

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Biyokimya Anabilim Dalı**

**DİYABETE BAĞLI OLARAK GELİŞTİRİLMİŞ
NEFROPATİLİ RAT MODELİNDE MYRİCETİN'İN
VE MERSİN BİTKİSİNİN EKSTRAKTININ BÖBREK
DOKUSU ÜZERİNE ETKİSİ**

Filiz ÖZCAN

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2009

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Biyokimya Anabilim Dalı**

**DİYABETE BAĞLI OLARAK GELİŞTİRİLMİŞ
NEFROPATİLİ RAT MODELİNDE MYRICETİN'İN VE
MERSİN BİTKİSİNİN EKSTRAKTININ BÖBREK DOKUSU
ÜZERİNE ETKİSİ**

Filiz ÖZCAN

Yüksek Lisans Tezi

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yakup ALICIGÜZEL**

Bu Çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından Desteklenmiştir. (Proje No: 2007.02.0122.004)

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir.”

Antalya, 2009

Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma, jürimiz tarafından Biyokimya Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. /..... /.....

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Yakup ALICIGÜZEL
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Gültekin YÜCEL
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı



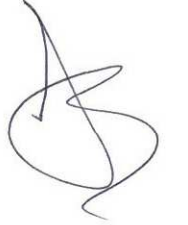
Üye : Prof. Dr. H. İbrahim UZUN
Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı



Üye : Doç. Dr. Mutay ASLAN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı



Üye : Doç. Dr. Sema AKMAN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı
Nefroloji Bölümü



Onay:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun /..... /..... tarih ve /..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof Dr. İsmail ÜSTÜNEL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Diabetes Mellitus (DM), düşük insülin sekresyonu ve insülin rezistansı ile karakterize metabolik bir hastalıktır. Uzun dönem DM komplikasyonları hastalık ve ölümün başlıca sebebi olan kötü glisemik kontrolle ilişkilidir. Oksidatif stresdeki artışın, diyabetin ve komplikasyonlarının, gelişim sürecinde ve ilerlemesinde oldukça büyük bir rolü olduğu düşünülmektedir. *Myrtus communis* (mersin), DM hastalarında hiperglisemi ve oksidatif stresin azaltılması için geleneksel olarak halk arasında kullanılmaktadır. Mersin bitkisi ve ekstratlarındaki temel polifenollerin flavonoidler ve antosiyaninler olduğu bilinmektedir. Flavonoidler arasından da myricetin ve kuersetinin antioksidan aktivitesinin yüksek olduğu saptanmıştır.

Bu projedeki amacımız, hipoglisemik ve antioksidan özellikleri olan myricetin ve mersin ekstratlarının, tek doz intraperitoneal streptozotolin enjeksiyonu ile oluşturulmuş diyabetik sıçanlarda, böbrek fonksiyon bozuklukları ve oksidatif metabolizma üzerine olan koruyucu etkilerini araştırmaktır. Bu amaçla 44 adet albino wistar sıçan kullanılarak 4 grup (kontrol, diyabet, diyabet-mersin, diyabet-myricetin) oluşturuldu. Diyabet oluşumunu takiben 16. haftada, açlık kan şekeri (AKŞ), idrar proteini, kan üre azotu (BUN) ve kreatinin klirensi ölçümleri yapılarak böbrek fonksiyonları izlenerek tedavi sürecine başlandı. Tedavi sürecinde, diyabet-myricetin grubuna intraperitoneal olarak 12 saatte bir 3mg olmak üzere toplam 6 mg/gün myricetin ve diyabet-mersin grubuna gavaj yoluyla 250 mg/gün mersin ekstraktı 10 gün süre ile verildi. Tedavi süresince 0., 2., 6., ve 10. günlerde, sıçanlardan metabolik kafesler aracılığı ile idrar ve kuyruk venlerinden kan numuneleri toplanarak; idrar hacmi, AKŞ, idrar proteini, BUN ve kreatinin klirensi değerlerine bakıldı. Tedavi bitiminde, sıçanlara anestezi yapılarak, histokimyasal analiz, ksantin oksidaz/dehidrogenaz ve glutatyon peroksidaz aktivitelerinin ölçülebilmesi için böbrek dokuları çıkarıldı. Biyokimyasal analizlerin sonucunda, diyabetik sıçanlara myricetin uygulanması böbrek fonksiyonlarında bir iyileşme sağlamıştır. Tedavi döneminin sonunda, idrar proteini, BUN, AKŞ ve idrar hacmi diyabet kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tedavi gruplarında istatistiksel ölçüde anlamlı olarak düşük bulunmuştur ve bunun yanında kreatinin klirensi yükselmiştir. Ayrıca diyabet grubu ile karşılaştırıldığında, tedavi gruplarının böbreklerinde, ksantin oksidaz/dehidrogenaz enzim aktivitesi azalmış ve glutatyon peroksidaz aktivitesi artmıştır.

Sonuç olarak mersin bitkisinin ve doğada yaygın olarak bulunan bir flavonoid olan myricetin anti-hiperglisemik ve antioksidan etkisinden dolayı böbrek fonksiyonlarında bir iyileşme sağladığı gözlemlenmiştir. Edinilen bilimsel veriler, diyabette oluşan böbrek fonksiyon bozukluğunun azaltılmasında yeni doğal tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde fayda sağlayabilir.

Anahtar kelimeler: Diyabet, diyabetik nefropati, myricetin, *Myrtus communis*, böbrek, oksidatif stres.

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disease characterized by insulin resistance and reduced secretion of insulin. Long-term complications of DM have been associated with poor glycemic control, which is a major cause of morbidity and mortality. It is considered that increased oxidative stress may have an important role in the development and progression of diabetes and its complications. *Myrtus communis* (myrtle) has been traditionally used in folk medicine to treat hyperglycemia and as an antioxidant. It is known that major polyphenols of myrtle and its extracts are flavonoids and anthocyanidins. It is reported that among the flavonoids myricetin and quercetin have potent antioxidant activities.

In this project, our aim was to investigate the protective effects of myricetin and myrtle extracts, which have hypoglycemic and antioxidant properties in diabetic rat models formed via a single dose streptozotocin injection. For this purpose, 44 albino wistar rats were divided into 4 groups (control, diabetic, diabetic-myrtle, diabetic-myricetin). Fasting blood glucose (FBG), urine protein, blood urea nitrogen (BUN), and creatinine clearance was measured 16 weeks after diabetes was confirmed. Myricetin and myrtle treatment was started 16 weeks after STZ injection. Rats in the diabetic-myricetin group were given intraperitoneal injections of myricetin every 12 hours for 10 days, while rats in the diabetic-myrtle group were given a single dose of 250 mg myrtle ethanolic extract via gavage for 10 days. On treatment days 0, 2, 6, and 10, rats were kept in individual metabolic cages, and 24 h urine samples were collected for measurement of urine protein and creatinine. On the same days blood samples were collected from the tail vein for measurement of FBG, BUN, and creatinine. At the end of the treatment, rats were sacrificed and kidneys were removed for xanthine oxidase/dehydrogenase, glutathione peroxidase measurements and histochemical analysis. It was determined that administration of myricetin improved renal function in rats at the end of the experimental period. Administration of myrtle extract and myricetin decreased xanthine oxidase/dehydrogenase and increased glutathione peroxidase activities when compared to the diabetic group.

In conclusion, it was observed that treatment with myrtle and myricetin, a flavonoid widely found in nature, improved renal function by means of reducing hyperglycemia and oxidative stress. These treatments appear to be effective against oxidative stress which may play an important role in the pathogenesis of diabetes and its implications. Obtained scientific data may be of advantage in the development of new effective and naturel treatment methods.

Key words: Diabetes, diabetic nephropathy, myricetin, *Myrtus communis*, kidney, oxidative stress.

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın planlanması ve yapılmasında yardımlarını esirgemeyen proje yürütücüsü ve akademik danışmanım Sayın Prof. Dr. Yakup ALICIGÜZEL başta olmak üzere tüm bölüm hocalarıma;

Bitki deneylerinin yapılması aşamasında bilgileri ve desteklerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. H. İbrahim UZUN ve Araş. Gör. Arzu BAYIR başta olmak üzere, Ziraat Fakültesi'nde yardımcı olan tüm hocalarıma ve asistan arkadaşlarıma;

Histolojik analizlerin her aşamasında bilgi ve desteklerini esirgemeyen Sayın Doç Dr. Emin Türkay KORGUN ve Araş. Gör. Aslı ÖZMEN'e;

Araştırmaların her aşamasında bilgi ve desteğini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Mutay ASLAN'a;

Hayvan deneylerinin her aşamasında yardımcı olan Deneş Hayvanları Ünitesi çalışanlarına;

Çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen tüm Merkez Laboratuvarı çalışanlarına;

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm asistan arkadaşlarıma;

Teş çalışmam da dahil olmak üzere hayatımın her aşamasında desteklerini esirgemeyen sevgili aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Filiz ÖZCAN

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
TABLolar DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1. Diabetes Mellitus	3
2.1.1. Tanımı ve Sınıflandırılması	3
2.1.1.1. Tip 1 Diyabet	5
2.1.1.2. Tip 2 Diyabet	5
2.1.1.3. Diğer Spesifik Tipler	6
2.1.1.4. Gestasyonel Diyabet	6
2.1.2. Diabetes Mellitus Tanısı	6
2.1.3. Diabetes Mellitus Komplikasyonları	7
2.2. Diyabetik Nefropati	8
2.2.1. Diyabetik Nefropatide Tanı ve Doğal Seyir	8
2.2.2. Diyabetik Nefropati Patogenezindeki Mekanizmalar	10
2.2.2.1. Poliol Yolağı	11
2.2.2.2. Heksozamin Yolağı	11
2.2.2.3. Protein Kinaz C'nin Aktivasyonu	12
2.2.2.4. Pentoz Fosfat Şantı	12
2.2.2.5. Glukozun Non-Enzimatik Glikasyonu ve AGE Oluşumu	13
2.2.3. Diyabetik Nefropati Tedavisi	13
2.3. Flavonoidler ve Myricetin	15
2.3.1. Flavonoidlerin Yapısı ve Sınıflandırılması	15
2.3.2. Flavonoidlerin Yan Grupları ve Antioksidan Aktivitesi	18
2.3.4. Flavonoidlerin Diyetle Alınımı ve Absorpsiyonu	20
2.3.5. Myricetin, Antioksidan Etkisi, Diyabet ile İlişkisi	22

2.4.	Mersin	23
2.4.1.	Genel Özellikleri ve Diyabete Etkisi	23
2.5.	Diabetes Mellitus ve Serbest Radikaller	25
2.5.1.	Serbest Radikaller	26
2.5.1.1.	Süperoksit Radikali ($O_2^{\bullet-}$)	27
2.5.1.2.	Hidrojen peroksit (H_2O_2)	28
2.5.1.3.	Hidroksil Radikali ($\bullet OH$)	28
2.5.1.4.	Singlet Oksijen	29
2.5.1.5.	Nitrik Oksit ($NO\bullet$)	29
2.5.2.	Serbest Radikal Kaynakları	29
2.5.3.	Serbest Radikallerin Etkileri	30
2.5.4.	Antioksidan Savunma Sistemleri	32
2.5.5.	Antioksidan Enzimler	33
2.5.5.1.	Süperoksit Dismutaz (SOD)	33
2.5.5.2.	Glutasyon Peroksidaz (GPx)	33
2.5.5.3.	Katalaz	34
2.5.5.4.	Glutasyon S Transferaz	35
2.5.6.	Ksantin Oksidoredüktaz	35
MATERYAL ve METOD		39
3.1.	Deney Hayvanları	39
3.1.1.	Grupların Oluşturulması	39
3.1.2.	Diyabet Oluşturulması	39
3.1.3.	Kan Şekeri Ölçümü	40
3.1.4.	Myricetin ve Mersin Ekstraktının Hazırlanışı ve Uygulaması	40
3.1.5.	İdrar ve Kan Numunelerinin Toplanması ve Sıçanların Kesimi	40
3.1.6.	Kreatinin Tayini	40
3.1.7.	İdrarda Protein Tayini	41
3.1.8.	Kan Üre Azotu (BUN) Tayini	42
3.1.9.	Ksantin Oksidaz ve Dehidrogenaz Tayini	43
3.1.10.	Glutasyon Peroksidaz (GPx) Tayini	44
3.1.11.	Protein Tayini	45
3.1.12.	Histokimyasal İnceleme	45
3.2.	Bitki Deneyleri	46
3.2.1.	Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu	46
3.2.2.	Ham Ekstraktların Kimyasal Analizleri	46
3.2.2.1.	Toplam Fenolik Madde Analizi	46
3.2.2.2.	Myricetin HPLC ile Analizi	47
3.2.2.3.	Toplam Flavonoid Miktarının Tayini	48
3.2.2.4.	Toplam Antioksidan Kapasitenin Ölçülmesi	48
3.3.	İstatistiksel Analiz	49
3.4.	Gereçler ve Kimyasal Maddeler	49
3.4.1.	Gereçler	49
3.4.2.	Kimyasal Malzemeler	49
BULGULAR		50

4.1.	Hayvan Deneyleri	50
4.1.1.	Genel Görünüm	50
4.1.2.	Vücut Ağırlıkları	50
4.1.3.	İdrar Hacmi Bulguları	51
4.1.4.	Böbrek Ağırlığı / Vücut Ağırlığı Bulguları	52
4.1.5.	Açlık Kan Şekeri Bulguları	53
4.1.6.	İdrar Proteini Bulguları	55
4.1.7.	Kan Üre Azotu (BUN) Bulguları	56
4.1.8.	Kreatinin Klirensi Bulguları	57
4.1.9.	Glutatyon Peroksidaz (GPx)	58
4.1.10.	Ksantin Oksidaz ve Dehidrogenaz (XO ve XDH)	60
4.1.11.	Histokimyasal İnceleme Sonuçları	62
4.2.	Bitki Deneyleri	63
4.2.1.	Ham Ekstraktların Kimyasal Analiz Sonuçları	63
TARTIŞMA		67
SONUÇLAR		75
ÖZGEÇMİŞ		76
KAYNAKLAR		77

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACE	: Anjiyotensin dönüştürücü enzim
ADA	: Amerikan Diyabet Derneği
AGE	: İleri glikasyon son ürünü
AO	: Aldehit oksidaz
ATP	: Adenozin trifosfat
BUN	: Kan üre nitrojeni
CAT	: Katalaz
DAG	: Diaçil gliserol
DCCT	: The Diabetes Control and Complication Trail
DM	: Diabetes mellitus
DN	: Diyabetik nefropati
FAD	: Flavin adenin dinükleotid
G6P	: Glukoz 6 fosfat
G6PD	: Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz
GFAT	: Glutamin fruktoz-6-fosfat amino transferaz
GFR	: Glomerular filtrasyon hızı
GLUT	: Glukoz taşıyıcısı
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GSH	: Redükte glutasyon
GSSH	: Okside glutasyon
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HbA_{1c}	: Hemoglobin A _{1c}
HPLC	: yüksek performanslı likid kromatografisi
IFG	: Bozulmuş açlık glukozu
IGT	: Bozulmuş glukoz toleransı
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
MAPK	: Mitojen-aktive protein kinazlar
MDA	: malodialdehit
MODY	: Maturty onset diabetes of the young
NAD	: Okside nikotinamid adenin dinükteotid
NADH	: Redükte nikotinamid adenin dinükleotid
NADP	: Okside nikaotinamid adenin dinükleotid fosfat
NADPH	: Redükte nikaotinamid adenin dinükleotid fosfat
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
O•	: Süperoksid
OGTT	: Oral glukoz tolerans testi
OH⁻	: Hidroksil
PKC	: Protein kinaz C
RNS	: Reaktif nitrojen türleri
RO•	: Lipid alkoksil

ROS	: Reaktif oksijen türleri
RS•	: Tiyol radikalleri
RSO•	: Sülfenil peroksil
RSO₂	: Tiyol peroksil
SDBY	: Son dönem böbrek yetmezliği
SOD	: Süperoksid dismutaz
TGF	: Değiştirici büyüme faktörü
UKPDS	: United Kingdom Prospective Diabetes Study
WHO	: World Health Organization
XDH	: Ksantin dehidrogenaz
XO	: Ksantin oksidaz
XOR	: Ksantin oksidoredüktaz

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1	Diabetes mellitusun sınıflandırılması	4
Tablo 2.2	Diyabet ve bozulmuş glukoz homeostazisi	7
Tablo 3.1	HPLC elüsyon programı	47
Tablo 4.1	Tedavi sonunda deney gruplarına ait vücut ağırlığı değerleri	51
Tablo 4.2	Tedavi sonunda deney gruplarına ait idrar hacmi bulguları	52
Tablo 4.3	Tedavi sonunda böbrek ağırlığı /vücut ağırlığı bulguları	53
Tablo 4.4	Deney gruplarında açlık kan şekerinin tedavi öncesi ve sonrası değişimi	54
Tablo 4.5	İdrar proteini tedavi öncesi ve sonrası günlere göre değişimi	55
Tablo 4.6	Deney gruplarında günlere göre BUN değerleri	57
Tablo 4.7	Deney gruplarında günlere göre kreatinin klirensi değişimi	58
Tablo 4.8	Glutatyon peroksidaz bulguları	59
Tablo 4.9	Ksantin oksidaz ve dehidrogenaz bulguları	60
Tablo 4.10	Ham ekstrakttaki (HE) Myricetin, toplam fenolik madde (TFM), toplam flavonoid (TF) ve IC ₅₀ değerleri (mg/g ham ekstrakt)	64

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Diyabetik nefropati gelişimine katkı sağladığı düşünülen hücre içi biyokimyasal yollardaki hiperglisemi indüklü değişimler	10
Şekil 2.2	Flavonoidlerin çekirdek yapıları	16
Şekil 2.3	Diyetle alınan flavonoidlerin sınıflandırılması, yapısı ve kaynakları	17
Şekil 2.4	Diyetle alınan polifenollerin ve metabolitlerinin insanlardaki rotası	21
Şekil 2.5	Myricetin'in molekül yapısı	22
Şekil 2.6	Mersin (<i>Myrtus communis</i> L.) bitkisi	24
Şekil 2.7	Serbest radikallerin oluşum ve ortadan kaldırılmasında temel mekanizmalar	33
Şekil 2.8	Ksantin oksidoredüktazın katalizlediği reaksiyonlar	36
Şekil 2.9	Ksantin oksidaz ve ksantin dehidrogenaz formları arasındaki fark	36
Şekil 2.10	Ksantin oksidoredüktaz sekonder ve tersiyer yapısı	37
Şekil 3.1	İdrar Proteini Standart Grafiği	42
Şekil 3.2	Doku homojenatları için protein standart grafiği	45
Şekil 3.3	Toplam fenolik madde standart grafiği	47
Şekil 3.4	Toplam flavonoid standart grafiği	48
Şekil 4.1	Hayvanlardaki genel görünüm	50
Şekil 4.2	Tedavi sonunda deney gruplarına ait vücut ağırlığı değerleri	51
Şekil 4.3	Tedavi sonunda deney gruplarına ait günlük idrar hacmi bulguları	52
Şekil 4.4	Tedavi sonunda böbrek ağırlığı /vücut ağırlığı bulguları	53
Şekil 4.5	Deney gruplarında açlık kan şekerinin tedavi öncesi ve sonrası değişimi	54
Şekil 4.6	Deney gruplarında idrar proteininin günlere göre değişimi	56
Şekil 4.7	Deney gruplarında tedavi günlerine göre BUN değişimi	57
Şekil 4.8	Deney gruplarında günlere göre kreatinin klirensi değişimi	58
Şekil 4.9	Glutatyon peroksidaz bulguları	59
Şekil 4.10	Ksantin oksidaz bulguları	61
Şekil 4.11	Ksantin dehidrogenaz bulguları	61

Şekil 4.12	Histokimyasal preparat fotoğrafları	62
Şekil 4.13	Mersin bitkisi ekstraktının HPLC ile incelenmesi sonucunda elde edilen kromatogram	65
Şekil 4.14	Mersin bitkisi ekstraktının hidroliz işlemi sonucu HPLC ile incelenmesi ile elde edilen kromatogram	66

GİRİŞ

Diabetes mellitus (DM), pankreasın insülin salgısının mutlak veya kısmi yetersizliği veya insülin etkisinin yetmezliği (insülin rezistansı) ile oluşan karbonhidrat, lipid, ve protein metabolizmalarındaki bozukluklar ile karakterize edilen endokrin ve metabolik bir hastalıktır [1-3]. Diabetes mellitusun komplikasyonları mikrovasküler ve makrovasküler olmak üzere ikiye ayrılır. Mikrovasküler komplikasyonları retinopati, nefropati ve nöropati; makrovasküler komplikasyonları kronik kalp yetmezliği, periferik damar hastalığı ve serebrovasküler hastalıklardır. Diyabetik nefropati (DN) son dönem böbrek yetmezliğinin (SDBY) ana sebeplerinden biri olan önemli bir mikrovasküler komplikasyondur [4, 5].

Oksidatif stres serbest oksijen radikallerinin fazla üretimi ya da antioksidan sistem etkilerinin azaltılmasından kaynaklanmaktadır [1]. Bir çok in vitro ve in vivo çalışma göstermiştir ki, oksidatif stres DN'nin gelişiminde en önemli patofizyolojik mekanizmalardan biridir. Diabetes mellitusta serbest radikaller önemli rol oynar [6]. Sadece diyabetik komplikasyonların gelişiminde değil, diyabetin ortaya çıkışında da serbest radikallerin rolü hakkında çeşitli hayvan deneylerinden elde edilen bulgular mevcuttur [1].

Diyabetdeki reaktif oksijen türlerinin (ROS) kaynakları; glukozun oksidasyonu, ileri glikasyon son ürünlerinin (AGE) oluşumu, poliol-inozitol yoluna giren substrat miktarının artışı, eikazonoid metabolizmasının artışı kapsar [7, 8]. Ayrıca NADH/NADPH oksidaz, ksantin oksidoredüktaz, endotelial nitrik oksit sentaz enzimleri gibi vasküler duvarda bulunan bazı enzimler ROS'un üretimine katkıda bulunur [9-11].

Fenolik bileşikler ve onların bazı türleri otooksidasyonun önlenmesinde çok etkilidirler. Reaktif oksijen türleri ve antioksidan savunma sistemleri arasındaki denge bozulduğu takdirde, biyolojik olarak ilgili makromoleküllerde kimyasal değişiklikler meydana gelebilir. Bu dengesizlikler sonucunda, pek çok hastalığın başlangıç ve gelişimi için uygun patobiyokimyasal değişimler ortaya çıkabilmektedir [9]. Flavonoidler ve diğer bitki fenoliklerinin süperoksid, alkoksil, peroksil ve nitrik oksit (NO) gibi radikalleri temizleme, demir ve bakır şelasyonu, μ -tokoferol rejenerasyonu foksionlarına ek olarak; vazodilatatör, immünostimulan, antialerjik, östrojenik, antiviral etkileri de söz konusudur [12]. Fosfolipaz-A₂, siklooksijenaz, lipooksijenaz enzimlerinin inhibisyonu ile antiinflamatuvar özellik gösterirler. Ayrıca, ksantin oksidaz (XO), glutatyon redüktaz (GR), NADH-oksidad ve protein kinaz enzimlerini inhibe ettiklerini gösteren veriler mevcuttur [13]. Tüm flavonoidler, 3'-4'dihidroksi konfigürasyonu ile antioksidan aktiviteye sahiptir. Bu konfigürasyon antioksidan aktivitenin güçlenmesine sebep olur. B halkasındaki hidroksilasyon, antioksidan aktiviteye katkıda bulunur. Diğer önemli özellikler, 4. pozisyonda bir

karbonil grubu ve 3' ve/veya 5' pozisyonunda OH gruplarıdır. Birçok çalışma, flavonoidler ile yapılan tedavilerin, diyabet ve diyabetik böbreklerdeki fonksiyon bozukluklarına karşı olumlu sonuçlar verdiğini göstermiştir [14].

Mersin, Akdeniz bölgesinin doğal bitki örtüsünde bulunan, yapraklarını dökmeyen ağaçcık ya da çoğunlukla kısa çalı formunda bulunan bir bitkidir. Mersin bitkisinin yaprakları, meyveleri ve esansiyel yağı halk arasında yaygın bir şekilde tedavi amaçlı kullanılır. Bitkinin yapraklarından elde edilen esansiyel yağ diyabetli hastalarda kan glukoz seviyesini düşürmek amacıyla kullanılmıştır [15]. Streptozotozin ile oluşturulan diyabetik fare modellerine mersin yapraklarının etanol-su ekstraktının verilmesi hipoglisemik etkiye sebep olmuştur [16]. Benzer şekilde, mersin yağının diyabetik tavşanlara uygulanması sonucunda kan şeker düzeylerinde azalma görülmüştür [2, 17].

Mersin yapraklarının su ile elde edilmiş ekstraktı in vitro olarak potansiyel α -glukozidaz inhibitörü etkisi gösterir [18]. Alfa-glukozidazlar, kompleks karbonhidratların bağırsakta parçalanmasını sağlarlar. Bu enzimler inhibe edildiği takdirde bağırsakta karbonhidratlar parçalanmadığı için emilimleri gerçekleşemez ve kan şekeri düzeyine ilave katkı sağlayamazlar [18]. Mersin meyvelerindeki ve ekstraktlarındaki temel polifenollerin flavonoidler ve antosiyaninler olduğu belirtilmiştir. Flavonoidler arasında ağırlıklı olarak myricetin ve kuersetin daha fazla bulunur. Bu flavonoidlerin antioksidan aktivitesi yüksek ve stabil bulunmuştur. Antioksidan aktivitenin yüksek olmasıyla fenolik madde miktarının fazla olması arasında bağlantı olduğu bildirilmiştir [19].

Yapılan çalışmalar mersin bitkisi ve myricetin antioksidan [2] ve hipoglisemik etkilerini göstermiştir [2, 16, 17]. Mersin bitkisinin karbonhidrat metabolizmasında görevli bazı enzimler üzerine etkili olabileceğini gösteren veriler de rapor edilmiştir [65]. Literatürde var olan bu çalışmalardan yola çıkılarak araştırma projemizde bir flavonoid olan myricetin ve mersin bitkisi ekstraktının DN'de oluşan bulgulara etkileri incelenmiştir. Bu amaçla materyal bölümünde belirtildiği şekilde oluşturulan deney gruplarından serum, idrar ve böbrek homojenatları elde edilmiş ve açlık kan şekeri (AKŞ), serum ve idrar kreatinini, kreatinin klirensi, idrar proteini, kan üre azotu (BUN), böbrek ağırlığı/vücut ağırlığı belirlenmiştir. Böbrek dokuları hematoksil-eozin ile boyanarak histopatolojik inceleme yapılmıştır. Böbrek homojenatlarında glutatyon peroksidaz (GPx), ksantin oksidaz ve ksantin dehidrogenaz enzim aktivitelerine bakılmıştır.

GENEL BİLGİLER

2.1.Diabetes Mellitus

2.1.1. Tanımı ve Sınıflandırılması

Diabetes mellitus insülin sekresyonu, insülinin etkisi veya her ikisindeki bozukluklardan kaynaklanan hiperglisemi ile karakterize, metabolik bir hastalıktır. Diyabetdeki uzun dönem kronik hiperglisemi özellikle gözler, böbrekler, sinirler, kalp ve kan damarları gibi bazı organlarda uzun dönemde hasar, fonksiyon bozukluğu ve yetmezliğe neden olur [20, 21].

Diyabet gelişimi bazı patolojik olayları içerir. Diyabetdeki metabolik değişiklikler, kronik hiperglisemiye eşlik eden karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasındaki anormallikler ve insülinin hedef dokulardaki eksik etkisidir [22, 23]. İnsülin etkisindeki eksiklik, yetersiz insülin sekresyonu veya insüline azalmış doku cevabı sonucunda gelişir. Aynı hastada insülin sekresyonundaki bozukluk ve insülin etkisindeki eksiklik sıklıkla bir arada bulunur ve çoğu zaman hangi anormalliğin hipergliseminin primer nedeni olduğu açık değildir [21].

Diabetes mellitusun uzun dönemdeki etkileri çeşitli organlarda hasar, fonksiyon bozukluğu ve yetmezlik ile sonuçlanır. Diabetes mellitus, susama, poliüri, görme kaybı ve kilo kaybı gibi karakteristik semptomlar gösterir. İleri formlarında ise ketoasidozis, non-ketotik hiperozmolar durum gelişebilir ve halsizliğe, komaya ve tedavi edilmediği durumlarda ölüme yol açabilir. Tanı konulmadan önce, uzun süreli hiperglisemiye maruz kalındığı takdirde ise, yükselen kan glukoz düzeyleri çeşitli patolojik ve fonksiyonel değişikliklere sebep olmaktadır [24]. Hipergliseminin klasik belirti ve semptomları şunlardır [20]:

- Poliüri
- Polidipsi
- Polifaji
- Kilo kaybı
- Halsizlik
- Görme bozukluğu
- Ağız kuruluğu
- Bazı enfeksiyonlara yatkınlık
- Ketoasidoz

Son 10 yıldır diyabet tiplerinin etiyolojisinin anlaşılmasında ve tanımlanmasında önemli bir ilerleme elde edilmiştir. Diyabetin şu anki sınıflandırması, 1999'da World Health Organization (WHO) tarafından yayımlanan,

özel formların etiyojisine dayanmaktadır [25]. Bu sınıflandırma Tablo 2.1'de gösterilmiştir [21, 24].

Tablo 2.1 Diabetes mellitusun sınıflandırılması

1. Tip 1 diyabet Otoimmün İdiyopatik
2. Tip 2 diyabet
3. Diğer spesifik tipler 3.1. β-hücre fonksiyonunda genetik defektler MODY3 (Kromozom 12, HNF-1a) MODY2 (Kromozom 7, glukokinaz) MODY1 (Kromozom 20, HNF-4a) Mitokondriyal DNA Diğer tipler 3.2. İnsülin etkisinde genetik defektler Tip A insülin rezistansı Lepreçunizm Rabson-Mendenhall sendromu Lipoatrofik diyabet Diğerleri 3.3. Ekzokrin pankreas hastalıkları Pankreatit Travma/pankreatektomi Neoplazi Kistik fibrozis Hemokromatozis Fibrokalküloz pankreatopati Diğerleri 3.4. Endokrinopatiler Akromegali Cushing sendromu Glukagonoma Feokromositoma Hipertiroidizm Somatostatinom Aldosteronoma Diğerleri 3.5. İlaç ya da kimyasal maddeler Vakor Pentamidin Nikotik asid Glukokortikoidler Tiroid hormonu Diazoksid β -adrenerjik antagonistler Tiazidler

Dilantin
 α -interferon
Diğerleri

3.6. İnfeksiyonlar

Konjenital rubella
Sitomegalovirüs
Diğerleri

3.7. İmmün kökenli nadir görülen diyabet formları

“Stiff-man” sendromu
Anti insülin reseptör antikorları
Diğerleri

3.8. Diyabetle birlikte olan diğer genetik sendromlar

Down sendromu
Klinefelter sendromu
Turner sendromu
Wolfram sendromu
Friedreich ataksisi
Hantington koresi
Laurence-Moon-Biedl sendromu
Miyotonik distrofi
Porfiri
Prader-Willi sendromu
Diğerleri

4. Gestasyonel Diyabetes Mellitus

2.1.1.1. Tip 1 Diyabet

Hastalığın en sık görülen formlarından biridir. İnsülin noksanlığı ile karakterizedir. Ketoasidoz ve dehidratasyondan kaynaklanan akut semptomların çok sıklıkla eşlik ettiği bir kliniği vardır. Tip 1 diyabet kesinlikle insülin tedavisi gerektirir. Tip 1 diyabet genellikle genç kişilerde; 10-30 yaş aralığında görülür [21, 24].

Otoimmün diyabet ve idiyopatik diyabet olmak üzere iki alt gruba ayrılmıştır. Otoimmün diyabet denilen form için, önceden insülin bağımlı diyabet, tip 1 diyabet, juvenil başlangıçlı diyabet terimleri kullanılmaktaydı. Bu form, pankreas β -hücrelerinin hücresel kaynaklı otoimmün yıkımı sonucunda oluşur. Tip 1 diyabetin diğer alt grubu olan idiyopatik diyabetli hastaların bazılarının kalıcı insülopenisi vardır, fakat otoimmüniteye ait kanıt yoktur. Bu hastaların ketozis ve ketoasidozise yatkınlıkları vardır. Tip 1 diyabetik hastaların ancak çok az bir kısmı bu kategoriye girer. Bu form genellikle kalıtsaldır [22, 23].

2.1.1.2. Tip 2 Diyabet

Hastalığın en yaygın tipi, tip 2 DM'dir. Eskiden insülin bağımsız DM şeklinde isimlendirilirdi. Tip 2 diyabetli hastalarda insülin rezistansı veya insülin aktivitesinde noksanlık mevcuttur. Bu hastalarda insülin tedavisine ihtiyaç duyulmaz. Genellikle yetişkinlikte ortaya çıkar. Genetik ve çevresel faktörlerin birbirleri ile etkileşimleri sonucu gelişir [26]. Bu tip diyabetli hastalar genellikle obesdirler ve

obesite insülin rezistansının gelişimini arttırır. Obes olmayan hastalar ise özellikle abdominal bölgelerde, artmış vücut yağ oranına sahiptirler. Bu diyabet tipinde ketoasidoz çok nadir görülür ve genellikle enfeksiyon gibi başka bir hastalığa bağlı stres nedeniyle oluşur. Bu tip diyabet, hipergliseminin kademeli olarak artış göstermesi ve başlangıçta klasik semptomların şiddetli olmaması nedeniyle uzun yıllar tanı almayabilir. Ancak bu hastalar makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonların gelişmesi açısından artmış risk taşırlar [24].

2.1.1.3. Diğer Spesifik Tipler

WHO'nun sınıflandırması, yukarıdaki iki diyabet formunun dışında, hastalığın birçok farklı formunu içermektedir. İlaçlar ya da hormonal bozukluklar tarafından ortaya çıkan sekonder diyabetin çoğu formu tip 2 diyabete, nadiren de tip 1 diyabete benzer. Sekonder diyabetin ayırıcı tanısı hastalığa yol açan faktörlerin belirlenmesi temeline dayanmaktadır. Nadir olarak görülen, insülin sekresyonundaki genetik defektler ya da genetik hormon defektleri gibi diyabetin monogenik formları klinikte çok önemlidir. Genetik β hücresi defektlerinin en sık görülen formu MODY (maturity onset diabetes of the young) olarak kısaltılan bir grup bozukluktur. Diğerleri tablo 2.1'de gösterilmiştir [26].

2.1.1.4. Gestasyonel Diyabet

Gestasyonel DM, gebelik döneminde başlamış olan veya ilk olarak gebelik döneminde tespit edilen glukoz intoleransıdır. Glukoz intoleransının gebelikten önceki bir zamanda başlamış olabileceği ihtimali daha önceden tanımlanmadıysa göz önünde bulundurulmaz. Ailesinde diyabet tanısı konmuş 25 yaşın üstündeki kadınlar, daha önceden gestasyonel diyabet geçirmiş kadınlar, obesler ve Afrika kökenli Amerikalılar, Hispanikler ve Hindistan kökenli Amerikalılar gibi etnik gruplarda görülmesi olasılığı yüksektir. Eğer başlangıçta negatifse, 24–28. haftalar arasında yeniden test yapılmalıdır. Vakaların büyük bir çoğunluğunda glukoz regülasyonu doğumdan sonra normale döner. Ancak gestasyonel diabetes mellitus hikayesi olanlarda tip 2 diyabet riski yüksektir [20, 24].

Gestasyonel DM'un klinik olarak tanınması çok önemlidir, çünkü diyet ve gerektiğinde insülin tedavisi, iyi bilinen gestasyonel DM bağımlı perinatal mortalite ve morbiditeyi azaltmaktadır. Gestasyonel DM'lu kadınlarda hipertansif bozuklukların görülme sıklığı artmıştır. Ayrıca fetal kongenital anormallikler, ölü doğum, makrozomi, hipoglisemi, sarılık, polisitemi ve hipokalsemi riski artmıştır [20].

2.1.2. Diabetes Mellitus Tanısı

Amerikan Diyabet Derneği (ADA) tarafından, diyabet riski olan tüm bireylerde ve 45 yaşın üstündeki tüm bireylerde diyabet taramasının yapılması önerilmektedir [27].

Açlık glukozunun ≥ 126 mg/dl, oral glukoz tolerans testi sonrası 2. saatte ya da rastgele herhangi bir zamanda alınmış plazmada ölçülen glukoz miktarının ≥ 200 mg/dl olması diyabet kriteri olarak değerlendirilir. Açlık glukozu hastalığı taramak için kolay ucuz ve tekrarlanabilir bir methodur. Oral glukoz tolerans testi (OGTT), bozulmuş açlık glukozu (IFG) ya da normal açlık glukozuna sahip yüksek risk

taşıyan kişilere yapılır. Plazma glukozu başlangıçta ve 75 g glukoz yüklendikten 2 saat sonra ölçülür. Bozulmuş açlık glukozu ve bozulmuş glukoz toleransı (IGT) glukoz homeostazisinde bir anormallik olduğuna işaret eder fakat bu bireylerin kesin diyabet olduklarının kanıtı değildir. Diyabet tanısı, farklı günlerde ölçülen iki anormal glukoz değerine dayanmaktadır. Diyabet kriterlerine göre AKŞ'de 100-125 mg/dl arasındaki değerler IFG olarak; 2. saat tokluk kan şekerinde 140-199 mg/dl arasındaki değerler ise IGT olarak tanımlanmaktadır. Açlık kan glukozunda 100 mg/dl altı, 2. saat tokluk plazma glukozunda 140 mg/dl altı değerler normal kabul edilmektedir. Özellikle tip 1 diyabetde; hastalarda poliüri, polidipsi, kilo kaybı ve plazma glukozunun 200 mg/dl'den fazla olması durumunda bu kişilere diyabet tanısı konur ve insülin tedavisi gerekmektedir [28].

Diyabetde hemoglobin A1C (HbA1C) ölçümü kullanılarak tanı konulmaz. Ancak, HbA1C diyabet tanısı konmuş hastalarda glisemik kontrol takibinin yapılmasında uygundur. Bu ölçüm glikozile olmuş hemoglobin miktarını ve normal bir eritrositin yaşam süresi olan önceki 3 aydaki ortalama kan glukoz miktarını gösterir. HbA1C değeri 6 ise ortalama kan glukoz seviyesi 135 mg/dl, 7 ise 170 mg/dl, 8 ise 205 mg/dl'dir. Diyabet tanı kriterleri tablo 2.2'de özetlenmiştir [27, 28]:

Tablo 2.2 Diyabet ve bozulmuş glukoz homeostazisi

Açlık glukozu	Glukoz (mg/dl)
Normal	< 100
Pre-diyabet: bozulmuş açlık glukozu	100-125
Diyabet	≥ 126
2. saat glukozu (OGTT) ya da rastgele ölçüm	Glukoz (mg/dl)
Normal	< 140
Pre-diyabet: bozulmuş glukoz toleransı	140-199
Diyabet	≥ 200

2.1.3. Diabetes Mellitus Komplikasyonları

Diabetes mellitusun uzun süreli etkileri sonucunda gelişen bazı spesifik komplikasyonları mevcuttur. Bu komplikasyonlar akut ve kronik komplikasyonlar olarak iki gruba ayrılmaktadır. Kronik komplikasyonlar ise mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar olarak gruplandırılmıştır [28].

Diyabet komplikasyonları aşağıda kısaca sınıflandırılmıştır:

A. Diyabetin akut komplikasyonları

- Hiperozmolar hiperglisemi
- Diyabetik ketoasidoz
- Akut infeksiyonlar

B. Diyabetin kronik komplikasyonları

1. Mikrovasküler komplikasyonlar

- Retinopati
- Görme bozukluğu
- Körlük
- Nöropati

- Periferik: Duyusal (ağrı, hissizlik, parestezi) ve motor nöropati
- Otonomik: Gastroparezi, postural hipotansiyon
- Nefropati
 - Proteinüri, kronik böbrek hastalıkları, diyaliz
- 2. Makrovasküler komplikasyonlar
 - Koroner arter hastalıkları
 - Miyokardiyal infarktüs
 - Periferik vasküler hastalıklar
 - Klodikasyon, ülser
 - Serebrovasküler hastalıklar
 - Felç

2.2. Diyabetik Nefropati

Diyabetik nefropati, DM'un başlıca mikrovasküler komplikasyonlarından biridir. Hem tip 1, hem tip 2 diyabet için önemlidir. Her ikisinde de diyabetle ilişkili renal lezyonlar benzerdir ve sonuç olarak kronik böbrek yetmezliğine sebep olur [29, 30]. Diyabetli insanların yaklaşık % 20-30'unda nefropati bulguları gelişmektedir; ancak tip 2 diyabetli hastalarda göreceli olarak daha az oranda son dönem böbrek yetmezliği gelişmektedir [31]. Diyabetle ilgili ölümlerin yaklaşık % 10'u böbrekten kaynaklanır. Tip 1 diyabetde böbrek kaynaklı ölüm % 50 oranındayken, tip 2 diyabette % 5 (Avrupa'da % 10-30) olarak bildirilmiştir [29]. Tip 1 diyabetik hastaların yaklaşık % 40'ında DN gelişmektedir. Çünkü DN'nin insidansının oldukça fazla etnik çeşitliliği vardır ve tip 1 diyabetlilerin sadece 1/3'ünde genetik yatkınlığın oldukça etkili olduğu DN gelişmektedir. Göreceli olarak daha az tip 2 diyabetli hastada SDBY oluşumunu sağlayan nefropati gelişmesine rağmen, tip 2 diyabetli hasta sayısının hızlı bir şekilde artmasından dolayı, hastaların bu grubu daha önemli olmaktadır [32].

2.2.1. Diyabetik Nefropatide Tanı ve Doğal Seyir

Diyabetik nefropatinin gelişmesi yıllar alır. Tip 1 DM'li hastalarda 3 yıldan önce gelişimi nadirdir ve genellikle 5- 15 yıldan sonra gelişir. Herhangi bir girişim yapılmazsa tip 1 diyabetli hastaların % 80'ninde mikroalbuminüri, her yıl % 10-20 oranında artarak devam eder. Tip 2 diyabetli hastaların tanı konulmasından ortalama sekiz yıl önce diyabetik olduğu düşünülmektedir. Tanı alındıktan kısa bir süre sonra ise birçoğunda mikroalbuminüri ve aşikar nefropati tespit edilir [33, 34].

Diyabetik nefropati, 5 yıldan fazla süreden beri var olan diyabet ve retinopati ile birlikte sürekli olarak devam eden "klinik albuminürinin" (üriner albumin atılımı >300 mg/gün) ortaya çıkması ile tanımlanır. Bu kişilerde üriner bölge enfeksiyonları, diğer renal hastalıklar ve kalp yetmezliği de olabilir. Bu süreç genellikle kan basıncının artışı ile ilgilidir. Diyabetik nefropati klasik olarak proteinüri miktarının 0,5 g/gün değerinden büyük olması ile belirlenir. Bu durum aşikar nefropati, klinik nefropati, proteinüri ya da makroalbuminüri olarak isimlendirilir.

Diyabetik nefropatideki yapısal anormallikler glomerular ve mezangiyal genişleme, tübular bazal membran kalınlaşması, tübular atrofi, interstisyel genişleme, afferent ve efferent arteriyollerde hiyalinozisi kapsar [35]. Mezangiyal genişleme, normoalbuminüriden mikroalbuminüriye ve mikroalbuminüriden aşikar nefropatiye

geçiş sürecinde önemli bir rol oynar. Mezangiyal genişleme, DN'de glomerular filtrasyon hızında (GFR) kayba sebep olan bir lezyondur. Mezangiyum genişlediği için glomerular kapiller lümen daralır ve filtrasyon alanı azalır. Bunun aksine glomerular bazal membran kalınlaşması GFR ile ilişkili değil, albumin atılım hızı yani albuminüri patogenezi ile ilişkili bir lezyondur [36].

Tip 1 ve tip 2 DM'la ilgili renal lezyonlar benzerdir. Glomerular podositler, mezangiyal ve endotelial hücreler, tübular epitelyum, interstisyel fibroblastlar ve vasküler endotel gibi birçok hücre bu olaya karışır. Diyabetik nefropatideki patofizyolojik değişikliklere, hiperfiltrasyon ve mikroalbuminüriyi takiben, glomerular ve tübulo-interstisyel alanlardaki hücresel ve hücre dışı düzensizliklerle ilişkili olarak renal fonksiyonların kötüleşmesi de dahildir. Glomerullarda ve tübüllerde birçok hücrede hiperplazi/hipertrofi durumu, glomerular ve tübular bazal membranlarda kalınlaşmaya, tübulo interstisyel ve mezangiyal alanlarda genişlemeye yol açmaktadır. Diğer değişiklikler arteriyollerin hiyalinizasyonu ve aynı zamanda intra-renal arter kollarının kalınlaşması şeklindedir. Bu durum renal hasarın artışına sebep olan glomerular mikrosirkülasyonun otoregülasyonunda bozulmaya sebep olur [30].

Diyabetik nefropati çok aşamalı bir durumdur. Klinik olarak ortaya çıkması birkaç yıl sürer. Diyabetin başlangıcında genellikle glomerular hiperfiltrasyon, yüksek renal kan akımı ve böbrekte hipertrofi gibi renal fonksiyonlarda değişiklikler olur. Bu değişikliklerin çoğu erken dönemde iyi glisemik kontrol ile geriye çevrilebilir, ama çok sayıda insanda devam eder ve klinik nefropatinin daha sonraki gelişiminde önemli olabilir [37]. Diyabetik nefropati gelişim süreci aşağıda açıklanan beş evreden geçer [29, 34, 38]:

Evre 1(Hiperfiltrasyon ve hipertrofi evresi): Diyabet tanısının konduğu anda mevcuttur. Bu başlangıç devresinde renal hiperfiltrasyon ve hipertrofi vardır. Glomerular filtrasyon hızı ve idrar albümin atılımı artmıştır. Glomerular filtrasyon hızı aynı yaştaki kontrollerle karşılaştırıldığında % 20–40 daha fazladır ve üriner albümin atılımı artışı ile karakterizedir. Böbreklerin hipertrofik olduğu ultrasonografi ile de gösterilebilir. Glomerular kapiller basınç artmasıyla ilişkili olarak glomerular hacim ve kapiller yüzey alanı artar. Normogliseminin sağlanması ile birlikte nefropati daha ileri klinik evrelere geçmeden geriler. Bu evre 2 yıl sürer.

Evre 2 (Sessiz evre): Diyabetin ikinci üçüncü yılında başlar. Kan glukozunun vasat seyri ile 10–15 yıla kadar devam edebilir. Klinik belirti olmadan renal lezyonlar oluşur. Ama morfolojik değişiklikler yıllar boyu sessiz bir şekilde gelişir. Glomerular filtrasyon hızı hala yüksektir ve hiperfiltrasyon devam eder. Kan basıncı ve idrar albümin atılımı normaldir. Buna karşın glomerular bazal membranda non-spesifik bir kalınlaşma ve mezangiumda sınırlı bir genişleme mevcuttur. Kapiller filtrasyon yüzey alanı azalır ve glomerüloskleroz başlar.

Evre 3 (Başlangıç halinde nefropati dönemi-mikroalbuminürik evre): Devamlı mikroalbuminüri diyabetin başlangıcından itibaren 6–15 yıl sonra başlar. Üriner albümin atılımı mikroalbuminürik düzeyde, yani 30-300 mg/gün veya 20–200 µg/dk arasındadır. Mikroalbuminüri kan basıncında hafif ama fark edilebilir bir

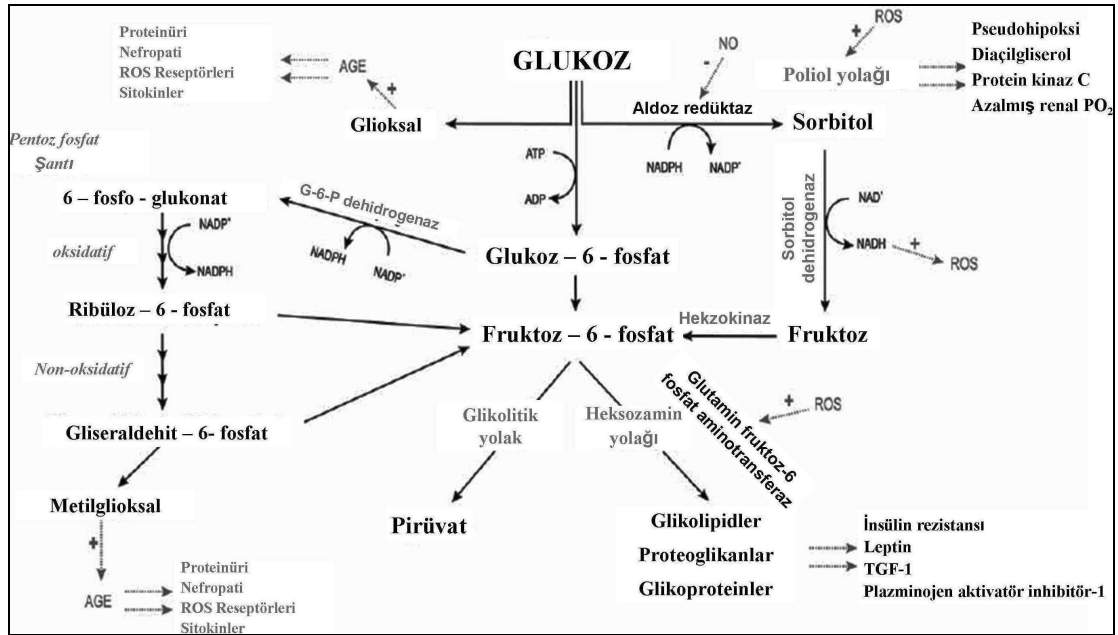
yükselme ile birlikte. Bu evrede, glomerulda bazal membran kalınlığı ve fraksiyonel mezangiyal volüm daha da artar, sonuçta filtrasyon yüzeyinde azalma yaratır. Glomerular filtrasyon hızı bu evrede azalmaya başlar. Aşık nefropatinin habercisidir. Bu evre 10–20 yıl kadar sürebilir.

Evre 4 (Klinik (Aşık) diabetik nefropati dönemi): Klasik olarak kalıcı proteinüri (>300 mg/gün) ile karakterizedir. Beraberinde sıklıkla hipertansiyon da vardır ve eğer hipertansiyon tedavi edilmez ise renal fonksiyon kaybı hızlanır. GFR azalır. GFR'nin düşme hızı, yılda 10 ml/dk'dır. Histolojik değişiklikler belirgindir. Böbrekte morfolojik olarak yaygın glomerüloskleroz vardır.

Evre 5 (Son dönem böbrek yetersizliği-Üremik evre): Üremi gelişmesi ile birlikte, sıvı retansiyonu, ödem gibi diğer komplikasyonlarda görülmeye başlar. GFR düşmeye devam eder. Ağır hipertansiyon, hipoalbuminemi, üre ve kreatinin yüksekliği vardır. Kan basıncını kontrol etmek güçleşir. Renal replasman tedavisi gereklidir.

2.2.2. Diyabetik Nefropati Patogenezindeki Mekanizmalar

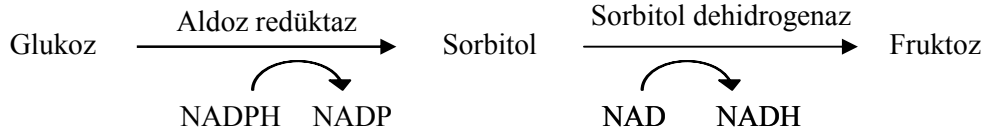
Birçok hüresel yolak glukoz seviyesinin artışı aracılığıyla aktive olur. Diyabetik nefropatinin gelişimiyle ilgili olduğuna inanılan bu yollar Şekil 2.1'de özetlenmiştir. Bu yollardan başlıcaları şunlardır:



Şekil 2.1 Diyabetik nefropati gelişimine katkı sağladığı düşünülen hücre içi biyokimyasal yollardaki hiperglisemi indüklü değişimler (ROS- Reaktif oksijen türleri; AGE-İleri glikasyon ürünleri; NO-Nitrik oksit; ATP-Adenozin trifosfat; ADP-Adenozin difosfat; NADPH-Redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfat; NADP-okside nikotinamid adenin dinükleotid fosfat; NADH-redükte nikotinamid adenin dinükleotid; NAD-okside nikotinamid adenin dinükleotid) [39].

2.2.2.1. Poliöl Yolağı

Hücre içi glukoz konsantrasyonunun artması, in vivo ortamda ayrıcalıklı olarak insülden-bağımsız glukoz alımın olduğu dokularda poliöl yolağına doğru akışı arttırdığı gösterilmiştir. Normal koşullarda, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH)-bağımlı enzim aldoz redüktaz (AR) toksik aldehytleri alkol gruplarından indirgeyerek inaktive eder. Ancak, yüksek glukoz konsantrasyonunun olduğu durumlarda AR, NADPH kullanarak glukozu sorbitole indirger. Sorbitol, sorbitol dehidrogenaz aracılığıyla NAD^+ 'nın NADH'a indirgenmesi ile daha ileri basamaklarda fruktoza okside olur [39–41].

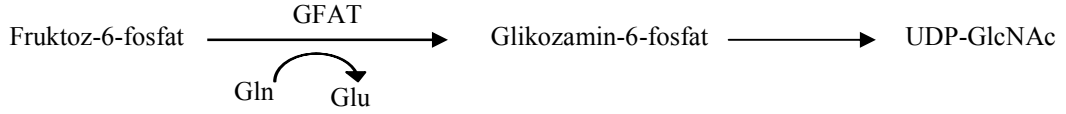


Bu yolağın aktifleşmesi hem klinik hem de deneysel çalışmalarda aşık diyabet sürecinde gösterilmiştir. Normal şartlar altında, AR enziminin glukoz oldukça düşük affinitesi ($K_m=70$ mmol/l) vardır [42]. Ancak, hücre içi glukoz konsantrasyonunun artışı ile poliöl yolağına akış artmaktadır. Poliöl yolağının diyabet-indüklü aktiflenmesi renal medullayı da içeren birçok dokuda gösterilmiştir. Poliöl yolağına doğru aktivitenin artışı ana olarak $NADH/NAD^+$ oranının artmasından dolayı hüresel redoks durumunu değiştirir. Bu başlıca laktat konsantrasyonunun artmasından dolayı, laktat/pirüvat oranını artırır. Uzun dönemli diyabetde, hem renal kortekste hem de medulla da laktat/pirüvat oranının arttığı gösterilmiştir. Ama poliöl yolağının inhibisyonu, sadece medullar bölgede laktat/pirüvat oranının artışı önlemiştir. Bu bulgular AR'ın medullar bölgede daha fazla bulunmasıyla tutarlıdır. Şunu önemle belirtmek gereklidir ki; laktat oluşumunun artışı hipoksi ile sonuçlanmaz. Çünkü pürin baz metabolitlerinin doku seviyeleri (adenozin, inozin ve hipoksantin) hiperglisemi başladıktan sonra yükselmez. Tam mitokondriyal solunum için oksijen desteği gerekli olmasına rağmen, sürekli hiperglisemi durumunda laktat/pirüvat oranında artışın meydana geldiği bilinmektedir. Mevcut oksijenin hipoksik başlangıcın üzerinde olmasına rağmen, $NADH/NAD^+$ oranının artışı hipoksi süreci ile benzer olarak hüresel anormallikler ile sonuçlanmaktadır. Bu durum ortak bir şekilde "pseudohipoksi" olarak adlandırılır ve hücre içi redoks durumunun değişimi ile sonuçlanır. Diyabetik hayvanların renal medullasında artmış laktat oluşumunun bulunması, bu bölgede önemli derecede düşük hücre dışı pH olması ile sonuçlanmaktadır. NADPH antioksidanların rejenerasyonunda görev alır ve NADPH seviyesinin düşmesi dokuları oksidatif hasara daha hassas hale getirir. Yükselmiş poliöl yolağı aktivitesi aracılığıyla indüklenen hüresel değişiklikler pentoz fosfat yolağı, diaçil gliserol (DAG) ve protein kinaz C (PKC) aktivasyonlarını da içermektedir [39].

2.2.2.2. Heksozamin Yolağı

Heksozamin yolağı hücre içi glukozun aşırı yükselmesiyle uyarılır. Hücreye giren tüm glukozun büyük kısmı glikoliz aracılığı ile metabolize olur. Ancak, hücre içi glukozun küçük bir kısmı Heksozamin yolağına girer. Fruktoz-6-fosfat, N-asetil-glukozamine metabolize olur ve daha sonra glikoliplidlere, proteogikanlara ve

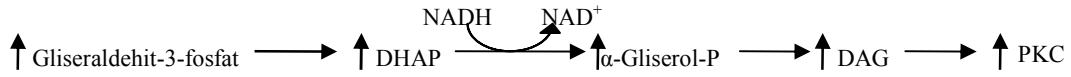
glkoproteinlere metabolize olur. Heksozamin biyosentezinde hız sınırlayıcı enzim glutamin-fruktoz-6-fosfat amidotransferaz (GFAT)'dır [42].



Mezangiyal hücrelerde GFAT konsantrasyonunun artması sitokin üretimini artırır ve bu enzimi kodlayan genlerdeki varyasyonlar DN yatkınlığına katkıda bulunur. Çalışmalar; heksozamin yolağının, insülin rezistansı ve diyabetik komplikasyonların gelişimini ilerleten, büyüme faktörleri ve leptin ekspresyonunun artmasıyla ilişkili olduğunu söylemektedir. Proteoglikanların ve glkoproteinlerin oluşumu, dönüştürücü büyüme faktör (TGF)- α , TGF- β 1 ve buna ek olarak plazminojen aktivatör inhibitör-1'in artışı ile sonuçlanır. Hücre kültürlerinde, yüksek glukoz konsantrasyonları TGF- β 1'in uyarılmasına sebep olur ve TGF- β 1'in pro-sklerotik ajan ve bunun yanında diyabetik komplikasyonların gelişimine sebep olan bir faktör olduğu bilinmektedir. Tübular hücre kültürlerine hem glukoz hem de glukozamin eklenmesi TGF- β 1'in süre ve doz bağımlı uyarılması ile sonuçlanmaktadır. Karşılaştırma yapıldığında, heksozamin yolağı plazma glukoz düzeyinin sensörü olarak rol oynayan düzenleyici bir fonksiyona sahiptir [39].

2.2.2.3. Protein Kinaz C'nin Aktivasyonu

Yüksek hücre içi glukoz seviyeleri PKC'yi aktive eden DAG de novo sentezini artırmaktadır.



Protein kinaz C hüresel bazı proteinleri fosforile edebilmektedir. Protein kinaz C aktivitesinin artışı, mezangiyal hücrelerde, TGF- β aracılı tip IV kollojen ve fibronektin gibi ekstraselüler matris proteinlerinin sentezini sağlayan genlerini ekspresyonuna aracılık eder. Ayrıca PKC aktivasyonu, hücre içi sinyal iletiminde proliferasyonunda ve hipertrofide önemli bir rolü olan, mitojen-aktif protein kinazlar (MAPK) ile bağlantılıdır. Bazı hayvan çalışmalarında PKC inhibisyonunun, renal hiperfiltrasyonu tersine çevirdiği ve glomerular albümin permabilitesini artırdığı görülmüştür. Protein kinaz C inhibitörleri ile yapılan tedavilerde diyabetik (db/db) farelerde üriner albümin atılım oranının azaldığı ve TGF- β 'nın glomerular ekspresyonunun azalması aracılığıyla mezangiyal genişlemenin önlendiği gözlemlenmiştir [40].

2.2.2.4. Pentoz Fosfat Şantı

Pentoz fosfat şantı, hüresel sorbitol sentezini, sorbitol konsantrasyonunu ve hücre içi glutasyonu kontrol edici bir mekanizma olarak çalışan, NADPH-rejenerasyon sistemidir. Hücre içinde bulunan NADPH, oksidatif strese karşı koruyucu temel bir indirgendir. NADPH üretimi ana olarak glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) aktivitesine bağımlıdır. Hekzokinazların mitokondriye bağlanması hem adenosin difosfat (ADP) hem de glukoz-6-fosfat (G6P) oluşumunda artış ile sonuçlanır. ADP mitokondriye girer ve mitokondriyal oksidatif

fosforilasyonu aktive eder. Glukoz 6 fosfat enerji metabolizması için önemli bir ara bileşiktir; glikoliz, glikojen sentezi ve pentoz fosfat şantı arasında anahtar pozisyonda durur. Plazma glukozu arttığında, glikolizi mitokondriyal metabolizmaya bağlayan mitokondriyal oksidatif fosforilasyon hızlanır. Pentoz fosfat şantı enzimleri G6PD aktivitesinin hızının sınırlı olduğu oksidatif bölümün başlangıcındaki hücrelerin içinde antioksidan fonksiyonu sağlar. Bunun için, G6PD aktivitesindeki azalma NADPH düzeylerinde azalma ile sonuçlanır bu suretle de hücreler oksidan hasara hassaslaşır. Bazı şartlar pentoz fosfat şantındaki G6PD ve diğer enzimlerin aktivitelerini değiştirebilir.

2.2.2.5. Glukozun Non-Enzimatik Glikasyonu ve AGE Oluşumu

Glukoz, karbonil gruplarının kimyasal reaktivitesi ile enzim etkisi olmaksızın proteinler ile reaksiyona girebilir. Non-enzimatik glikozilasyon veya glikasyon olarak bilinen bu reaksiyon glukoz seviyesinin artışıyla birlikte özellikle kollojen gibi uzun ömürlü proteinlerle ile glukozun birleşmesinin artışına sebep olur. Protein glikasyonun ileri basamakları, AGE oluşumu ile sonuçlanır [32].

İleri glikasyon son ürünleri reaktif dikarbonilleri oluşturan, glikozun glioksala otooksidasyonu, Amadori ürünlerinin (glukoz-türevli 1-amino-1-deoksifruktoz lizin bileşimi) 3-deoksiglukozona bozunması ve gliseraldehit-3-fosfatın metilglioksala dönüşümü ile oluşurlar. Bu dikarbonillerin hepsi (glioksal, metilglioksal ve 3-deoksiglukozon) AGE oluşturmak için, çeşitli proteinlerin amino grupları ile reaksiyona girerler. Hücre içinde AGE'ler oluştuğu zaman; gen ekspresyonunda, protein fonksiyonlarında, hatta ekstraselüler matriks ve kanda patolojik değişimlere sebep olurlar. İleri glikasyon son ürünleri diyabetik dokularda toplanırlar; çünkü, şeker konsantrasyonu ve sürenin fonksiyonu ekstraselüler matriks fonksiyonlarında kalıcı anormalliklere sebep olur; ROS spesifik reseptörlerin ve sitokinlerin üretimini sitümüle eder, ve hatta proteinleri modifiye ederler. Artmış AGE oluşumunun birçok olumsuz sonucu vardır. Çünkü proteinlerin posttranslasyonel modifikasyonları, hem diyabetik hastalarda hem de diyabetik hayvanlarda mitokondri-uyarımlı oksidatif strese sebep olabilir [39].

2.2.3. Diyabetik Nefropati Tedavisi

Diyabetik nefropatinin gelişim süreciyle ilgili yapılan çalışmalarda bazı terapötik stratejilerin hastalığı yavaşlatabileceği görülmüştür. Bu terapi stratejileri arasında glisemik kontrol, hipertansiyon kontrolü ve renin-anjiyotensin sistem inhibisyonu gibi yöntemler bulunmaktadır [43].

The Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) ve United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) çalışmalarında diyabetik insanlarda mikroalbuminüri ve aşık nefropati gelişme riskinin, yoğun diyabet terapileri ile önemli derecede azaldığını göstermişlerdir [31, 44].

Nefropati gelişimini durdurmada izlenen ilk yol kan şekerini düzenlemektir. Açlık kan şekeri seviyesini 126 mg/dl'den aşağı, tokluk kan şekeri seviyesini 160 mg/dl'den aşağı ve HbA_{1C}'yi % 7 gr/dl altına düşürme yolu izlenmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda kan şekerinin düzenlenmesi ile mikrovasküler komplikasyonların geciktirilebileceği ve oranlarının azaltılabileceği gösterilmiştir. Yoğun insülin

tedavisi ile konvansiyonel tedaviyi karşılaştıran çalışmaların meta-analizinde, HbA₁C’de ortalama % 1,4’lük azalma ile nefropati ilerleme riskinin % 34 oranında azaldığı gösterilmiştir. Japonlarda tip 2 diyabetde yoğun ve konvansiyonel insülin tedavilerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, yoğun insülin tedavisi ile nefropati, retinopati ve nöropatide azalma olduğu bildirilmiştir. Yoğun insülin tedavisine, haftada bir intravenöz insülin eklenmesiyle kan basıncı, glisemi kontrolü ve anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörü kullanımından bağımsız olarak DN ilerlemesinin azaldığı bildirilmiştir [29].

Son zamanlara kadar, diyabetli insanlar, yıllarca sülfonilüre, insülin ve metmorfin gibi kısıtlı sayıda ajanlarla tedavi edilmişlerdir. Tip 1 ve tip 2 diyabetde medikal yaklaşım son 5–10 yılda oral ilaçların yeni sınıflarının varlığı, enjekte edilebilen ilaçlar ve rekombinant insan insülinleri ile dramatik olarak değişmiştir. Hem tip 1 hem de tip 2 diyabetin tedavisindeki başlıca seçim kan glukozuna ve HbA₁C’ye dayanmaktadır. Fiziksel aktivitenin artması, beslenme şeklinin düzeltilmesi, uygun vücut kilolarına inilmesi gibi yaşam tarzındaki değişiklikler; insülin duyarlılığı, glisemik kontrol, kan basıncı ve kolesterol seviyelerindeki iyileşmeler başlıca hedefler olmaktadır [28].

Tip 1 DM tedavisindeki temel hedef, semptomları hafifletmek, kan şekerini iyi bir şekilde ayarlamak, mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonların gelişmesini engellemektir. İnsülinin yokluğu söz konusu olduğundan, insülin tedavisi gerekmektedir. Ayrıca beslenme ayarlanması yapılmalı ve egzersiz özendirilmelidir. Hipoglisemi oluşturmadan, kan şekerini normal düzeylere yakın tutmak, komplikasyonların gelişmemesi açısından önemlidir. Tip 2 diyabet tedavisinde komplikasyonları engellemek açısından temel hedef, bozulan metabolik anormallikleri düzeltmeye yönelik olmalıdır. İyi bir glisemik kontrol ile retinopati, nefropati gibi mikrovasküler komplikasyonlar azalmaktadır. Bu olgularda mutlaka risk faktörü olan hipertansiyon ve dislipideminin tedavisi de gerekmektedir. Bu nedenle bu olgularda, tek başına kan şekerinin düzenlenmesi yeterli olmamaktadır. Tip 2 diyabet hastalarının önemli bir bölümü obes olduğu için, tedavinin başında, diyet ve egzersiz gibi, yaşam stili değişikliklerinin yapılması gerekmektedir [27].

Çoğu olguda kombine tedavi gerekmektedir. Glukoz düzeyini düzenlenmesi için şu ilaçlar kullanılmaktadır: 1) İnsülin salgılatıcıları olarak, sülfonilüreler (Glipizid, Gliklazid, Gliburid, Glimeperid) ve glinidler (repaglinid, nateglinid) pankreastan insülin salgılanmasını sağlarlar. 2) Biguanidlerden metformin, kilo kaybı yanında hepatik glukoz çıkışını engeller ve periferik glukoz alımını artırır ve insülin direncini azaltır, obeslerde tercih edilen bir ilaçtır. 3) α -glukozidaz inhibitörlerinden akarboz ve miglitol barsaktan, glukoz emilimini azaltır. 4) Tiyazolidinedionlar (rosiglitazon ve pioglitazon) kullanılabilir [45].

Sülfanilüreler, hipoglisemik etkileri bazal plazma glukoz seviyesi ile direk ilişkili olan, hücresel seviyede adenosin trifosfat (ATP)-bağımlı potasyum kanallarını kapatarak gösterirler. Fizyolojik koşullarda kapalı olan bu kanallar iskemik koşullarda açılarak, hücreyi iskeminin etkilerinden koruyan hiperpolarizasyona neden olurlar. Sülfanilüreler bu kanalların açılmasını önleyerek hücreyi koruyan

hiperpolarizasyonun oluşmasını engellerler. Glinidler, sulfanilüreler gibi ATP-bağımlı potasyum kanallarını kapatarak etki ederler fakat etki mekanizmaları daha kompleksdir. Hem açlık glukoz düzeyini hem de HbA_{1C}'yi azaltır fakat lipid profili üzerine önemli bir etki göstermezler. Biguanidler bu sınıfın en sık kullanılan üyesi olan metformin glukoneogenezi inhibe eder, gastrointestinal sistemden glukoz emilimini azaltır ve başlıca iskelet kaslarında olmak üzere insülin varlığında dokular tarafından periferik glukoz alımını artırır. Tiyazolidinedionlar kimyasal yapı ve etki mekanizmaları diğer gruplardan farklıdır. Metformin gibi insüline duyarlılığı artırır. Özellikle yağ, kas ve karaciğer hücrelerinde insüline duyarlılığı artırır. α -glukozidaz inhibitörlerinin temel etki mekanizmaları, maltaz, isomaltaz, sükras ve glukozamilaz gibi bazı α -glukozidaz grubu enzimlerin kompetitif inhibisyonudur. Bu enzimler ince bağırsakta bulunan membrana bağlı enzimlerdir ve oligosakkaridler ve disakkaridler glukozu hidrolize ederler. Karbonhidratların sindirimini geciktirerek bunların emilimini daha distal ince bağırsak ve kolona kaydırırlar. Böylece glukozun gastrointestinal sistemden emilimini geciktirirler [45, 46].

Tip 1 diyabetli hastalarda hipertansiyon genellikle DN'nin altında yatan sebeplerdendir ve tipik olarak mikroalbuminüri başladığı zaman ortaya çıkar. Tip 2 diyabetlilerde hipertansiyon hastaların 1/3'ünde diyabet tanısı konduğunda mevcuttur [29, 34]. Diyabetli hastalarda hipertansiyon genellikle genişlemiş plazma hacmi, artmış periferik vasküler rezistans ve düşük renin aktivitesi ile ilişkilidir. Hem sistolik hem diastolik hipertansiyon (>130/80 mmHg) DN sürecini belirgin şekilde hızlandırır. Agresif antihipertansif uygulamalar GFR'deki düşüş oranını fazlasıyla azaltabilirler. Uygun antihipertansif müdahale tip 1 diyabetli hastalarda ortalama yaşam süresini önemli derecede arttırabilmektedir ve aşık nefropati geliştikten 16 yıl sonra mortaliteyi % 90'dan % 45'e azaltırken, diyaliz ve transplantasyon oranını da % 73'den % 31'e düşürür. Bazı çalışmalarda tip 1 diyabetli hipertansif hastalarda ACE inhibitörleri albuminüri seviyelerini düşürebilir ve renal hastalık gelişim oranını kan basıncını düşürücü diğer antihipertansif ajanlardan daha yüksek derecede azaltmaktadır. ACE inhibitörlerinin yanı sıra kan basıncını düzenlemek amacıyla anjiyotensin reseptör blokörleri de kullanılmaktadır [31].

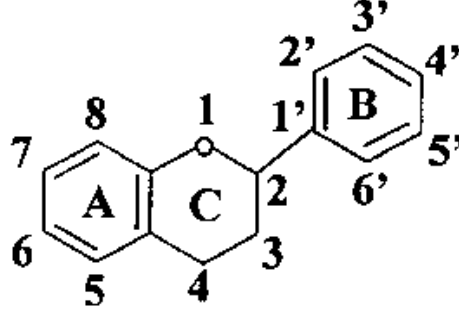
Tuz kullanımının kısıtlanması ve diyet sırasında alınacak proteinin 0,6 gr/kg/gün şeklinde sınırlandırılması ile GFR'nin düşme hızında azalma sağlanmıştır [31]. Tip 1 diyabet grubunda daha sık görülen SDBY'de, diyaliz ve transplantasyon önerilmektedir. Transplantasyon programına alınan her üç hastanın birinde, DN sonucu gelişen son dönem böbrek hastalıkları belirlenmektedir. Renal transplantasyon 60 yaşından genç kişilerde tercih edilir [29]. Diğer tedavi yöntemleri arasında sodyum ve fosfor kısıtlanması, fosfor bağlayıcı ajanlar, radyokontrast maddelerden kaçınmak veya öncesinde hastayı iyi hidrate etmek sayılabilir. SDBY'de ise hemodiyaliz, sürekli ayaktan periton diyalizi, böbrek ve pankreas transplantasyonu yapılabilir [29, 34].

2.3. Flavonoidler ve Myricetin

2.3.1. Flavonoidlerin Yapısı ve Sınıflandırılması

Flavonoidler düşük molekül ağırlıklı geniş bir sınıftır, flavan çekirdeği ile karakterizedir. Bitkilerin yapraklarında, tohumunda, köklerinde ve çiçeklerinde geniş

çapta yayılmış olan 4000'i aşkın flavonoid tanımlanmıştır [47, 48]. Bitkilerde, bu içerikler ultraviyole radyasyon, patojenler ve herbivorlara karşı korunmada iş görürler. Çiçeklerdeki antosiyanin kopigmentleri tozlaşmada böcekleri cezbeder ve insan diyetinde flavonoidlerin ana kaynağı olan meyvelerin ve sebzelerin mavi ve kırmızı renginden sorumludur [49].



Şekil 2.2 Flavonoidlerin çekirdek yapıları

Flavonoidlerin beslenme sürecinde, biyolojik aktiviteleri ve metabolitleri, kimyasal yapılarına ve molekül üzerindeki çeşitli kısımların dizilişine bağlıdır. Flavonoid çekirdeklerinin basit yapılarında çeşitli alt gruplar ile sonuçlanan, A, B ve C halkalarındaki değişim şekilleri göz önünde bulundurulur (Şekil 2.2) [50].

Flavonoidler, fenolik ve piran halkaları içeren ve bunların yer değiştirmesine bağlı olarak sınıflandırılan benzo- γ -piron türevleridir [48]. Diyetel flavonoidler hidroksi, metoksi ve glikozidik yan gruplarının düzenlerine göre birbirlerinden farklıdır ve A ve B halkaları konjugedir. Metabolizma süresince hidroksil gruplar eklenir, metillenir, sülfatlanır ya da glukuronidatlanır. Yiyeceklerde, flavonoidler esasen 3-O-glikozitler ve polimerler olarak bulunur. Flavonoidler C halkalarındaki oksidasyon seviyelerine göre sınıflara ayrılırlar [49, 50]

Sınıfı	Genel Yapı	Flavonoid	Yan Grupları	Diyetsel Kaynağı
Flavanol		(+)-kateşin (-)-epikateşin Epigallocateşin gallat	3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4',5'-OH,3- gallat	Çay (camellia sinensis) Çay Çay
Flavon		Krisin Apigenin Rutin Luteolin Luteolin glikozit	5,7-OH 5,7,4'-OH 5,7,3',4'-OH, 3- rutinoz 5,7,3',4'-OH 5,7,3'-OH, 4'- glukoz 5,4'-OH, 4',7- glukoz	Meyve kabuğu Maydanoz, kereviz Kırmızı şarap, esmer buğday Turunçgiller, domates kabuğu Kırmızı biber
Flavanol		Kamferol Kuersetin Myricetin Tamariksetin	3,5,7,4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4',5'-OH 3,5,7,3'-OH,4'-OMe	Pırasa, brokoli, hindiba greyfurt, siyah çay Soğan, marul, brokoli domates, çay, kırmızı şarap dut, zeytin yağı, elma kabuğu Yabani mersin meyvesi, kırmızı şarap
Flavanon (dihidroflavon)		Naringin Naringenin Taksifolin Eriodiktiol Hesperidin	5,4'-OH,7- ramnoglukoz 5,7,4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 5,7,3',4'-OH 3,5,3'-OH,4'-OMe, 7- rutinoz	Turunçgiller, greyfurt Turunçgil meyvesi Turunçgil meyvesi Limon Portakal
İzoflavon		Genistin Genistein Daidzein Daidzin	5,4'-OH, 7- glukoz 5,7,4'-OH 4'-OH, 7- glukoz 7,4'-OH	Soya Soya Soya Soya
Antosiyanidin		Apigenidin Siyanidin	5,7,4'-OH 3,5,7,4'-OH,3,5-OMe	Renkli meyveler Kiraz, ahududu, çilek

Şekil 2.3 Diyetle alınan flavonoidlerin sınıflandırılması, yapısı ve kaynakları [49]

Bunlar (Şekil 2.3):

- *Antosiyanidinler
- *Flavanoller (Kateşinler)
- *Flavonlar
- *Flavonoller
- *Flavanonlar
- *İzoflavonlar

Flavonoidlerin yapısı A, B ve C olarak adlandırılan 3 fenolik halka içeren flavonoid çekirdeğinden oluşur. Benzen halkası olan A, 6 üyeli C halkası ile kondanse olmuştur. C halkası da yan grup olarak 2-pozisyonunda fenil benzen halkası olan B halkasını taşır. C halkası flavanoller (kateşin) ve antosiyaninlerdeki gibi bir heterosiklik piran olabilir; flavonoller, flavonlar ve flavanonlarda olduğu gibi bir piron olabilir. 4-okso-flavonoid olarak adlandırılanlar genellikle flavonoid olarak tanımlanırlar. Bunlar C halkasındaki 4. karbondaki karbonil grubu taşıyan flavanoller (kateşinler), flavanonlar, flavonoller ve flavonlardır. Flavonoidlerin kimyasal doğası yapısal sınıflara, hidroksilasyon derecelerine, diğer yan gruplarına, konjugasyonlarına ve polimerizasyon derecelerine bağlıdır [50].

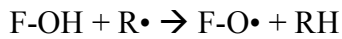
Flavonoidlerin yapıları, major gruplar ve yan gruplar (glikozillenme, hidrojenasyon, hidroksilasyon, malonilasyon, metilasyon ve sülfatasyon) arasında farklılıklar gösterir. Konjugasyon, glikozilasyon ve metilasyon şekilleri oldukça

komplekstir, molekülün biyolojik özelliğini ve hidrofiliğini belirler ve belirgin şekilde flavonoidin moleküler ağırlığını artırır. Şeker birimlerine bağlanmamış flavonoid molekülü “aglikon” olarak, şeker birimleri bağlanmış flavonoid molekülü de “flavonoid glikozitleri” olarak adlandırılır. Katesinler dışındaki flavonoidler bitkilerde aglikon olarak bulunmaz, bitkilerde en yaygın formlar glikozit türevleridir. Glikozilasyon flavonoid molekülünün polarizasyonunu artırır; bu özellik bitki hücrelerindeki vakuollerde depolanmaları için gereklidir. Flavonoller ve flavonlar gıdalarda genellikle o-glikozit olarak bulunur. Ana flavonoid sınıflarının arasında flavonoller meyvelerde, kuersetin ise sebzelerde baskın olarak bulunur. Glikozidler oluştuğunda, flavonol molekülü üzerindeki tercih edilen glikozilasyon bölgeleri C-3 pozisyonu ve daha az sıklıkla C-7 pozisyonudur. D-glukoz en alışımlı şeker rezidüsüdür; ama arabinoz, galaktoz, glukoramnoz, lignin, L-ramnoz, ve ksiloz gibi diğer karbonhidrat yan grupları da bulunur. Örneğin; kuersetin 3-O-glikozit bağıyla ramnoz ile bağlanırsa kuersitrin ve ya glukoramnoz ile bağlanırsa rutin oluşmaktadır. Yapraklı sebzelerde ve meyvelerde, flavonoller yalnızca glikozit halinde bulunurlar. Flavonol glikozidleri ağırlıklı olarak yapraklarda, çiçeklerde ve kabuk gibi dıştaki kısımlarda bulunurlar ve öz kısmına gidildikçe konsantrasyonları azalır. Flavonoller sadece eser miktarlarda toprak altı bitki kısımlarında bulunmaktadır [50].

2.3.2. Flavonoidlerin Yan Grupları ve Antioksidan Aktivitesi

Flavonoidler ve diğer bitki fenoliklerinin süperoksid (O•), lipid alkoksil (RO•) ve peroksil (ROO•), nitrik oksit (NO) radikal temizleme, demir ve bakır şelasyonu, μ -tokoferol rejenerasyonu fonksiyonlarına ek olarak; vazodilatatör, immünstimulan, antiallerjik, östrojenik, antiviral (HSV, HIV, influenza ve rhinovirüslere karşı) etkileri de söz konusudur. Fosfolipaz-A2, siklooksijenaz, lipooksijenaz enzimlerinin inhibisyonu ile antiinflamatuvar özellik gösterirler. Ayrıca, XO, GR, NADH-oksidad, protein kinaz gibi bazı enzimleri inhibe ettiklerine dair veriler de mevcuttur [10].

Yan grupların uzaydaki düzenlenmeleri, antioksidan aktivitenin belirlenmesinde yalnızca flavan iskeletinden daha belirleyici olabilir. Çoğu fenolik antioksidanlar tutarlı bir şekilde hem konfigürasyon hem de hidroksil gruplarının toplam sayısına göre bazı antioksidan aktivite mekanizmalarında etkilidirler. Serbest radikal temizleme kapasitesi aşağıda gösterilen reaksiyona katılan hidroksil gruplarının yüksek reaktivitesine bağlıdır [49]:



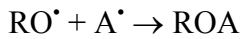
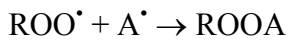
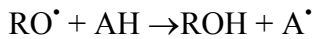
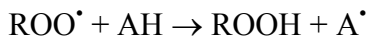
B-halkası hidroksil konfigürasyonu ROS ve reaktif nitrojen türleri (RNS) temizlemede en önemli belirleyicidir. B-halkasındaki hidroksil grupları hidroksil, peroksil ve peroksinitrit radikallerine hidrojen ve elektron vererek stabilize ederler ve oldukça stabil flavonoid radikali oluşmasına sebep olurlar. Yapısal homolog flavon ve flavononlar arasında peroksil ve hidroksil temizleme doğrusal ve eğrisel olarak sırasıyla hidroksil gruplarının toplam sayısına göre artar. B halkasındaki hidroksilasyon, antioksidan aktiviteye katkıda bulunur. Tüm flavonoidler, 3'-4'dihidroksi konfigürasyonu ile antioksidan aktiviteye sahiptir. Robinetin ve myricetin 5' pozisyonunda ek hidroksil grubuna sahiptirler. Bu antioksidan aktivitenin güçlenmesine sebep olur [10].

3'4'-katekol yapısı B-halkasında güçlü bir şekilde lipid peroksidasyonu inhibisyonunu artırır. Peroksinitrit, süperoksit ve peroksil radikallerinin temizlenmesinde, bu düzenlenme en dikkat çekici özelliktir. Örneğin; luteolinin peroksil radikali temizleme yeteneği kamferolden büyük ölçüde daha fazladır; herikisinde de özdeş hidroksil konfigürasyonu vardır, ama kamferolde B-halkasında katekol yapısı bulunmaz (Şekil 2.3). Kateşin aracılığıyla peroksinitrit temizleme, temel olarak B-halkasındaki katekole bağlıdır. Flavonoidlerin oksidasyonu katekol varlığında B-halkasında meydana gelir, elektronların kolaylıkla yerdeğiştirmesi aracılığıyla oldukça stabil orto-semikinon radikali oluşur [14].

Polihidroksillenmiş ve polimetoksillenmiş flavonoidler arasındaki antioksidan aktivite farklarının çoğu, benzer bir şekilde hem hidrofobiklik hemde moleküler düzlemsellikteki farklılıklardan ileri gelmektedir. Antioksidan aktivitenin O-metilasyon ile baskılanması düzlemselliği bozan stearik etkileri düşündürülebilir. Hidroksil yan gruplarının metoksiye oranı, flavonoidlerin temizleyici yeteneklerini gerekli miktarda göstermemesine rağmen, özellikle B-halkasında metoksi gruplarının pozisyonu hasastır. 6'-OH/4'-OMe konfigürasyonundan 6'-OMe/4'-OH'a dönüşüm tamamıyla eşdüzlemselliğin indüklenmesi vasıtasıyla DPPH'nin temizlenmesini ortadan kaldırır. DPPH doğal olarak bulunan bir radikal değildir ve biyolojik sistemlerde oksidatif hasarın birincil cevabı olan reaktif süperoksit ve hidroksil türevleri ile karşılaştırıldığında göreceli olarak stabildir [10, 49].

3'4'-katekol yapısının 4'-O-metilasyon aracılığıyla sterik engellenmesi antioksidan güç ile önemli derecede uyuşmaktadır. Örneğin; kuersetinin tamariksetine 4'-O-metilasyonu ferröz sülfat indüklü lipid peroksidasyonu oranını %98'den %2,6'ya azaltmaktadır. Kamferol 3'4'-dimetil eter, kamferolün peroksil temizleme yeteneğinin yaklaşık olarak yarısını göstermektedir. Hatta çoklu A-halkası metoksi grupları B-halkası katekolün pozitif etkilerini tersine çevirmektedir, çünkü oksidasyon ürünü malondialdehitin (MDA) inhibisyonu, A-halkasında ortodimetoksi ya da trimetoksi yapıları bulunan flavonlar tarafından artırılmaz. Bu bilgiler insanlarda saptanan kuersetinin 3'-metoksi metaboliti olan izohamnetinin esas bileşikten daha düşük antioksidan etkisinin olduğunu göstermektedir [49].

Flavonoidler, glikozidler gibi canlı hücrelerde ortaya çıkarlar, sıcak asit ve enzimlerle sırasıyla aglikon ve şekere parçalanabilirler. Fenolik antioksidanlar, lipid radikallere, hızla H⁺ vererek lipid oksidasyonu ile reaksiyona girer. Görevi lipid ROO[•] ve RO[•] radikalini parçalamak ve böylece lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunu sonlandırmaktır.



Sonuçta oluşan fenoksi radikali yeni bir serbest radikal oluşumunu başlatmamalı veya zincir reaksiyonu ile hızlı bir oksidasyona maruz kalmamalıdır. Bu yönden fenolik antioksidanlar mükemmel H⁺ ve elektron donörleridir. Oluşan fenoksi radikali aromatik halka etrafında çiftlenmemiş elektronların lokalizasyon

değişiklikleri ile dengelenir. Bir fenolün orto veya para pozisyonlarındaki iki OH grubu onun antioksidan aktivitesini artırır. 1–2 dihidroksibenzen türevlerinin etkinliği fenoksi radikalının molekül içi hidrojen bağ stabilizasyonu ile artırılır [10].

Genel flavonoid yapısal sınıflarının arasındaki ayırt edici özellik 4-okso ile birleşimde doymamış 2–3 bağının varlığı ya da yokluğudur. 3'4'-katekol, 3-OH ve kuersetinin tüm hidroksilasyon şekillerinden başka, bazı çalışmalar 2–3 doymamışlığının ve 4- karboksil gruplarının önemini belirlemişlerdir. 2-3 çift bağ, 4- karbonil grubu ve 3 hidroksil grubu olan flavonoidlerin daha güçlü antioksidan olduğuyla ilişkili çalışmalar mevcuttur [51, 52].

Çalışmaların çoğunluğu bu özelliklerden birinin ya da her ikisinin de bulunmadığı flavonoidlerde, her ikisinin bulunduğu flavonoidlerden daha düşük güçte antioksidanlığın olduğunu desteklemektedir. A ve B halkası arasındaki birleşim flavonoid radikalın kararlılığını sağlayan, aromatik çekirdeğin rezonans etkisine olanak verir ve bundan dolayı 3'4'-katekol'un fenoksil radikal stabilize edici etkisini optimize etmede hayatidir. Tüm bu açıklamalara dayanarak; Flavanollerin flavonlardan daha etkili serbest radikal temizleyici olmaları hidroksil gruplarının fazla olmasına ve 3-OH bulundurmalarına bağlanabilir [11].

Aglikonlar glikozitlerinden daha güçlü antioksidanlardır. Genistin agikonu olan genisteine göre peroksinitrit indüklü düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonun azaltılmasında daha az etkilidir. Çaydaki flavonol glikozitlerinin glikozidik yan gruplarının sayısı arttıkça antioksidan özellikleri azalmaktadır. Yapıda bulunmalarının ve toplam sayılarının yanında şekerlerin yapıları ve pozisyonları önemli rol oynamaktadır [49]. Diyetle, flavonoid glikozidik yan grupları en yaygın olarak 3 ve 7 numaralı karbon atomlarına bağlanırlar [14]. Ancak heterosiklik yapıda, A-halkasına şeker birimlerinin bağlanması 3-glikozilasyondan daha azalmış aktiviteye sebep olur. 7. karbondaki O-glikozilasyon rat mitokondrisinde flavonoidlerin antioksidan etkilerini zayıflatır. Fakat fosfolipid tabakalarında hidroperoksite karşı 3 ve 7 glikozitler arasında hiç fark bulunamamıştır. Metilasyonda olduğu gibi, O-glikozilasyon, flavonoidin kalani ile birlikte B-halkasının eş düzlemselliğini ve elektronların yer değiştirmesini engelleyebilir. Aglikonlara göre glikozitler daha zayıf antioksidanlar olmalarına rağmen biyoyararlanımları bazen glikoz yan grupları aracılığıyla artabilir [14, 49].

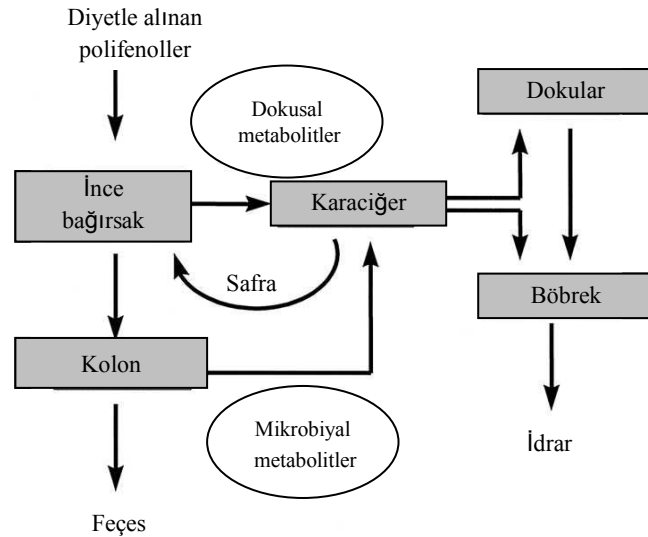
2.3.4. Flavonoidlerin Diyetle Alınımı ve Absorbsiyonu

Flavonoidlerin diyetle ne kadar alındığının hesaplandığı sadece birkaç çalışma mevcuttur. Birleşik Devletler'de mevsime bağlı olarak flavonoid alınımının 1–1, 1 g/gün arasında olduğunu belirlemiştir [53]. Hollanda'da günlük flavonol ve flavon alınımının 23 mg/gün olduğunu bulmuştur [53]. Daha yakın zamanlarda Danimarka'da flavonol, flovon ve flavanonların günlük alınımının 28 mg/gün olduğunu rapor etmiştir [53, 54].

Flavonoidlerin absorpsiyonu ve biyoyararlanımının araştırıldığı çeşitli insan çalışmaları yapılmıştır. Başlarda, diyetle alınan flavonoidlerin absorpsiyonunun önemsiz olduğu düşünülmekteydi; çünkü besinlerdeki flavonoidlerin çoğunluğu glikozitlerle bağlıydı. Bağırsaklarda glikozidik bağları parçalayabilecek bir enzim

salgılanmadığı için, bağırsak duvarından kan akımına sadece aglikonların geçebildiğine inanılmaktaydı. Son zamanlarda yapılan çalışmalar özel flavonoidlerin biyoyararlanımının önceleri inanıldığından daha fazla olduğunu göstermektedir [53].

İntestinal absorpsiyonda başlıca etkili olan polifenol yapısıdır. En yaygın tartışılan yapısal parametreler moleküler ağırlık, glikozilasyon ve esterifikasyondur. Theaflavinlerin yüksek molekül ağırlığı ($m_a=568$) idrarda düşük geri alınımını açıklayabilir. Yüksek molekül ağırlıklı polifenollerin diğer bir sınıfı olan proantosiyanidinlerdir (kondense taninler). Proantosiyanidinler 578 ve daha üzeri moleküler ağırlıklı ve polimerizasyon dereceleri çeşitli olan flavonoid polimerleridir. Günümüzde bağırsaklardan hemen hemen hiç absorblanmadığı açıktır. Keteşinler ve proantosiyanidinler dışında çoğu flavonoid besinlerde glikozile halde bulunurlar. Glikozilasyon bağırsak bariyerinden emilim üzerinde etkilidir. Soğanın ihtiva ettiği kuersetin glikozitlerinin absorpsiyonu (% 52), kuersetin aglikonlarının (% 24) absorpsiyonundan daha fazladır. Ratlara oral olarak uygulanmasından 4 saat sonra, 3 kat daha fazla plazma konsantrasyonu gözlemlendiği gibi, kuersetinin 3-O-glikoziti kuersetinden daha iyi absorbe edilir. Bunun aksine kuersetinin ramnoziti aynı koşullarda zayıf bir şekilde absorbe edilmektedir. Ramnozitlerin bağırsaktan absorpsiyonu glikozitlerle karşılaştırıldığında absorpsiyonlarının gecikmesine bakılırsa, muhtemelen kolonik mikroflora tarafından deglikozilasyon gerektirmektedir. Kuersetin glikozitlerinin kolaylaştırılmış absorpsiyonu laktaz florizin hidrolaz ya da enterositlerdeki sitozolik glikozidaz tarafından hidrolizlerine bağlanabilir. Ancak kuersetinde gözlemlenen, glikozilasyon vasıtasıyla absorpsiyonun kolaylaştırılması naringenin ve florizin gibi diğer glikozitlerde gözlemlenmemiştir [55].



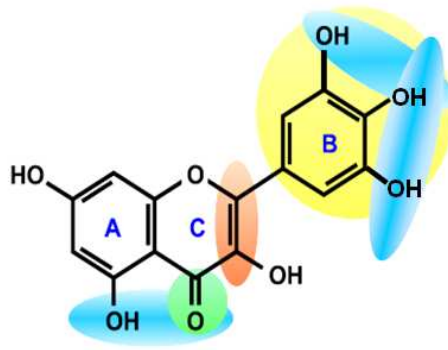
Şekil 2.4 Diyetle alınan polifenollerin ve metabolitlerinin insanlardaki rotası [55]

Genellikle eksiksiz flavonoid glikozitleri ince bağırsaktan hemen hemen hiç absorbe edilmez, çünkü şeker yan grupları hidrofilikliği artırmaktadır. Diyetten alınan flavonoid glikozitleri ince bağırsaktan geçer, çekum ve kolona girer (Şekil

2.4). Burada enterobakteriler tarafından aglikonlarına hidrolize edilir. Flavonoid aglikonları kolay bir şekilde kalın bağırsaktaki epitelyal hücrelerden absorbe edilir. Çünkü bunların lipofilikliği hücrel membranların fosfolipid tabakalarından geçişini hızlandırır. Daha sonra, dalaşıma girerler ve karaciğerde O-metilasyona, glukuronidasyona veya sülfatlanmaya maruz kalırlar. Daha sonra bu metabolitlerin önemli bir kısmı safraya salgılanır ve intestinal lümene geri döner. Bir kez daha hidroliz edilebilir, intestinal hücreler tarafından geri emilebilir veya feçes ile atılabilirler [56].

2.3.5. Myricetin, Antioksidan Etkisi, Diyabet ile İlişkisi

Myricetin (Şekil 2.5) 3, 5, 7, 3', 4' ve 5' pozisyonlarında hidroksil yan gruplarına sahip, doğal olarak bulunan, flavonol alt sınıfına dahil bir flavonoiddir. Doğada çayda, şarapta, çilek kiraz gibi meyveler, sebzelerde ve tıbbi otları de içeren bitkiler arasında yaygın bir şekilde bulunur. Sebzelerde, çilek gibi yumuşak meyvelerde myricetin, serbest aglikonlarından çok, glikozit formunda bulunur ve olgunlaşmış meyvelerde daha fazladır [57]. Tüketilen myricetin bir kısmı gastrointestinal sistem tarafından absorbe edilir; kalan kısmı gastrointestinal mikroflora tarafından metabolize edilir. Absorblanan myricetin metabolizmasından böbrekler ve intestinal duvar ile beraber büyük ölçüde karaciğer sorumludur. Majör metaboliti idrara salgılanan 3,5-dihidroksifenilasetik asit olarak belirlenmiştir. Myricetin güçlü antioksidan, antikarsinojenik ve antiagregan özelliklerini içeren çeşitli terapötik etkilerinin araştırıldığı birçok çalışma yapılmıştır [58–60].



Şekil 2.5 Myricetin molekül yapısı

Şekil 2.5'de de görüldüğü gibi Myricetin yapısında, 4-okso, 2–3 çift bağı ve 3, 5, 7, 3', 4', 5' hidroksil yan grupları içeren önemli bir flavonoiddir. İçerdiği bu yan gruplardan 3'4'-katekol yapısı B-halkasında güçlü bir şekilde lipid peroksidasyonu inhibisyonunu artırır. Myricetin 5' pozisyonda ek hidroksil grubuna sahip olması antioksidan aktivitenin güçlenmesine sebep olur. 2–3 çift bağ, 4-karbonil grubu ve 3 hidroksil grubu olan flavonoidlerin daha güçlü antioksidan olduğuyla ilişkili çalışmalar mevcuttur [52].

Myricetin rat karaciğerlerinin mikrozomlarında araşidonik asitten malondialdehit (MDA) oluşumunu inhibe ettiği bulunmuştur. Fenazin metosülfat-NADH sistem kaynaklı süperoksit anyonlarını temizlemede ve hidrojen peroksitin ultraviyole fotoliz aracılığıyla üretilen hidroksil radikallerini temizlemede etkili

olduğu yapılan çalışmalarla gözlemlenmiştir [61]. Bu nedenle antioksidan özellikleri aktif oksijen türlerini temizleme yeteneğini ortaya koymaktadır. Hipoksantin-XO sistem sık sık enzimatik olarak in vitro ortamda süperoksit anyonu üretebilir. Bu sisteme myricetin eklenmesi süperoksit anyon üretimini oldukça düşürmektedir. Ancak, myricetin XO aktivitesini inhibe edebilme yeteneği de yapılan bu tip çalışmalarda göz önünde bulundurulmalıdır [58, 62, 63].

Siklooksijenaz ve lipooksijenaz araşidonik asidin serbest radikal peroksidasyonunu katalizleyen enzimlerdir. Myricetin soya fasülyesi lipooksijenaz aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir ve araşidonik asit substrat olarak kullanıldığında ratların karaciğer sitozolünde lipooksijenaz aktivitesini inhibe ettiği de rapor edilmiştir [64].

Myricetin anti-inflamatuar aktiviteye sahiptir ve antikarsinogenik, antiviral ve antimikrobiyal ajan olarak rol oynar. Platelet agregasyonundan koruyucu etkiye sahiptir. Daha önceki çalışmalarda 30'dan fazla flavonoid arasından myricetin lipogenez üzerine uyarıcı etkisinin olduğu saptanmıştır. Aynı çalışmada insülin reseptör fonksiyonu ve glukoz taşıyıcısı 4 (GLUT 4) translokasyonu olmaksızın rat adipositlerine glukoz transportunun arttığı bulunmuştur. Myricetin diyabetteki güçlü terapötik etkileri incelenmiştir. Myricetin ile tedavi edildikten yalnızca 2 gün sonra hiperglisemi ve hipertrigliserideminin diyabetik hayvanlarda anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır. Diyabetik ratlarda hipergliseminin % 50 kadar azaldığı ve hipertrigliserideminin diyabetin normale dönmesi ile birlikte azaldığı saptanmıştır. Aynı çalışmada myricetin ile tedavi hepatik glikojen ve G6P içeriğinde artışa neden olmuştur. Total glikojen sentaz ya da fosforilaz aktivitesi üzerine etki olmaksızın, hepatik glikojen sentaz I aktivitesinde artışa sebep olmuştur. Kaslarda fosforilaz etkisini azaltmıştır. Böylece myricetin hipoglisemik etkisi muhtemelen glikojen metabolizması üzerine olan etkisinden ileri gelmektedir. Bu çalışmada myricetin tedavisi sonucunda hepatotoksisite bulgusu yoktur ve bu sebeple myricetin diyabette güçlü bir terapötik ajan olabileceği söylenebilir [65].

2.4. Mersin

2.4.1. Genel Özellikleri ve Diyabete Etkisi

Latincesi *Myrtus communis L.* olan mersin bitkisi, *Myrtaceae* familyasından olup, genellikle kısa boylu bazen de 1–3 m. olabilen ağaççıklardır (Şekil 2.6). *Myrtaceae* familyası Ülkemizde iki cinsle temsil edilmektedir. Tek türe sahip olan *Myrtus L.* cinsi Ülkemizde coğrafik sınırı denize komşu olan hemen bütün illerimizde yayılış göstermektedir Akdeniz maki formasyonunun sık rastlanan, önemli bir üyesi olan mersin yurdumuzun hemen bütün kıyı bölgelerinde yoğun kümeler halinde bulunur [66]. Türkiye’de mersin ağaççıkları, kıyı şeridinde ve çam ormanlarının arasında, özellikle de Toros Dağları’nda denizden 500–600 m yukarılarda yetişmektedir [67]. İçerdiği uçucu yağlardan kaynaklanan hoş kokusuyla halk arasında tanınan bir bitkidir. Herdem yeşil bir bitkidir [66]. *Myrtus communis L.* ülkemizde genellikle “mersin” olarak bilindiği halde özellikle Güney sahillerimizde “murt” ve “hambeles” adlarıyla bilindiği yörelerimiz de vardır. Ayrıca bazı yerlerde yaprağına “bahar” adı verilmektedir [66, 67].



Şekil 2.6 Mersin (*Myrtus communis L.*) bitkisi

Mersin, yapraklarını dökmeyen ağaç veya çalı formunda bir bitkidir. Yapraklar ovatlansolat derimsi, düz kenarlı, gövde üzerinde karşılıklı veya çapraz dizilişlidir. Yapraklar stipulsuz ve aromatik glandular punktattır. Çiçekler yaprak koltuklarından tek tek çıkar. Beyaz renkli ve beş parçalıdır. Erkek organlar çok sayıda, meyve nohut büyüklüğünde, siyahımsı mor renkli ve çok tohumludur [68].

Meyveleri az etli oval yalancı bir bakkadır. Yaklaşık zeytin büyüklüğündedir. Tepesinde kaliks bakiyesi (çanak yaprakların artığı) taşır. Meyvelerinin üzeri özellikle arıların bitkiyi tanınmasını sağlayan (ve mersin bitkisine özel olmayıp bazı diğer bitkilerde de olabilen) hafif bir mumsu tabaka ile kaplıdır, bu da meyveye mat bir görünüm verir. Meyva çok tohumludur. Yenilebilen bu meyvaların hoş, baharatlı bir tadı ve aromatik kokusu vardır [66]. *Myrtus communis* meyvelerinden İtalya'da, Sardinya Adası'na özgü karakteristik mersin likörü üretilir [19].

Myrtus communis L. geleneksel olarak antiseptik ve dezenfektan ilaç olarak kullanılan bir bitkidir. Bu bitkiyle yapılan kimyasal çalışmalara bakılacak olursa; yapraklarından [69], esansiyel yağından [70] ve meyvelerinden [71] birçok bileşik izole edilmiştir [19].

Montoro et al. yaptığı bir çalışmada; küresel şekilli, koyu kırmızıdan mora kadar renkler içeren meyvenin içerisinde antosiyanidin olarak delfinidin, petunidin, malvidin, peonidin ve siyanidin glikozitlerinin bulunduğunu raporlamıştır. Yapılan aynı çalışmada mersin meyvesinde myricetin ve kuersetinin yüksek performanslı likid kromatografisi (HPLC) analizinde flavonoidler arasında en yüksek pikleri oluşturduğu gözlemlenmiştir [19, 72].

Mersin, yemeklerde baharat olarak veya halk arasında diyabet tedavisinde ve antiseptik madde olarak kullanılan, Akdeniz şurubu olarak bilinir. Mersin ekstraktlarının antihiperglisemik [17, 18], antibakteriyal [73] ve analjezik içeriğe sahip olduğu bulunmuştur. Son zamanlardaki çalışmalarda mersinin farklı ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri tanımlanmış ve oksidatif stresle ilişkili hastalıkların tedavisinde etkili olabileceği belirtilmiştir [74].

Farah et al. yaptığı bir çalışmada; mersin bitkisinin esansiyel yağının fraksiyonel distilasyonu sonucunda, 1,8-sineol (% 43), mirtenil asetat (% 25) ve α -pinen (% 10) gibi bileşiklerin yüksek yoğunlukta olduğunu bulmuştur. Bunun yanında aynı çalışmada az da olsa α -terpineol (% 3,8), δ -terpinen (% 2,9) ve geranil asetat (% 2,8) gibi bileşiklerinde bulunduğu raporlanmıştır [70]. Yapılan başka bir çalışmada da esansiyel yağ kompozisyonu benzer şekilde ağırlıklı olarak 1,8-sineol, mirtenil asetat, α -pinen, linalool ve mirtenol gibi terpenlerden oluştuğu bulunmuştur [75].

Mersin yaprakları üzerinde yapılan bir çalışmada; HPLC analizleri ile mersin yaprağı ekstraktlarında bulunan polifenollerin miktarları ve hangi bileşiklerin bulunduğu belirlenmiştir. *Myrtus communis* yapraklarında az miktarlarda fenolik asitler (kafeik, ellajik asit ve gallik asit), kuersetin türevleri (kuersetin-3-O-galaktozid ve kuersetin-3-O-ramnozid) bulunmaktadır, kateşin türevleri (Epigallokateşin, Epigallokateşin-3-O-gallat) ve myricetin türevleri (myricetin-3-Ogalaktozid, myricetin-3-O-ramnozid) yüksek miktarlarda saptanmıştır [69].

Önal vd. yaptığı çalışmada *Myrtus communis*'in güçlü bir şekilde α -glukozidaz enzimini inhibe ettiğini göstermişlerdir. Bunun yanında HPLC ile *Myrtus communis*'ten alınan aktif materyalin sadece fenolik fraksiyonun güçlü α -glukozidaz inhibitörü olarak rol oynadığı gösterilmiştir. Bu gözlemler; *Myrtus communis*'in su ekstraktının fenolik içeriğinin α -glukozidaz inhibisyonuna sebep olabileceğini göstermektedir [18].

Sepici vd. *Myrtus communis* esansiyel yağı ile besledikleri diyabetik tavşanlarda kan glukoz düzeyinin anlamlı derecede düştüğünü tespit etmişlerdir [17]. Yaptıkları başka bir çalışmada da diyabetik tavşanlarda *Myrtus communis* esansiyel yağının glukoz homeostazisini sağladığını ve bununla birlikte lipid peroksidasyonunu önlediğini göstermişlerdir. Aynı çalışmada mersin esansiyel yağının antioksidan enzimleri de anlamlı derecede aktive ettiğini tespit etmişlerdir [2].

2.5. Diabetes Mellitus ve Serbest Radikaller

Son yıllarda yapılan çalışmalar, artmış serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonunun, birçok hastalığın patogeneğinde rol aldığını göstermektedir. miyokard enfarktüsü gibi kardiyolojik hastalıklar, nörolojik hastalıklar, astım, DM, romatoid artrit gibi romatolojik hastalıklar, kanser ve yaşlanma dahil birçok hastalığın oksidatif stres ile ilişkisi gösterilmiştir.

Diabetes mellitus, günümüz insanının yaşam şartlarından dolayı tüm dünyada hızla yayılan, yüksek mortalite ve morbidite riski taşıyan bir hastalıktır. Yapılan çalışmalarda deneysel olarak diyabet oluşturulan ratlarda ve diyabetik hastalarda ROS'un ve lipid peroksidasyonunun önemli derecede arttığı ve oksidatif stresin diabet

etiolojisinde ve ilerlemesinde rolü olduğu bildirilmiştir. Bunlara ilave olarak, uzamış oksidatif stresin ve antioksidan kapasitede görülen değişikliklerin, diyabetin kronik komplikasyonlarının ortaya çıkışı ile de ilişkili olabileceği araştırmacılar tarafından vurgulanmaktadır [76].

Son yıllarda, oksidatif stres rolü üzerine daha fazla dikkat çekilmiştir ve oksidatif stresin sekonder diyabet komplikasyonlarında ortak anahtar rol oynayabileceği üzerinde durulmaktadır. Serbest radikaller normal metabolik süreçte ve çevresel uyarınlar ile ilişkili olarak vücutta sürekli olarak üretilir. Oksidatif stres radikal üretici ve temizleyici sistemlerin dengesizliği sonucunda serbest radikal üretiminin artması veya antioksidan savunma sisteminin aktivitesinin azalması (veya herikisinin bir arada oluşumu) sonucunda oluşmaktadır. Oksidatif stresin DM patogenezindeki katkısının sadece oksijen serbest radikal üretimi ile değil, bunun yanınada non-enzimatik protein glikozilasyonu, glukozun oto-oksidasyonu, bozulmuş glutasyon metabolizması, antioksidan enzimlerdeki değişimler ve lipid peroksitlerin oluşumunun da olduğu öne sürülmektedir [77].

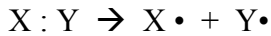
Retinopati, aterosklerotik vasküler hastalıklar gibi DM komplikasyonlarının çoğu oksidatif stres ile ilişkilidir ve antioksidanların tedavi amaçlı kullanılabileceği düşünülmektedir. Bitkiler genellikle flavonoidler ve taninler gibi büyük miktarlarda antioksidanlar içermektedirler. Bu maddelerin DM üzerindeki hipoglisemik etkileri ile ilişkili olarak antioksidan etkilerinin de önemli olduğu düşünülmektedir [77].

2.5.1. Serbest Radikaller

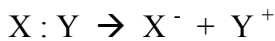
Serbest radikaller için birçok tanım yapılmasına rağmen otoritelerin üzerinde birleştiği tanım; bir serbest radikalın moleküler ya da atomik yörüngesinde bulunan ve genelde çok reaktif olan çiftleşmemiş elektron bulunduran bir kimyasal ürün olduğu şeklindedir. Atomlardaki elektronlar yörünge olarak bilinen boşluklarda hareket ederler. Her yörüngede birbirine zıt yönde hareket eden en fazla iki elektron bulunur [76].

Bir serbest radikal 3 yolla ortaya çıkabilir [76, 78]:

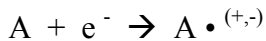
1. Kovalent bağ taşıyan normal bir molekülün homolitik yıkımı sonucu oluşurlar (Bölünme sonrası her bir parçada ortak elektronlardan biri kalır).



2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı ya da bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi ile oluşurlar. Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron, atomlardan birisinde kalır.



3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile oluşurlar.

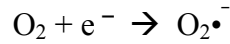


Serbest radikaller, pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötral olabilirler. Biyolojik sistemlerde en fazla elektron transferi ile oluşurlar. Her ne kadar serbest radikal reaksiyonları, bağışıklık sistemi hücrelerinden nötrofil, makrofaj gibi hücrelerin savunma mekanizması için gerekli olsa da, serbest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

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Oksijen, iki elektronu eşleşmemiş şekilde bir elektron dağılımına sahiptir. Bu yüzden bazen oksijen bir radikal olarak değerlendirilir. Oksijen molekülünün reaktif bir özelliği olmamasına rağmen diğer radikallerle reaksiyona girme özelliğine sahiptir [79]. Diyabette ve daha başka birçok hastalığın patolojisinde rol oynadığı düşünülen serbest oksijen radikalleri şunlardır:

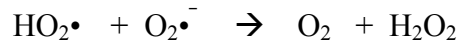
2.5.1.1. Süperoksid Radikali ($O_2^{\bullet -}$)

Oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu, serbest süperoksid anyonu oluşmaktadır [78-80].



Süperoksid, bir serbest radikal olmakla birlikte kendisi direkt olarak fazla zarar vermez. Asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metali iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır [79].

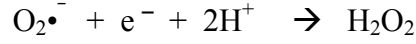
Süperoksid radikali moleküler oksijenin indirgenmesinde ara basamaktır ve oluştuğu yerden fazla uzağa diffüze olamaz. Bu radikalin moleküler düzeyde önemli özelliği, sekonder olarak ürettiği radikallerdir. Doğal oksijen molekülünün başka bir molekülden elektron almış hali olan $O_2^{\bullet -}$ mitokondriyal elektron transfer zincirinde NADH'nin NAD^{+} 'a okside olması ile üretilir. Ayrıca pek çok oksidaz tarafından da üretilir. Süperoksid genel olarak anyon şeklinde tarif edildiği halde, ortamın pH'ına bağlı olarak protonlanarak katyon haline dönüşebilir [79]. Süperoksid düşük pH değerlerinde daha reaktif olup oksidan perhidroksil (HO_2^{\bullet}) radikali oluşturmak üzere protonlanır. Fizyolojik pH'da protonlanmış formu azdır. Süperoksid perhidroksil radikali ile reaksiyona girerse, biri okside olur diğeri de indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonunda oksijen ve hidrojen peroksit meydana gelir [78].



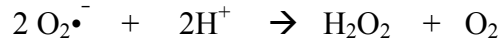
Süperoksid, bir serbest radikal olmakla birlikte, kendisi direkt olarak fazla zarar vermez. Asıl önemli olan, hidrojen peroksit (H_2O_2) kaynağı ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Süperoksid, nötrofillerin bakterisidal aktivitesi, apoptozis, inflamasyon ve vasküler fonksiyonların regülasyonu gibi yararlı etkilere sahiptir. Azalmış süperoksid düzeyleri, bakteriyel enfeksiyonlara artmış bir yatkınlığa yol açabilir. Artmış süperoksid düzeyleri ise süperoksid dismutaz (SOD) enzimi ile hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene dönüştürülerek azaltılır. Böylece hücrel süperoksid düzeyleri sıkı kontrol altındadır. Süperoksidin aşırı üretimi hücrel metabolizmanın aşırı yükselmiş glukoz tarafından bozulduğu durumlarda gerçekleşir. Bu da diyabetin komplikasyonlarına neden olur. ATP sentezi inhibe edilir ve elektron transport zinciri yavaşlar [79].

2.5.1.2. Hidrojen peroksid (H₂O₂)

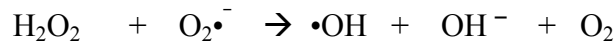
Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden 2 elektron alması veya süperoksidin bir elektron alması sonucu peroksid oluşur. Peroksid molekülü 2 hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksid meydana gelir [78].



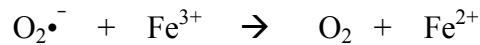
Hidrojen peroksid membrandan kolayca geçebilen, uzun ömürlü bir oksidandır. Ancak, biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin asıl üretimi süperoksidin dismutasyonu ile olur. İki süperoksid molekülü iki proton alarak hidrojen peroksid ve moleküler oksijeni oluştururlar. Reaksiyon sonucu radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden bu bir dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir [79].



Hidrojen peroksid bir serbest radikal olmadığı halde, ROS içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü süperoksid ile reaksiyona girerek, en aktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir [79].



Bu reaksiyona “Haber-Weiss” reaksiyonu adı verilir. Haber-Weiss reaksiyonu ya katalizör varlığında ya da katalizörsüz oluşabilir. Fakat katalizörsüz reaksiyon oldukça yavaş ilerler. Demirle katalizlenen ikinci şekli ise çok hızlıdır. Bu reaksiyonda ferri demir (Fe³⁺) süperoksid tarafından ferro demire (Fe²⁺) indirgenir. Sonra bu ferro demir kullanılarak “Fenton reaksiyonu” ile hidrojen peroksidden •OH ve OH⁻ üretilir. Reaksiyon mekanizması şu şekildedir [78, 80].



2.5.1.3. Hidroksil Radikali (•OH)

Hidroksil, bilinen en reaktif radikaldır. Amino asitler, nükleik asitler, organik asitler, fosfolipidler ve şekerler gibi biyokimyasal maddelerin bir çoğuyla reaksiyona girebilir. Hidroksil radikali, Fenton reaksiyonuyla meydana gelir. Gamma radyasyona maruz kalan dokularda da hidroksil radikali oluşabilir. Alınan enerji hücre suyu tarafından absorbe edilir ve sudaki oksijen-hidrojen kovalent bağının parçalanmasına neden olur. Böylece hidrojen ve oksijen üzerinde dış orbitalde tek elektron kalır ve 2 radikal oluşur. Hidroksilin yarılanma ömrü çok kısadır ve pek çok molekülden hidrojen atomu çıkarılmasını sağlar. Tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak yeni radikallerin oluşmasına sebep olur [78, 79].



2.5.1.4. Singlet Oksijen

Singlet oksijen, ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği gibi serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da sebep olur. Oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spinini ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle oluşur [80].

2.5.1.5. Nitrik Oksit (NO•)

Nitrik oksit, nitrik oksit sentaz (NOS) olarak bilinen sitozolik bir enzimin aktivitesi ile oluşur. Nitrik oksit tek eşleşmemiş elektron içeren küçük bir moleküldür. Nitrik oksit, biyolojik olarak dokularda arjinin ve sitrulinin nitrik oksit sentaz enzimi metabolize edilmesi ile oluşur. Nitrik oksit bol bulunan bir reaktif radikaldir. Önemli bir oksidatif sinyal molekülüdür. Nörotransmisyon, kan basıncı düzenlenmesi, savunma mekanizmaları, düz kas gevşemesi ve immün regülasyon gibi değişik fizyolojik olaylarda önemli rol oynar. Nitrik oksit hücre dışı ortamlarda oksijen ve su ile reaksiyona girerek nitrat ve nitrit anyonlarına dönüşür. Reaktif nitrojen türlerinin fazla üretimi nitrosatif stres olarak isimlendirilir. Sistemde reaktif nitrojen türlerinin oluşumu, sistemin bunları nötralize ve elimine yeteneğini aşması sonucu meydana gelmektedir. Nitrosatif stres nitrosilasyon reaksiyonlarına sebep olabilir ve bu da protein yapılarının değişmesine ve normal fonksiyonlarının inhibe olmasına sebep olur [80].

Vasküler tonun regülasyonunda guanilat siklazı aktive eden NO• major rol oynar. Oksijen bağlanan bölgeye kompetitif bağlanarak direkt olarak sitokrom oksidazın inhibisyonu ile hücresel solunumu düzenler. Nitrik oksit bazı durumlarda bir antioksidan gibi davranır ve lipid peroksidasyonundan korur. Bununla birlikte süperoksid düzeylerinin arttığı durumlarda süperoksitle reaksiyona girer ve bir prooksidan olan peroksinitrit oluşturur. Diyabette görülen endotel fonksiyon bozukluklarından (tartışmalı olmakla birlikte) endoteldeki nitrik oksit üretiminin azalması sorumlu tutulmaktadır. Ancak diyabette NO•'in artmış olduğunu rapor eden araştırmacılar da vardır [79].

Süperoksidin, fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit ile birleşmesi sonucunda reaktif bir oksijen türevi olan peroksinitrit meydana gelir. Böylece NO•'in normal etkisi inhibe edilir. Ayrıca, peroksinitritlerin doğrudan proteinlere zararlı etkileri vardır [78, 80].



2.5.2. Serbest Radikal Kaynakları

Serbest oksijen radikallerinin etkisi sonucu karbon merkezli radikaller (R•), peroksil radikalleri (ROO•), alkoksil radikalleri (RO•), tiyol radikalleri (RS•) gibi önemli serbest radikaller de meydana gelirler. Tiyol radikalleri ise oksijenle tekrar reaksiyona girip sülfenil (RSO•) veya tiyol peroksil (RSO₂•) gibi radikaller meydana getirirler [78].

Serbest radikallerin kaynakları şunlardır [81]:

I - Normal biyolojik işlemler

- 1 - Oksijenli solunum
- 2 - Katabolik ve anabolik işlemler

II - Oksidatif stres yapıcı durumlar

- 1 - İskemi - hemoraji - travma - radyoaktivite -intoksikasyon
- 2 - Ksenobiotik maddelerin etkisi
 - a-) İnhale edilenler
 - b-) Alışkanlık yapan maddeler
 - c-) ilaçlar
- 3 - Oksidan enzimler
 - a-) Ksantin oksidaz
 - b-) İndolamin dioksijenaz
 - c-) Triptofan dioksijenaz
 - d-) Galaktoz oksidaz
 - e-) Siklooksijenaz
 - f-) Lipooksijenaz
 - g-) Monoamino oksidaz
- 4 - Stres ile artan katekolaminlerin oksidasyonu
- 5 - Fagositik inflamasyon hücrelerinden salgılanma (nötrofil, monosit, makrofaj, eosinofil, endotelyal hücreler)
- 6 - Uzun süreli metabolik hastalıklar
- 7 - Diğer nedenler: Sıcak şoku, güneş ışını, sigara

III - Yaşlanma süreci

2.5.3. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller, hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler. Mitokondrideki aerobik solunumu bozar, hücrenin potasyum kaybını ve trombosit agregasyonunu artırır. Proteaz, fosfolipaz, elastaz, siklooksijenaz, XO, lipooksijenaz, triptofan dioksijenaz ve galaktoz oksidaz gibi litik enzimleri aktifleştirirler.

Serbest radikaller, savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacak oranda oldukları zaman organizmada çeşitli bozukluklara yol açarlar. Belirli bir düzeye kadar olabilen oksidan molekül artışı yine vücutta daima belirli bir düzeyde bulunan doğal antioksidan moleküller tarafından etkisiz hale getirilmektedir. Böylece sağlıklı bir organizmada oksidan düzeyi ve antioksidanların bunları etkisizleştirme gücü bir denge içindedir. Oksidanlar belirli düzeyin üzerinde oluşur veya antioksidanlar yetersiz olursa yani denge bozulursa söz konusu oksidan moleküller organizmanın yapı elemanları olan protein, lipid, karbohidrat, nükleik asitler ve yararlı enzimleri bozarak zararlı etkilere yol açarlar. Bu zararlı etkileri şu şekilde özetleyebiliriz [81]:

- Hücre organelleri ve membranındaki lipid ve protein yapısını bozarlar,
- Hücre içi yararlı enzimleri etkisizleştirirler,
- DNA'yı tahrip ederler,
- Mitokondrilerdeki aerobik solunumu bozarlar,

- Elastaz, proteaz, fosfolipaz, lipoksigenaz, siklooksigenaz, ksantinoksidaz, indolamin dioksigenaz, triptofan dioksigenaz, galaktoz oksidaz gibi litik enzimleri aktive ederler,
- Hücrenin potasyum kaybını arttırmaları,
- Trombosit agregasyonunu arttırmaları,
- Dokulara fagosit toplanmasını kolaylaştırırlar,
- Hücre dışındaki kollagen doku komponentlerini, savunma enzimlerini ve transmitterleri yıkarlar,

Biyomoleküllerin büyük sınıfları serbest radikaller tarafından etkilenirler. Bunlardan özellikle lipidler en hassas olanlarıdır. Membran yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünlerini oluştururlar. Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü kendi kendini devam ettiren bir zincir reaksiyonu olarak ilerler. Lipid peroksidasyonu ile oluşan membran hasarı geri dönüşümsüzdür [78].

Membranda bulunan yağ asitleri ve kolesterolün doymamış bağları serbest radikallerle reaksiyona girip peroksidasyona neden olabilir. İlk önce yağ asidi hidrojen ve kendi üzerinde birer elektron kalacak şekilde parçalanır ve lipid radikalini oluşturur. Lipid radikali de oksijenle reaksiyona girerek lipid peroksil radikalini oluşturur. Lipid peroksil radikali de diğer doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girer. Böylece zincirleme bir reaksiyon başlamış olur. Ayrıca lipid peroksidler ortamdaki hidrojen atomları ile de reaksiyona girerek lipid hidroperoksidleri de oluştururlar. Lipid peroksidler daha sonra malondialdehid (MDA) ve 4-hidroksi nonenal gibi yıkım ürünlerine dönüşürler. Bu yıkım ürünleri de DNA veya proteinlerle reaksiyona girebilir ve mutajeniktirler. Üç veya daha fazla çift bağa sahip yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu MDA oluşmaktadır. Bu da tiyobarbitirik asid reaktif maddeler olarak ölçülmektedir. MDA lipid peroksidasyonunun şiddetiyle orantılı olarak artar, ancak spesifik değildir. Aynı zamanda membran bileşenlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağlanmasına neden olabilir [79, 80].

Proteinler serbest radikallerin etkisine karşı, poliansatüre yağ asitlerinden daha az hassastırlar. Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden etkilenme dereceleri yapılarında bulunan aminoasit çeşitlerine bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğundan triptofan tirozin, fenil alanin, histidin, metiyonin, sistein gibi aminoasitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli radikaller meydana gelirler. Bu reaksiyonlar sonucu disülfür bağı içeren birçok proteinin üç boyutlu yapıları bozulur ve normal fonksiyonlarını meydana getiremezler [78].

Serbest radikaller aracılığıyla hasara uğrayan bir diğer biyomolekül grubu da nükleik asitler ve DNA'dır. Hidroksil radikalının DNA molekülü ile reaksiyona girdiği, pürin ve primidin bazlarına, ve hatta deoksiriboz iskeletine hasar verdiği bilinir. En yoğun çalışılan DNA hasarı 8-hidroksi-20-deoksiguanozin oluşumudur [80]. Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlarla rahatça reaksiyona girer ve daha

sonra hücrede değişikliklere sebep olur. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit membranlardan kolayca geçerek hücre çekirdeğine ulaşır ve DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. Bu yüzden DNA, serbest radikallerden kolay zarar görebilir bir hedefdir [78].

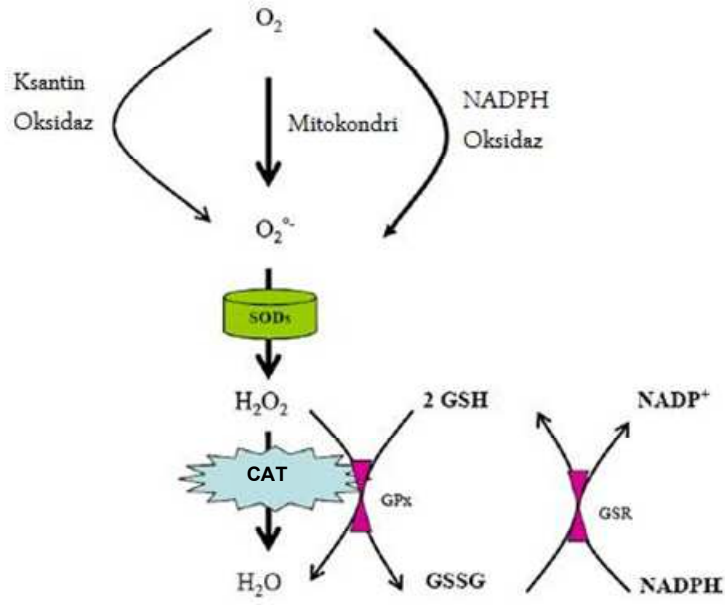
Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerine de önemli etkileri bulunmaktadır. Monosakkaritlerin oksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelir. Bu bileşikler, diyabet ve bunun gibi çeşitli hastalıkların patolojik sürecinde önemli rol oynarlar [80].

2.5.4. Antioksidan Savunma Sistemleri

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunlar antioksidan savunma sistemleri veya kısaca antioksidanlar olarak bilinirler [78]. Oksidanları inaktif hale getiren maddelere antioksidanlar denir. Normal sağlıklı kişilerde serbest radikaller/antioksidanlar denge halindedir. Diyabette ise bu denge serbest radikaller lehine bozulmuştur. Bu da diyabetin komplikasyonlarına neden olmaktadır. İşte bu antioksidan mekanizmaları daha aktif hale veya bozulmuş bu dengeyi antioksidanlar lehine artırabilirsek diyabetin komplikasyonlarıyla başa çıkabiliriz. Antioksidanlar 4 farklı mekanizma ile oksidanları etkisizleştirirler:

1. Scavenging (temizleme) etkisi: Oksidanları zayıf bir moleküle çevirme şeklinde olan bu etki enzimler tarafından yapılır.
2. Quencher (baskılama) etkisi: Oksidana bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirme şeklinde olan bu etki vitaminler ve flavonoidler tarafından yapılır.
3. Onarma etkisi
4. Zincir koparma etkisi: Oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını engelleyen ağır metaller şeklinde olan bu etki hemoglobin, seruloplazmin ve E vitamini tarafından yapılır [79].

Süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksitaz (GPx) ve katalaz (CAT) içeren enzimler, enzimatik antioksidanlar olarak anılırlar. Enzimatik olmayan antioksidanlar askorbik asit (vitamin C), α -tokoferol (vitamin E), glutatyon (GSH), karotenoidler, flavonoidler ve bunlara benzer diğer antioksidanları içerirler. Normal şartlar altında, heriki aktivite arasında ve bu antioksidanların hücre içi seviyeleri denge mevcuttur. Bu denge organizmaların hayatta kalmasında ve sağlıklı olmaları için esansiyeldir [80].

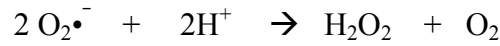


Şekil 2.7 Serbest radikallerin oluşum ve ortadan kaldırılmasında temel mekanizmalar

2.5.5. Antioksidan Enzimler

2.5.5.1. Süperoksid Dismutaz (SOD)

Mc Cord ve Fridovich tarafından ilk kez 1968 yılında tanımlanmıştır. Süperoksid dismutaz (EC 1.15.1.1) enzimi süperoksidin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler [82-84].



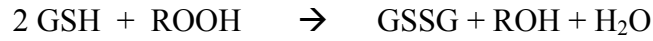
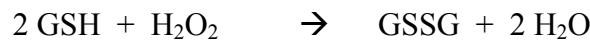
Süperoksid dismutazın katalize ettiği reaksiyonun spontan reaksiyonundan binlerce kat hızlıdır. Süperoksid dismutazın insanda 2 tipi bulunmaktadır. Bunlar sitozolde bulunan dimerik Cu-Zn SOD ve mitokondride bulunan tetramerik Mn SOD izomerleridir. Bunun dışında prokaryotik organizmalarda bulunan Fe-SOD izoformu da bulunmaktadır [82, 83, 85]. Genel olarak hücrede en bol bulunan izomer sitozolik Cu-Zn SOD'dir. Cu-Zn SOD 21 nolu kromozomda Mn SOD 6 nolu kromozomda lokalizedir. Her iki SOD izomerinin katalizlediği reaksiyon aynıdır [84].

Enzimin fizyolojik fonksiyonu; oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksid serbest radikalının zararlı etkilerinden korumaktır. Böylece lipid peroksidasyonunu inhibe eder. SOD aktivitesi yüksek oksijen kullanımımolan dokularda fazladır ve dokudaki oksijen basıncının artması ile artar. Bu enzim sayesinde intraselüler süperoksid düzeyleri düşük tutulur [78].

2.5.5.2. Glutasyon Peroksidaz (GPx)

Glutasyon peroksidaz (GPx), elektron donörü olarak redükte glutasyon (GSH) kullanarak peroksitlerin detoksifiasyonunda ana rol oynamaktadır. GPx, aktif merkezinde selenosistein içerir ve peroksit detoksifikasyonunda önemli bir role sahiptir. Selenyum- bağımlı GPx'in memelilerde bulunan en az 4 izozimi vardır. Sitosolik form olan GPx1 dokularda yaygın olarak bulunur ve en çok araştırılan

formdur. GPx2 gastrointestinal form olarak kodlanmıştır ve üremede bilinen spesifik bir fonksiyonu yoktur. GPx3 plazmada ve epididimal sıvıda bulunan formdur. GPx4 spesifik olarak fosfolipid hidroperoksit detoksifikasyonunda rol oynayan bir izoformdur, PhGPx olarak da isimlendirilir ve testislerde yüksek oranlarda ekspresse edilir [85, 86]. Tüm GPx izoformları redükte peroksitlere selenollerin (Se-OH) oluşumu vasıtasıyla iki elektron aktarırlar. Bu selenoenzimlerin antioksidan özellikleri Fenton reaksiyonu için potansiyel substrat olan peroksitlerin ortadan kaldırmasını sağlamaktadır. GPx bir tripeptid olan ve hücrelerde yüksek konsantrasyonlarda (mikromolar) bulunan GSH ile birleşimde rol oynar. GPx'in katalitik reaksiyonu için substrat H₂O₂ ya da organik peroksitlerdir (ROOH). GPx peroksitleri suya (veya alkole)ve bileşenlerine ayırır, aynı zamanda GSH'ı okside eder [87].



Hidroperoksitlerin redükte olması ile meydana gelen GSSG, glutatyon redüktazın katalizlediği reaksiyon ile tekrar GSH'a dönüşür [88, 89]. Bu reaksiyon aşağıda gösterilmiştir:



Glutatyon redüktaz yükseltgenmiş glutatyonu indirgenmiş hale çeviren 2 subünitten oluşmuş bir dimerdir. Her bir subünit 3 tane yapısal alan içerir: NADPH bağlayan alan, FAD bağlayan alan ve ara yüz alan olmak üzere. Okside glutatyon bir subünitin FAD alanı ve diğer subünitin arayüz alanından oluşan bir bağlanma bölgesi vardır. Glutatyonun indirgenme reaksiyonu sırasında sıklıkla elektronlar NADPH'dan FAD'ye transfer edilir. Daha sonra subünitlerdeki iki sistein arasında bulunan disülfid köprüsüne transfer edilmek suretiyle okside glutatyon aktarılmış olur. Yapılan çalışmalarda diyabette glutatyon redüktaz aktivitesinin azalmış olduğu belirtilmektedir [79].

GPx'in, fagositik hücrelerde önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GPx, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmelerini engeller. GPx aktivitesi düşük olan makrofajlarda zimosanla başlatılan solunum patlamasını takiben, hidrojen peroksit salınımının arttığı gösterilmiştir. Eritrositlerde de GPx oksidan strese karşı en etkili antioksidandır. GPx aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksidin artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar [78].

2.5.5.3. Katalaz

Sumer ve Dounce tarafından 1937'de kristalize halde saflaştırıldı. Her biri bir prostetik grup olan ve yapısında Fe⁺³ bulunduran 4 hem grubundan oluşmuş bir hemoproteindir. Peroksizomlarda lokalizedir. SOD'ın oluşturduğu H₂O₂'i katalaz peroksidazlarla beraber oksijen ve suya parçalar. Katalaz aktivitesi eritrosit, karaciğer ve böbrekte yoğundur [13, 78, 90].



Glutasyon peroksidazın H_2O_2 'e karşı K_m 'i katalaza göre daha düşüktür. Yani düşük konsantrasyonlarda H_2O_2 'i glutasyon peroksidaz parçalar, yüksek konsantrasyonlarda ise katalaz aktivite kazanır [88].

Katalaz, hücreleri oksijen toksisitesine ve lipid peroksidasyonuna karşı koruyan, hidrojen peroksidi su ve oksijene dönüştürürken, SOD ve GPX ile birlikte fonksiyon gösteren enzimatik antioksidan sistemidir. Memeli sistemlerinde, karaciğer ve böbrek gibi yüksek konsantrasyonlarda katalaz içeren organlarda endojen H_2O_2 seviyesi düşüktür ve akciğerler ve kalp gibi düşük konsantrasyonlarda katalaz içeren organlarda endojen H_2O_2 'e konsantrasyonu yüksektir [91].

2.5.5.4. Glutasyon S Transferaz

Glutasyon-S transferazlar (GST) her biri iki alt birimden oluşan bir enzim ailesi olup ilk defa 1961 yılında tanımlanmışlardır. Başta araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksidlerine karşı GST'ler Se-bağımsız GSH peroksidaz aktivitesi göstererek bir savunma mekanizması oluştururlar. Bu mekanizma aşağıda özetlenmiştir[78]:

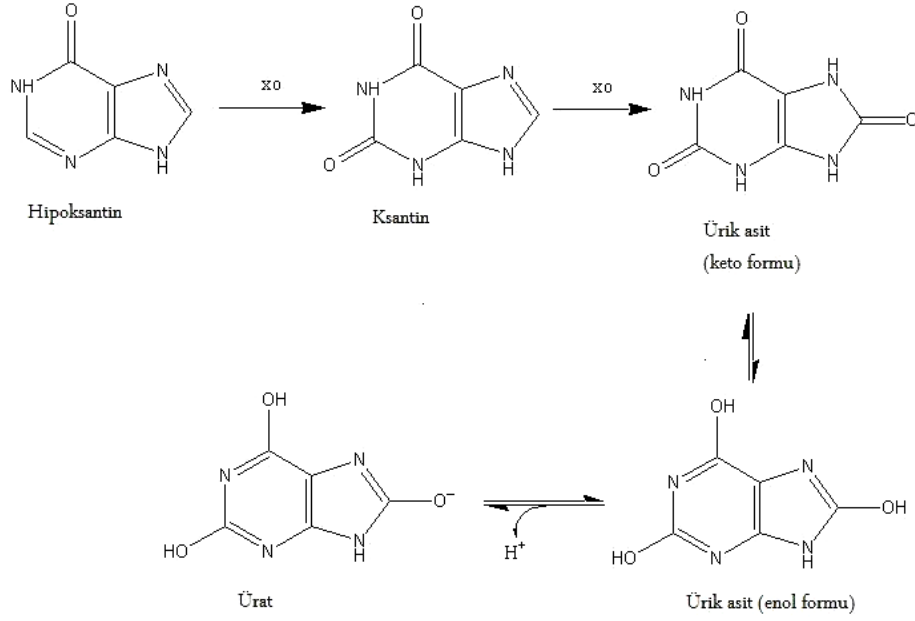


Toksik metabolitlerle glutasyonun konjugasyonunu katalizleyen GST enzimi de toksik metabolitlerin detoksifikasyonuna yol açan başka bir antioksidan enzimdir. Yapılan çalışmalarda diyabette antioksidan enzimlerin arttığı veya azaldığı şeklinde raporlar vardır. Ancak diyabette kesin olarak antioksidan sistemlerde bozukluk vardır [79].

GST'ler, reaksiyonlarında glutasyon kullanarak karsinogenler, terapötik ilaçlar ve oksidatif stres ürünleri gibi çeşitli bileşiklerin dönüşümünü sağlayan bir enzim ailesidir. GST'ler α , μ , π , σ ve θ gibi sınıflara ayrılırlar. Bunlardan μ GST-M1- M5'e kadar olan farklı izoenzim gruplarına ayrılmaktadır [87].

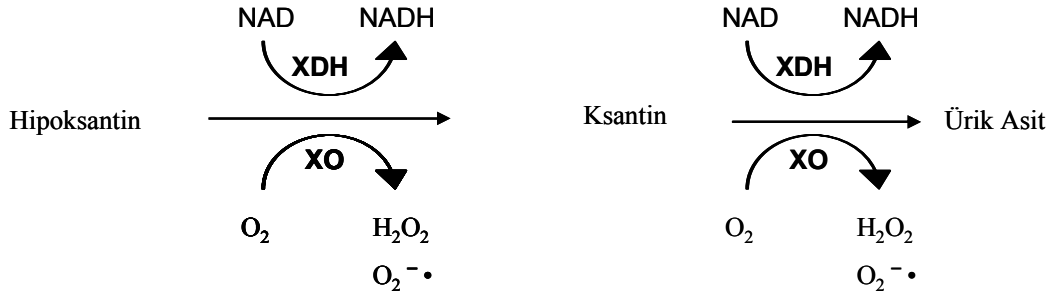
2.5.6. Ksantin Oksidoredüktaz

Ksantin oksidoredüktaz (XOR), ilk kez Schardinger tarafından 1902'de aldehit oksidaz (AO) enzimi olarak sütte tanımlanmıştır. XOR, insanlardan bakterilere kadar birçok canlıdan izole edilmiş bir enzimdir. Pürin metabolizmasında, ürik asit oluşumunun son iki basamağında, hipoksantin'in ksantine hidroksilasyonunu katalizleyen bir enzimdir (Şekil 8) [92, 93]. Molibdoenzim ailesinin iyi korunmuş bir üyesidir ve AO ve sülfite oksidaz içerir. XOR, molibdopterin (Mo-Co), iki adet demir-sülfür ($\text{Fe}_2\text{-S}_2$) merkezi ve flavin dinükleotid (FAD) kofaktörlerine sahiptir [94].



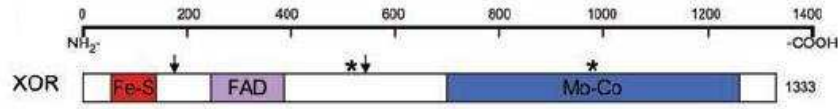
Şekil 2.8 Ksantin oksidoredüktazın katalizlediği reaksiyonlar

Ksantin oksidoredüktazın, XO ve ksantin dehidrogenaz (XDH) olmak üzere değişebilir iki formu vardır. Bunların arasındaki fark; XDH, NAD⁺'ı elektron alıcısı olarak kullanırken; XO, O₂'yi elektron alıcısı olarak kullanır ve hidrojen peroksit oluşturur.(Şekil 9) Ancak her iki form da hipoksantinden ksantin oluşumunu ve ksantinden ürik asit oluşumunu katalizler [94].

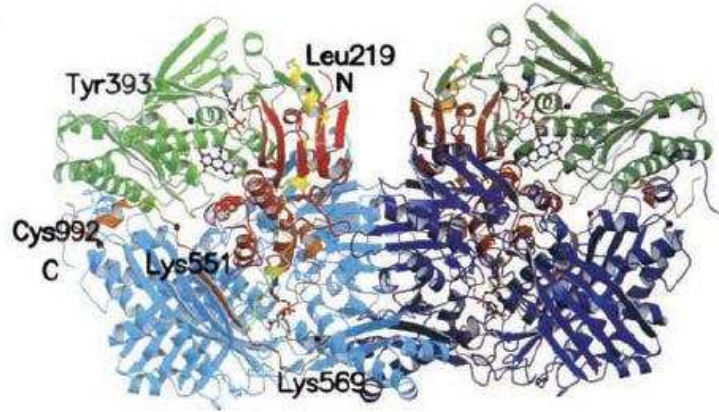


Şekil 2.9 Ksantin oksidaz ve ksantin dehidrogenaz formları arasındaki fark

İnsanlarda kodlanan XOR geni 60 kb'dan büyük, 36 exon içeren ve 2. kromozomun kısa kolunda bulunan bir gendir. 3999 bp ve 1333 aminoasit içerir. Ksantin oksidoredüktaz yaklaşık 300 kDa ağırlığında, katalitik olarak bağımlı iki alt üniteye sahip, homodimer yapıları bir proteindir. Her alt ünite, spesifik kofaktörlerin bağlı olduğu üç domain bulunur.(Şekil 10) N-terminal domaini (1–165. aminoasitler), her biri 4 sistein rezidüsü ile birleşmiş Fe₂-S₂ merkezli 2 sub-domainden oluşur. Bağlantı peptidi (226–531. aminoasitler) sıkı bir şekilde bağlanmış olan FAD taşıyan ara domain ile birleşmiştir. Diğer bağlayıcı peptid FAD domainini C-terminal domainine (590-1332. aminoasitler) bağlamıştır. C-terminal domaini en uzun domaindir ve Mo-Co bağlı bölgesi bulunmaktadır [94].



N-terminus	2Fe ₂ S ₂	aa 1-165
Intermediate	FAD	aa 226-531
C-terminus	Mo-Co	aa 590-1332



Şekil 2.10 Ksantin oksidoredüktaz sekonder ve tersiyer yapısı [94]

Ksantin dehidrogenaz ve XO hipoksantin ve ksantin gibi substratlara yüksek affiniteye sahiptirler. Omurgalılarda, dehidrogenaz formu tercihen NAD⁺'yi NADH'a redükler. Redüklenmiş XO, elektronları oksijene transfer etmek suretiyle, ya süperoksit ya da hidrojen peroksit üretir [95]. Mo-Co ve FAD arasındaki molekül içi elektron transferine, elektron havuzu veya alıcısı olarak görev alan Fe₂-S₂ merkezleri aracılık eder. Elektronlar, FAD'dan NAD⁺'ye ya da O₂'ye aktarılır. Tam olarak redüklenmiş XO'nun reoksidasyonunda ilk iki basamağı, iki elektronun O₂'ye transferi ve hidrojen peroksitin oluşumudur. Daha sonra XO, geriye kalan elektronlarını ayrı basamaklarda transfer eder, O₂'yi redükleyerek süperoksit radikalini üretir. Böylece, tamamıyla redüklenmiş XO'nun tam anlamıyla reoksidasyonu 2 H₂O₂ ve 2 O₂ sağlar. İlginç bir şekilde, oksijen ile reaksiyona giren FAD'ın daha iyi termodinamik stabilitesinden dolayı, XDH her bir oksijen molekülü için daha fazla süperoksit radikali oluşturur. Ancak, süperoksit radikalinin üretiminde daha etkili olmasına rağmen, XDH oksijen ile yavaş bir şekilde reaksiyona girer. Ksantin dehidrogenazın süperoksit üretimindeki maksimal hızı, XO'nun V_{max}'ının % 25'i kadardır. Bu yavaş reaksiyon hızına ilaveten, NAD⁺ XDH'a hızlı bağlandığından dolayı kritiktir. Bu yüzden O₂ oldukça zayıf bir yarışçıdır. Ksantin

oksidoredüktazdan NAD^+ 'ya elektron transfer mekanizması O_2 'ninki kadar iyi açıklanmamıştır [94].

Ksantin oksidoredüktaz- türevli ROS hem dokuların yapısal hasarında hem de hücre sinyal iletiminin engellenmesine sebep olur. Klasik olarak ROS membran yapısının bozulması ve lizozomal enzimlerin salınımı ile sonuçlanan lipid peroksidasyonuna, genetik mutasyonlar ve enzim disfonksiyon ya da proteolizise sebep olan DNA ve aminoasit oksidasyonuna sebep olabilmektedir. Ksantin oksidoredüktaza gelince oksidatif hasar, sıklıkla süperoksid ve hidrojen peroksid vasıtasıyla oluşur. 1981'de Granger et al. XOR-türevli ROS'un iskemi-reperfüzyon durumunda oluşan hasarının nedeni olarak göstermiştir [94]. Ksantin oksidoredüktazın aterosklerotik plaklarda bulunduğu gösterilmiştir. Bu plaklarda lokal ürik asit konsantrasyonunun 5-6 kat arttığı ve XOR aktivitesinin upregüle olduğu gösterilmiştir [96]. Swei et al., yaptığı bir çalışmada; XOR'ı inhibe eden tungsten-indüklü diyet, Dahl tuz-duyarlı hipertansif ratlarda başarılı bir şekilde kan basıncını düşürmüştür, tuza dirençli ratlarda herhangi bir etkisi olmamıştır. Bu sonuçlar XOR-türevli ROS'un tuz indüklü hipertansiyonda potansiyel bir rolü olduğunu göstermektedir [97]. Ksantin oksidoredüktaz aktivitesine bağımlı olarak, ürik asit seviyelerinin kan basıncı korele olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur [98].

MATERYAL ve METOD

3.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada, ağırlıkları 200–300 gram arasında değişen erkek albino Wistar sıçanlar kullanıldı. Denekler üzerinde yapılan tüm işlemler Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanı Bakım ve Kullanım Kurulu tarafından değerlendirildi ve onaylandı. Sıçanlar her kafeste 5 hayvan olacak şekilde muhafaza edildi. 12 saatlik aydınlık karanlık periyodunda, 22 ± 2 °C sıcaklık ve $50\pm 5\%$ nem içeren koşullarda, sınırsız miktarda yem ve musluk suyu ile beslendiler. Deney planı başlangıçta diyabetli hayvanlarda ölümler olabileceği düşünülerek, her grupta 15 hayvan olacak şekilde yapıldı. Bu gruptaki sıçanlarda çok sayıda ölüm olduğundan diyabet kontrol grubunda 11, diyabet-myricetin grubunda 10, diyabet-mersin grubunda 10, kontrol grubunda da 13 sıçan deney sürecini tamamlayabildi. Gruplar:

- Grup1: Kontrol
- Grup2: Diyabet kontrol
- Grup3: Diyabet-Myricetin
- Grup4: Diyabet-Mersin

3.1.1. Grupların Oluşturulması

Kontrol Grubu (K) (n=13): Bu gruptaki sıçanlara herhangi bir uygulama yapılmadı.

Diyabet Grubu (D) (n=11) : Bu gruptaki sıçanlara intraperitoneal tek doz STZ uygulandı.

Diyabeti-Myricetin Grubu (D-Myr) (n=10): Bu gruptaki sıçanlara intraperitoneal tek doz STZ uygulandı. Diyabetik nefropati oluşumu belirlendikten sonra 3mg/12 saat Myricetin intraperitoneal enjeksiyon yolu ile 10 gün boyunca uygulandı

Diyabet-Mersin Grubu (D-M) (n=10): Bu gruptaki sıçanlara intraperitoneal tek doz STZ uygulandı. Diyabetik nefropati oluşumu belirlendikten sonra 250 mg mersin ekstraktı 10 gün boyunca gavaj yolu ile uygulandı.

3.1.2. Diyabet Oluşturulması

Albino Wistar ratlarında diyabeti sağlamak için streptozotosin (STZ, Sigma, USA) enjekte edilmiştir. Diyabet oluşturulacak sıçanlara bir günlük açlığı takiben, 0,1 M'lık soğuk sitrat tamponunda (pH=4,5) hazırlanmış 50 mg/kg STZ taze bir şekilde intraperitoneal olarak tek doz enjekte edildi. Enjeksiyonu takiben sıçanların

kafesine su yerine % 10'luk sükröz çözeltisi konuldu ve 1 gün boyunca içmeleri sağlandı.

3.1.3. Kan Şekeri Ölçümü

Tüm kan şekeri ölçümleri Accu-Check Go (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) marka glukometre ve Accu-Check Go (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) marka strip kullanılarak yapıldı. Streptozotosin enjeksiyonundan 72 saat sonra sıçanların kuyruk veninden alınan kanlarda açlık kan şekeri (AKŞ) tayini yapıldı ve AKŞ değerleri 200 mg/dl'yi geçen ratlar diyabetik olarak kabul edildi.

3.1.4. Myricetin ve Mersin Ekstraktının Hazırlanışı ve Uygulaması

Myricetin 500 µl'de 3 mg olacak şekilde izotonik solüsyon içerisinde çözüldü ve sıçanlara 3 mg/12 saat olmak üzere günde 2 kez intraperitoneal enjeksiyon yoluyla 10 gün boyunca verildi. Mersin bitkisi ekstraktı izotonik solüsyon ile çözülerek, içerisinde yaklaşık 6 mg myricetin içerecek şekilde 250 mg/gün olarak gavaj yoluyla 10 gün boyunca uygulandı. Böbrek fonksiyonlarının ölçüldüğü 16. haftadan sonra myricetin ve mersin ekstraktı 10 gün boyunca ratlara uygulandı. Mersin bitkisi ekstraktının myricetin içeriği HPLC ile oluşturulan standart eğri kullanılarak hesap edildi.

3.1.5. İdrar ve Kan Numunelerinin Toplanması ve Sıçanların Kesimi

Açlık kan şekeri 200 mg/dl üzerinde ölçülen ratlar tedavi sürecinin başlangıcında (16. hafta; 0. gün), 2. gün, 6. gün ve 10. günlerde metabolik kafeslere konarak 24 saatlik idrar örnekleri toplandı. Toplanan idrarların hacimleri ölçüldü. Kan örnekleri tedavi süresince kuyruk veninden toplandı. Bununla birlikte diyabet sürecinin başlangıcında ve kesim öncesi sıçanların ağırlıkları ölçüldü. 10. günün sonunda aç bırakılan hayvanlar üretan anestezisi ile bayıltılarak kan ve dokuları toplandı. Kan ve idrar örnekleri taze olarak çalışıldı. Alınan doku örnekleri de çalışılana kadar -70 °C'de muhafaza edildi.

3.1.6. Kreatinin Tayini

İdrar ve serum kreatinin ölçümleri, tüm gruplarda Jaffe metoduna göre yapıldı [99, 100].

Prensip:

Bu deneyin prensibi, kreatininin alkali ortamda pikrik asitle birleşerek turuncu kırmızı renkli bir bileşik oluşturması ve bu bileşiğin absorbansının spektrofotometrede 500 nm'de okunması esasına dayanır.

Reaktifler:

- 1) Pikrik asit: 33 mM
- 2) NaOH : 0,4 M

Deneyin Yapılışı:

Pikrik asit ve NaOH reaktifleri eşit oranda karıştırıldı. Deneyden 5–10 dakika önce numuneler ve reaktif 37°C'lik su banyosuna kondu.

	Kör	Standart	Numune
Pikrik asit-NaOH karışımı	1mL	1mL	1mL
Distile su	100µL	-	-
Standart (2 mg/dL kreatinin)	-	100µL	-
Numune (serum veya 1/20 dilüe idrar)	-	-	100µL

Tüpler iyice karıştırıldıktan sonra 30, ve 90, sn'lerde spektrofotometrede 500nm'de absorbansları ölçüldü.

Hesap:

$$[(A_{90} - A_{30})_{\text{numune}} / (A_{90} - A_{30})_{\text{standart}}] \times 2 = \text{mg/dL kreatinin}$$

$$\text{mg/dL kreatinin} \times 88,4 = \mu\text{mol/L kreatinin}$$

Kreatinin klirensinin hesaplanması:

İdrara ve serum kreatin deneylerinden elde edilen sonuçlar aşağıdaki formülde yerine konularak kreatinin klirensi hesaplandı.

$$C = (U \times V) / P$$

C: klirens

U: idrardaki kreatinin hacmi

V: bir dakikadaki idrar hacmi (mL)

P: plazmadaki kreatinin miktarı

3.1.7. İdrarda Protein Tayini

İdrarda protein tayini biüret metoduna göre yapıldı [101].

Prensip:

Proteinlerdeki peptit bağlarının bazik ortamda Cu^{+2} iyonları ile menekşe renkli bakır-peptid bağı-protein kompleksi oluşturmaları ve bu kompleksin absorbansının 545 nm de spektrofotometrik olarak değerlendirilmesi prensibine dayanır

Reaktifler:

1)Biüret reaktifi:

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (3 g)

Sodyum potasyum tartarat ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (9 g)

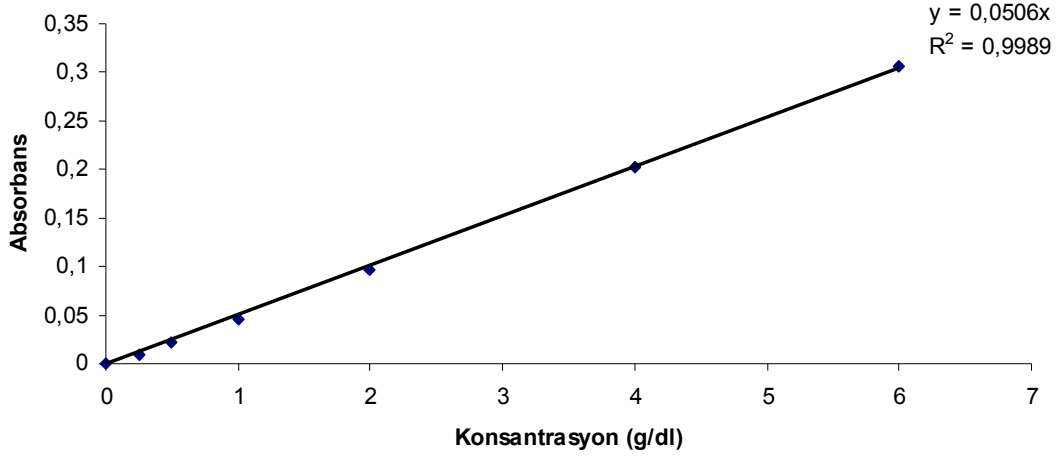
NaOH %10'luk 300 ml

KI (5 g)

Bakır sülfat bir miktar distile suda çözülür. Sodyum potasyum tartarat bir miktar distile suda çözüldü ve bakır sülfat ile karıştırıldı. Bu karışım 300 ml %10 NaOH ile yavaş yavaş karıştırıldı. KI'da eklendikten sonra son hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı. Oda ısısında uzun süre stabildir.

2) Protein standartı

Bovine serum albumin (BSA) kullanıldı. 0.25 g/dl, 0,5 g/dl, 1 g/dl, 2 g/dl, 4 g/dl ve 6 g/dl konsantrasyonları kullanılarak, Şekil 3.1'deki protein standart grafiği ile idrarda protein miktarı hesaplandı.



Şekil 3.1 İdrar Proteini Standart Grafiği

Deneyin Yapılışı:

Bir deney tüpüne 0,5 ml idrar konuldu (İdrar berrak değilse whatman no.1 filtre kağıdında süzülmelidir). Üzerine 0,5 ml % 5 TCA ilave edildi. Karıştırıldı ve oda ısısında 5 dakika bekletildikten sonra 4000–5000 devirde 10 dk santrifüj edildi. Sonra süpernatant atılır ve tüp baş aşağı süzgeç kağıdı üzerine çevrilerek süzülmesi sağlandı. Bu esnada çökeleğin zarar görmemesine dikkat edildi. Daha sonra aşağıdaki şekilde çalışmaya devam edildi.

Reaktif	Kör	Numune	Standart
İdrar	--	Çökelek	--
Standart	--	--	0,1 ml
Büret reaktifi	5 ml	5 ml	5 ml

Numune tüpü vorteksle iyice karıştırılarak çökeleğin dağılması sağlandı. Bu tüpler oda ısısında 20 dk bekledikten sonra 545 nm'de köre karşı okundu ve protein standart grafiği kullanılarak sonuç hesaplandı.

3.1.8. Kan Üre Azotu (BUN) Tayini

Tüm gruplara ait ratların serumlarındaki BUN/Üre seviyeleri Roche/Hitachi marka modüler sistem otoanalizörde ölçüldü [102]. Deneyin prensibi; üre, üreaz enzimi varlığında CO₂ ve amonyağa parçalanır. Oluşan amonyak, α-ketoglutarat ve NADH ile reaksiyona girerek, L-glutamat, NAD⁺ ve su oluşur. NADH absorbansındaki düşüş kinetik olarak ölçülerek üre miktarı bulunur.

3.1.9. Ksantin Oksidaz ve Dehidrogenaz Tayini

Ksantin oksidaz/dehidrogenaz enziminin aktivitesi Beckman et al.'un yaptığı spektrofotometrik yöntem modifiye edilerek ölçüldü.

Prensip:

Ksantin oksidazın pterin (2-amino-4-hidroksipteridin)'i fluoresans veren bir ürün olan izoksantopterin oksidasyonunu sağlamasına dayanan bir yöntemdir [103]. Deney ortamına bir elektron alıcısı olan metilen mavisi eklenerek bir sonraki aşamada XDH aktivitesinin toplamı ölçülür. Ölçüm eksitasyon 345nm, emisyon 370nm'de spektrofotometrede yapılır.

Reaktifler:

- 1) İzoksantopterin (1mM)
- 2) Standart Tampon (pH 7.8, 50 mM K₂HPO₄; 0.1 mM EDTA)
- 3) Pterin (1mM)(100µl NaOH içeren 10 ml distile su ile hazırlanır.)
- 4) Metilen mavisi (1mM)

Deneyin Yapılışı:

	1.XO	2.XDH	3.İzoksantopterin Standardı (XO için)	4.İzoksantopterin Standardı (XDH için)
Tampon (µl)	1910	1910	1920	1920
Numune (µl)	10	10	-	-
İzoksantopterin (µl)	-	-	20	20
Metilen Mavisi (µl)	-	20	-	20
Pterin (µl)	20	20	-	-
Toplam volüm	1940	1960	1940	1960

1. Numunedeki XO aktivitesini tayin etmek için; 1910 µl tampon içerisine 10µl numune eklendi. Üzerine 20 µl pterin eklenerek, spektrofotometre eksitasyon 345nm ve emisyon 370 nm'de 0. ve 1. dakikalardaki fluoresansları ölçülür. $\Delta F = F_{1.dk} - F_{0.dk}$ hesaplandı.

2. Numunedeki XDH aktivitesini tayin etmek için; 1910 µl tampon içerisine 10µl numune eklendi. Üzerine 20 µl metilen mavisi ve 20 µl pterin eklenerek 0. ve 1. dakikalardaki fluoresansları ölçüldü. ΔF hesaplandı.

3. Standart olarak izoksantopterin kullanıldı. XO aktivitesini tayin etmek için; 1920 µl tampon içerisine 20 µl izoksantopterin eklenerek 0. ve 1. dakikalardaki fluoresansları ölçüldü. ΔF hesaplandı.

4. Ksantin dehidrogenaz aktivitesini tayin etmek için; 1920 µl tampon içerisine 20µl izoksantopterin eklendi. Üzerine 20 µl metilen mavisi eklenerek 0. ve 1. dakikalardaki fluoresansları ölçüldü. ΔF hesaplandı.

Enzim Aktivitesinin Hesaplanması:

Enzim aktivitesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanır.

$$U = [(\Delta F \times 0,1) / F_{\text{izoksantopterin}}] \times 0,001 \times DF$$

U: Enzim aktivitesi

ΔF : Fluoresansta bir dakikada meydana gelen değişiklik

Fizoksantopterin: İzoksantopterin fluoressansında bir dakikada meydana gelen değişiklik

DF: Dilüsyon faktörü (Küvetteki toplam hacim / numune hacmi)

3.1.10. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Tayini

Glutasyon peroksidaz aktivitesi Paglia ve Valentina'nın birleşik enzimatik yöntemi modifiye edilerek tayin edildi [104].

Prensip:

Birinci aşamada redükte GSH, GPx tarafından katalizlenen bir reaksiyonda t-bütil hidroperoksit (t-BuOOH) kullanılarak okside edilir. İkinci aşamada ise ortama eksojen olarak eklenen GR yine ortama eksojen olarak eklenen NADP'yi kullanarak okside glutasyonu yeniden redükler. Bu sırada 340 nm'de NADPH absorbansındaki azalma ölçülür.

Reaktifler:

1) Fosfat tamponu (50 mM, pH = 7.2) K_2HPO_4 / KH_2PO_4 kullanılarak hazırlanır. tampon kahverengi şişede, 4 °C'de 1 yıl stabildir.

Reaksiyon karışımı

2) EDTA (0.3 mM)

3) NADPH (0.1mM)

4) GR (0.5 U)

5) Sodyum azid (NaN_3) (0.5 mM)

Bu maddeler uygun miktarlarda tartılarak, fosfat tamponu içinde çözülür.

6) Redükte glutasyon (GSH) (2.5mM)

8) t-BuOOH (0.4 mM)

Deneyin Yapılışı:

Tüm dokulardan elde edilen süpernatantların her biri için, bir GSH içeren (GSH+) ve bir de GSH içermeyen (GSH-) olmak üzere iki tüp hazırlandı.

	GSH (+) numune tüpü	GSH (-) numune tüpü
Reaksiyon karışımı (µL)	750	750
Doku süpernatanı (µL)	50	50
GSH (µL)	100	□
Distile su (µL)	□	100
t- BuOOH (µL)	100	100

t- BuOOH eklenmesi ile birlikte 37°C'de 340 nm'de hem GSH (+) hem de GSH(-) numunelerinin 3'er dakikalık ölçümleri yapıldı.

Aktivitenin hesaplanması:

GSH (+) ve GSH(-) numunelerine ait ölçümleri ΔOD 'si bulunur.

$$\text{GSH-Px aktivitesi(U/g protein)} = [\text{GSH}(+) \Delta OD - \text{GSH}(-)\Delta OD \times 10^5] / [311 \times \text{protein g/dL}]$$

3.1.11. Protein Tayini

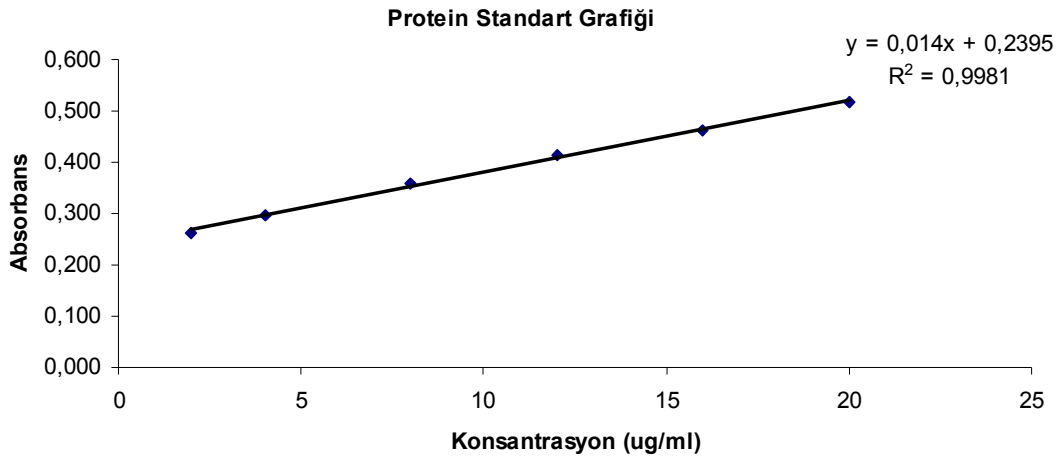
Böbrekte protein tayini modifiye Bradford yöntemine esas alan kit ile yapıldı [105].

Reaktifler:

- 1) Standart solüsyon: 2 mg/ μl bovine serum albümin
- 2) CPPA reaktifi (Coomassie Plus Protein Assay Reagent, Pierce-1856210)

Deneyin Yapılışı:

Tüm doku homojenatları 1/500 dilüe edilerek çalışıldı. 100 μl dilüe doku süpernatanı üzerine 100 μl CPPA reaktifi eklendi. Absorbans 595 nm'de 96 well-plate reader spektrofotometrede okundu. Standart çalışması ise, numune yerine 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonuna sahip BSA standartları kullanılarak yapıldı. Dokulardaki protein miktarı aşağıdaki standart grafiği kullanılarak hesaplandı.



Şekil 3.2 Doku homojenatları için protein standart grafiği

3.1.12. Histokimyasal İnceleme

Sıçanlardan elde edilen böbrek dokuları, oda sıcaklığında 24 saat boyunca % 10'luk formalin içerisinde fiske edildi. Fiksasyon işleminin sonunda dokular 2 –2,5 saat boyunca musluk suyu altında yıkandı. Daha sonra sırasıyla % 70, % 80 ve % 90'lık alkol serilerinde birer gün boyunca bekletildi. Ardından saf alkol içerisinde 3–3,5 saat boyunca bekletildi. Alkol serileri ile dehidrate edilen böbrek dokusu ksilol ile şeffaflaştırıldı. Daha sonra böbrek dokusu 60 ° C'lik etüvde, her saat başı parafini değiştirilmek suretiyle 3 saat boyunca parafin içerisinde bekletildi. 3.saat sonunda böbrek dokusu temiz parafine gömülerek oda ısısında donması sağlandı. Parafin bloklara gömülmüş böbrek dokularından, 5 mikron kalınlığında kesitler alınarak

preparatlar hazırlandı. Hazırlanan preparatlara ışık mikroskopik incelemeler yapılabilmesi için hematoksilen- eozin boyaması yapıldı.

3.2. Bitki Deneyleri

3.2.1.Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu

Fenolik madde ekstraksiyonu için Antalya'nın çeşitli mevkilerinden toplanmış olan mersin (*Myrtus communis*) bitkisinin yaprakları 35°C'lik etüvde 2 gün süreyle kurutuldu. Kurutulan yapraklar porselen havan ile toz haline gelinceye kadar iyice dövüldü. Toz halindeki 50 gr yaprak 500ml etanol içerisinde 48 saat boyunca bekletildi. 48 saatlik periyot dolduktan sonra etanolik ekstrakt filtre kağıtları ile süzüldü. Elde edilen süzütünün etanol fazı rotary vakum evaporatörde 40°C'de uçuruldu. Geriye kalan ham ekstrakt koyu renk şişelerde +4°C hayvanlara verilinceye kadar saklandı [106].

3.2.2. Ham Ekstraktların Kimyasal Analizleri

3.2.2.1.Toplam Fenolik Madde Analizi

Toplam fenolik maddenin (TFM) kolorimetrik olarak tayininde spektrofotometrik yöntem kullanıldı [107].

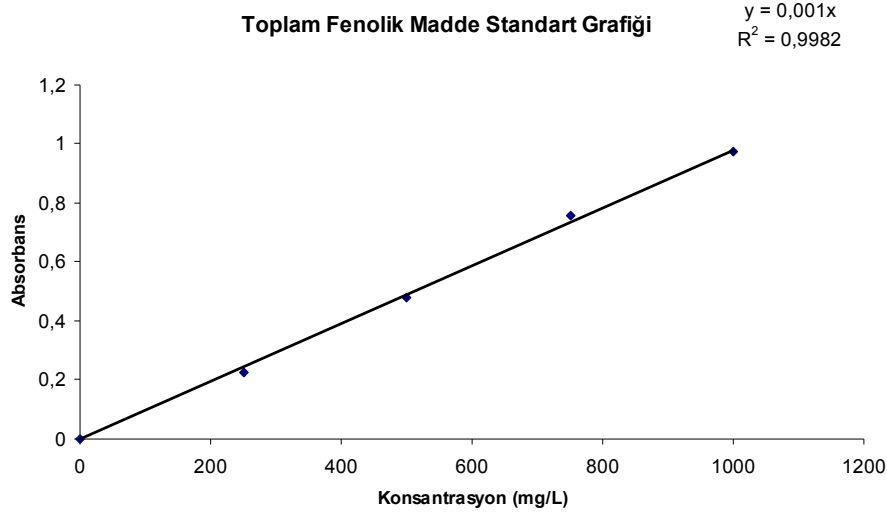
Reaktifler:

- 1) Folin-Ciocalteau çözeltisi (0,2 N)
- 2) Sodyum karbonat çözeltisi (75 g/l)
- 3) Gallik asit standartı (250-2000 mg/L arası)

Deneyin yapılışı:

	Kör	Numune
Örnek (Ekstrakt)	-	100 µl
Distile su	1 ml	900 µl
Folin-Ciocalteau çözeltisi	5 ml	5 ml
Sodyum karbonat çözeltisi	4 ml	4 ml

Spektrofotometrede 765 nm dalga boyunda okunan absorbans değerinden ve gallik asit ile hazırlanmış standart eğrisinden yararlanılarak toplam fenolik madde miktarı mg/g ham ekstrakt olarak gallik aside eşdeğer olarak aşağıdaki standart grafiği kullanılarak hesaplandı hesaplandı.



Şekil 3.3 Toplam fenolik madde standart grafiği

3.2.2.2. Myricetin'in HPLC ile Analizi

Myricetin'in analizinde Agilent 1100 marka HPLC (Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co.KG, Waldbronn, Germany) aleti kullanıldı ve tespiti 350 nm'de diode array dedektörle gerçekleştirildi. HPLC aletinin degaz ünitesi, 4'lü pompası, 20 µl lüplü manuel enjeksiyon ünitesi bulunmaktadır.

Mersin bitkisindeki myricetin'in ayrılmasında ve teşhisinde ACE C-18 analitik kolon (250 x 4.6 mm, 5 µm partikül çapı) ve gradient çözelti kullanıldı. Bu amaçla solvent A olarak formik asit: su (1:19), solvent B olarak metanol kullanıldı. Elüsyon programı Tablo 3.1'de verilmiştir. Akış hızı 1,0 ml/dk olarak işlem gerçekleştirildi. Myricetin miktarının tespitinde eksternal standart yöntemi, standart olarak hayvanlara intraperitoneal olarak enjekte edilen myricetin kullanıldı.

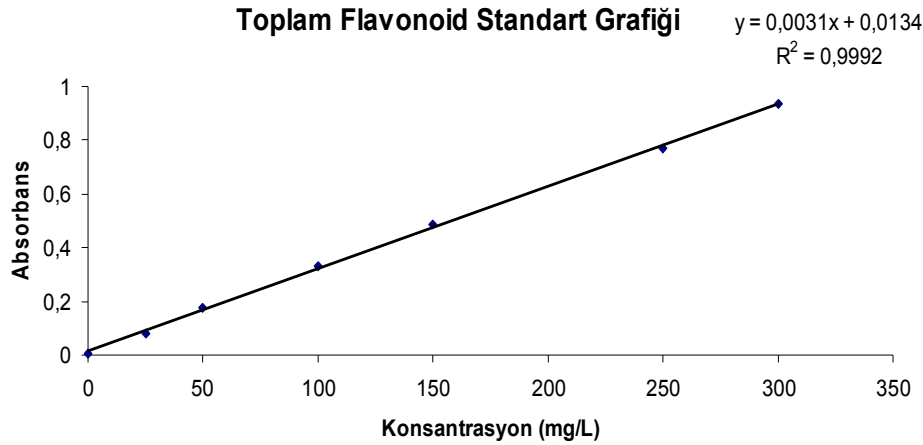
Tablo 3.1 HPLC elüsyon programı

Zaman (dakika)	Solvent A (%)	Solvent B (%)
0	100	0
3	85	15
13	75	25
25	70	30
35	65	35
39	55	45
42	55	45
44	50	50
47	45	55
50	30	70
56	25	75
60	0	100

100 mg ham ekstrakt 10 ml etanolün içerisinde çözülerek HPLC'ye verildi [108]. Fenolik maddelerin serbest formlarının analizinin yapılabilmesi için ise; 100 mg ham ekstrakt 2 g/l TBHQ içeren %62,5'lik 4 ml metanol ve 6 N HCl ile 2 saat boyunca 90 °C'de hidroliz yapıldıktan sonra HPLC'ye verildi [109].

3.2.2.3. Toplam Flavonoid Miktarının Tayini

Toplam flavonoid miktarının alüminyum klorid ile kolorimetrik olarak tayininde Karadeniz vd. [110] tarafından tanımlanan spektrofotometrik yöntem kullanıldı. 1 ml örnek 10 ml'lik cam deney tüpü içine konuldu, üzerine 4 ml distille su ve 0,3 ml %5'lik NaNO₂ ilave edildi ve karıştırıldı. 5 dk sonra 0,6 ml %10'luk AlCl₃.6H₂O eklendi, 5 dk sonra da 2 ml 1 mol/L'lik NaOH ilave edildi ve toplam hacim distile suyla 10 ml'ye tamamlandı. Karışım iyi bir şekilde karıştırıldıktan sonra spektrofotometrede 510 nm dalga boyunda okunacak absorbans değerinden ve kateşin ile hazırlanmış standart eğriden yararlanılarak toplam flavonoid miktarı gram ham ekstraktaki mg kateşine eşdeğer olacak şekilde hesaplandı.



Şekil 3.4 Toplam flavonoid standart grafiği

3.2.2.4. Toplam Antioksidan Kapasitenin Ölçülmesi

Ölçümlerde stabil radikal 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) solusyonu kullanıldı. Ekstrelerin DPPH üzerindeki serbest radikalleri temizleyici etkileri Lafka et al. [107] tarafından modifiye edilmiş metod kullanılarak ölçüldü. Metanol kullanılarak farklı konsantrasyonlarda (5–160 mg/L) hazırlanmış örnek çözeltilisinin 0.1 ml'si üzerine yine metanolde hazırlanmış (0.025 g/L) DPPH çözeltilisinden 3.9 ml ilave edildi ve vortekste 30 saniye karıştırılarak oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika bekletildi. Karanlıkta inkübasyon sonrasında, örneklerin absorbansı UV spektrofotometre kullanılarak 515 nm'de metanole karşı ölçüldü. Örneklerin serbest radikalleri temizleyici etkileri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$\% \text{ inhibisyon (IC50)} = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100$$

A_{kontrol} : 0.1 ml metanol + 3.9 ml DPPH çözeltisinin metanole karşı okunan absorbands değeri

$A_{\text{örnek}}$: Örneklerin 30 dk sonunda metanole karşı okunan absorbands değeri

Elde edilen % inhibisyon değerleri örneklerin farklı konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirilerek her bir örneğin % 50 renk açılımını sağlayan derişimleri % 50 inhibisyon (IC50) değeri olarak hesaplandı. Antiradikal aktivite 1/IC50 olarak hesaplandı.

3.3. İstatistiksel Analiz

Tüm sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verildi. İstatistiksel analizler Sigma Stat 2.03 Windows XP paket programı ile yapıldı. Elde edilen verilerin karşılaştırılmasında uygulanan istatistiksel metodlar bulgular kısmında ayrıntılı olarak yazılmıştır.

3.4. Gereçler ve Kimyasal Maddeler

3.4.1. Gereçler

Spektrofotometre: Shimadzu UV 1601

Spektrofluorometre: Perkin Emler LS 45

Evaporatör: Heidolp Laborota 4000

HPLC: Agilent 1100

Su banyosu: Precitherm PRV Boehringer Mannheim

Santrifüj: Heraeus Sepatech Labofuge 15R, Beckman Enculture 22R,

Hassas terazi: Shimadzu AY220

Homojenizatör: Art-Micra D-1

pH metre: Hanna pH211

Derindondurucu: Uğur, Sanyo

Buzdolabı: Ariston

Otomatik pipet: Eppendorf marka 1000 ml'lik, Biohit marka 20-200 ul, 10-100 ul, 5-50 ul'lik

Cam pipet: 5, 10 ml'lik

Cam balon jojeler, erlen mayerler, beherler, santrifüj tüpleri, ependorf tüpler, deney tüpleri

3.4.2. Kimyasal Malzemeler

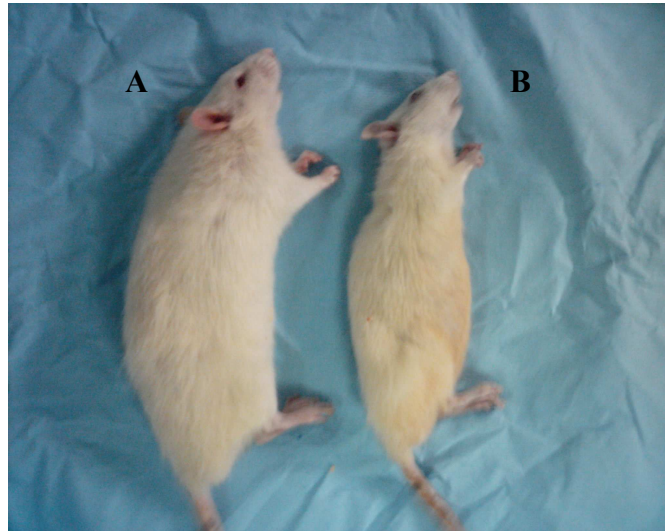
Tüm kimyasal malzemeler Sigma ve Merck'den temin edildi.

BULGULAR

4.1.Hayvan Deneyleri

4.1.1.Genel Görünüm

Deney gruplarına ait görünüm Şekil 4.1’de gösterilmiştir. İntraperitoneal STZ uygulamasından sonra hayvanların gelişiminde gözle görülür oranda değişiklik gözlemlenmiştir. Kontrol grubuna göre diyabetik hayvanların vücut ağırlıklarında önemli oranda gerileme gözlemlenmiştir. Diyabetik hayvanların tüylerinde sararma ve dökülme, kuyruk renklerinde değişim ve hayvanlarda genel bir halsizlik gözlemlenmiştir. Diyabetik grupların idrar çıkışında önemli derecede artış olmuştur. Yem ve su tüketimleri artmıştır.



Şekil 4.1 Hayvanlardaki genel görünüm.
A: Kontrol, B: Diyabet

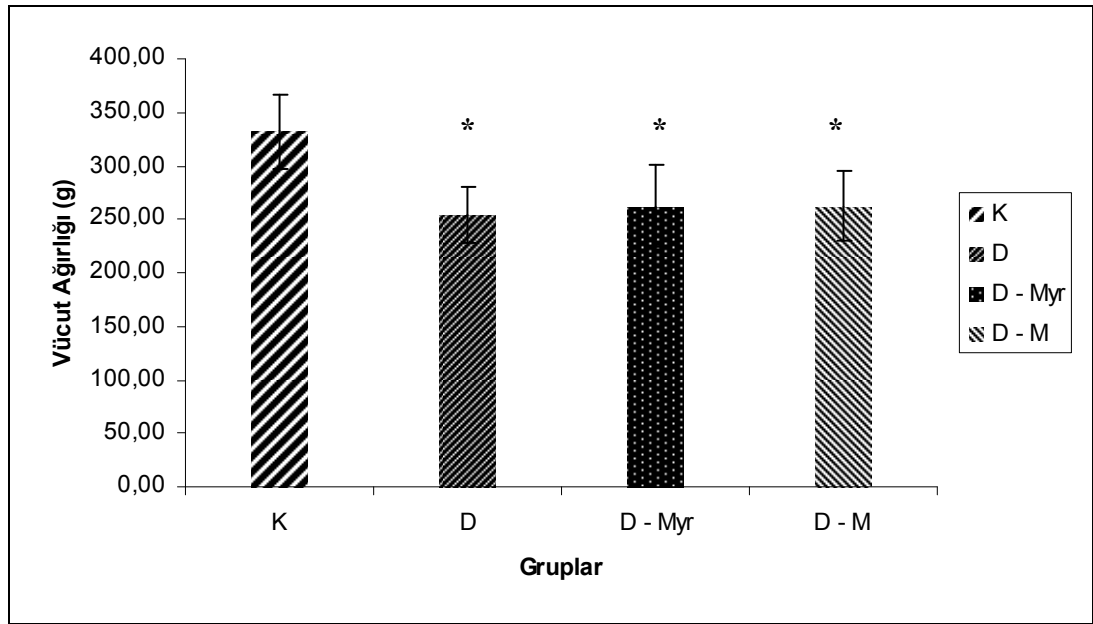
4.1.2. Vücut Ağırlıkları

Vücut ağırlığı değerleri ve gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırma sonuçları Tablo 4.1’de ve şekil 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.1’de ve Şekil 4.2’de görüldüğü gibi, diyabetik ratlarda (D, D-Myr, D-M) ölçülen vücut ağırlığı, kontrol (K) grubundaki ratlara göre anlamlı olarak düşük bulundu (*= $p < 0.05$). Gruplar arasındaki farklılık Tek Yönlü Varyans Analizini takiben Tukey testi ile değerlendirildi.

Tablo 4.1 Tedavi sonunda deney gruplarına ait vücut ağırlığı değerleri. Veriler ortalama \pm standart sapma (Ort. \pm Std. Sp) olarak verilmiştir, n=denek sayısı.

Gruplar	n	Vücut Ağırlığı (g) Ort \pm Std. Sp.
K	13	332.08 \pm 34.1
D	11	253.9 \pm 26.12 *
D – Myr	10	262.5 \pm 37.7 *
D – M	10	262.3 \pm 32.6 *



Şekil 4.2 Tedavi sonunda deney gruplarına ait vücut ağırlığı değerleri

*= $p < 0.05$; Kontrol (K) grubunun diyabet (D), diyabet-myricetin (D-Myr) ve diyabet-mersin (D-M) grupları ile karşılaştırılması.

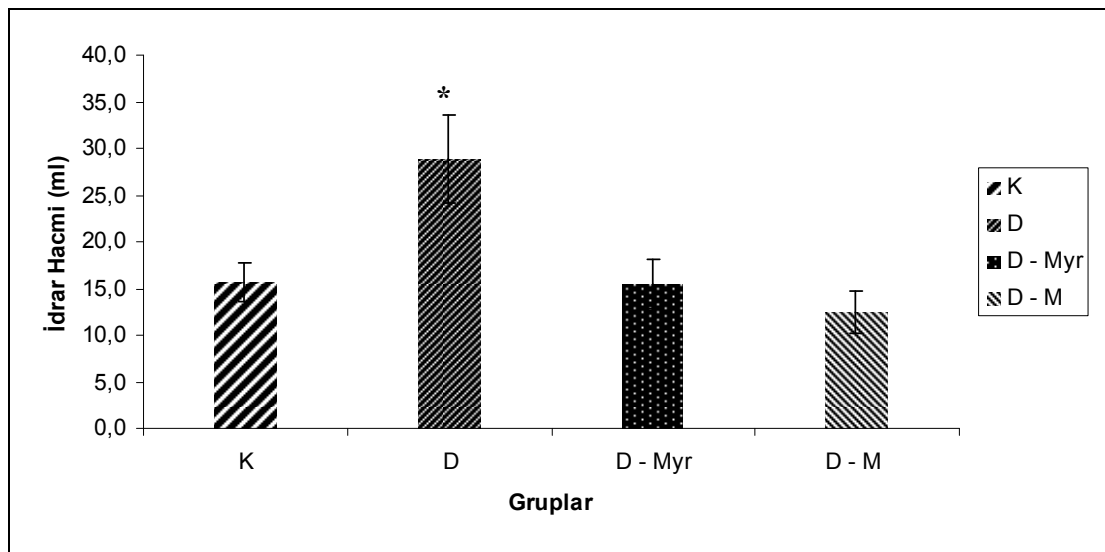
4.1.3. İdrar Hacmi Bulguları

Tedavi sonunda deney gruplarında ölçülen idrar hacmi bulguları ve istatistiksel karşılaştırma sonuçları tablo 4.2’de ve şekil 4.3’de gösterilmiştir.

Tablo 4.2’de görüldüğü gibi, diyabet grubunun (D) tedavi sonundaki idrar hacmi diğer tüm gruplara göre anlamlı olarak yüksek bulundu (*= $p < 0,05$). Deney grupları arasındaki istatistiksel farklılık Kruskal Wallis Tek Yönlü Varyans analizi ile değerlendirildikten sonra Dunn’s yöntemiyle belirlendi.

Tablo 4.2 Tedavi sonunda deney gruplarına ait idrar hacmi bulguları. Veriler ortalama \pm standart sapma (Ort. \pm Std. Sp) olarak verilmiştir, n=denek sayısı.

Gruplar	n	İdrar Hacmi (ml /24 saat) Ort \pm Std. Sp.
K	13	15.7 \pm 2.1
D	11	28.9 \pm 4.7 *
D – Myr	10	15.4 \pm 2.6
D – M	10	12.5 \pm 2.3



Şekil 4.3 Tedavi sonunda deney gruplarına ait günlük idrar hacmi bulguları

*= $p < 0.05$; Diyabet (D) grubunun kontrol (K), diyabet-myricetin (D-Myr) ve diyabet-mersin (D-M) grubu ile karşılaştırılması

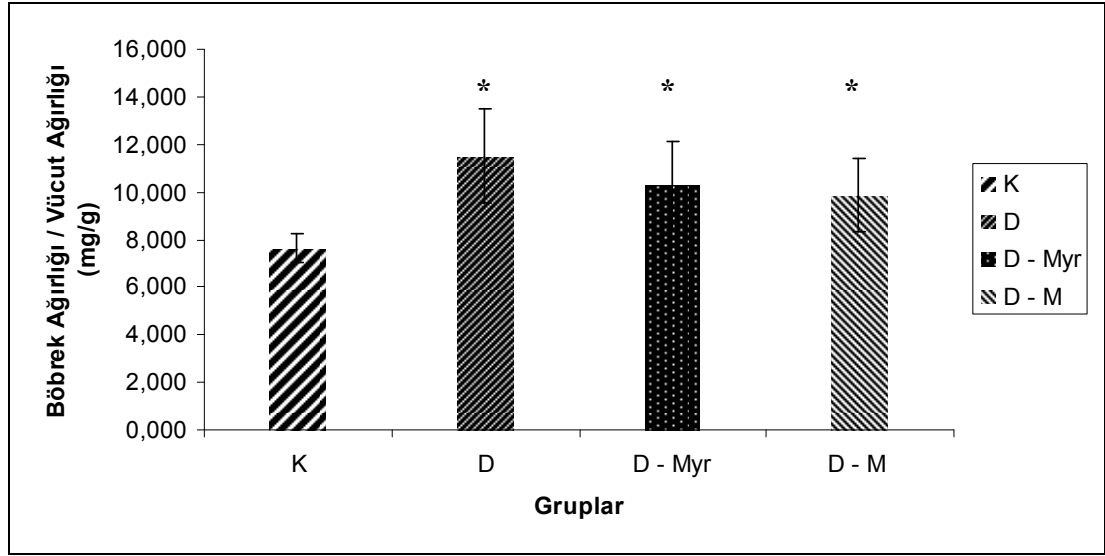
4.1.4. Böbrek Ağırlığı / Vücut Ağırlığı Bulguları

Tedavi sonunda gruplara göre böbrek ağırlığı/vücut ağırlığı bulguları ve istatistiksel karşılaştırma sonuçları tablo 4.3’de ve şekil 4.4’de gösterilmiştir.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında diğer tüm deney gruplarında böbrek ağırlığı/vücut ağırlığı anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Gruplar arasındaki farklılık Tek Yönlü Varyans Analizini takiben Tukey testi ile değerlendirildi.

Tablo 4.3 Tedavi sonunda böbrek ağırlığı /vücut ağırlığı bulguları. Veriler ortalama \pm standart sapma (Ort. \pm Std. Sp) olarak verilmiştir, n=denek sayısı.

Gruplar	n	Böbrek Ağırlığı/Vücut Ağırlığı (mg/g) Ort \pm Std. Sp.
K	13	7.63 \pm 0.60
D	11	11.51 \pm 1.95 *
D – Myr	10	10.52 \pm 2.63 *
D – M	10	9.86 \pm 1.57 *



Şekil 4.4 Tedavi sonunda böbrek ağırlığı /vücut ağırlığı bulguları

*= $p < 0.05$; Tüm diyabetik grupların (D, D-M, D-Myr) kontrol grubu (K) karşılaştırılması.

4.1.5. Açlık Kan Şekeri Bulguları

Gruplara göre AKŞ bulguları ve istatistiksel karşılaştırma sonuçları tablo 4.4’de ve şekil 4.5’de gösterilmiştir.

Sıfırıncı ve 2. günlerde tüm diyabetik gruplarda (D, D-Myr, D-M) ölçülen açlık kan şekeri kontrol (K) grubuna göre anlamlı ölçüde yüksek bulundu (*= $p < 0.001$). Tedavinin 6. ve 10. günlerinde ise diyabet (D) grubunda ölçülen açlık kan şekeri düzeyi diğer tüm gruplara (K, D-Myr, D-M) göre anlamlı olarak yüksekti (**= $p < 0.001$). 6. ve 10. günlerde tedavi verilen diyabetik gruplar (D-M, D-Myr) ile kontrol grubu arasında AKŞ düzeyleri anlamlı bir farklılık göstermedi.

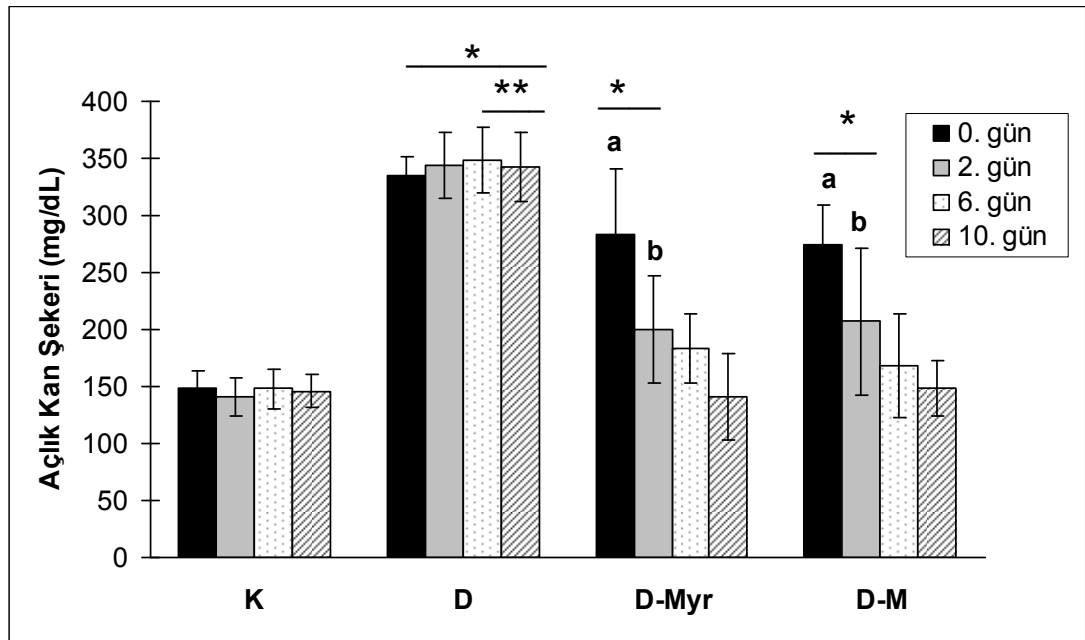
Kontrol (K) ve diyabetik (D) grupta günler arasında AKŞ düzeylerinde anlamlı bir değişim gözlenmez iken, tedavi verilen diyabetik gruplarda (D-Myr, D-M) 0. gündeki AKŞ düzeyleri diğer günlere göre anlamlı olarak yüksekti (a= $p < 0.001$).

Tedavi verilen diyabetik gruplarda 2. günde ölçülen AKŞ 10. güne göre halen anlamlı olarak yüksek bulundu ($b=p<0.05$).

Gruplar arasındaki farklılık İki Yönlü Varyans Analizini takiben Tukey testi ile değerlendirildi.

Tablo 4.4 Deney gruplarında açlık kan şekerinin tedavi öncesi ve sonrası değişimi. Veriler ortalama \pm standart sapma (Ort. \pm Std. Sp) olarak verilmiştir, n=denek sayısı.

Gruplar	n	Açlık Kan Şekeri (mg/dl)			
		0.gün	2.gün	6.gün	10.gün
K	13	148 \pm 16	141 \pm 16	148 \pm 17	146 \pm 14
D	11	335 \pm 16 *	344 \pm 29 *	348 \pm 29 **	342 \pm 30 **
D - Myr	10	283 \pm 58 *, ^a	200 \pm 47 *, ^b	183 \pm 30	141 \pm 38
D - M	10	274 \pm 35 *, ^a	207 \pm 64 *, ^b	168 \pm 45	149 \pm 24



Şekil 4.5 Deney gruplarında açlık kan şekerinin tedavi öncesi ve sonrası değişimi

Gruplar arası karşılaştırma;

*= $p<0.001$; Kontrol (K) grubu ile karşılaştırıldığında.

**= $p<0.001$; Tüm gruplar ile karşılaştırıldığında.

Grup içi karşılaştırma;

a= $p<0.001$; 2., 6. ve 10. günler ile karşılaştırıldığında.

b= $p<0.05$; 10.gün ile karşılaştırıldığında.

4.1.6. İdrar Proteini Bulguları

Gruplara ve tedavi günlerine göre idrar proteini bulguları ile istatistiksel karşılaştırma sonuçları tablo 4.5 ve şekil 4.6'da gösterilmiştir.

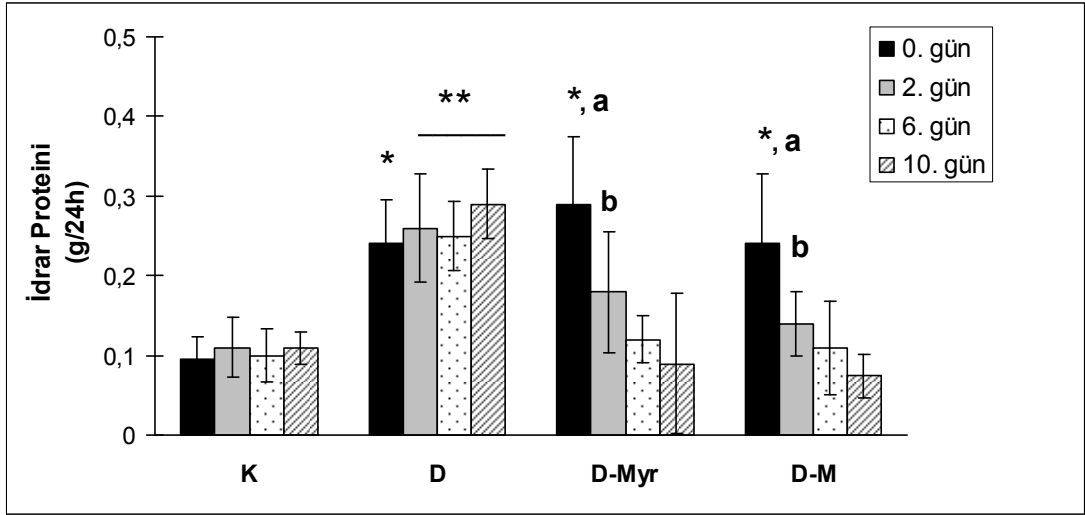
Sıfırıncı günde tüm diyabetik gruplarda (D, D-Myr, D-M) ölçülen 24 saatlik protein atılımı kontrol (K) grubuna göre anlamlı ölçüde yüksekti (*= $p<0.001$). tedavi sonrası ise sadece diyabetik (D) grupta 24 saatlik idrar protein atılımı diğer tüm gruplara göre anlamlı ölçüde yüksekti (**= $p<0.001$). 2., 6. ve 10.günlerde tedavi verilen diyabetik gruplar (D-M, D-Myr) ile kontrol (K) grubu arasında 24 saatlik idrar protein atılımı değerleri anlamlı bir farklılık göstermedi.

Kontrol (K) ve diyabetik grupta (D) günler arasında 24 saatlik idrar protein düzeylerinde anlamlı bir farklılık görülmez iken; tedavi verilen diyabetik gruplarda (D-Myr, D-M) tedavi öncesi 24 saatlik idrar proteini, tedavi sonrası tüm günlere göre anlamlı ölçüde yüksekti ($a=p<0.001$). Tedavi verilen diyabetik gruplarda (D-Myr, D-M) 2. günde ölçülen 24 saatlik idrar proteini 10. güne göre halen anlamlı derecede yüksek bulundu ($b=p<0.001$).

Gruplar arasındaki farklılık İki Yönlü Varyans Analizini takiben Tukey testi ile değerlendirildi.

Tablo 4.5 İdrar proteini tedavi öncesi ve sonrası günlere göre değişimi. Veriler ortalama \pm standart sapma (Ort. \pm Std. Sp) olarak verilmiştir, n=denek sayısı.

Gruplar	n	İdrar Proteini (g/24 saat)			
		0. gün	2. gün	6. gün	10. gün
K	13	0.096 \pm 0.027	0.11 \pm 0.038	0.10 \pm 0.034	0.11 \pm 0.02
D	11	0.24 \pm 0.055 *	0.26 \pm 0.067 **	0.25 \pm 0.044 **	0.29 \pm 0.043 **
D - Myr	10	0.29 \pm 0.084 *, a	0.18 \pm 0.076 ^b	0.12 \pm 0.029	0.09 \pm 0.088
D – M	10	0.24 \pm 0.087 *, a	0.14 \pm 0.04 ^b	0.11 \pm 0.059	0.074 \pm 0.027



Şekil 4.6 Deney gruplarında idrar proteininin günlere göre değişimi

Gruplar arası karşılaştırma;

*= $p < 0.001$; kontrol grubuna göre.

**= $p < 0.001$; diğer tüm gruplara göre.

Grup içi karşılaştırma;

a= $p < 0.001$; 2., 6. ve 10. günler ile karşılaştırıldığında.

b= $p < 0.001$; 10. gün ile karşılaştırıldığında.

4.1.7. Kan Üre Azotu (BUN) Bulguları

Gruplara göre BUN değerlerinin tedavi günlerine göre günler arası ve gruplar arası istatistiksel karşılaştırma sonuçları tablo 4.6 ve şekil 4.7’de gösterilmiştir.

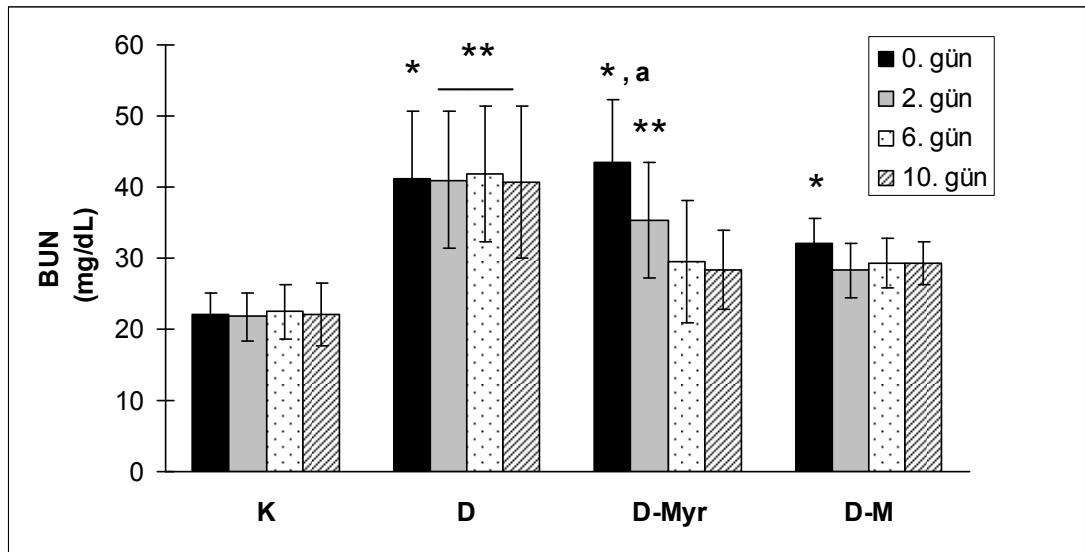
Tedavi öncesi 0. günde kan üre azotu (BUN) değerleri tüm diyabetik gruplarda (D, D-Myr, D-M) kontrol (K) grubuna göre yüksekti ($*=p < 0.001$). 2., 6. ve 10. günlerde diyabetik (D) grupta ölçülen BUN değerleri kontrol (K) ve diyabet-mersin (D-M) gruplarına göre anlamlı olarak yüksekti ($**=p < 0.001$). Diyabet-myricetin (D-Myr) grubunda 2. günde ölçülen BUN değeri de benzer şekilde kontrol (K) ve diyabet-mersin (D-M) gruplarına göre anlamlı olarak yüksekti ($**=p < 0.001$).

Kontrol (K), diyabet (D) ve diyabet-mersin (D-M) gruplarında günler arasında BUN değerlerinde anlamlı bir farklılık gözlenmezken; diyabet-myricetin (D-Myr) grubunda tedavi öncesi BUN değerleri tedavi sonrasına göre anlamlı olarak yüksektir (a= $p < 0.001$).

Gruplar arasındaki farklılık İki Yönlü Varyans Analizini takiben Tukey testi ile değerlendirildi.

Tablo 4.6 Deney gruplarında günlere göre BUN değerleri. Veriler ortalama \pm standart sapma (Ort. \pm Std. Sp) olarak verilmiştir, n=denek sayısı.

Gruplar	n	BUN (mg/dl)			
		0. gün	2. gün	6. gün	10. gün
K	13	22.2 \pm 2.9	21.8 \pm 3.3	22.5 \pm 3,8	22.1 \pm 4.5
D	11	41.3 \pm 9.5 *	41.0 \pm 9.6 **	41.8 \pm 9.6 **	40.7 \pm 10.7 **
D - Myr	10	43.5 \pm 8.9 *, ^a	35.4 \pm 8.1 **	29.5 \pm 8.6	28.4 \pm 5.5
D – M	10	32.2 \pm 3.4 *	28.3 \pm 3.8	29.3 \pm 3.4	29.3 \pm 3.0



Şekil 4.7 Deney gruplarında tedavi günlerine göre BUN değişimi

Gruplar arası karşılaştırma;

*= $p < 0.001$; kontrol grubuna göre.

**= $p < 0.001$; kontrol ve diyabet-mersin grubuna göre.

Grup içi karşılaştırma;

a= $p < 0.001$; diğer günlere göre.

4.1.8. Kreatinin Klirensi Bulguları

Gruplara göre kreatinin klirensi bulguları, günler arası ve gruplar arası istatistiksel karşılaştırma sonuçları tablo 4.7 ve şekil 4.8'de gösterilmiştir.

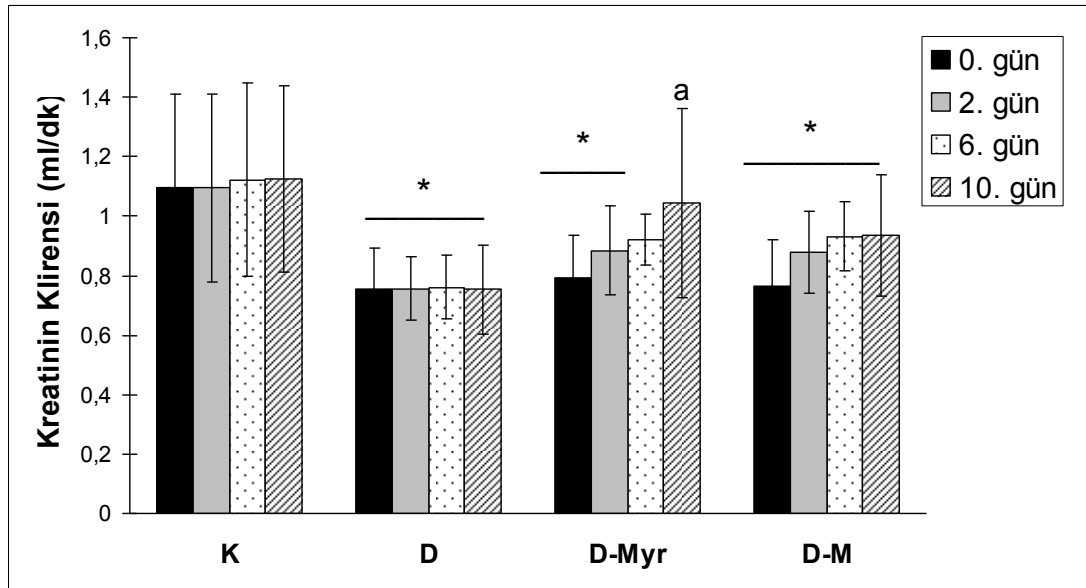
Kreatinin klirensi tüm diyabetik gruplarda (D, D-Myr, D-M) tedavi öncesi 0. gün ve tedavi sonrası 2. ve 6. günlerde kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşüktü (*= $p < 0.001$). Tedavi sonrası 10. günde ise diyabet (D) ve diyabet-mersin (D-M) grubunda kreatinin klirensi kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşüklüğünü korurken, diyabet-myricetin (D-Myr) grubunda kontrol (K) grubuna göre anlamlı bir fark görülmemektedir. Kontrol (K), diyabet (D) ve diyabet-mersin (D-M) gruplarında

günler arasında kreatinin klirensi değerleri anlamlı bir fark göstermezken, diyabet-myricetin grubunda tedavi sonrası 10. günde ölçülen kreatinin klirensi değeri tedavi öncesine göre anlamlı olarak yükselmiştir ($a=p<0.001$).

Gruplar arasındaki farklılık İki Yönlü Varyans Analizini takiben Tukey testi ile değerlendirildi.

Tablo 4.7 Deney gruplarında günlere göre kreatinin klirensi değişimi. Veriler ortalama \pm standart sapma (Ort. \pm Std. Sp) olarak verilmiştir, n=denek sayısı.

Gruplar	n	Kreatinin klirensi(ml/dk)			
		0. gün	2. gün	6. gün	10. gün
K	13	1.095 \pm 0.314	1.095 \pm 0.316	1.122 \pm 0.324	1.127 \pm 0.313
D	11	0.754 \pm 0.140 *	0.757 \pm 0.106 *	0.762 \pm 0.105 *	0.758 \pm 0.15 *
D - Myr	10	0.794 \pm 0.143 *	0.885 \pm 0.151 *	0.920 \pm 0.086 *	1.043 \pm 0.318 ^a
D - M	10	0.766 \pm 0.153 *	0.879 \pm 0.138 *	0.932 \pm 0.116 *	0.935 \pm 0.204 *



Şekil 4.8 Deney gruplarında günlere göre kreatinin klirensi değişimi

Gruplar arası karşılaştırma;

*= $p<0.001$; kontrol grubuna göre.

Grup içi karşılaştırma;

a= $p<0.001$; 0. gün ile karşılaştırma

4.1.9. Glutasyon Peroksidaz (GPx)

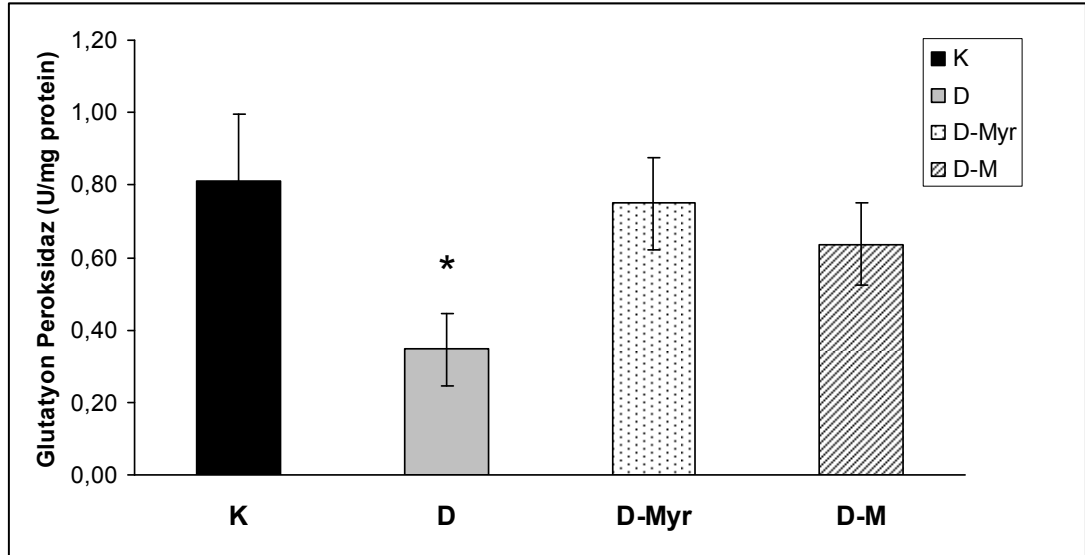
Gruplara göre glutasyon peroksidaz bulguları ve istatistiksel karşılaştırma sonuçları tablo 4.8 ve şekil 4.9'da gösterilmiştir.

Böbrek dokularında ölçülen glutatyon peroksidaz aktivitesi diyabet (D) grubunda diğer gruplara göre (K, D-M, D-Myr) anlamlı olarak düşük bulundu (*= $p<0.001$). Kontrol grubu (K) ile tedavi verilen diyabetik gruplarda (D-M, D-Myr) glutatyon peroksidaz aktivitesi istatistiksel olarak farklı değildi.

Gruplar arasındaki farklılık Tek Yönlü Varyans Analizini takiben Tukey testi ile değerlendirildi.

Tablo 4.8 Glutatyon peroksidaz bulguları. Veriler ortalama \pm standart sapma (Ort. \pm Std. Sp) olarak verilmiştir, n=denek sayısı.

Gruplar	n	Glutatyon peroksidaz (U/mg protein) Ort \pm Std. Sp.
K	13	0.81 \pm 0.18
D	11	0.35 \pm 0.1 *
D – Myr	10	0.75 \pm 0.13
D – M	10	0.64 \pm 0.11



Şekil 4.9 Glutatyon peroksidaz bulguları

*= $p<0.001$; K, D-Myr, D-M ile karşılaştırma

4.1.10. Ksantin Oksidaz ve Dehidrogenaz (XO ve XDH)

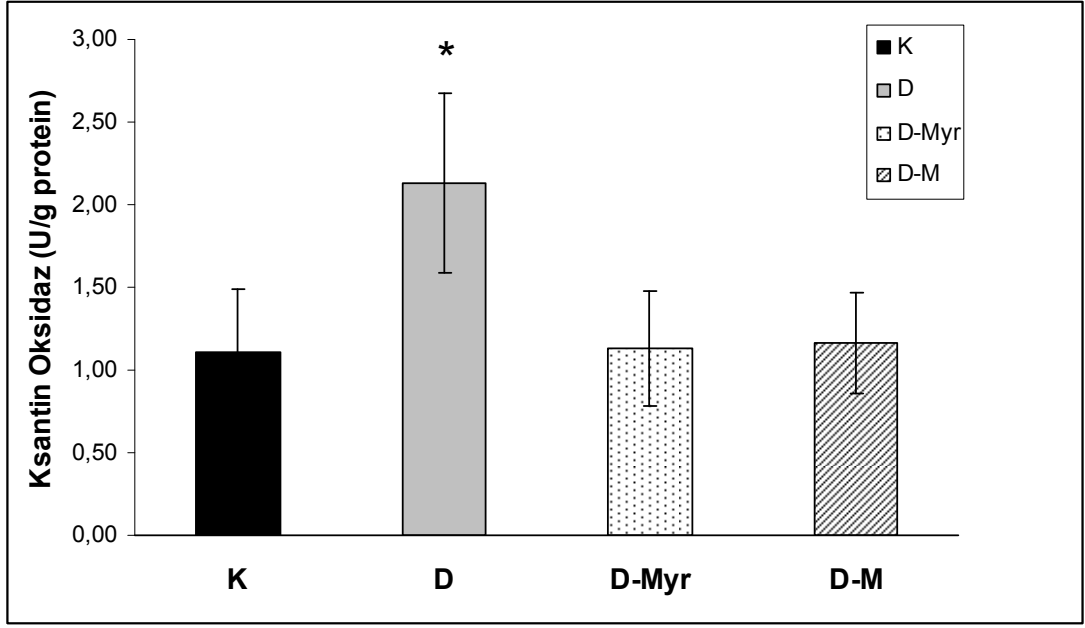
Gruplara göre XO ve XDH bulguları ve istatistiksel karşılaştırma sonuçları tablo 4.9, şekil 4.10 ve 4.11’de gösterilmiştir.

Böbrek dokularında ölçülen XO ve XDH aktiviteleri diyabet (D) grubunda diğer gruplara göre (K, D-M, D-Myr) anlamlı olarak yüksek bulundu (*= $p < 0.001$). Kontrol grubu (K) ile tedavi verilen diyabetik gruplarda (D-M, D-Myr) ksantin oksidaz ve ksantin dehidrogenaz aktiviteleri istatistiksel olarak farklı değildi.

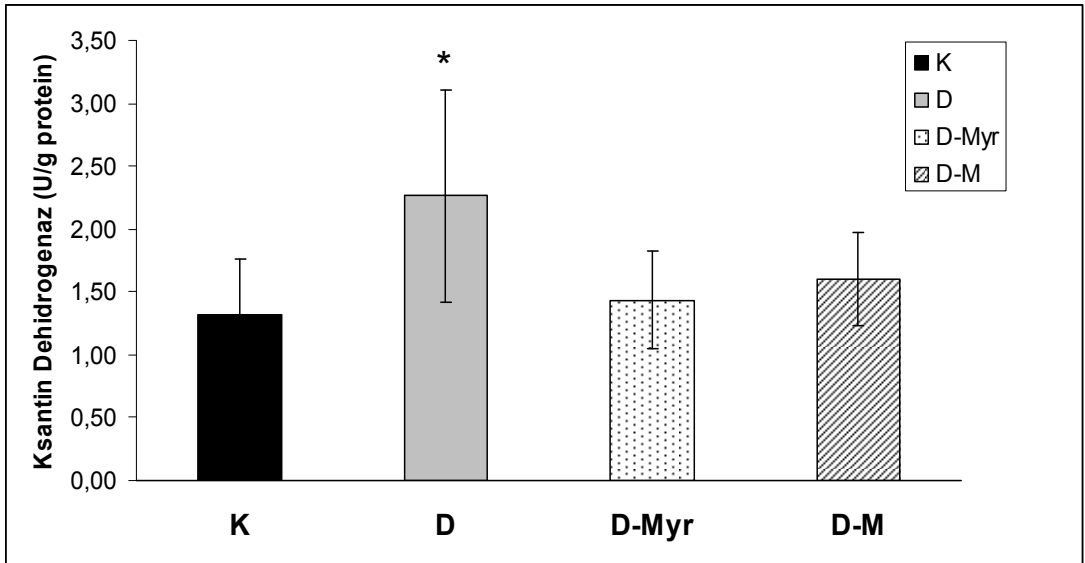
Gruplar arasındaki farklılık Tek Yönlü Varyans Analizini takiben Tukey testi ile değerlendirildi.

Tablo 4.9 Ksantin oksidaz ve dehidrogenaz bulguları. Veriler ortalama \pm standart sapma (Ort. \pm Std. Sp) olarak verilmiştir, n=denek sayısı.

Gruplar	n	Ksantin oksidaz (U/g protein) Ort \pm Std. Sp	Ksantin dehidrogenaz (U/g protein) Ort \pm Std. Sp.
K	13	1.11 \pm 0.36	1.32 \pm 0.44
D	11	2.13 \pm 0.54 *	2.26 \pm 0.84 *
D – Myr	10	1.15 \pm 0.35	1.53 \pm 0.39
D – M	10	1.16 \pm 0.31	1.60 \pm 0.37



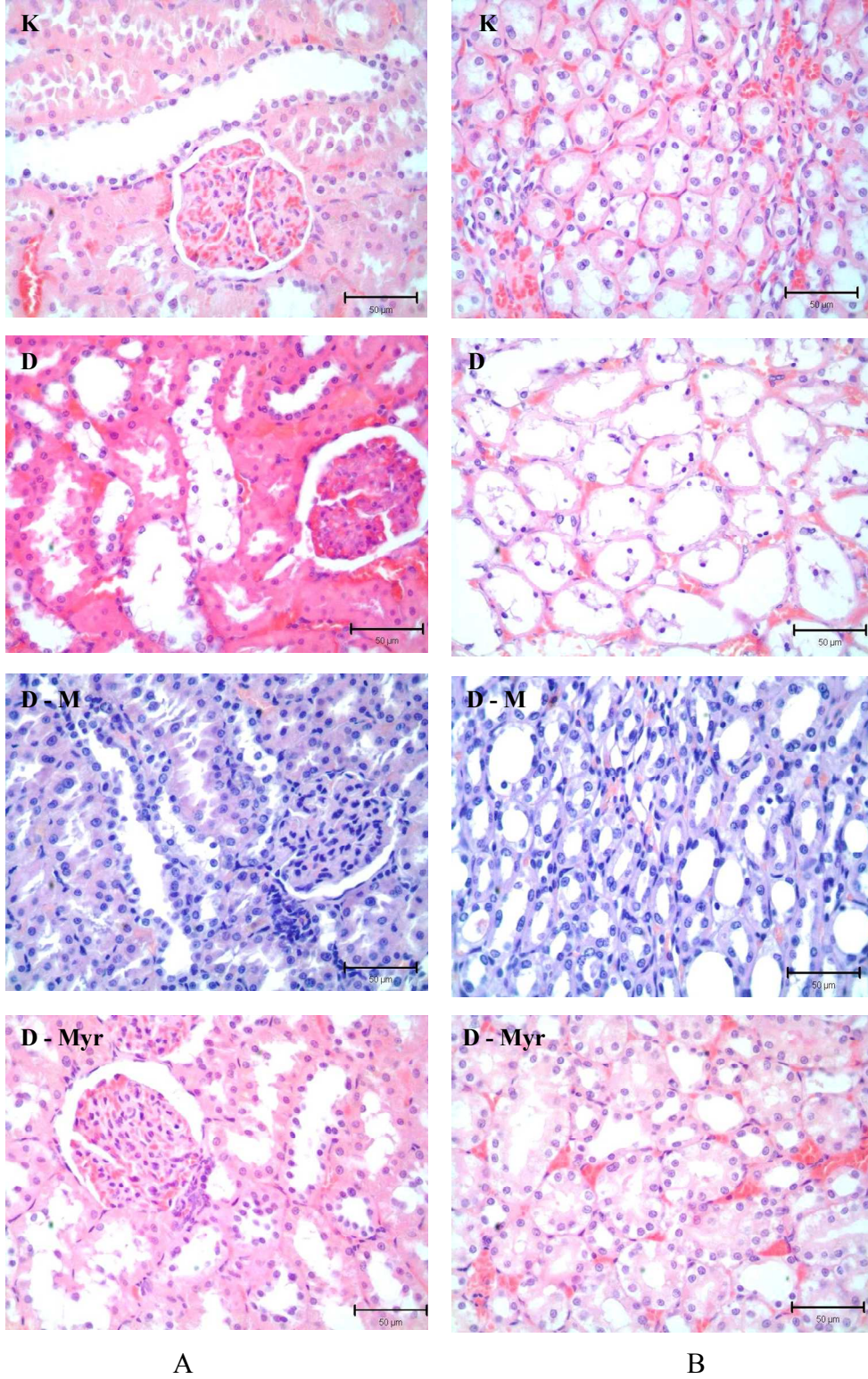
Şekil 4.10 Ksantin oksidaz bulguları



Şekil 4.11 Ksantin dehidrogenaz bulguları

*= $p < 0,001$; Diğer gruplar ile karşılaştırıldığında

4.1.11.Histokimyasal İnceleme Sonuçları



Şekil 4.12 Histokimyasal preparat fotoğrafları A: Korteks, B: Medulla, K: Kontrol, D: Diyabet D-M: Diyabet Mersin, D-Myr: Diyabet myricetin (büyütme 40X, skala bar 50 µm)

Şekil 4.12’de de görüldüğü gibi, kontrol grubuna kıyasla diyabetik grupta özellikle toplayıcı tübüllerde ve glomerullarda fark görülmüştür. Diyabet grubunda toplayıcı tübülleri oluşturan hücrelerin bütünlüğünü kaybettiği gözlenmiştir. Hücrelerin çoğunda sitoplazma morfolojisi oldukça dejeneredir. Genel olarak, diyabet grubunda glomeruların boyutları küçülmüştür. Bununla birlikte glomeruların yapısal bütünlüklerini kaybettikleri gözlenmiştir. Tedavi gruplarında diyabet grubuna kıyasla daha iyi bir morfoloji gözlenmiştir.

Medullada mevcut olan papiller kanallar, distal tübülün düz parçaları ve henle kulbunun ince kollarının diyabet grubunda oldukça dejenere olduğu gözlenmiştir. Hücreler adeta parçalanmış ve nükleuslar lümene dağılmış olarak görülmektedir. Ancak tedavi gruplarında bu yapıların daha düzenli olduğu gözlenmiştir. Papillar kanallar, distal tübülün düz parçaları ve henlenin ince kulbu yapısal olarak diyabet grubuna göre daha iyi bir morfoloji sergilemektedir.

4.2. Bitki Deneyleri

4.2.1. Ham Ekstraktların Kimyasal Analiz Sonuçları

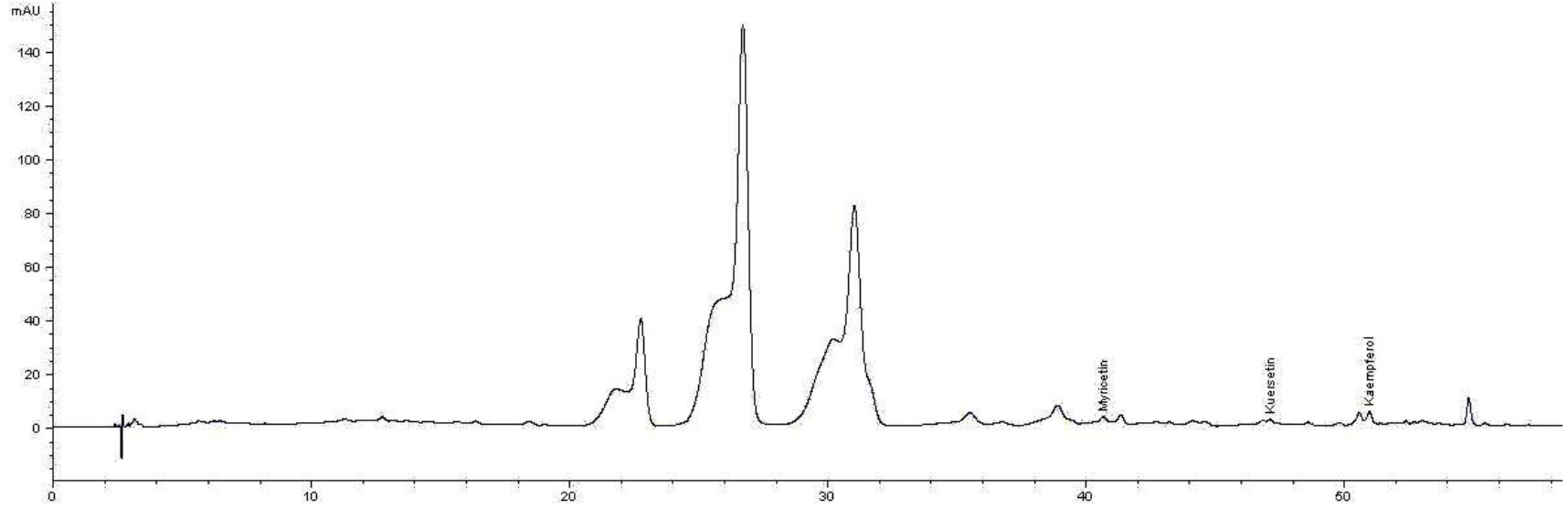
Hidroliz yapılarak yapraklarda bulunan fenolik maddeler aglikonlarına dönüştürülmüştür. Böylece flavonoidlerin serbest formlarının miktarları tam olarak hesaplanabilmiştir. Bundan dolayı hidroliz yapılmış yaprak örneklerinin toplam fenolik madde ve flavonoid içeriği yapılmayanlara göre daha fazla bulunmuştur.

Ham ekstraktaki myricetin miktarı, toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid içeriği, Antioksidan kapasite (IC_{50}) ve antiradikal aktivite değerleri Tablo 4.10’de gösterilmiştir. Flavonoid miktarı hidroliz yapılmış örneklerde 37,48 mg/g ham ekstrakt olarak ölçülmüş, bu miktarın % 58’nin de myricetin (21,722 mg/g ham ekstrakt) olduğu belirlenmiştir. Ayrıca HPLC analizinde, yapraklarda myricetinden başka gallik asit, prosiyanidin B1, kateşin, prosiyanidin B2, epigallokateşin-3-O-gallat, epikateşin, epikateşin-3-O-gallat, rutin, kuersetin ve kamferol de tespit edilmiştir.

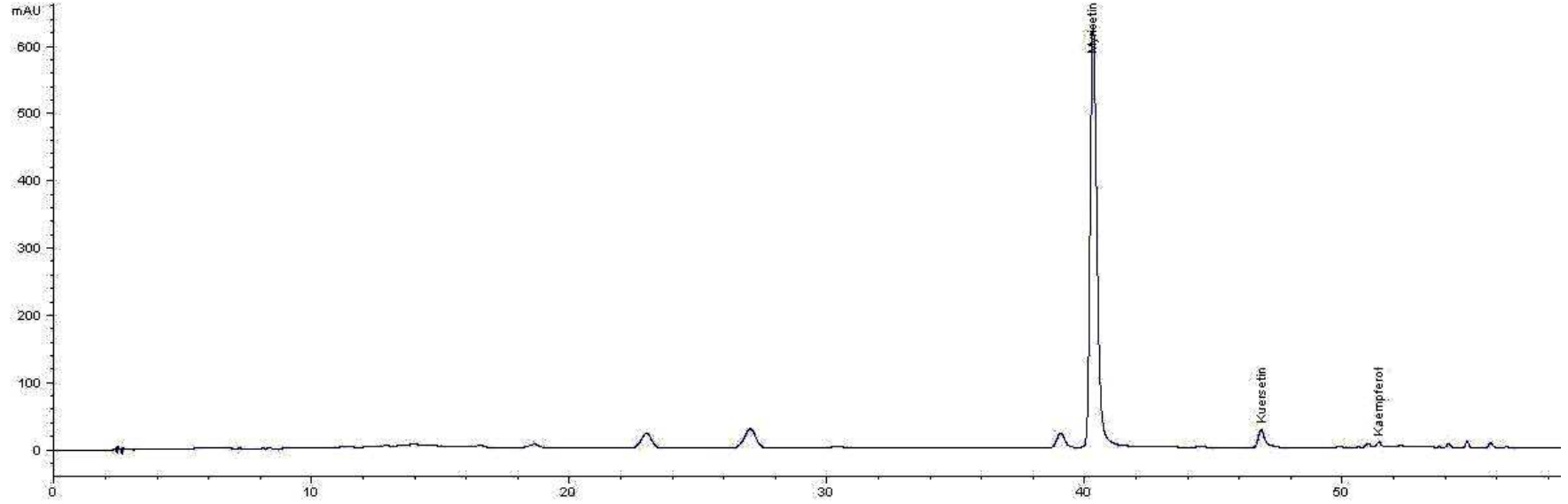
Tablo.4.10 Ham ekstrakttaki (HE) Myricetin, toplam fenolik madde (TFM), toplam flavonoid (TF) ve IC₅₀ değerleri (mg/g ham ekstrakt)

	Myricetin (mg / g)	TFM (mg / g)	TF (mg / g)	IC₅₀	AA (1/IC₅₀)
Ham Ekstrakt (normal)	0,015	148,57	21,63	0,536	1,870
Ham Ekstrakt (hidroliz)	21,722	296,40	37,48	0,361	2,770

Yapraklardaki fenolik maddelerin antioksidan kapasiteleri de ölçülmüş, hidroliz yapılanlar da antioksidan ve antiradikal kapasite daha yüksek bulunmuştur. Aglikon miktarı arttıkça antioksidan aktivitenin arttığı düşünülmektedir. Şekil 4.13 ve 4.14'deki kromotogramlarda görüldüğü gibi hidroliz yapılmayan ham ekstraktlarda glikozit formunda olduğu için myricetin miktarı çok az iken, hidroliz yapıldıktan sonra bu miktar önemli derecede artmıştır.



Şekil.4.13 Mersin bitkisi ekstraktının HPLC ile incelenmesi sonucunda elde edilen kromatogram. Ölçüm 350 nm’de, 60 dakika boyunca gerçekleştirilmiştir. Myricetin’in çıkış zamanı 40.29–40.33. dakikalar arasında gerçekleşmiştir.



Şekil.4.14 Mersin bitkisi ekstraktının hidroliz işlemi sonucu HPLC ile incelenmesi ile elde edilen kromatogram. Ölçüm 350 nm’de, 60 dakika boyunca gerçekleştirilmiştir. Myricetin’in çıkış zamanı 40.29–40.33. dakikalar arasında gerçekleşmiştir.

TARTIŞMA

Diabetes mellitus; insülin salgılanma yetersizliği ve hedef dokularda insülinin metabolik etkisine karşı gelişen direnç hali ile karakterize, genetik kökenli metabolik bir hastalıktır [111]. Protein, yağ ve karbonhidrat metabolizmasını etkileyen insülin sekresyonu ya da reseptöründeki anormallikler ile karaciğer, böbrek ve pankreasın hasarına da sebep olur [112]. Diyabet dünya çapında hızlı bir şekilde artan bir sağlık problemidir. Buna paralel olarak başlıca komplikasyonlarından biri olan nefropati de hızlı bir şekilde artmaktadır [113]. Diyabetik nefropati DM'un başlıca kronik komplikasyonudur ve diyabetik hastalardaki mortalite ve morbiditenin artmasının önemli bir sebebidir [114].

Diyabetik nefropati, kalıcı proteinüri, yüksek arteriyal kan basıncı ve renal fonksiyonlarda bozulma ile karakterize doku harabiyetine neden olan kronik bir durumdur [113]. Albumin atılım hızı, 24 saatlik idrarda kalıcı olarak 300 mg'ı aştığında aşikar nefropati tanısı konulur [115]. Renal fonksiyonların ve glomerular filtrasyon hızının bozulması, glomerular filtrasyon bariyerinin hasarı ile ortaya çıkar. Buna tübular reabsorbsiyonun bozulması, sirküle olan kreatininde artış ve morfolojik olarak ekstraselüler matriks birikimi ve glomerul içerisinde bazal membran kalınlaşması eşlik eder [113]. En sonunda, DN, diyaliz ya da transplantasyon terapilerine gerek duyulan aşırı skarlaşma ve non-fonksiyonel son dönem böbrek oluşumuna yol açar [115].

Böbrek gibi glikoz girişi insüline bağımlı olmayan dokularda, kan glikoz konsantrasyonu yükseldiğinde normalde aktif olmayan aldoz redüktaz yolu işlerlik kazanarak, sorbitol oluşumuna neden olur. Sorbitol plazma membranından diffüze olamadığından, hücre içinde birikir ve hücre membran bütünlüğünü bozar. Ayrıca osmotik etki yaparak hücrenin su alıp şişmesine neden olur. Hücrenin şişmesi morfolojik ve fonksiyonel yapı değişikliklerini de beraberinde getirir [116]. Hiperglisemide polioll yolunun aktivasyonu ile NADH/NAD⁺ oranı artmakta ve bu da enzimatik olmayan glikasyonu ve diaçilgliserol sentezini artırmaktadır. Diaçilgliserolün artışı da protein kinaz C aktivasyonuna yol açarak diyabetdeki damar patolojilerine neden olmaktadır.

Tip 1 ve tip 2 DM hastalarında antidiyabetik tedavinin amacı normoglisemiye ulaşmak ve tip 2 diyabetde insülin rezistansını azaltmaktır. Böylece diyabetin ileri komplikasyonları önlenerek metabolik kontrol düzeltilmektedir. Tip 2 diyabet için en yararlı terapi, yemek sonrası optimum kan glukoz seviyesinin kontrol edilmesi olarak bilinmektedir. Glukoz seviyelerinin yükselmesini önlemeyi amaçlayan terapötik ilaçların arasında, ince bağırsak epitelyumunda membrana bağlı bir enzim olan ve dissakaritlerden glukozun ayrılmasını katalizleyen α -glukozidaz'ın (EC 3.2.1.20) inhibitörleri yer alır. α -Glukozidaz inhibitörleri, glukozun absorpsiyonunu ve sindirimini engeller ve yemek sonrası plazma glukoz seviyelerinin azalmasını sağlar.

Bu hipotez hayvan çalışmalarında ve sonraki klinik çalışmalarda, α -glukozidaz inhibitör çeşitlerinin uygulanmasıyla başarılı bir şekilde tespit edilmiştir [18, 117]. Diyabetik veya obez hastalar için bu inhibitörlerin kullanımının olasılığı, insanlarda şekerlerin absorpsiyonunu etkili bir şekilde azaltan acorbose, miglitol, emigitate ve voglibiose gibi ilaçlar vasıtasıyla denenmiştir. Tip 2 diyabetli hastalarda ve tip 1 diyabette α -glukozidaz inhibitörü ajanlar hipergliseminin kontrolünde yararlı olmuştur. Son yıllarda, biyolojik olarak aktif maddeleri içeren bazı yiyeceklerin ve geleneksel bitkilerin öneminin farkına varılmıştır ve birçoğunun fizyolojik etkileri incelenmiştir [18, 118].

Birçok bitkide α -glukozidaz inhibitörlerinin varlığı araştırılmış ve doğal tıpta antidiyabetik özellikleri gözlemlenmiştir. Önal vd. yaptığı çalışmada *Urtica dioica*, *Taraxacum officinale*, *Viscum album* ve *Myrtus communis* bitkilerinin α -glukozidaz etkileri incelenmiştir. Bütün bitkiler farklı tesirde α -glukozidaz inhibitor aktivite göstermiştir. Ancak *Myrtus communis* güçlü bir şekilde enzimi inhibe etmiştir. Bunun yanında HPLC ile *Myrtus communis*'ten alınan aktif materyalin sonraki seperasyonunda sadece fenolik fraksiyonun güçlü α -glukozidaz inhibitörü olarak rol oynadığı gösterilmiştir. Fenolik içeriğin güçlü bir inhibisyona sebep olduğu düşünülmektedir. Bu gözlemler; *Myrtus communis*'in su ekstraktının fenolik içeriğinin α -glukozidaz inhibisyonuna sebep olabileceğini göstermektedir [18].

Çalışmamızda, α -glukozidaz etkisi kanıtlanmış olan mersin bitkisinin yapraklarından yaptığımız etanolik ekstraktda HPLC sonuçlarına göre toplam flavonoid miktarının % 58'inin, fenolik maddelerinde % 7,33'ünün myricetin olduğunu bulduk. Burada da görüldüğü gibi, literatürdeki diğer çalışmalarda da mersin bitkisinde yüksek oranda myricetin bulunduğu gösterilmiştir [19, 69, 72].

Ong KC. et al. yaptıkları bir çalışmada 30'dan fazla biyoflavonoidin lipogenez üzerindeki etkilerini incelemişler ve bunlardan sadece myricetin lipogenezi uyarıcı etkiye sahip olduğunu bulmuşlardır. Aynı çalışmada, insülin reseptör fonksiyonuna ve Glut 4 translokasyonuna etkisi olmaksızın, myricetin rat adipositlerinde glukoz transportunu artırdığını göstermişlerdir [119]. Ong et. al. yaptıkları diğer çalışmada myricetin diyabetik hayvanlardaki glisemi ve glikojen metabolizması üzerine etkisini de incelemişlerdir. Bu çalışmanın verilerine göre myricetinle tedavinin 2. gününden sonra hiperglisemi ve hipertrigliserideminin diyabetik hayvanlarda anlamlı derecede azaldığını göstermişlerdir. Aynı çalışmada myricetin sağlıklı hayvanlarda hiçbir değişiklik olmaksızın, diyabetik sıçanlarda glikojen depolanmasını % 36 artırdığını bulmuşlardır. Hepatik glukoz-6-fosfat içeriğinin artışının, muhtemelen myricetin glukoz transportunu artırması ile ilişkili olabileceğini düşünmektedirler. Glukoz-6-fosfat glikojen sentezinde substrat olarak kullanılmaktadır. Diyabetik sıçanların myricetin ile tedavisi hepatik glikojen sentaz I aktivitesini artırmıştır ve böylece glikojen sentezinde de artış olmuştur. Myricetin sağlıklı hayvanlarda hepatik glikojen fosforilaz aktivitesi üzerine ve dolayısıyla da glikojenoliz üzerine etkisi olmamıştır. Myricetin tedavisi yapılmasına rağmen diyabetik ratlarda hepatik glikojen fosforilaz aktivitesi ve dolayısıyla da glikojenoliz düşük seviyelerde kalmıştır. Araştırmacıların tüm bu bulguları myricetin glikojen metabolizması ve dolayısıyla kan glukozu üzerine etkilerini göstermektedir [65].

Diyabet tanısında birincil şart kronik hiperglisemidir. Kronik hiperglisemiye belirlemek için en önemli belirteç AKŞ düzeyinin ölçülmesidir [120]. Bu çalışmamızda diyabet (D) grubundaki sıçanların deney süresince ölçülen AKŞ değerleri, kontrol (K) grubundaki sıçanlara göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar literatürdeki diğer sonuçlarla da uyumluluk göstermektedir [121, 122]. Diyabet (D) grubu ile karşılaştırıldığında, hem mersin ekstraktı hem de myricetin tedavi sonrası 2. günden itibaren AKŞ düzeylerini anlamlı ölçüde düşürmüştür. Myricetinde gözlenen bu etki literatür ile uyumludur [65]. Tedavi gruplarının günlere göre değişimi kendi içinde değerlendirildiğinde, en etkin hipoglisemik etkinin tedavi sonunda sağlandığını gözlenmiştir. Mersin bitkisinin hipoglisemik etkisinin araştırıldığı başka çalışmalar da mevcuttur [2, 16, 17]. Ancak günlere göre değişimin araştırıldığı literatür bilgisi yoktur. Literatür bilgilerine dayanarak, mersin bitkisinin fenolik fraksiyonunun güçlü α -glukozidaz inhibitör etkisi [18] ile diyabetik sıçanlarda kan glukoz seviyesini düşürdüğü açıklanabilir. Myricetin hücre içine glukoz alınımını arttıran ve glikojen yapımını destekleyen yöndeki etkileri [65] mevcut çalışmamızda görülen kan glukoz düzeylerindeki azalmayı açıklar niteliktedir.

Yılmaz S vd. STZ ile DM oluşturulmuş sıçanlarda glikoz metabolizmasının etkilendiği ve DM'a bağlı olarak karaciğer pirüvat kinaz aktivitesinin azaldığı, böbrek pirüvat kinaz aktivitesinde ise günlere bağlı olarak değişikliklerin gerçekleştiğini gözlemlemişlerdir. Bu çalışma sonunda, diyabete bağlı ortaya çıkan hiperglisemi ve pirüvat kinaz aktivitesinde meydana gelen değişikliklerin sıçanların böbrek dokusunda patolojik değişikliklere yol açabileceği ve diyabet komplikasyonlarının nedeni olabileceği söylenmiştir. Böbreklerde deneysel diyabetin 3. gününde bir değişiklik olmadığını, fakat 12. gündeki bulguların diyabete spesifik değişiklikler olduğu gözlenmiştir. Böbrek medullası çok az mitokondri içerdiği için ATP kaynağı olarak glikolize bağımlı olduğundan, glikolizin son basamağındaki bu enzim aktivitesinin artabileceğini söylemişlerdir [111].

Diyabetin diğer önemli semptomu poliüridir. Çalışmamızda diyabet grubunun idrar hacmi kontrol grubuna göre anlamlı olarak yükselmiştir. Bulgularımız literatür bilgileri ile uyumludur [123, 124]. Tedavi gruplarında ise diyabet grubuna göre düşmüştür. Yaptığımız deneysel tedaviye yönelik her iki uygulamada da (mersin ve myricetin) diyabetik anormalliklerden poliürininin 10 günlük tedavi sonucunda düzelmesinin sağlandığı gözlenmiştir.

Diyabetin karakteristik özelliklerinden biri de vücut ağırlıklarında azalma olmasıdır. Çalışmamızda da tüm diyabetik gruplardaki (D, D-M, D-Myr) sıçanların vücut ağırlığında literatüre benzer olarak azalma görülmüştür [125, 126]. Myricetin ve mersin tedavisi uygulanan diyabetik grupların vücut ağırlığında çok az bir artış vardır. Ancak bu artış anlamlı değildir.

Bilindiği gibi STZ uygulamasını takiben kontrol grubuna kıyasla vücut ağırlıklarındaki düşüş, idrar hacimlerinde ve AKŞ'lerindeki artış diyabetin başlıca bulgularındandır. Mersin ve myricetin uygulanan sıçanların tedavi bitiminde ise AKŞ'lerinde anlamlı bir düşüş ve buna paralel olarak idrar hacminde azalma gözlemlenmiştir. Bu bulgular mersin bitkisinin ve myricetin biribirinden farksız

olarak karbonhidrat metabolizması üzerindeki güçlü hipoglisemik etkilerini bir kez daha kanıtlamaktadır. Myricetin ve mersin ekstraktı tedavi sonucunda kan şekerini regüle ederek diyabet semptomlarını da hafifletmiştir.

Diyabetik nefropatide gözlemlenen bir diğer değişiklikte renal hipertrofidir. Renal hipertrofinin düzeyini anlamak için, böbrek ağırlığı/vücut ağırlığı oranından yararlanılır [127]. Kontrol grubuna göre, tüm diyabetik gruplarda (D, D-M, D-Myr) böbrek ağırlığı/vücut ağırlığı oranı artmıştır. Bu sonuç böbrek hipertrofisi geliştiğini göstermektedir. Bu sonuçlarımız literatür ile uyumludur [128] [126]. Mersin ve myricetin ile tedavi gruplarında böbrek ağırlığı/vücut ağırlığı oranında hafif bir düşüklük mevcuttur, ancak bu durum istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Glukoz, hücrelere doğrudan toksik etkiye bulunur. Hücre çoğalmasına, böbrekte ekstraselüler matriksin artmasını gösteren kollajen-fibronektin-laminin artışına yol açar. Mezengial hücreler daha az heparan sülfat sentezler ve bazal membrandaki negatif elektrik yükünün azalmasına ve albüminürinin artmasına neden olur. Hücredeki matriks ve glomerül bazal membran yapı elemanlarından biri de kollajendir. Diyabette kollajen artışı vardır ve bu artış, insülin ile önlenir. Ayrıca, glomerül bazal membran yapısında yer alan bir glikozaminoglikan olan heparan sülfatın azaldığı saptanmıştır. Heparan sülfat, siyalik asit ile birlikte glomerüler kapiller duvarının negatif elektrik yükünü sağlar. Diyabette saptanan heparan sülfat ve siyalik asit azalmaları ile glomerül kapiller duvarının negatif yükü azalır ve erken dönem nefropati patogenezinde ve filtrasyon bariyerinin zedelenmesinde rol oynar. Proteinler tübüluslara ve mezengiuma geçer, fibrozis artışına yol açar [29].

Nefropatinin en erken belirteci olan mikroalbuminüri aşikar nefropati öncüsüdür ve 30-300 mg/gün kalıcı albümin atılım hızı ile tanımlanır. Mikroalbuminüri, tip 1 diyabette sonradan gelişen nefropatinin güçlü bir habercisidir. Mikroalbuminüri geliştiğinde, glomerullarda çoktan ileri glomerulopati gelişmiştir [115]. Aşikar nefropati >0,5 g/gün kalıcı proteinüri veya >300mg/gün makroalbuminüri ile karakterizedir. Proteinürideki sürekli artış, renal fonksiyonlarda değişken bir gerilemeye sebep olur. Proteinüri glomerular hasarın önemli bir kanıtıdır ve diyabetik glomerulopatinin şiddetinin belirlenmesinde kullanılabilir. Diyabetik nefropatide ağır proteinüri güçlü bir şekilde patolojik değişikliklerin belirtecidir. Tip 1 diyabetlilerin % 87'sinde, tip 2 diyabetlilerin % 70'inde nefrotik sendrom ve kalıcı proteinüri gelişiminden sonra 15 yıl içinde diyabetik hastaların % 75'inden fazlasında son dönem böbrek yetmezliği görüldüğü klinik bulgularla gösterilmiştir [129].

Yapılan çalışmada idrar proteini kontrol (K) grubuna göre diyabet gruplarında tedavi öncesinde anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu bulgu literatür ile de uyumludur [130]. Diyabet-myricetin ve diyabet-mersin gruplarında on günlük tedavi bitiminde diyabet (D) grubuna göre idrar protein düzeyleri anlamlı derecede azalmış ve kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir fark göstermemiştir. Grupların kendi içlerinde günler bazında değerlendirme yapıldığında; mersin ve myricetin verilen gruplarda idrar protein miktarı 2. günde 10.güne göre halen yüksek iken; 10. günde her iki tedavi grubunda da anlamlı düşüşler gözlemlenmiştir.

Glomerular filtrasyon hızının belirteci olarak kreatinin klirensi ölçülmektedir. Serum kreatininini, renal fonksiyonların en yaygın kullanılan belirtecidir. Serum kreatininini kas dokusundaki kreatinin metabolik ürünüdür ve üretimi kas kitlesi ile ilişkilidir. Serum kreatininini glomerular tarafından serbest bir şekilde filtre edilir ve reabsorpsiyonu yoktur; ancak küçük miktarlarda sekrete edilir. Kreatinin klirensi, idrar kreatininini, idrar hacmi ve serum kreatininini kullanılarak hesaplanır. Kreatinin klirensi endojen metodlar arasında altın standart olarak kabul edilir ve yalnız başına serum kreatinininden daha iyidir [131, 132]. Yaptığımız çalışmada böbrek fonksiyonlarını değerlendirebilmek için kreatinin klirensini hesapladık. Kontrol grubu ile kıyasladığımızda, tüm diyabetik gruplarda (D, D-M, D-Myr) tedavi öncesinde, 2. günde ve 6. günde kreatinin klirensi anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Bu bulgular diğer çalışmalarla uyumludur [126, 128]. Mersin ve myricetin verilen diyabetik ratların on günlük tedavi sonrasında kreatinin klirensi her iki grupta da diyabet (D) grubuna göre yükselmiştir. Tedavi sonrası 10. günde ölçülen kreatinin klirensi myricetin verilen ratlarda kontrole göre anlamlı bir değişiklik göstermektedir.

Üre, protein metabolizmasının atılım ürünüdür. Karaciğerde üretilir ve böbrekler aracılığıyla atılır. Renal fonksiyonlar normal olduğunda kan üre nitrojeni (BUN) düşük seviyelerdedir. Normalde böbrekler aracılığı ile atılması gereken üre gibi çözülmüş maddeler, renal yetmezlik geliştiğinde plazmada birikir ve üremiye sebep olur. Klasik olarak yüksek BUN seviyeleri renal fonksiyon kaybının bir belirtecidir. Ancak yüksek BUN düzeylerinin birçok hüresel süreçte ters etkilerinin olabileceği düşünülmektedir [133]. Çalışma prosedürümüz gereği deneysel olarak oluşturduğumuz tüm diyabetik ratların kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, tedavi öncesinde BUN seviyelerinin anlamlı olarak yükseldiği gözlemlenmiştir. Bu bulgular literatür ile uyumludur [77, 134]. Kontrol, diyabet ve diyabet-mersin gruplarında günler arasında anlamlı bir farklılık gözlenmezken, diyabet-myricetin grubunda tedavi öncesi BUN değerleri tedavi sonrasına göre anlamlı olarak yüksektir.

Sıçanların böbrek dokularından hazırlanan preparatlar incelendiğinde kontrol grubuna göre diyabet grubunda hücre yapılarında ve bütünlüğünde önemli olarak dejenerasyon gözlemlenmiştir. Diyabet sonucu oluşan renal hasar böbrek preparatlarında oldukça açık şekilde gözlemlenmiştir. Glomeruler, tübüler ve tübülointerstisyel yapı değişikliklerini içeren diyabetik böbrek hasarının gelişim mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak hipergliseminin, glikoz otooksidasyonu ve protein glikozilasyonu ile serbest oksijen radikallerinin hızını arttırması ve koruyucu antioksidan kapasiteyi düşürmesiyle ortaya çıkan oksidatif stresin diğer diyabetik komplikasyonlar gibi böbrek üzerinde de etkisi olabileceği bildirilmektedir [138]. Düşen antioksidan kapasitenin daha fazla hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri gibi reaktiflerin oluşumunu hızlandırıp, doku hasarını kolaylaştırdığı düşünülmektedir. Bazı araştırmacılar oksidatif stres inhibisyonunun DN bulgularının hafiflemesine neden olduğunu rapor etmiştir [138]. Böbrek, daha önce de bahsedildiği gibi, glikoz girişi insüline bağımlı olmayan bir dokudur. Kan glikoz konsantrasyonu yükseldiğinde normalde aktif olmayan aldoz redüktaz yolu aktive olur ve sorbitol oluşumuna neden olur. Sorbitol hücre membranından diffüze olamadığından, hücre içinde birikir ve membran bütünlüğünü bozar. Ayrıca osmotik etki yaparak hücrenin su alıp şişmesine neden olarak, buna bağlı olarak da morfolojik

ve fonksiyonel yapı değişikliklerine sebep olur. Böbrek dokusundaki tüm bu bozuklukların hiperglisemi, DN ile gelişen hipertansiyon sonucu gelişebileceği düşünölmektedir. Mersin ve myricetin ile tedavi edilen diyabetik sıçanların böbrek dokularındaki histolojik bulgular olumlu yönde bir tedavinin yapıldığını göstermektedir. Tedavi sonrası böbrek tübülleri ve glomerulardaki hücreler diyabet grubuna göre daha düzgün görölmektedir. Myricetin ve mersin bitkisinin antioksidan ve antihiperglisemik özelliklerinden dolayı, diyabetik sıçanların böbrek dokularında tedavi sonrasında morfolojik bulgular daha normale yakın gözlenmiştir.

Streptozotozin ile oluşturulan diyabetik sıçan grubunda idrar proteini, serum BUN değerleri, böbrek histolojisi ve kreatinin klirensi değerlerinin, kontrol grubuna göre farklı bulunması, sıçanlarda diyabetin önemli bir mikrovasküler komplikasyonu olan DN'nin habercisi olan böbrek fonksiyonlarının bozulduğunun bir göstergesidir.

Bilindiği gibi böbrek fonksiyonlarının belirlenmesinde kullanılan temel testler BUN ve kreatinin klirensidir. Protein katabolizmasının stabil olmadığı durumlarda BUN değerleri renal fonksiyonu doğru olarak yansıtmaz. Örneğin dehidratasyon ve benzeri su-elektrolit dengesizliklerinde göreceli BUN konsantrasyonu artışı, yani prerenal azotemi, gelişebilir. Diyabetik gruplarda gözlenen BUN yüksekliğine, hiperglisemiye bağımlı su-elektrolit dengesizliği ve genel durum bozukluğu katkı sağlayabilir. Tedavi olan diyabetik ratlarda kan şekerinin daha regüle hale gelmesi BUN değerlerinde görölen anlamlı azalmayı açıklayabilir niteliktedir.

Kreatinin klirensi böbrek fonksiyonlarını yansıtan en iyi parametredir. Çalışmada elde edilen verilere göre sadece myricetin tedavisi alan ratlarda kreatinin klirensinde anlamlı bir düşme olmuştur. Bu durumda böbrek fonksiyonlarını iyileştirme yönünden myricetin, mersin bitki ekstraktına göre daha etkili olduğu söylenebilir.

Yapılan birçok diyabet ile oksidan stres ilişkisi araştırmalarına göre, DM fonksiyonel ve yapısal komplikasyonlarla ilişkili ciddi bir metabolik bozukluktur. Bu bozukluk insan ve hayvanlarda ROS'nin üretimindeki artış ile ilişkilidir [135]. Artmış oksidatif stresin, diyabetin ve komplikasyonlarının, gelişiminde ve ilerlemesinde oldukça büyük bir payı olduğu kabul edilir. Diyabete, genellikle serbest radikal oluşumunun artışı ya da antioksidan savunma sisteminin zayıflaması eşlik eder [136]. Serbest oksijen radikal aktivitesindeki artış lipid peroksidasyonunu başlatabilir; proteinlerin glikasyonuna ve enzimlerin inaktivasyonuna neden olabilir; kollojenin yapı ve fonksiyonunda değişimlere sebep olabilir; bazal membran ve diğer membranlara etkisi olabilir ve diyabetin uzun dönemli komplikasyonlarında önemli rol oynayabilir. Diyabette oksidatif stres, antioksidan sistemin yetersiz kalması ile belirir. Bu durum serbest radikallerin zararlı etkilerini daha da artırır. Diyabetik insan ve hayvan modellerinin, kronik hiperglisemiden dolayı yüksek oksidatif stres sergiledikleri raporlanmıştır. Diyabetin başlıca semptomu olan hiperglisemi sadece ROS'un oluşumunu artırmaz, bunun yanında ROS'ni temizleyici enzimler tarafından katalizlenen antioksidan reaksiyonlara da etki eder [112].

Diyabetik nefropatide ve diğer diyabetik komplikasyonlarda da en yaygın patojenik faktörün oksidatif stres olduğu düşünölmektedir [137]. Reaktif oksijen türü

oluşturan enzimler arasında, süperoksit radikalının biyolojik kaynağı olarak bilinen XO, nefropati gibi diyabetik komplikasyonların gelişiminde önemli rol oynar [138].

Çalışmamızda oksidatif statüyü belirlemek için XO ve XDH enzimlerinin böbrek dokusundaki aktivitelerini ölçtük. Bu ölçümlerin sonucunda kontrol grubundaki sıçanların böbrek dokusuna kıyasla, diyabetik sıçanların böbrek dokusunda daha yüksek XO ve XDH aktivitesi bulunmuştur. Bu bulgular literatürdeki çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Kim HJ et al. yaptığı çalışmada renal XO aktivitesinin diyabetik hayvanlarda yüksek olduğunu belirtmiştir [137]. Jin DQ et al. diyabet sürecinde sıçan karaciğerinde XO aktivitesini yüksek bulmuştur [138]. Desco M-C et al. yine aynı şekilde yaptığı bir çalışmada, hepatik XO ve XDH aktivitelerinin diyabette arttığını göstermiştir [139]. Tüm bu literatür bulgularını ve sunulan bulguları bir arada düşünürsek diyabetik komplikasyonların gelişiminin, XO aktivitesinin artışından dolayı süperoksit üretiminin artmasıyla ilişkili olabileceğini söyleyebiliriz. Mersin ve myricetin ile tedavi ettiğimiz diyabetik gruplarda, XO ve XDH seviyeleri anlamlı olarak düşmüştür. Diyetle alınan flavonoidlerin, insan sağlığı üzerindeki yararlı etkileri önemli derecede dikkat çekmiştir. Bazı flavonoidlerin, süperoksit ve hidrojen peroksit üreten XO enzimini inhibe ettiği bilinmektedir [140]. Mo S-F et al. yaptığı bir çalışmada 15 adet flavonoidin hipoürisemik etkilerini incelemiştir. Kuersetin, puerarin, myricetin, morin ve kamferol hiperürisemik hayvanlarda karaciğerdeki ürik asit seviyelerini önemli derecede düşürdüğünü gözlemlemişlerdir. Kuersetin, puerarin, myricetin, morin ve kamferol'ün karaciğer XO'ını inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir. Tüm bu bilgilere göre bu flavonoidler XO'ı inhibe etmek suretiyle ürik asit seviyelerini azalttığı düşünülmektedir [141]. Yapılan çalışmalarda flavonoidlerdeki C-5 ve C-7 pozisyonundaki hidroksil grubunun XO inhibisyonunda zorunlu olarak bulunması gerektiğini göstermiştir. Yapı-aktivite ilişkisi çalışmaları, C-7 hidroksil grubu içeren krisin, luteolin, kamferol, kuersetin ve myricetin gibi planar flavonlar ve flavonollerin düşük konsantrasyonlarında ($IC_{50}=0,4-5,02$ uM arasında) XO'ı inhibe ettiklerini göstermiştir [141, 142]. Bizim çalışmamızda da XO ve XDH enzimlerinin, bir flavonoid olan myricetin ve yüksek miktarlarda flavonoid içeren mersin bitkisi ile tedavi sonucunda, anlamlı derecede inhibe olduğu görülmüştür.

Glutasyon peroksidaz hidrojen peroksit ya da organik peroksitleri substrat olarak kullanır. Katıldığı reaksiyon sonucunda peroksitleri suya veya alkollere dönüştürür ve GSH'ı okside eder [136]. Glutasyon peroksidaz aktivitesi, diyabet grubunda kontrol grubundan anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Bu bulgu diyabet ile ilgili yapılan diğer çalışmalarla uyumludur [106, 135, 143, 144]. Mersin ve myricetin ile yaptığımız tedaviler sonrasında glutasyon peroksidaz aktivitesi her iki grupta da anlamlı olarak artmıştır ve kontrol seviyelerine yaklaşmıştır. Yüksek kan glukoz seviyelerinde glukozun protein yapısındaki bileşiklere non-enzimatik olarak bağlandığı yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Aynı mekanizma ile glukoz protein yapısındaki enzimlere de bağlanarak aktivitelerini inhibe edebileceği düşünülebilir. Bu sebeplerden dolayı diyabette glutasyon peroksidaz aktivitesi düşmüş olabilir. Flavonoidlerin ve flavonoid içeren mersin bitkisinin muhtemel antioksidan gücü ortamda bulunan reaktif oksijen türlerini nötralize ederek, ortamın oksidan stresini azaltır. Bu sayede GPx aktivitesinde artış olabileceği de düşünülmelidir. Myricetin

ve kuersetin gibi flavonoidlerin yüksek miktarlarda tüketilmesinin diyabet riskini azalttığı bilinmektedir [12].

Diyabet ve diyabet komplikasyonlarının reaktif oksijen türleri ile olan ilişkisini gösteren çalışmalarda, non-enzimatik glikasyon, enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stres, sorbitol yolunun aktivitesi, hipoksi ve iskemi-reperfüzyon sonucu oluşan doku hasarının serbest radikal üretimini arttırdığı ve antioksidan savunma sistemini değiştirdiği vurgulanmaktadır [76, 145]. Serbest radikal oluşumunun hipergliseminin direkt sonucu olduğunu destekleyen çalışmaların [146] yanısıra endotel ve düz kas hücreleri yüksek konsantrasyonda glukoz içeren ortamda inkübe edildiğinde de serbest radikal oluşumunun başladığı gözlenmiştir. Hiperglisemi ile oksidatif stres arasında yakın ilişki olduğu görüşü in vivo çalışmalar ile de desteklenmiştir. Diyabetik hastaların uzun süreli yüksek kan glukoz konsantrasyonlarına maruz kalmaları oksidatif stresi arttırabilir. Non enzimatik glikozilasyonun glukozun oto-oksidasyonu ile ilişkili olduğu ve yine glikozillenmiş proteinlerin serbest radikal oluşumunda çok önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir [76].

Sonuç olarak mersin bitkisinin ve doğada yaygın olarak bulunan bir flavonoid olan myricetinin anti-hiperglisemik ve antioksidan etkisinden dolayı böbrek fonksiyonlarında bir iyileşme sağladığı gözlemlenmiştir. Edinilen bilimsel veriler, diyabetde oluşan böbrek fonksiyon bozukluğunun azaltılmasında yeni doğal tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde fayda sağlayabilir.

SONUÇLAR

Bulduğumuz deneysel verilere göre sonuçlarımızı şu şekilde özetleyebiliriz:

1. Uzun süreli hiperglisemiye maruz kalan hayvanların dış görünüşlerinde gözle görülür bir değişim mevcuttur. Hayvanlarda halsizlik, artmış su tüketimi ve vücut ağırlıklarında önemli derecede azalma gözlemlenmiştir.
2. Açlık kan şekeri, günlük idrar hacmi ve vücut ağırlığı bulguları streptozotzin enjekte edilen sıçanların diyabet olduğunun göstergesidir.
3. Böbrek ağırlığı/vücut ağırlığı, idrar proteini, BUN, böbrek histolojisi ve kreatinin klirensi bulguları diyabetik sıçanlarda böbrek fonksiyonlarının bozulduğunu göstermiştir.
4. Myricetin mersin bitkisi içerisindeki toplam flavonoid miktarının büyük bir kısmını oluşturduğu HPLC ve spektrofotometrik analizler sonucunda gösterilmiştir.
5. Myricetin ve mersin bitkisi ekstraktı, diyabetin ilk ve en önemli belirteci olan hiperglisemiyi azalttığı gösterilmiştir.
6. Myricetin ve mersin bitkisi ekstraktının kısa süreli tedavi sonucunda vücut ağırlıkları ve böbrek ağırlığı/vücut ağırlığı üzerine pek etkili olmadığı görülmüştür. Bunun yanında tedavi gruplarında idrar çıkışının daha az olduğu saptanmıştır.
7. Mersin ve myricetin hipoglisemik etkisine bağlantılı olarak BUN ve idrar proteini değerlerini düşürdüğü gözlemlenmiştir. Tedavi bitiminde myricetin grubunda anlamlı ölçüde olmakla birlikte tüm tedavi gruplarında kreatinin klirensinin yüksek olduğu görülmüştür.
8. Mersin ve myricetin diyabetik hayvanlarda, ksantin oksidoredüktaz enzim sistemini inhibe edip, glutayon peroksidazın aktivitesini artırarak oksidatif strese karşı rol oynadığı gösterilmiştir.

ÖZGEÇMİŞ

Filiz ÖZCAN, 01.02.1982'de Antalya'da doğdu. İlkokulu 1993 yılında Antalya Barbaros İlkokulu'nda, ortaokulu 1996 yılında Antalya Faruk Tugayoğlu İlköğretim Okulu'nda, liseyi 1999 yılında Antalya Lisesi'nde ve lisans öğrenimini de 2004 yılında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde tamamladı. 2006 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı. Halen Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde araştırma görevlisi olarak çalışmaya devam etmektedir. Yabancı dili İngilizcedir.

KAYNAKLAR

1. Rahimi R, Nikfar S, Larijani B, and Abdollahi M, A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. *Biomed Pharmacother*, 2005. 59(7): p. 365-73.
2. Sepici-Dincel A AS, Cevik C, Sengelen M, Yeşilada E, Effects of in vivo antioxidant enzyme activities of myrtle oil in normoglycaemic and alloxan diabetic rabbits. *J Ethnopharmacol*, 2007. 110(3): p. 498-503.
3. Öntürk H ÖH, Deneysel diyabet oluşturulması ve kan şeker seviyesinin Ölçülmesi. *Genel Tıp Derg*, 2007. 17(4): p. 231-236
4. Renno WM, Abdeen S, Alkhalaf M, and Asfar S, Effect of green tea on kidney tubules of diabetic rats. *Br J Nutr*, 2008. 100(3): p. 652-9.
5. Celen YZ OE, Araz M, Okan V, Diabetes Mellitus Olgularında Glomerular Filtrasyon Değerlerinin İncelenmesi. *Van Tıp Dergisi*, 2000. 7(1): p. 24-27.
6. Oktem F, Ozguner F, Yilmaz HR, Uz E, and Dundar B, Melatonin reduces urinary excretion of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase, albumin and renal oxidative markers in diabetic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2006. 33(1-2): p. 95-101.
7. Scott JA and King GL, Oxidative stress and antioxidant treatment in diabetes. *Ann N Y Acad Sci*, 2004. 1031: p. 204-13.
8. Ohtake K, Ishiyama Y, Uchida H, Muraki E, and Kobayashi J, Dietary nitrite inhibits early glomerular injury in streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats. *Nitric Oxide*, 2007. 17(2): p. 75-81.
9. Schnackenberg CG, Oxygen radicals in cardiovascular-renal disease. *Curr Opin Pharmacol*, 2002. 2(2): p. 121-5.
10. Cimen M, Flavonoidler ve Antioksidan Özellikleri. *T Klin J Med Sci*, 1999. 19(296-304).
11. Harborne JB and Williams CA, Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 2000. 55(6): p. 481-504.
12. Knekt P, Kumpulainen J, Jarvinen R, Rissanen H, Heliovaara M, Reunanen A, Hakulinen T, and Aromaa A, Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr*, 2002. 76(3): p. 560-8.

13. Moon YJ, Wang X, and Morris ME, Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicol In Vitro*, 2006. 20(2): p. 187-210.
14. Cotelle N, Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem*, 2001. 1(6): p. 569-90.
15. Yoshimura M, Amakura Y, Tokuhara M, and Yoshida T, Polyphenolic compounds isolated from the leaves of *Myrtus communis*. *Nat Med (Tokyo)*, 2008. 62(3): p. 366-8.
16. Elfellah MS, Akhter MH, and Khan MT, Anti-hyperglycaemic effect of an extract of *Myrtus communis* in streptozotocin-induced diabetes in mice. *J Ethnopharmacol*, 1984. 11(3): p. 275-81.
17. Sepici A, Gurbuz I, Cevik C, and Yesilada E, Hypoglycaemic effects of myrtle oil in normal and alloxan-diabetic rabbits. *J Ethnopharmacol*, 2004. 93(2-3): p. 311-8.
18. Onal S, Timur S, Okutucu B, and Zihnioglu F, Inhibition of alpha-glucosidase by aqueous extracts of some potent antidiabetic medicinal herbs. *Prep Biochem Biotechnol*, 2005. 35(1): p. 29-36.
19. Montoro P, Tuberoso CI, Piacente S, Perrone A, De Feo V, Cabras P, and Pizza C, Stability and antioxidant activity of polyphenols in extracts of *Myrtus communis* L. berries used for the preparation of myrtle liqueur. *J Pharm Biomed Anal*, 2006. 41(5): p. 1614-9.
20. Mealey BL and Ocampo GL, Diabetes mellitus and periodontal disease. *Periodontol 2000*, 2007. 44: p. 127-53.
21. Aslan M, Endokrin ve Metabolizma hastalıkları. İç Hastalıkları, ed. İlicin G BK, Süleymanlar G, Unal S. Vol. 2. Cilt. 2003. 2279–2291.
22. Conget I, [Diagnosis, classification and pathogenesis of diabetes mellitus]. *Rev Esp Cardiol*, 2002. 55(5): p. 528-35.
23. Ichinose K KE, Eguchi K, Recent Advancement of Understanding Pathogenesis of Type 1 Diabetes and Potential Relevance to Diabetic Nephropathy. *Am J Nephrol*, 2007. 27: p. 554-564.
24. WHO, Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus, in *report of WHO consultation*. 1999.
25. Malecki M and Skupien J, Problems in differential diagnosis of diabetes types. *Pol Arch Med Wewn*, 2008. 118(7-8): p. 435-40.
26. Leahy JL, Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Arch Med Res*, 2005. 36(3): p. 197-209.

27. ADA, Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care*, 2007. 27: p. 4-41.
28. Skamagas M, Breen TL, and LeRoith D, Update on diabetes mellitus: prevention, treatment, and association with oral diseases. *Oral Dis*, 2008. 14(2): p. 105-14.
29. Tugrul A, Diyabetik Nefropati. *Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2002. 19 (2): p. 113-121.
30. Kanwar YS, Wada J, Sun L, Xie P, Wallner EI, Chen S, Chugh S, and Danesh FR, Diabetic nephropathy: mechanisms of renal disease progression. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2008. 233(1): p. 4-11.
31. ADA, Nephropathy in Diabetes. *Diabetes Care*, 2004. 27: p. 79-83.
32. Lehmann R and Schleicher ED, Molecular mechanism of diabetic nephropathy. *Clin Chim Acta*, 2000. 297(1-2): p. 135-44.
33. Gross JL, de Azevedo MJ, Silveiro SP, Canani LH, Caramori ML, and Zelmanovitz T, Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment. *Diabetes Care*, 2005. 28(1): p. 164-76.
34. Kurt M AA, Gürlek A;, Diyabetik Nefropati. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 2004. 35: p. 12-17.
35. Fioretto P BM, Barzon I, Arboit M, Vestra MD; , Diabetic nephropathy: An update on renal structure. *International Congress Series*, 2007. 1303: p. 51-59.
36. Vestra MD FP, Diabetic nephropathy: renal structural studies in type 1 and type 2 diabetic patients. *International Congress Series*, 2003. 1253: p. 163-169.
37. Thomas S VG, Diabetic nephropathy. *Medicine*, 2006. 34(3): p. 83-86.
38. Sözen T, Endokrin ve Metabolizma hastalıkları. *İç Hastalıkları*, ed. İliçin G, Biberoglu, K, Süleymanlar, G, Ünal, S. Vol. 2. 2003. 2321-2331.
39. Nordquist L and Palm F, Diabetes-induced alterations in renal medullary microcirculation and metabolism. *Curr Diabetes Rev*, 2007. 3(1): p. 53-65.
40. Veldman BA and Vervoort G, Pathogenesis of renal microvascular complications in diabetes mellitus. *Neth J Med*, 2002. 60(10): p. 390-6.
41. Cumbie BC and Hermayer KL, Current concepts in targeted therapies for the pathophysiology of diabetic microvascular complications. *Vasc Health Risk Manag*, 2007. 3(6): p. 823-32.

42. Haneda M, Koya D, Isono M, and Kikkawa R, Overview of glucose signaling in mesangial cells in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 2003. 14(5): p. 1374-82.
43. Craig KJ DK, Munnery M, Owens DR, Williams JD, Phillips AO;, Identification and Management of Diabetic Nephropathy in the Diabetes Clinic. *Diabetes Care*, 2003. 26: p. 1806-1811.
44. Fioretto P, Bruseghin M, Berto I, Gallina P, Manzato E, and Mussap M, Renal protection in diabetes: role of glycemic control. *J Am Soc Nephrol*, 2006. 17(4 Suppl 2): p. S86-9.
45. Blickle JF, Doucet J, Krummel T, and Hannedouche T, Diabetic nephropathy in the elderly. *Diabetes Metab*, 2007. 33 Suppl 1: p. S40-55.
46. Soyulu A, Altunkeser, BB; , Oral antidiyabetiklerin kardiyovasküler etkileri. *Selçuk Tıp Derg* 2005. 21: p. 67-71.
47. Taylor LP and Grotewold E, Flavonoids as developmental regulators. *Curr Opin Plant Biol*, 2005. 8(3): p. 317-23.
48. Cushnie TP and Lamb AJ, Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents*, 2005. 26(5): p. 343-56.
49. Heim KE, Tagliaferro AR, and Bobilya DJ, Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem*, 2002. 13(10): p. 572-584.
50. Aherne SA and O'Brien NM, Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, 2002. 18(1): p. 75-81.
51. Tsimogiannis D, Oreopoulou, V, Free radical scavenging and antioxidant activity of 5, 7, 3', 4'-hydroxy-substituted flavonoids. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2004. 5: p. 523- 528.
52. Sugihara N, Ohnishi, M, Imamura, M, Furuno, K, Differences in Antioxidative Efficiency of Catechins in Various Metal-Induced Lipid Peroxidations in Cultured Hepatocytes. *Journal of Health Science*, 2001. 47(2): p. 99-106.
53. Ross J, Kasumn CM; , Dietary Flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. *Annu. Rev. Nutr.*, 2002. 22: p. 19-34.
54. Justesen U, Knuthsen P, Andersen NL, Leth T; , Estimation of daily intake distribution of flavonols and flavanones in Denmark. *Scand J Nutr*, 2000. 44: p. 158-160.
55. Scalbert A, Morand C, Manach C, and Remesy C, Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed Pharmacother*, 2002. 56(6): p. 276-82.

56. Murota K and Terao J, Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Arch Biochem Biophys*, 2003. 417(1): p. 12-7.
57. Lee KH and Choi EM, Myricetin, a naturally occurring flavonoid, prevents 2-deoxy-D-ribose induced dysfunction and oxidative damage in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Eur J Pharmacol*, 2008. 591(1-3): p. 1-6.
58. Ong KC and Khoo HE, Biological effects of myricetin. *Gen Pharmacol*, 1997. 29(2): p. 121-6.
59. Kumamoto T, Fujii M, and Hou DX, Myricetin directly targets JAK1 to inhibit cell transformation. *Cancer Lett*, 2008.
60. Tzeng SH, Ko WC, Ko FN, and Teng CM, Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids. *Thromb Res*, 1991. 64(1): p. 91-100.
61. Robak J and Gryglewski RJ, Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharmacol*, 1988. 37(5): p. 837-41.
62. Pirouzpanah S, Hanaee J, Razavieh SV, and Rashidi MR, Inhibitory effects of flavonoids on aldehyde oxidase activity. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2008: p. 1.
63. Hayder N, Bouhleb I, Skandrani I, Kadri M, Steiman R, Guiraud P, Mariotte AM, Ghedira K, Dijoux-Franca MG, and Chekir-Ghedira L, In vitro antioxidant and antigenotoxic potentials of myricetin-3-o-galactoside and myricetin-3-o-rhamnoside from *Myrtus communis*: modulation of expression of genes involved in cell defence system using cDNA microarray. *Toxicol In Vitro*, 2008. 22(3): p. 567-81.
64. Pereira TA and Das NP, Assay of liver cytosol lipoxygenase by differential pulse polarography. *Anal Biochem*, 1991. 197(1): p. 96-100.
65. Ong KC and Khoo HE, Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. *Life Sci*, 2000. 67(14): p. 1695-705.
66. Oğur R, Mersin Bitkisi (*Myrtus Communis L.*) Hakkında Bir İnceleme. *Çevre Dergisi*, 1994. 10: p. 21-25.
67. Aydın C, Özcan, MM, Determination of nutritional and physical properties of myrtle (*Myrtus communis L.*) fruits growing wild in Turkey. *Journal of Food Engineering*, 2007. 79: p. 453-458.
68. İlçim A, Diğrak, M, Bağcı, E; , Bazı Bitki Ekstraktlarının Antimikrobiyal Etkilerinin Araştırılması. *Tr. J. of Biology*, 1998. 22: p. 119-125.
69. Romani A, Pinelli P, Mulinacci N, Vincieri FF, Tattini M; , Identification and Quantitation of Polyphenols in Leaves of *Myrtus communis L.* *Chromatographia*, 1999. 49: p. 17-20.

70. Farah A, Afifi A, Fechtal M, Chhen A, Satrani B, Talbi M, Chaouch A; , Fractional distillation effect on the chemical composition of Moroccan myrtle (*Myrtus communis* L.) essential oils. *Flavour Fragr. J.* , 2006. 21: p. 351-354.
71. Tuberoso C, Melis M, Angioni A, Pala M, Cabras P, Myrtle hydroalcoholic extracts obtained from different selections of *Myrtus communis* L. *Food Chemistry*, 2007. 101: p. 806-811.
72. Montoro P, Tuberoso CI, Perrone A, Piacente S, Cabras P, and Pizza C, Characterisation by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry of anthocyanins in extracts of *Myrtus communis* L. berries used for the preparation of myrtle liqueur. *J Chromatogr A*, 2006. 1112(1-2): p. 232-40.
73. Bonjar GH, Antibacterial screening of plants used in Iranian folkloric medicine. *Fitoterapia*, 2004. 75(2): p. 231-5.
74. Feisst C, Franke L, Appendino G, and Werz O, Identification of molecular targets of the oligomeric nonprenylated acylphloroglucinols from *Myrtus communis* and their implication as anti-inflammatory compounds. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005. 315(1): p. 389-96.
75. Chryssavgi G, Vassiliki P, Athanasios M, Kibouris T, Michael K;, Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chemistry*, 2008. 107: p. 1120-1130.
76. Altan N, Sepici Dinçel A, Koca C, Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres. *Turk J Biochem*, 2006. 31(2): p. 41-45.
77. Kaleem M, Asif M, Ahmed QU, and Bano B, Antidiabetic and antioxidant activity of *Annona squamosa* extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Singapore Med J*, 2006. 47(8): p. 670-5.
78. Akkuş İ, Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. 1995: Mimoza yayınları.
79. Memişoğulları R, Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 2005. 3: p. 30-39.
80. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, and Telser J, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007. 39(1): p. 44-84.
81. Çavdar C, Sifil, A, Çamsarı, T, Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*, 1997. 3-4: p. 92-95.

82. Blokhina O, Virolainen E, and Fagerstedt KV, Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot (Lond)*, 2003. 91 Spec No: p. 179-94.
83. Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, and Lomri A, Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint Bone Spine*, 2007. 74(4): p. 324-9.
84. Liochev SI and Fridovich I, The effects of superoxide dismutase on H₂O₂ formation. *Free Radic Biol Med*, 2007. 42(10): p. 1465-9.
85. Fujii J, Iuchi Y, and Okada F, Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reprod Biol Endocrinol*, 2005. 3: p. 43.
86. Margis R, Dunand C, Teixeira FK, and Margis-Pinheiro M, Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. *Febs J*, 2008. 275(15): p. 3959-70.
87. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, and Mazur M, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, 2006. 160(1): p. 1-40.
88. Kalpakcioglu B and Senel K, The interrelation of glutathione reductase, catalase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and glucose-6-phosphate in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*, 2008. 27(2): p. 141-5.
89. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, and Giovannini C, Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem*, 2005. 16(10): p. 577-86.
90. Kirkman H, Gaetani GF, Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends in Biochemical Sciences*, 2006. 32(1): p. 44-50.
91. Scandalios JG, Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res*, 2005. 38(7): p. 995-1014.
92. Enroth C EB, Okamoto K, Nishinoi T, Nishino T, Pai EF, Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: Structure-based mechanism of conversion. *PNAS*, 2000. 97(20): p. 10723-10728.
93. Wassmann S, Wassmann K, and Nickenig G, Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension*, 2004. 44(4): p. 381-6.

94. Berry CE and Hare JM, Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol*, 2004. 555(Pt 3): p. 589-606.
95. Koou A, Frederiks WM, Gossrau R, Van Noorden CJF; , Localization of Xanthine Oxidoreductase Activity Using the Tissue Protectant Polyvinyl Alcohol and Final Electron Acceptor Tetranitro BT; . *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1991. 39(1): p. 87-93.
96. Patetsios P, Song M, Shutze WP, Pappas C, Rodino W, Ramirez JA, and Panetta TF, Identification of uric acid and xanthine oxidase in atherosclerotic plaque. *Am J Cardiol*, 2001. 88(2): p. 188-91, A6.
97. Swei A, Lacy F, Delano FA, Parks DA, and Schmid-Schonbein GW, A mechanism of oxygen free radical production in the Dahl hypertensive rat. *Microcirculation*, 1999. 6(3): p. 179-87.
98. Mazzali M, Hughes J, Kim YG, Jefferson JA, Kang DH, Gordon KL, Lan HY, Kivlighn S, and Johnson RJ, Elevated uric acid increases blood pressure in the rat by a novel crystal-independent mechanism. *Hypertension*, 2001. 38(5): p. 1101-6.
99. Bartels H and Bohmer M, [Micro-determination of creatinine]. *Clin Chim Acta*, 1971. 32(1): p. 81-5.
100. Fabiny DL and Ertingshausen G, Automated reaction-rate method for determination of serum creatinine with the CentrifChem. *Clin Chem*, 1971. 17(8): p. 696-700.
101. Mehmetoğlu İ. *Klinik Biyokimya Laboratuvar El Kitabı*. 2004.
102. Talke H and Schubert GE, [Enzymatic Urea Determination in the Blood and Serum in the Warburg Optical Test.]. *Klin Wochenschr*, 1965. 43: p. 174-5.
103. Beckman JS, Parks DA, Pearson JD, Marshall PA, and Freeman BA, A sensitive fluorometric assay for measuring xanthine dehydrogenase and oxidase in tissues. *Free Radic Biol Med*, 1989. 6(6): p. 607-15.
104. Paglia DE and Valentine WN, Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*, 1967. 70(1): p. 158-69.
105. Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976. 72: p. 248-54.
106. Pari L and Latha M, Antidiabetic effect of *Scoparia dulcis*: effect on lipid peroxidation in streptozotocin diabetes. *Gen Physiol Biophys*, 2005. 24(1): p. 13-26.

107. Lafka T, Sinanoglu V; Lazos ES, On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chemistry*, 2007. 104: p. 1206-1214.
108. Hakimoglu F, Kizil G, Kanay Z, Kizil M, and Isi H, The effect of ethanol extract of *Hypericum lysimachioides* on lipid profile in hypercholesterolemic rabbits and its in vitro antioxidant activity. *Atherosclerosis*, 2007. 192(1): p. 113-22.
109. Hertog MGL HP, Venema DP, Optimization of a Quantitative HPLC Determination of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids in Vegetables and Fruits. *J. Agrlc. Food Chem.*, 1992. 40: p. 1591-1598.
110. Karadeniz F, Burdurlu HS, Koca N, Soyer Y;, Antioxidant activity of selected fruits and vegetables grown in Turkey. *Turk J Agric For*, 2005. 29: p. 297-303.
111. Yılmaz S, Üstündağ, B; , Streptozotosin ile Diabet Oluşturulan Ratların Karaciğer ve Böbrek Dokularında Pirüvat Kinaz Aktivite Düzeyleri. *Turk J Vet Anim Sci*, 2002. 26: p. 549-553.
112. Singh N, Kamath V, and Rajini PS, Attenuation of hyperglycemia and associated biochemical parameters in STZ-induced diabetic rats by dietary supplementation of potato peel powder. *Clin Chim Acta*, 2005. 353(1-2): p. 165-75.
113. Patari A, Forsblom C, Havana M, Taipale H, Groop PH, and Holthofer H, Nephriuria in diabetic nephropathy of type 1 diabetes. *Diabetes*, 2003. 52(12): p. 2969-74.
114. Suzuki D and Miyata T, Carbonyl stress in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Intern Med*, 1999. 38(4): p. 309-14.
115. Meinhardt U, Ammann RA, Fluck C, Diem P, and Mullis PE, Microalbuminuria in diabetes mellitus: efficacy of a new screening method in comparison with timed overnight urine collection. *J Diabetes Complications*, 2003. 17(5): p. 254-7.
116. Vardı N, Iraz M, Öztürk F , Uçar M, Gül M, Eşrefoğlu M , Otlu A, Deneysel Diyabetin Sıçan Böbreklerinde Meydana Getirdiği Histolojik Değişiklikler Üzerine Melatoninin İyileştirici Etkileri. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2005. 12(3): p. 145-152.
117. Kim J-S, Kwon C-S, Son KH, İnhibition of alpha-glucosidase and amylase by luteolin, a flavonoid. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000. 64(11): p. 2458-2461.
118. Fujita H, Yamagami T, and Ohshima K, Long-term ingestion of a fermented soybean-derived Touchi-extract with alpha-glucosidase inhibitory activity is

safe and effective in humans with borderline and mild type-2 diabetes. *J Nutr*, 2001. 131(8): p. 2105-8.

119. Ong KC and Khoo HE, Insulinomimetic effects of myricetin on lipogenesis and glucose transport in rat adipocytes but not glucose transport translocation. *Biochem Pharmacol*, 1996. 51(4): p. 423-9.
120. Kuzuya T, Nakagawa S, Satoh J, Kanazawa Y, Iwamoto Y, Kobayashi M, Nanjo K, Sasaki A, Seino Y, Ito C, Shima K, Nonaka K, and Kadowaki T, Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*, 2002. 55(1): p. 65-85.
121. Ronchi FA, Irigoyen MC, and Casarini DE, Association of somatic and N-domain angiotensin-converting enzymes from Wistar rat tissue with renal dysfunction in diabetes mellitus. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2007. 8(1): p. 34-41.
122. Valentovic MA, Alejandro N, Betts Carpenter A, Brown PI, and Ramos K, Streptozotocin (STZ) diabetes enhances benzo(alpha)pyrene induced renal injury in Sprague Dawley rats. *Toxicol Lett*, 2006. 164(3): p. 214-20.
123. Kang KS, Kim HY, Yamabe N, Nagai R, and Yokozawa T, Protective effect of sun ginseng against diabetic renal damage. *Biol Pharm Bull*, 2006. 29(8): p. 1678-84.
124. Anjaneyulu M and Chopra K, Quercetin, an anti-oxidant bioflavonoid, attenuates diabetic nephropathy in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2004. 31(4): p. 244-8.
125. Kataya HA and Hamza AA, Red Cabbage (*Brassica oleracea*) Ameliorates Diabetic Nephropathy in Rats. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2008. 5(3): p. 281-7.
126. Qi XM WG, Wu YG, Lin H, Shen JJ, Lin SY, Renoprotective Effect of Breviscapine through Suppression of Renal Macrophage Recruitment in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Nephron Exp Nephrol*, 2006. 04: p. 147-157.
127. Wolf G and Ziyadeh FN, Molecular mechanisms of diabetic renal hypertrophy. *Kidney Int*, 1999. 56(2): p. 393-405.
128. Anjaneyulu M and Chopra K, Effect of irbesartan on the antioxidant defence system and nitric oxide release in diabetic rat kidney. *Am J Nephrol*, 2004. 24(5): p. 488-96.
129. Williams ME, Diabetic nephropathy: the proteinuria hypothesis. *Am J Nephrol*, 2005. 25(2): p. 77-94.
130. Sugano M, Yamato H, Hayashi T, Ochiai H, Kakuchi J, Goto S, Nishijima F, Iino N, Kazama JJ, Takeuchi T, Mokuda O, Ishikawa T, and Okazaki R,

High-fat diet in low-dose-streptozotocin-treated heminephrectomized rats induces all features of human type 2 diabetic nephropathy: a new rat model of diabetic nephropathy. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2006. 16(7): p. 477-84.

131. Tanaka A, Suemaru K, and Araki H, A new approach for evaluating renal function and its practical application. *J Pharmacol Sci*, 2007. 105(1): p. 1-5.
132. Wyss M and Kaddurah-Daouk R, Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev*, 2000. 80(3): p. 1107-213.
133. Xiao S, Erdely A, Wagner L, and Baylis C, Uremic levels of BUN do not cause nitric oxide deficiency in rats with normal renal function. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2001. 280(6): p. F996-F1000.
134. Saito M, Kinoshita Y, Satoh I, Shinbori C, Kono T, Hanada T, Uemasu J, Suzuki H, Yamada M, and Satoh K, N-hexacosanol ameliorates streptozotocin-induced diabetic rat nephropathy. *Eur J Pharmacol*, 2006. 544(1-3): p. 132-7.
135. Montilla P, Barcos M, Munoz MC, Bujalance I, Munoz-Castaneda JR, and Tunez I, Red wine prevents brain oxidative stress and nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biochem Mol Biol*, 2005. 38(5): p. 539-44.
136. Maritim AC, Sanders RA, and Watkins JB, 3rd, Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol*, 2003. 17(1): p. 24-38.
137. Kim HJ, Kong MK, and Kim YC, Beneficial effects of Phellodendri Cortex extract on hyperglycemia and diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *BMB Rep*, 2008. 41(10): p. 710-5.
138. Jin DQ, Li G, Kim JS, Yong CS, Kim JA, and Huh K, Preventive effects of *Laminaria japonica* aqueous extract on the oxidative stress and xanthine oxidase activity in streptozotocin-induced diabetic rat liver. *Biol Pharm Bull*, 2004. 27(7): p. 1037-40.
139. Desco MC, Asensi M, Marquez R, Martinez-Valls J, Vento M, Pallardo FV, Sastre J, and Vina J, Xanthine oxidase is involved in free radical production in type 1 diabetes: protection by allopurinol. *Diabetes*, 2002. 51(4): p. 1118-24.
140. Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, and van Leeuwen PA, Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr*, 2001. 74(4): p. 418-25.
141. Mo SF, Zhou F, Lv YZ, Hu QH, Zhang DM, and Kong LD, Hypouricemic action of selected flavonoids in mice: structure-activity relationships. *Biol Pharm Bull*, 2007. 30(8): p. 1551-6.

142. Nagao A, Seki M, and Kobayashi H, Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1999. 63(10): p. 1787-90.
143. Kamalakkannan N and Stanely Mainzen Prince P, Rutin improves the antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic rat tissues. *Mol Cell Biochem*, 2006. 293(1-2): p. 211-9.
144. Lee JS, Effects of soy protein and genistein on blood glucose, antioxidant enzyme activities, and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci*, 2006. 79(16): p. 1578-84.
145. Baynes JW and Thorpe SR, Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes*, 1999. 48(1): p. 1-9.
146. Giugliano D, Ceriello A, and Paolisso G, Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care*, 1996. 19(3): p. 257-67.