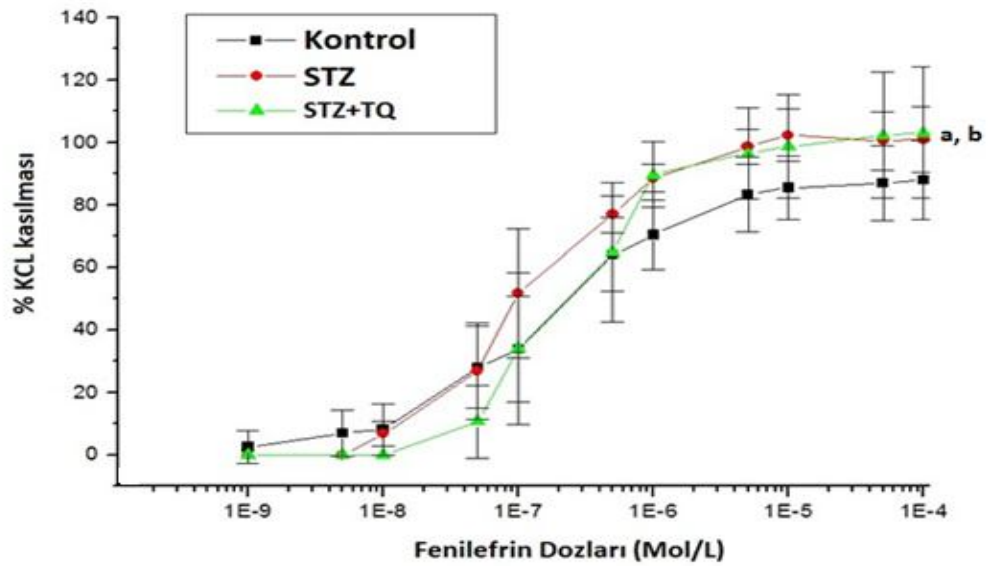
Veriler ortalama±standart sapma (Ort±SS) olarak ifade edildi. a, aynı zaman diliminde kontrol grubuna göre anlamlı farklılık vardır (independent t test); p<0.001.

5.4. İzole Organ Çalışmaları:

5.4.1. Phe kasılma cevapları

5.4.1.1. Phe doz-cevap eğrisi

Deneyin 21. Gününde dekapite edilen ratlardan alınan torasik aort dokusunun izole organ banyosundaki fenilefrin ile kasılma cevapları Şekil 8’de gösterilmiştir.



a, STZ grubu ile Kontrol grubu arasında anlamlı fark vardır, P=0,037 (Two Way ANOVA)
b, STZ+TQ grubu ile Kontrol grubu arasında anlamlı fark vardır, P=0,049 (Two Way ANOVA)

Şekil 8. Fenilefrin doz cevap eğrisi

Kontrol : 21 gün boyunca gavaj ile 1 ml mısır yağı verildi.
STZ : 21 gün boyunca gavaj ile 1 ml mısır yağı verildi.
STZ+TQ : 21 gün boyunca gavaj ile 1 ml mısır yağı içerisinde çözündürülmüş TQ (80 mg/kg/gün) verildi

Bu verilere göre STZ grubu ve STZ+TQ grupları ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık görülmüştür ($p<0.05$); kontrol grubuna göre STZ ve STZ+TQ gruplarında damar kasılmaları daha yüksek bulunmuştur.

5.4.1.2. Phe EC50 ve Emax değerleri

STZ grubu ile kontrol grubu arasında EC50 ve Emax değerleri arasında anlamlı olarak farklılık görülmemiştir. STZ+TQ grubu ile kontrol grubunun EC50 değerleri arasında ise istatistiksel olarak anlamlı olan bir farklılık vardır ($p<0.05$). STZ+TQ grubunda anlamlı olarak düşüş gözlenmiştir (Tablo 5).

Tablo 5. Tüm gruplarda Fenilefrin doz-cevap eğrisi EC50 ve Emax değerleri.

Gruplar	Ec50 (-Logaritmik)	Emax / KCI*100
Kontrol (n=8)	6,91±0,18	87,95±12,71
STZ (n=8)	6,88±0,22	101,02±10,52
STZ+TQ (n=8)	6,54±0,22 *	103,18±20,93

* Kontrole göre anlamlı farklılık vardır ($p<0,05$)

Kontrol : 21 gün boyunca gavaj ile 1 ml mısır yağı verildi.

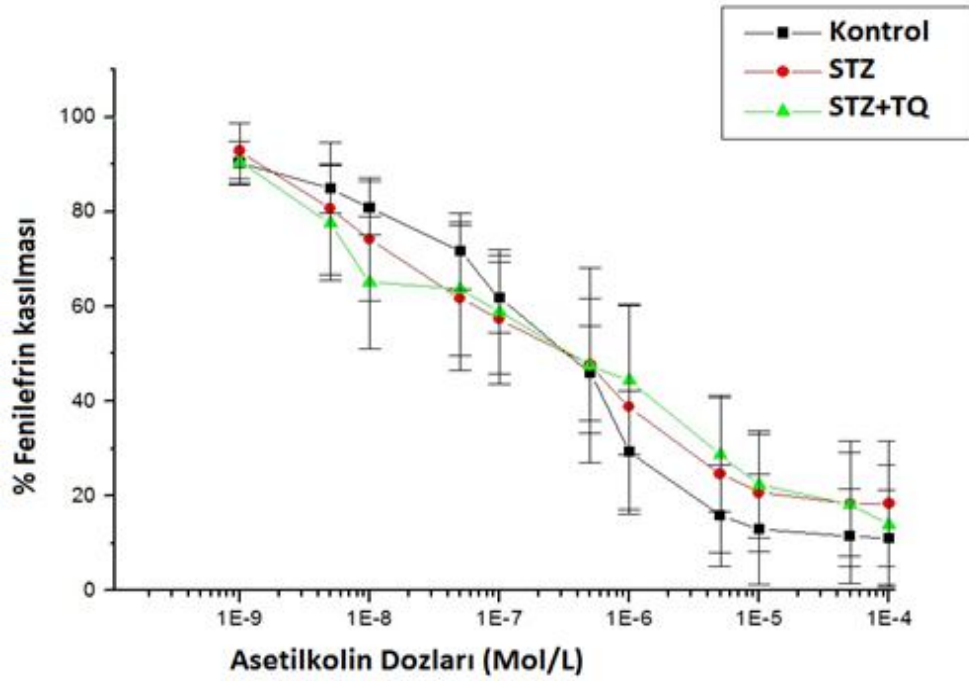
STZ : 21 gün boyunca gavaj ile 1 ml mısır yağı verildi.

STZ+TQ : 21 gün boyunca gavaj ile 1 ml mısır yağı içerisinde çözündürülmüş TQ (80 mg/kg/gün) verildi

5.4.2. Ach gevşeme cevapları

5.4.2.1. Ach doz-cevap eğrisi

Ach gevşeme cevaplarında tüm gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir (Şekil 9)



Şekil 9. Ach doz-cevap eğrisi

Kontrol : 21 gün boyunca gavaj ile 1 ml mısır yağı verildi.
 STZ : 21 gün boyunca gavaj ile 1 ml mısır yağı verildi.
 STZ+TQ : 21 gün boyunca gavaj ile 1 ml mısır yağı içerisinde çözündürülmüş TQ (80 mg/kg/gün) verildi

5.4.2.2. Ach EC50 ve Emax değerleri

Ach EC50 ve Emax düzeyleri arasında tüm gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir (Tablo 6).

Tablo 6. Tüm gruplarda Ach EC50 ve Emax değerleri.

Gruplar	Ec50 (-Logaritmik)	Emax (% phe kasılması)
Kontrol (n=8)	6,86±0,28	88,96±10,30
STZ (n=8)	7,10±0,52	81,70±13,25
STZ+TQ (n=8)	6,99±0,62	86,10±12,65

Kontrol : 21 gün boyunca gavaj ile 1 ml mısır yağı verildi.
 STZ : 21 gün boyunca gavaj ile 1 ml mısır yağı verildi.
 STZ+TQ : 21 gün boyunca gavaj ile 1 ml mısır yağı içerisinde çözündürülmüş TQ (80 mg/kg/gün) verildi.

5.5. eNOS immünreaktivitesi

eNOS immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; eNOS immünreaktivitesi damar dokusunda endotelde (siyah ok) gözlendi.

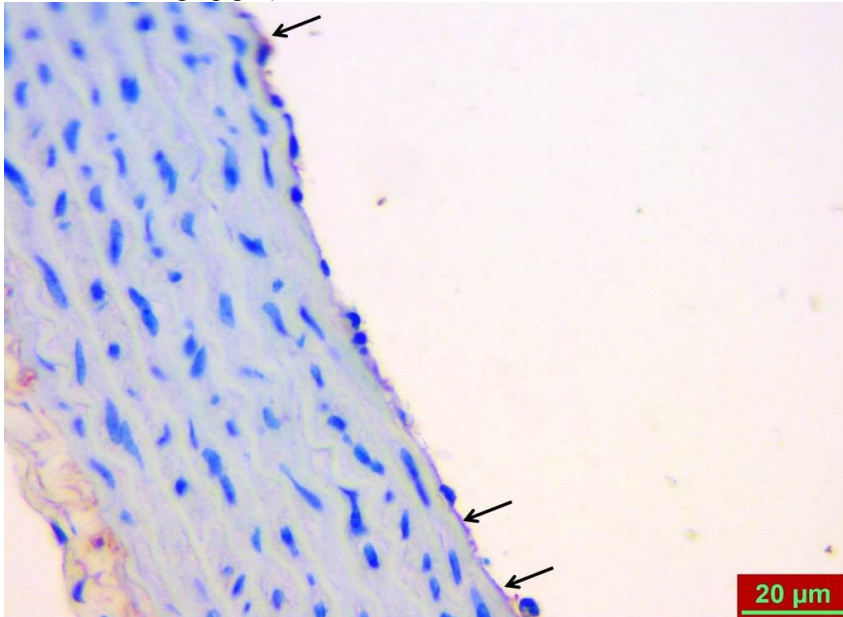
eNOS immünreaktivitesi; Kontrol grubu (şekil 10) ile karşılaştırıldığında STZ (şekil 11) grubunda anlamlı bir değişiklik izlenmedi. TQ (şekil 12) grubu ise kontrole benzerdi (Tablo 7)

Tablo 7. eNOS immünreaktivitesi.

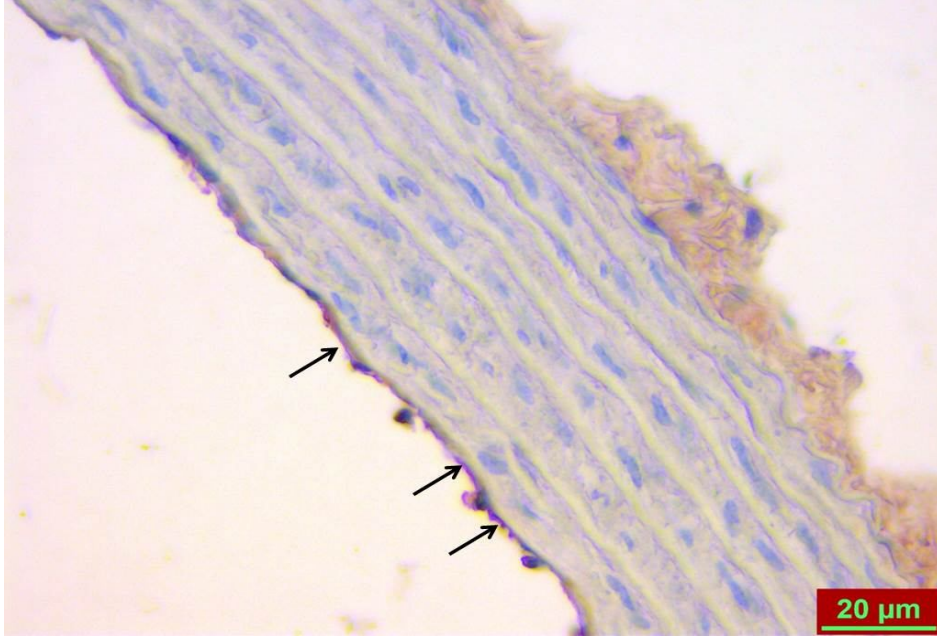
GRUP	eNOS Histoskor (yaygınlık x şiddet)
Kontrol (n=8)	0.28± 0.09
STZ (n=8)	0.31± 0.07
STZ+TQ (n=8)	0.26±0.05

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

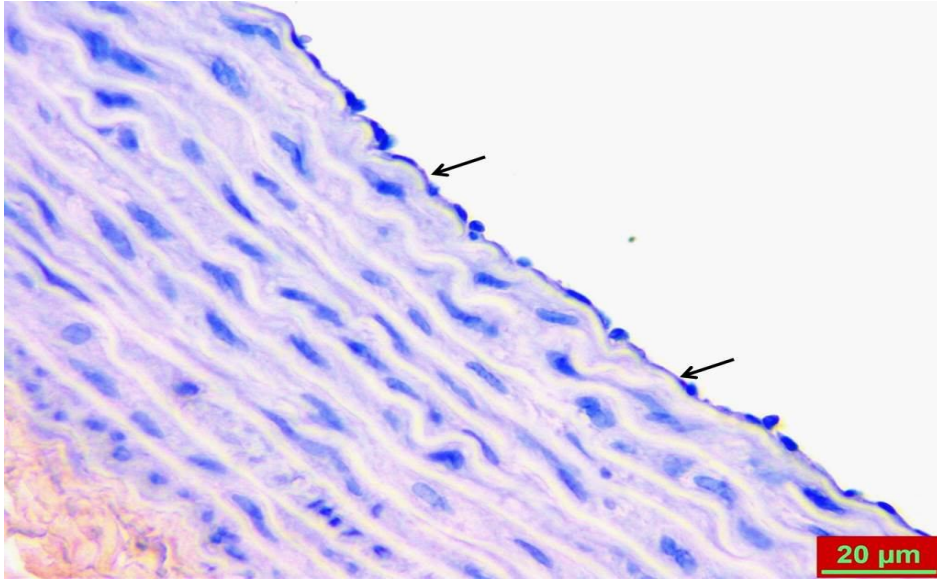
Kontrol : 21 gün boyunca herhangi bir uygulama yapılmadı.
STZ : 21 gün boyunca gavaj ile 1 ml mısır yağı verildi.
STZ+TQ : 21 gün boyunca gavaj ile 1 ml mısır yağı içerisinde çözündürülmüş TQ (80 mg/kg/gün) verildi



şekil 10. eNOS immünreaktivitesi; Kontrol grubu



Şekil 11. eNOS immünreaktivitesi; STZ grubu



Şekil 12. eNOS immünreaktivitesi; TQ grubu

5.5.1. CD-34 immünreaktivitesi

CD 34 immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; CD 34 immünreaktivitesi damar dokusunda endotelde (siyah ok) gözlemlendi.

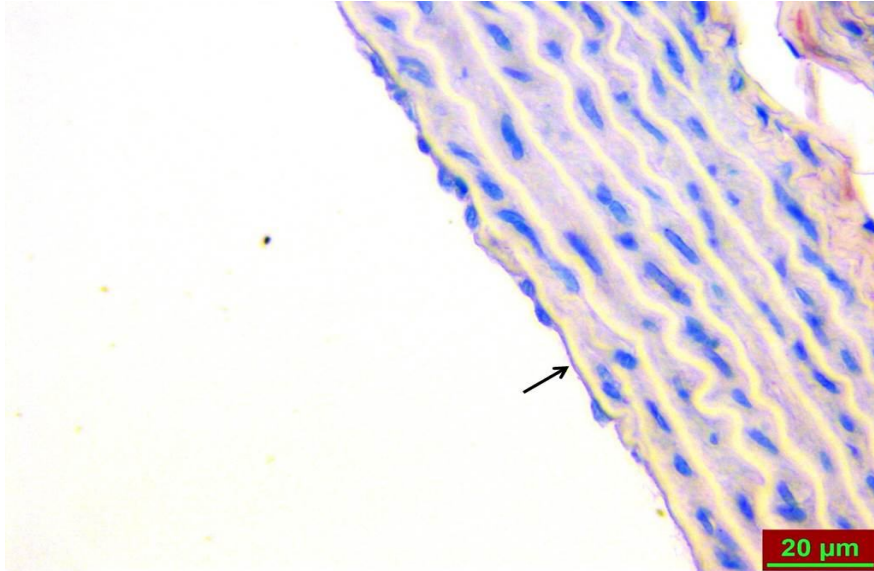
Tablo 8. CD34 immünreaktivitesi.

GRUP	CD34 Histoskor (yaygınlık x şiddet)
Kontrol (n=8)	0.13± 0.05
STZ (n=8)	1.75± 0.55 ^a
STZ+TQ (n=8)	0.15±0.05 ^b

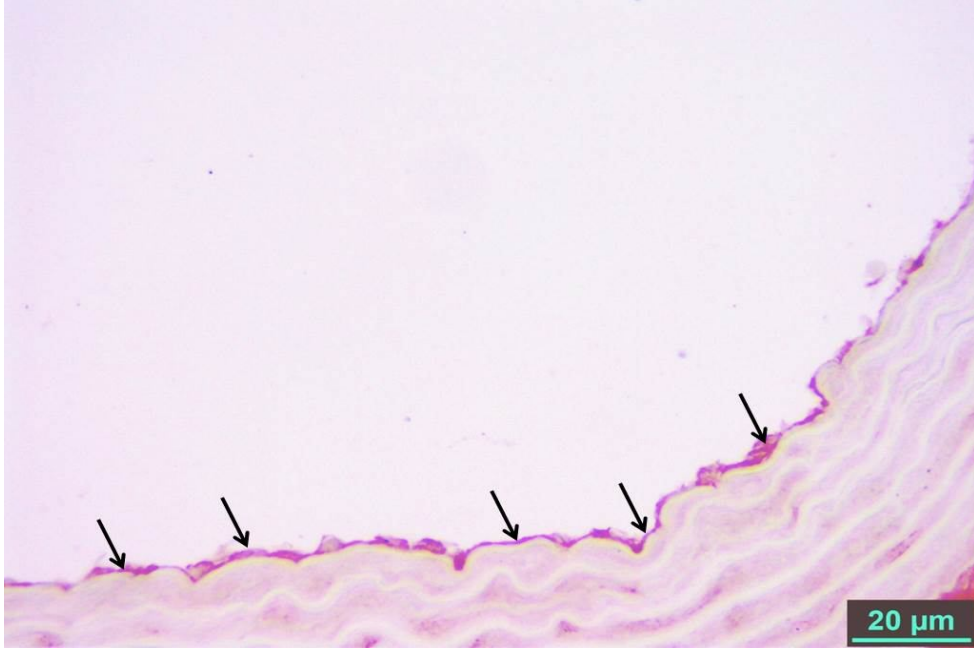
Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. ^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, ^b Stz grubuna göre karşılaştırıldığında, (p<0.05).

Kontrol : 21 gün boyunca gavaj ile 1 ml mısır yağı verildi.
STZ : 21 gün boyunca gavaj ile 1 ml mısır yağı verildi.
STZ+TQ : 21 gün boyunca gavaj ile 1 ml mısır yağı içerisinde çözündürülmüş TQ (80 mg/kg/gün) verildi

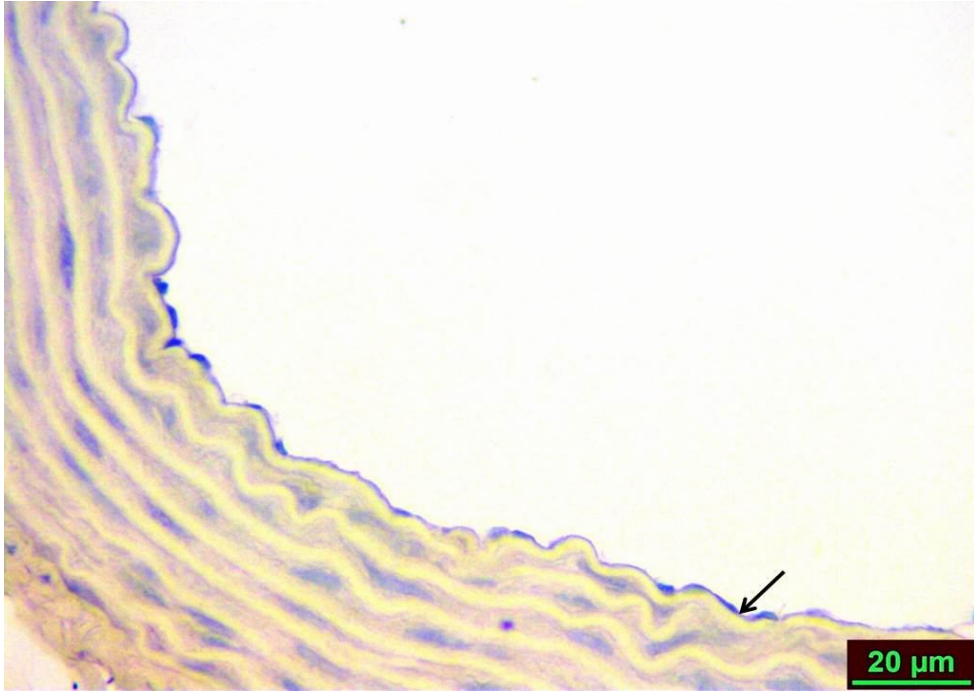
CD 34 immünreaktivitesi; Kontrol grubu (Şekil 13) ile karşılaştırıldığında STZ (Şekil 14) grubunda anlamlı olarak bir artış izlendi (p<0.05). STZ grubu ile karşılaştırıldığında TQ grubunda (Şekil 15) anlamlı bir azalma gözlemlendi ve kontrole yakındı. (Tablo 8). Skala bar: 20µm.



Şekil 13. CD34 immünreaktivitesi; Kontrol grubu



Şekil14. CD34 immünreaktivitesi; STZ grubu



Şekil 15. CD34 immünreaktivitesi; TQ grubu

6. TARTIŞMA

Bu çalışmada STZ ile oluşturulan diyabet modelinde, başlangıç ve deney sonu kan glukozu değerleri ve vasküler fonksiyonların yanısıra, eNOS, MMP-9 ve CD34 progenitör hücreleri üzerine diyabet ve TQ'un etkisi değerlendirilmiştir. Elde edilen verilere göre, TQ uygulamasının diyabet modelinde kan glukozundaki progresif artışa kısmen engel olduğu, Ach gevşeme cevaplarını değiştirmedeği, Phe EC50 cevaplarını ise olumlu yönde etkilediği, vasküler (torasik aorta) eNOS enzim aktivitesinin DM modelinden ve beraberinde TQ uygulamasından etkilenmediği, vasküler CD34 immunreaktivitesinin DM ile arttığı ve TQ ilavesiyle geri döndürüldüğü, vasküler MMP-9 enzim düzeylerinin ise DM ile azaldığı halde TQ ilavesiyle değişmediği tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmada deneyin 0. günü ve 21. günü kan basıncı ölçümlerinde grup içi ve gruplar arasında değişim gözlenmedi. Diyabetli hastalarda hipertansiyon sıklığı diyabetli olmayan olmayan gruptan 1,5-2 kat daha fazla görülmektedir. Batı toplumunda tip 1 diyabetli hastaların % 10-30'unda, tip-2 diyabetli hastaların ise % 30-50'sinde hipertansiyon görülmektedir (131). Nefropatinin en büyük göstergesi olan mikroalbüminüri hipertansiyon için bir belirteçtir. Hipertansiyon sıklığı nefropatisi olmayan tip 1 diyabetli hastalarda normal popülasyon ile aynı bulunmuştur. Bu durum hipertansiyonun diyabetin 3. evre komplikasyonu olan nefropatinin meydana gelmesi sonucu oluştuğunu göstermektedir (132). Çalışmamızda kan basıncında bir değişikliğin olmaması diyabetin 21 günlük sürecinde henüz nefropati komplikasyonunun oluşmamasından kaynaklanıyor olabilir.

DM, insülin salgılanması ve/veya insülinin periferik hücrelerdeki etkisinde meydana gelen anormallikler sonucunda oluşan yüksek glukoz düzeyi ile kendini gösteren bir takım metabolik sendromun ismidir. Bu güne kadar yapılan birçok çalışmada, çörek otunun etken maddesi olan TQ'nun glukozun metabolizmasında görev alan enzimler ve yüksek kan glukozu gibi durumların üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmamızda da, TQ'nun kan glukoz düzeyi üzerindeki etkileri araştırıldı. TQ'nun diyabette meydana gelen kan glukoz düzeyindeki artışı tamamen önlememekle beraber, STZ grubunda başlangıca göre meydana gelen anlamlı artışı önlediği tespit edildi. Önceki çalışmalarda TQ uygulanan diyabetik farelerde kan glukoz seviyeleri ölçülmüş ve belirgin bir azalma belirlenmiştir. Plazma insülin seviyelerinde ise belirgin bir artma gözlenmiştir (2, 13). Diyabette, heksokinaz ve glukoz-6-fosfat dehidrogenazın aktivitelerinde insülin yetersizliği ile azalma ve TQ uygulaması ile, insülin salınımıyla bu enzimlerin hepatik dokulardaki aktivitelerinde artış bildirilmiştir (2, 13, 32). TQ'nun insülin sekresyonu üzerindeki etkileri tam olarak açıklanamamakla birlikte; insülin sekresyonunu arttırarak ve glikoneogenezi engelleyerek kan glukoz düzeyini düşürdüğü belirtilmiştir (2). Ayrıca, TQ'nun diyabette meydana gelen oksidatif stresi azalttığı ve β hücre bütünlüğünü sağladığı belirtilmiştir (15). Çalışmamızda plazma insülin seviyeleri ölçülmemiş olması bu yönde karar vermeyi zorlaştırmakla birlikte, TQ uygulamasının diyabet modelimizde meydana gelmiş olan progresif glukoz artışını engellediği gerçeğinden hareketle, STZ aracılığıyla meydana gelen progresif β hücre toksisitesinin önlendiği ve/veya insülin salınımının arttığı hipotezleri olası görünmektedir.

Çalışmamızda, diyabette meydana gelen vasküler komplikasyonlar üzerinde TQ'nun etkisini incelemek amacıyla izole organ banyosunda Phe ile kasılma ve Ach ile gevşeme cevapları ölçülmüştür. İzole sıçan torasik aortasında düz kasın gevşeme ve kasılma yanıtları incelendiğinde; 10^{-6} molar Phe uygulaması sonrası, Ach uygulaması ile elde edilen gevşeme doz-cevap eğrisinde gruplar arasında farklılık olmadığı tespit edilmiştir. TQ'nun kontrol ve STZ grubuna göre Phe kasılma eğrisinde ec_{50} ($-\log_{10}$) değerlerini azalttığı, fakat sadece kontrol grubuna göre anlamlılık gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca Phe doz-cevap eğrisi için yapılan iki yönlü varyans analizinde kontrol grubu ile STZ+TQ grubu arasında anlamlı farklılık tespit edilmiştir. Özellikle düşük konsantrasyonlarda Phe uygulamasına kasılma cevabında TQ uygulamasıyla azalma meydana geldiği ve maksimal kasılmanın diyabetle artmış olduğu izlenmiştir. Bu sonuçlar torasik aortada Phe uygulamasına kasıcı cevabın arttığını düşündürmektedir.

Yapılan çalışmalarda diyabetik sıçanların torasik aorta halkalarında oluşan kasılma kuvvetlerinin kullanılan ajanlara göre farklılıklar gösterdiği bulunmuştur. Bazı araştırmacılar diyabetik sıçanların aorta halkalarında norepinefrinle veya Phe oluşan kasılma kuvvetinin arttığını (133, 134), diğer araştırmacılar ise kasılma kuvvetinin azaldığını bulmuşlardır (135-138). Diyabetin bir aylık döneminde α reseptörlerinin Phe'ne olan duyarlılığının azaldığı görülmüştür (139). Diyabette Phe ile meydana gelen kasılmanın arttığını gösteren çalışmada, 8 aylık antioksidan tedavisi ile bu artış düşürülmüş ve hatta kontrol değerlerinin aşağısına çekmiştir. Bu durum antioksidan etki ile diyabette meydana gelen Phe kasılma cevaplarında düşüşün meydana gelebileceğini göstermektedir. Sonuçta bizim çalışmamızdaki

bulgulara göre TQ' nun, STZ aracılı diyabette eNOS aktivitesini ve asetilkolin gevşeme yanıtlarını etkilemeden kasılma duyarlılığı üzerine azaltıcı etki gösterebileceği ve bu etkinin TQ'nun antioksidan özellik göstermesinden dolayı olabileceği ileri sürülebilir.

Diyabette Ach ile meydana gelen gevşeme cevabının azaldığını belirten çalışmalar vardır (134, 135, 138). Diyabetik hayvanlarda 8 aylık antioksidan tedavisi ile Ach gevşeme cevapları kısmen düzeltilebilmiştir (134). Çalışmamızda Ach ile meydana gelen gevşeme düzeyleri arasında gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Daha önce belirtildiği gibi, diyabet grubumuzda kan basıncı açısından bir değişim olmaması da, vasküler gevşeme cevaplarında değişim olmamasını destekler niteliktedir.

MMP'ler apoptozis ve anjiyogenez gibi bir çok hücre fonksiyonlarını düzenlerler. Çalışmamızda diyabet grubunda MMP-9 düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı oranda düşük olduğu ve TQ ilavesinin etkisiz kaldığı bulunmuştur. Literatür incelendiğinde genellikle diyabet ile MMP düzeylerinde artış gözlenen çalışmalar mevcuttur. Diyabetik retinopatisi olan hastaların ve hayvan modellerinin retina vitreusları içerisinde MMP-9 ve MMP-2 düzeylerinde artışlar gözlenmiştir (98). Aterosklerotik plak gelişimi sırasında, sitokin ve büyüme faktörlerini stimüle eden gen transkripsiyonunda, zimojen aktivasyonunda ve MMP aktivitesinde artış görüldüğü bildirilmektedir (83). Amilin (adacık amiloid polipeptid), β hücrelerinde insülin salgı granüllerinde beslenmeye yanıt olarak insülin ile birlikte üretilip beraber salgılanan bir polipeptiddir (140). Amilin sekresyonu artışı ve hiperglisemi ile amiloid adlı maddenin birikiminin meydana gelebileceği ve böylece insülin sentez ve

salgılanmasında bozukluklar ile diyabete neden olabileceği gösterilmiştir (1, 141). Tip 2 diyabette adacık MMP-9 mRNA seviyelerinin azalmasına bağlı olarak adacık MMP-9 aktivitesinin azaldığı ve bu duruma bağlı olarak adacık amiloid birikiminde ve β hücre kayıplarında artış gözlenmiştir. Adacık MMP-9 aktivitesinin artışının amiloid birikimini ve toksik etkilerini azaltabileceği düşünülmektedir (142).

Diyabette MMP'ler değişen dokularda farklı düzeylerde bulunabilmektedir (98, 142-144). Diyabetik ratlarda aort dokusunda MMP'lerin düzeyleri ne dair çalışmamızda, diyabetin akut döneminde vasküler MMP-9 düzeyinin azalabileceği ve TQ ilavesinden etkilenmediği gösterilmiştir.

Çalışmamızda eNOS immünreaktivitesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında STZ grubunda anlamlı bir değişiklik izlenmedi. TQ grubu ise kontrole benzer bir derecedeydi. Kan damarlarındaki NO sentezinde bir azalmanın ateroskleroz gibi durumlarla sonuçlanabileceği bildirilmiştir (145-150). Diyabet hastalarında endotelden prostosiklin ve NO salınımı bozulmuştur ve eNOS aktivitesindeki uzun süreli bozukluk kısmen diyabette meydana gelen hızlanmış ateroskleroza açıklayabilir (151). Diyabetli kişiler aynı yaş ve cinsiyette diyabet hastası olmayan kişilerin oluşturduğu bir grupla karşılaştırıldığında arterial sertliğin artmış olduğu gösterilmiştir (152). Retinopati gelişen tip 1 diyabetli hastaların endotelyal disfonksiyonun göstergesi olarak artmış NOS aktivitesine sahip olduğu belirtilmiştir (153). eNOS aktivitesinin düşmesi NO biyoyarlanımında azalmaya sebep olur ve bu durumun endotelyal disfonksiyonu oluşumunda etkili olduğu öne sürülmektedir (154). Çalışmamızda eNOS düzeyinin değişmemesinin nedeni, akut diyabette endotel hasarının NO düzeylerini

etkileyebilecek seviyede gerçekleşmemesi olabilir. Bu durumu in vitro Ach gevşeme cevaplarının belirgin düzeyde değişikliğe uğramamasıyla ve kan basıncında değişiklik oluşmamasıyla da uyumlu görünmektedir.

EPH'ler kemik iliğinde olgunlaşırlar ve dolaşıma dahil olarak damar hasarını bulunduğu yerlerde yoğunlaşarak hasarın tamirinde büyük görev üstlenirler. EPH'in VEGFR-2'yi ve kök hücre belirteci olan CD34'ü taşıdıkları gösterilmiştir (101). Çalışmamızda CD34 immünreaktivitesinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında STZ grubunda, TQ ilavesiyle tam olarak önlenebilen anlamlı bir artış izlendi.

Akut damar hasarı olan koroner arter cerrahisi geçiren hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada dolaşıma hızlı ama geçici bir şekilde EPH akımı gözlenmiştir. Hasar meydana geldikten 6 ila 12 saat sonrasında dolaşımdaki EPH sayısı %50 oranında yükselmiş ve 2 ila 3 gün içerisinde bazal düzeylerine gerilemiştir (107). Diğer bir araştırmada koroner arter hastalarındaki EPH miktarının düştüğü ve göç etme yeteneklerinin bozulduğu belirtilmiştir. EPH'lerde meydana gelen bu değişimlerin kardiyovasküler risk faktörleri ile korele olabileceği söylenmektedir (108-109). Böbrek dokusu üzerinde yapılan bir çalışmada, uzun ve kısa dönem diyabetli hayvanlarla, normoglisemik hayvanların böbrek dokusundaki CD34 miktarı karşılaştırılmış; uzun ve kısa dönem diyabetli hayvanlardaki CD34 miktarı normoglisemik hayvanlara göre yüksek bulunmuştur (111). Diyabetik nefropati sonucu kronik böbrek hastası olan (ortalama diyabet süresi 8 ± 3.45 yıl) ve diyabetten bağımsız olarak kronik böbrek hastası olan bireyler; diyabet hastası olan (ortalama diyabet süresi 3 ± 1.16 yıl) ve sağlıklı olan bireylerin bulunduğu 4 grup ile yapılan bir çalışmada diyabet grubu ve diyabetik

nefropati kaynaklı kronik böbrek hastası olan grupta kandaki CD34 düzeylerinin belirgin olarak düşük olduğu gözlenmiştir. Bu duruma diyabetteki hipergliseminin renal damarlar üzerindeki olumsuz etkileri sebebiyle tamir mekanizmasındaki bozulmanın neden olabileceği söylenmiştir (155). Bu sonucun çalışmamızın verileri ile örtüşmemesinin sebebi, diyabetin damarda uzun dönem komplikasyonlarının kısa dönem komplikasyonlarından farklı olabileceğinden kaynaklanıyor olabilir.

İnsanda glomerulogenesisin incelendiği bir çalışmada yeni doğanlarda glomerüler kapillerde yüksek oranda bulunan CD34 proteinin yetişkinlerde tamamına yakınının kaybedildiğini göstermektedir (156). Yaşlı hayvanlarda ve diyabetik hayvanlarda glomerüler hücre membranlarında CD34 düzeyinin artmış olmasının bu hayvanlarda oluşan hasara yanıt olarak yara iyileşmesi ve tümör gelişimi gibi patolojik durumların artmasından kaynaklandığı belirtilmiştir (157). Hiperglisemi ile tetiklenen büyüme faktörleri sitokinler ve endoteli etkileyen patolojik süreçler CD34 düzeyinin artışı ile ilişkili olabilir (158). Literatür ile karşılaştırıldığında uzun ve kısa dönem oluşturulan diyabetli hayvanlarda böbrek dokusundaki CD34 düzeyindeki artış bizim bulgularımızı destekler niteliktedir (111). Akut vasküler travma olan koroner arter hastalarında EPH'lerin dolaşıma hızlı geçişi, 2-3 gün sonra bazal düzeylere ulaşması vasküler hasarın erken döneminde EPH'lerin artış gösterebileceğini düşündürmektedir. Diyabetin erken döneminde damar üzerinde yapılan çalışmalarımızda hasarın akut dönemlerinde CD34 düzeyinin diyabette yüksek; TO uygulamasında ve kontrol grubunda daha düşük bulunması literatüre uyumlu görünümündedir.

Bütün bu veriler sonucunda TQ'nun STZ aracılı diyabette eNOS aktivitesini ve Ach gevşeme yanıtlarını etkilemeden, kasılma duyarlılığı üzerine azaltıcı etki gösterebileceği ilk kez gösterilmiştir. TQ uygulamasının STZ ile uyarılmış diyabette kan glukozundaki progresif artışa önleyici etki oluşturabileceği, bu etkinin apoptozis ve anjiogenezin düzenlenmesinde görevli olan MMP-9 enzimi aracılığını içermediği ve fakat, progenitör hücre belirteci olan CD34'ün de müdahil olduğu bir süreçle ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızın sınırlayıcılığı olarak; TQ'nun CD34 düzeylerini diyabetik gruba göre düşürmesinde insülin, HbA1c yüzdesinin, β adacık hücre histolojisinin ve oksidatif stres parametrelerinin katkısının değerlendirilmemiş olması bir eksikliktir.

TQ'nun diyabet ile oluşan damar hasarı üzerindeki etkilerini ve olası moleküler mekanizmasını araştırmak için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Yenigün M, Altuntaş Y. Her Yönüyle Diabetes Mellitus. 2. baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2001; 637-696.
2. Pari L, Sankaranarayanan C. Beneficial effects of thymoquinone on hepatic key enzymes in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *Life Sci.* 2009; 85(23-26): 830-4.
3. Badary OA. Thymoquinone attenuates ifosfamide-induced Fanconi syndrome in rats and enhances its antitumor activity in mice. *J Ethnopharmacol.* 1999; 67(2): 135-42.
4. Kanter M, Demir H, Karakaya C, Ozbek H. Gastroprotective activity of *Nigella sativa* L oil and its constituent, thymoquinone against acute alcohol-induced gastric mucosal injury in rats. *World J Gastroenterol.* 2005; 11(42): 6662-6.
5. Halawani E. Antibacterial activity of thymoquinone and thymohydroquinone of *Nigella sativa* L. and their interaction with some antibiotics. *Advances in Biological Research.* 2009; 3(5-6): 148-52.
6. Kaseb AO, Chinnakannu K, Chen D, Sivanandam A, Tejwani S, Menon M, et al. Androgen receptor and E2F-1 targeted thymoquinone therapy for hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res.* 2007; 67(16): 7782-8.
7. Badary O, Al-Shabanah O, Nagi M, Al-Bekairi A, Elmazar M. Acute and subchronic toxicity of thymoquinone in mice. *Drug Development Research.* 1998; 44: 56-61.
8. Badary OA, Abdel-Naim AB, Abdel-Wahab MH, Hamada FM. The influence of thymoquinone on doxorubicin-induced hyperlipidemic nephropathy in rats. *Toxicology.* 2000; 143(3): 219-26.
9. Salem ML. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *Int Immunopharmacol.* 2005; 5(13-14): 1749-70.
10. Abdel-Fattah AM, Matsumoto K, Watanabe H. Antinociceptive effects of *Nigella sativa* oil and its major component, thymoquinone, in mice. *Eur J Pharmacol.* 2000; 400(1): 89-97.
11. Hawsawi ZA, Ali BA, Bamosa AO. Effect of *Nigella sativa* (Black Seed) and thymoquinone on blood glucose in albino rats. *Ann Saudi Med.* 2001; 21(3-4): 242-4.
12. El-Mahmoudy A, Shimizu Y, Shiina T, Matsuyama H, El-Sayed M, Takewaki T. Successful abrogation by thymoquinone against induction of diabetes mellitus with streptozotocin via nitric oxide inhibitory mechanism. *Int Immunopharmacol.* 2005; 5(1): 195-207.
13. Fararh KM, Shimizu Y, Shiina T, Nikami H, Ghanem MM, Takewaki T. Thymoquinone reduces hepatic glucose production in diabetic hamsters. *Res Vet Sci.* 2005; 79(3): 219-23.
14. Kanter M. *Nigella sativa* and derived thymoquinone prevents hippocampal neurodegeneration after chronic toluene exposure in rats. *Neurochem Res.* 2008; 33(3): 579-88.
15. Kanter M. Protective effects of thymoquinone on streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *J Mol Histol.* 2009; 40(2): 107-15.
16. Inan S. Diyabetik retinopati ve etiyogenezi. *Kocatepe Medical Journal.* 2014; 15(2): 207-17.

17. Atalay M, Laaksonen D. Diabetes, oxidative stres and phsical exercise. Journal of Sports Science and Medicine. 2002; 1: 1-14.
18. Sayılan G. Streptozotosin ile diyabet geliştirilmiş sıçanlarda L-Karnitinin protein oksiidasyonu üzerine etkisi (tez). Edirne: Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri enstitüsü. 2008.
19. Onat A. Türk erişkinlerinde diyabet ve prediyabet: patogeneze önemli Katkı. TEKHARF 2009. 2. Baskı, İstanbul: Figür Grafik ve Matbaacılık Tic. Ltd. Şti., 2009, 140-146.
20. Satman I, Yilmaz T, Sengul A, Salman S, Salman F, Uygur S, et al. Population-based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: results of the turkish diabetes epidemiology study (TURDEP). Diabetes Care. 2002; 25(9): 1551-6.
21. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care. 2003; 26 Suppl 1: 5-20.
22. Diabetes Mellitus Çalışma ve Eğitim Grubu. Diabetes Mellitus ve komplikasyonlarının tanı, tedavi ve izlem klavuzu-2013. 6. Baskı, Ankara: Miki Matbaacılık San. ve Tic. Ltd. Şti., 2013, 21-22. 2013.
23. Gürdöl F, Ademoğlu E. Biyokimya. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul. 1. Baskı. 2006.
24. Glastras SJ, Craig ME, Verge CF, Chan AK, Cusumano JM, Donaghue KC. The role of autoimmunity at diagnosis of type 1 diabetes in the development of thyroid and celiac disease and microvascular complications. Diabetes Care. 2005; 28(9): 2170-5.
25. Orhan Y. Orhan Y. Diabetes Mellitus, Endokrinoloji Metabolizma ve Beslenme Hastalıkları. Ed: Sencer E, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul 2001: 247-286. 2001.
26. Goldstein J, Müller-Wieland D. Goldstein JB, Müller-Wieland D. Tip 2 Diyabet. (Çev. ed: Akman C), A. Martin Dunitz London and New York, 1. Baskı, 2004.
27. DeFronzo R, Bonadonna R, Ferrannini E. DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E. Pathogenesis of NIDDM In: KPMM Alberti, P Zimmet, RA DeFronzo, H Keen (eds), International Textbook of Diabetes Mellitus, New York, John Wiley&Sons Ltd, 1997; 31: 635-89. 1997.
28. Reaven G, Strom T. Reaven G, Strom T, Tip 2 Diyabet Sorular ve Cevaplar, Çev. ed: Satman İ, Merit Publishing International; 2003: 17-35.
29. Rashidi A, Kirkwood TB, Shanley DP. Metabolic evolution suggests an explanation for the weakness of antioxidant defences in beta-cells. Mech Ageing Dev. 2009; 130(4): 216-21.
30. Kopkan L, Majid DS. Superoxide contributes to development of salt sensitivity and hypertension induced by nitric oxide deficiency. Hypertension. 2005; 46(4): 1026-31.
31. DiGuseppi J, Fridovich I. The toxicology of molecular oxygen. Crit Rev Toxicol. 1984; 12(4): 315-42.
32. Sankaranarayanan C, Pari L. Thymoquinone ameliorates chemical induced oxidative stress and beta-cell damage in experimental hyperglycemic rats. Chem Biol Interact. 2011; 190(2-3): 148-54.
33. Kitiyakara C, Chabrashvili T, Chen Y, Blau J, Karber A, Aslam S, et al. Salt intake, oxidative stress, and renal expression of NADPH oxidase and superoxide dismutase. J Am Soc Nephrol. 2003; 14(11): 2775-82.

34. Jin N, Packer C, Rhoades R. reactive oxygen-mediated contraction in pulmonary arter 1991.
35. Gries F, Cameron N, Low P. Diabetes Mellitus, Textbook of Diabetic Neuropathy, . 2003: 1-16.
36. Satılmış Z. Diabetes mellitusda insülin tedavisinin periferik sinir sisteminde etkileri: Klinik ve elektrofizyolojik değerlendirme (tez). İstanbul: Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi. 2007.
37. İrer SV, Alper G. İrer SV, Alper G. Deneyssel diyabet modelleri. 2004; 2: 127-36. Türk Klinik Biyokimya Dergisi. 2004; 2: 127-136.
38. Rees DA, Alcolado JC. Animal models of diabetes mellitus. Diabet Med. 2005; 22(4): 359-70.
39. Bell RH, Jr., Hye RJ. Animal models of diabetes mellitus: physiology and pathology. J Surg Res. 1983; 35(5): 433-60.
40. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. Physiol Res. 2001; 50(6): 537-46.
41. Golfman L, Dixon IM, Takeda N, Lukas A, Dakshinamurti K, Dhalla NS. Cardiac sarcolemmal Na(+)-Ca²⁺ exchange and Na(+)-K⁺ ATPase activities and gene expression in alloxan-induced diabetes in rats. Mol Cell Biochem. 1998; 188(1-2): 91-101.
42. Jaouhari JT, Lazrek HB, Jana M. The hypoglycemic activity of Zygophyllum gaetulum extracts in alloxan-induced hyperglycemic rats. J Ethnopharmacol. 2000; 69(1): 17-20.
43. Prince PS, Menon VP, Pari L. Hypoglycaemic activity of Syzigium cumini seeds: effect on lipid peroxidation in alloxan diabetic rats. J Ethnopharmacol. 1998; 61(1): 1-7.
44. al-Shamaony L, al-Khazraji SM, Twaij HA. Hypoglycaemic effect of Artemisia herba alba. II. Effect of a valuable extract on some blood parameters in diabetic animals. J Ethnopharmacol. 1994; 43(3): 167-71.
45. Koh PO, Sung JH, Won CK, Cho JH, Moon JG, Park OS, et al. Streptozotocin-induced diabetes decreases placenta growth factor (PlGF) levels in rat placenta. J Vet Med Sci. 2007; 69(9): 877-80.
46. Wong TP, Debnam ES, Leung PS. Diabetes mellitus and expression of the enterocyte renin-angiotensin system: implications for control of glucose transport across the brush border membrane. Am J Physiol Cell Physiol. 2009; 297(3): 601-610.
47. Liu SH, Chang YH, Chiang MT. Chitosan reduces gluconeogenesis and increases glucose uptake in skeletal muscle in streptozotocin-induced diabetic rats. J Agric Food Chem. 2010; 58(9): 5795-800.
48. Sinzato YK, Damasceno DC, Laufer-Amorim R, Rodrigues MM, Oshiiwa M, Taylor KN, et al. Plasma concentrations and placental immunostaining of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha as predictors of alterations in the embryo-fetal organism and the placental development of diabetic rats. Braz J Med Biol Res 2011; 44(3): 206-211.
49. Masiello P, Broca C, Gross R, Roye M, Manteghetti M, Hillaire-Buys D, et al. Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. Diabetes. 1998; 47(2): 224-9.

50. Kobayashi T, Taguchi K, Yasuhiro T, Matsumoto T, Kamata K. Impairment of PI3-K/Akt pathway underlies attenuated endothelial function in aorta of type 2 diabetic mouse model. *Hypertension*. 2004; 44(6): 956-962.
51. Leung JY, Kwok EW, Liu GY, Pang CC. Attenuated alpha-adrenoceptor-mediated arterial and venous constrictions in rat models of diabetes. *Eur J Pharmacol*. 2010; 642(1-3): 128-33.
52. Huang BW, Chiang MT, Yao HT, Chiang W. The effect of high-fat and high-fructose diets on glucose tolerance and plasma lipid and leptin levels in rats. *Diabetes Obes Metab*. 2004; 6(2): 120-126.
53. Zhang M, Lv XY, Li J, Xu ZG, Chen L. The characterization of high-fat diet and multiple low-dose streptozotocin induced type 2 diabetes rat model. *Exp Diabetes Res*. 2008; 2008: 704045. PMID: 2613511.
54. Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul CL, Ramarao P. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res*. 2005; 52(4): 313-20.
55. Sayed AA. Thymoquinone and proanthocyanidin attenuation of diabetic nephropathy in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2012; 16(6): 808-15.
56. Mohammad A, Wadaan. Long-term effects of black seed and garlic oil on the offspring of two consecutive pregnancies in rats. *Journal of King Saud University (Science)*. 2009; 21: 155-61.
57. Kalaivanisailaja J, Manju V, Nalini N. Lipid profile in mice fed a high-fat diet after exogenous leptin administration. *Pol J Pharmacol*. 2003; 55(5): 763-9.
58. Garjani A, Fathiazad F, Zakheri A, Akbari NA, Azarmie Y, Fakhrjoo A, et al. The effect of total extract of *Securigera securidaca* L. seeds on serum lipid profiles, antioxidant status, and vascular function in hypercholesterolemic rats. *J Ethnopharmacol*. 2009; 126(3): 525-32.
59. Bacak G. Yağlı diyet ile beslenen sıçanlarda timokinon'un plazma leptin, karnitin, paraoksanaz, tiroid hormonları, insülin ve glikoz ile lipid profiline etkilerinin araştırılması. AKÜ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tez no: 2010-005, Afyonkarahisar. 2010.
60. Zaoui A, Cherrah Y, Alaoui K, Mahassine N, Amarouch H, Hassar M. Effects of *Nigella sativa* fixed oil on blood homeostasis in rat. *J Ethnopharmacol*. 2002; 79(1): 23-6.
61. Al-Naqeep G, Ismail M, Allaudin Z. Regulation of low-density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene expression by thymoquinone-rich fraction and thymoquinone in HepG2 cells. *J Nutrigenet Nutrigenomics*. 2009; 2(4-5): 163-72.
62. Ismail M, Al-Naqeep G, Chan KW. *Nigella sativa* thymoquinone-rich fraction greatly improves plasma antioxidant capacity and expression of antioxidant genes in hypercholesterolemic rats. *Free Radic Biol Med*. 2010; 48(5): 664-72.
63. Bamosa AO, Ali BA, al-Hawsawi ZA. The effect of thymoquinone on blood lipids in rats. *Indian J Physiol Pharmacol*. 2002; 46(2): 195-201.
64. Mansour MA, Ginawi OT, El-Hadiyah T, El-Khatib AS, Al-Shabanah OA, Al-Sawaf HA. Effects of volatile oil constituents of *Nigella sativa* on carbon tetrachloride-induced

- hepatotoxicity in mice: evidence for antioxidant effects of thymoquinone. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. 2001; 110(3-4): 239-51.
65. Badary OA, Taha RA, Gamal el-Din AM, Abdel-Wahab MH. Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. *Drug Chem Toxicol*. 2003; 26(2): 87-98.
 66. El-Dakhakhny M, Madi NJ, Lembert N, Ammon HP. Nigella sativa oil, nigellone and derived thymoquinone inhibit synthesis of 5-lipoxygenase products in polymorphonuclear leukocytes from rats. *J Ethnopharmacol*. 2002; 81(2): 161-4.
 67. Gali-Muhtasib H, Diab-Assaf M, Boltze C, Al-Hmaira J, Hartig R, Roessner A, et al. Thymoquinone extracted from black seed triggers apoptotic cell death in human colorectal cancer cells via a p53-dependent mechanism. *Int J Oncol*. 2004; 25(4): 857-66.
 68. Gali-Muhtasib HU, Abou Kheir WG, Kheir LA, Darwiche N, Crooks PA. Molecular pathway for thymoquinone-induced cell-cycle arrest and apoptosis in neoplastic keratinocytes. *Anticancer Drugs*. 2004; 15(4): 389-99.
 69. Shoieb AM, Elgayyar M, Dudrick PS, Bell JL, Tithof PK. In vitro inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thymoquinone. *Int J Oncol*. 2003; 22(1): 107-13.
 70. Roepke M, Diestel A, Bajbouj K, Walluscheck D, Schonfeld P, Roessner A, et al. Lack of p53 augments thymoquinone-induced apoptosis and caspase activation in human osteosarcoma cells. *Cancer Biol Ther*. 2007; 6(2): 160-9.
 71. Mansour M, Tornhamre S. Inhibition of 5-lipoxygenase and leukotriene C4 synthase in human blood cells by thymoquinone. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2004; 19(5): 431-6.
 72. El Mezayen R, El Gazzar M, Nicolls MR, Marecki JC, Dreskin SC, Nomiya H. Effect of thymoquinone on cyclooxygenase expression and prostaglandin production in a mouse model of allergic airway inflammation. *Immunol Lett*. 2006; 106(1): 72-81.
 73. Bourgou S, Pichette A, Marzouk B, Legault J. Bioactivities of black cummin essential oil and its main terpenes from Tunisia. *South African Journal of Botany*. 2010; 76: 210-6.
 74. Aljabre SH, Randhawa MA, Akhtar N, Alakloby OM, Alqurashi AM, Aldossary A. Antidermatophyte activity of ether extract of Nigella sativa and its active principle, thymoquinone. *J Ethnopharmacol*. 2005; 101(1-3): 116-9.
 75. Lucey DR, Clerici M, Shearer GM. Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clin Microbiol Rev*. 1996; 9(4): 532-62. PMID: 172909.
 76. Haq A, Lobo PI, Al-Tufail M, Rama NR, Al-Sedairy ST. Immunomodulatory effect of Nigella sativa proteins fractionated by ion exchange chromatography. *Int J Immunopharmacol*. 1999; 21(4): 283-95.
 77. Haq A, Abdullatif M, Lobo PI, Khabar KS, Sheth KV, al-Sedairy ST. Nigella sativa: effect on human lymphocytes and polymorphonuclear leukocyte phagocytic activity. *Immunopharmacology*. 1995; 30(2): 147-55.
 78. El-Mahmoudy A, Matsuyama H, Borgan MA, Shimizu Y, El-Sayed MG, Minamoto N, et al. Thymoquinone suppresses expression of inducible nitric oxide synthase in rat macrophages. *Int Immunopharmacol*. 2002; 2(11): 1603-11.

79. Rchid H, Chevassus H, Nmila R, Guiral C, Petit P, Chokairi M, et al. Nigella sativa seed extracts enhance glucose-induced insulin release from rat-isolated Langerhans islets. *Fundam Clin Pharmacol*. 2004; 18(5): 525-9.
80. Fararh KM, Atoji Y, Shimizu Y, Takewaki T. Insulinotropic properties of Nigella sativa oil in Streptozotocin plus Nicotinamide diabetic hamster. *Res Vet Sci*. 2002; 73(3): 279-82.
81. Edelstein D, Brownlee M. Mechanistic studies of advanced glycosylation end product inhibition by aminoguanidine. *Diabetes*. 1992; 41(1): 26-9.
82. Ezenwaka CE, Seales D, Surujlal R, Mathura RP. Glycated haemoglobin A1c measurement in stored whole blood sample is reliable for clinical use. *West Indian Med J*. 2009; 58(1): 17-20.
83. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003; 92(8): 827-39.
84. Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev*. 2000; 14(17): 2123-33.
85. Lambert E, Dasse E, Haye B, Petitfrere E. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004; 49(3): 187-98.
86. Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 1999; 274(31): 21491-4.
87. Hoekstra R, Eskens FA, Verweij J. Matrix metalloproteinase inhibitors: current developments and future perspectives. *Oncologist*. 2001; 6(5): 415-27.
88. Jones CB, Sane DC, Herrington DM. Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in acute coronary syndrome. *Cardiovasc Res*. 2003; 59(4): 812-23.
89. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001; 17: 463-516. PMID: 2792593.
90. Kuzuya M, Iguchi A. Role of matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *J Atheroscler Thromb*. 2003; 10(5): 275-82.
91. Lijnen HR. Extracellular proteolysis in the development and progression of atherosclerosis. *Biochem Soc Trans*. 2002; 30(2): 163-7.
92. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, et al. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1993; 4(2): 197-250.
93. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol*. 1997; 74(2): 111-22.
94. Beaudoux JL, Giral P, Bruckert E, Foglietti MJ, Chapman MJ. Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: therapeutic perspectives. *Clin Chem Lab Med*. 2004; 42(2): 121-31.
95. Lijnen HR. Matrix metalloproteinases and cellular fibrinolytic activity. *Biochemistry (Mosc)*. 2002; 67(1): 92-8.

96. More RS, Underwood MJ, Brack MJ, de Bono DP, Gershlick AH. Changes in vessel wall plasminogen activator activity and smooth muscle cell proliferation and activation after arterial injury. *Cardiovasc Res.* 1995; 29(1): 22-6.
97. Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* 1991; 5(8): 2145-54.
98. Kowluru RA, Zhong Q, Santos JM. Matrix metalloproteinases in diabetic retinopathy: potential role of MMP-9. *Expert Opin Investig Drugs.* 2012; 21(6): 797-805. PMID: 3802521.
99. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997; 275(5302): 964-7.
100. Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood.* 1998; 92(2): 362-7.
101. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood.* 2000; 95(3): 952-8.
102. Schwartz SM, Benditt EP. Clustering of replicating cells in aortic endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1976; 73(2): 651-3.
103. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res.* 2004; 95(4): 343-53.
104. Tepper OM, Sealove BA, Murayama T, Asahara T. Newly emerging concepts in blood vessel growth: recent discovery of endothelial progenitor cells and their function in tissue regeneration. *J Invest Med.* 2003; 51(6): 353-9.
105. Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell.* 2002; 109(5): 625-37.
106. Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med.* 2003; 9(11): 1370-6.
107. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med.* 2003; 348(7): 593-600.
108. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher AM, et al. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation.* 2001; 103(24): 2885-90.
109. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res.* 2001; 89(1): E1-7.
110. Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR, et al. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation.* 2002; 106(22): 2781-6.
111. Acevedo LM, Londono I, Oubaha M, Ghitescu L, Bendayan M. Glomerular CD34 expression in short- and long-term diabetes. *The journal of histochemistry and*

- cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society. 2008; 56(6): 605-14. PMID: 2386768.
112. Cohn JN. Arterial compliance to stratify cardiovascular risk: more precision in therapeutic decision making. *Am J Hypertens*. 2001; 14(8 Pt 2): 258-263.
 113. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980; 288(5789): 373-6.
 114. Murad F. Nitric oxide signaling: would you believe that a simple free radical could be a second messenger, autacoid, paracrine substance, neurotransmitter, and hormone? *Recent Prog Horm Res*. 1998; 53: 43-59.
 115. K S. Primer Hipertansiyon. 1. baskı ed. Ankara: GATA; 2003. 2003.
 116. Moncada S. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. *J R Soc Med*. 1999; 92(4): 164-9. PMID: 1297136.
 117. Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, et al. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*. 1994; 23(6 Pt 2): 1121-31.
 118. Vanhoutte PM. Endothelium and control of vascular function. State of the Art lecture. *Hypertension*. 1989; 13(6 Pt 2): 658-67.
 119. Buga GM, Gold ME, Fukuto JM, Ignarro LJ. Shear stress-induced release of nitric oxide from endothelial cells grown on beads. *Hypertension*. 1991; 17(2): 187-93.
 120. Russ RD, Walker BR. Role of nitric oxide in vasopressinergic pulmonary vasodilatation. *Am J Physiol*. 1992; 262(3 Pt 2): H743-7.
 121. Chen LY, Mehta JL. Further evidence of the presence of constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in human platelets. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1996; 27(1): 154-8.
 122. Russo A, Longo R, Vanella A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia*. 2002; 73 Suppl 1: 21-29.
 123. Moncada S, Palmer RM. Biosynthesis and actions of nitric oxide. *Semin Perinatol*. 1991; 15(1): 16-9.
 124. Armas-Padilla MC, Armas-Hernandez MJ, Sosa-Canache B, Cammarata R, Pacheco B, Guerrero J, et al. Nitric oxide and malondialdehyde in human hypertension. *Am J Ther*. 2007; 14(2): 172-6.
 125. Camilletti A, Moretti N, Giacchetti G, Faloia E, Martarelli D, Mantero F, et al. Decreased nitric oxide levels and increased calcium content in platelets of hypertensive patients. *Am J Hypertens*. 2001; 14(4 Pt 1): 382-386.
 126. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*. 1993; 329(27): 2002-12.
 127. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*. 2001; 357(Pt 3): 593-615.
 128. Needle MN, Goldwein JW, Grass J, Cnaan A, Bergman I, Molloy P, et al. Adjuvant chemotherapy for the treatment of intracranial ependymoma of childhood. *Cancer*. 1997; 80(2): 341-347.

129. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. 2004; 109: 27-32.
130. Brovkovich V, Dobrucki LW, Brovkovich S, Dobrucki I, Do Nascimento CA, Burewicz A, et al. Nitric oxide release from normal and dysfunctional endothelium. *J Physiol Pharmacol*. 1999; 50(4): 575-86.
131. Pick up J, Williams G. Pick Up J, Williams G. Hypertension and diabetes mellitus. In: Pick Up J, Williams G, editors. *Textbook of diabetes*. 2nd ed. Oxford: Blackwell Science; 1997. p. 56.1-56.19. 1997.
132. Kaplan N. Kaplan NM. Birincil hipertansiyon: doğal seyir, özel hasta toplulukları ve değerlendirme. In: *Klinik hipertansiyon*. 7. basım. Çeviren: Canbek E. İstanbul: Turgut Yayıncılık; 1998. s. 101-32.
133. Endotel .İzmir Tabip Odası Tıpta Temel Bilimler Kolu Sonbahar Okulu, 1994. 1994.
134. Arı N. Diyabetik Komplikasyonların Önlenmesinde Antioksidanlar: Piridindol Türevi Stobadin Üzerinde Çalışmalar. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri. 2006.
135. Elçioğlu HK, Kabasakal L, Sezen FS. STZ veya fruktoz ile oluşturulan diyabet modellerinde, sıçan aorta ve korpus kavernozum dokularındaki fonksiyonel değişikliklerde kaveolin-1 düzeylerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi. *Türk Farmakoloji Derneği 20 Ulusal Farmakoloji Kongresi; Kongre Programı ve Bildiri Özet Kitabı*. 2009(p-136): 320.
136. Takahashi Y, Negoro M, Wakabayashi I. Decreased modulation by lipopolysaccharide of aortic smooth muscle contractility in streptozotocin-induced hyperglycemic rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2003; 41(2): 162-70.
137. Ordonez Fernandez A, Hernandez Fernandez A, Borrego Dominguez JM, Gutierrez Carretero E, Calderon Sanchez E, Ruiz Perez M. Study of the reversibility of endothelial dysfunction in a rat model of diabetes mellitus: experimental treatment by transplantation of pancreatic islets. *Eur J Surg*. 2001; 167(9): 695-9.
138. Güvel Ç, Elçioğlu HK, Kabasakal L, Ayanoğlu Dülger FG. Fruktoz uygulaması ile gelişen insülin direncinde aorta dokusundaki fonksiyonel değişikliklerde genistein'in etkisi. *Türk Farmakoloji Derneği 20 Ulusal Farmakoloji Kongresi; Kongre Programı ve Bildiri Özet Kitabı* 2009(p-137): 321.
139. Schulingkamp RJ, Aloyo V, Tallarida RJ, Raffa RB. Changes in aorta alpha1-adrenoceptor number and affinity during one year of streptozotocin-induced diabetes in rats. *Pharmacology*. 2005; 74(1): 23-30.
140. Pittner RA, Albrandt K, Beaumont K, Gaeta LS, Koda JE, Moore CX, et al. Molecular physiology of amylin. *J Cell Biochem*. 1994; 55 Suppl: 19-28.
141. Narita R, Toshimori H, Nakazato M, Kuribayashi T, Toshimori T, Kawabata K, et al. Islet amyloid polypeptide (IAPP) and pancreatic islet amyloid deposition in diabetic and non-diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract*. 1992; 15(1): 3-14.
142. Aston-Mourney K, Zraika S, Udayasankar J, Subramanian SL, Green PS, Kahn SE, et al. Matrix metalloproteinase-9 reduces islet amyloid formation by degrading islet amyloid polypeptide. *J Biol Chem*. 2013; 288(5): 3553-9.

143. Van Linthout S, Seeland U, Riad A, Eckhardt O, Hohl M, Dhayat N, et al. Reduced MMP-2 activity contributes to cardiac fibrosis in experimental diabetic cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol*. 2008; 103(4): 319-27.
144. Ali S, Driscoll HE, Newton VL, Gardiner NJ. Matrix metalloproteinase-2 is downregulated in sciatic nerve by streptozotocin induced diabetes and/or treatment with minocycline: Implications for nerve regeneration. *Exp Neurol*. 2014; 261: 654-65.
145. Vacek TP, Rehman S, Neamtu D, Yu S, Givimani S, Tyagi SC. Matrix metalloproteinases in atherosclerosis: role of nitric oxide, hydrogen sulfide, homocysteine, and polymorphisms. *Vascular health and risk management*. 2015; 11: 173-83.
146. Li H, Horke S, Forstermann U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2014; 237(1): 208-19.
147. Cavieres V, Valdes K, Moreno B, Moore-Carrasco R, Gonzalez DR. Vascular hypercontractility and endothelial dysfunction before development of atherosclerosis in moderate dyslipidemia: role for nitric oxide and interleukin-6. *American journal of cardiovascular disease*. 2014; 4(3): 114-22.
148. Muller G, Morawietz H. Nitric oxide, NAD(P)H oxidase, and atherosclerosis. *Antioxidants & redox signaling*. 2009; 11(7): 1711-31.
149. Li H, Forstermann U. Prevention of atherosclerosis by interference with the vascular nitric oxide system. *Current pharmaceutical design*. 2009; 15(27): 3133-45.
150. Moncada S, Higgs EA. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J*. 1995; 9(13): 1319-30.
151. Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C, Brownlee M. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J Clin Invest*. 2001; 108(9): 1341-8.
152. Ravikumar R, Deepa R, Shanthirani C, Mohan V. Comparison of carotid intima-media thickness, arterial stiffness, and brachial artery flow mediated dilatation in diabetic and nondiabetic subjects (The Chennai Urban Population Study [CUPS-9]). *Am J Cardiol*. 2002; 90(7): 702-7.
153. İnan S. Diyabetik Retinopati ve Nitrik Oksit. *Kocatepe Medical Journal*. 2015; 16: 57-66.
154. Kishore R, Benedict C, Cheng Z. mu-Calpain as a Novel Target for Impairment of Nitric Oxide-Mediated Vascular Relaxation in Diabetes: A Mini Review. *J Mol Genet Med*. 2015; 9(2). PMID: 4482122.
155. Pala C, Altun I, Koker Y, Kurnaz F, Sivgin S, Kocyigit I, et al. The effect of diabetes mellitus and end-stage renal disease on the number of CD34+ cells in the blood. *Annals of hematology*. 2013; 92(9): 1189-94.
156. Takano K, Kawasaki Y, Imaizumi T, Matsuura H, Nozawa R, Tannji M, et al. Development of glomerular endothelial cells, podocytes and mesangial cells in the human fetus and infant. *Tohoku J Exp Med*. 2007; 212(1): 81-90.
157. Schlingemann RO, Rietveld FJ, de Waal RM, Bradley NJ, Skene AI, Davies AJ, et al. Leukocyte antigen CD34 is expressed by a subset of cultured endothelial cells and on endothelial abluminal microprocesses in the tumor stroma. *Lab Invest*. 1990; 62(6): 690-6.
158. Brandes RP, Fleming I, Busse R. Endothelial aging. *Cardiovasc Res*. 2005; 66(2): 286-94.

8. ÖZGEÇMİŞ

12.08.1989 tarihinde Düziçinde doğdum. İlk ve orta öğretimimi Mersin'in Gülnar ilçesinde, lise öğrenimimi Kilis Nedim Ökmen Anadolu Öğretmen Lisesinde tamamladım. 2012 yılında Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesinden mezun oldum. Yine aynı sene Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimime başladım.