



**PİNEALEKTOMİZE EDİLMİŞ VE
STREPTOZOTOSİN İLE DİYABET
OLUŞTURULMUŞ RATLARDA NEFROPATİ
ÜZERİNE KROSİNİN KORUYUCU ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Rihab Mudhafar Ali HAMMOOD KEELO

**2021
YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ BİYOKİMYA**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Eyüp ALTINÖZ**

**PİNEALEKTOMİZE EDİLMİŞ VE STREPTOZOTOSİN İLE DİYABET
OLUŞTURULMUŞ RATLARDA NEFROPATİ ÜZERİNE KROSİNİN
KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Rihab Mudhafar Ali HAMMOOD KEELO

**T.C.
Karabük Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında
Yüksek Lisans Tezi
Olarak Hazırlanmıştır**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Eyüp ALTINÖZ**

**KARABÜK
Kasım 2021**

Rihab Mudhafar Ali HAMMOOD KEELO tarafından hazırlanan “PİNEALEKTOMİZE EDİLMİŞ VE STREPTOZOTOSİN İLE DİYABET OLUŞTURULMUŞ RATLARDA NEFROPATİ ÜZERİNE KROSİNİN KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı bu tezin Yüksek Lisans Tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Eyüp ALTINÖZ
Tez Danışmanı, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından Oy Birliği ile Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 10/11/2021

Ünvanı, Adı SOYADI (Kurumu) İmzası

Başkan : Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ (İNÜ)

Üye : Prof. Dr. Eyüp ALTINÖZ (KBÜ)

Üye : Prof. Dr. Tahir KAHRAMAN (KBÜ)

KBÜ Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulu, bu tez ile, Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Hasan SOLMAZ
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

“Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu; ayrıca bu kuralların ve ilkelerin gerektirdiği şekilde, bu çalışmadan kaynaklanmayan bütün atıfları yaptığımı beyan ederim.”

Rihab Mudhafar Ali HAMMOOD KEELO

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

PİNEALEKTOMİZE EDİLMİŞ VE STREPTOZOTOSİN İLE DİYABET OLUŞTURULMUŞ RATLARDA NEFROPATİ ÜZERİNE KROSİNİN KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Rihab Mudhafar Ali HAMMOOD KEELO

Karabük Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Eyüp ALTINÖZ

Kasım 2021, 95 sayfa

Diyabetes mellitus (DM) insülin hormonunun azlığı veya yokluğu ile bilinen 21. yüzyılın en büyük küresel sağlık sorunlarından biridir. 2019 yılında 20 ile 64 yaş arasında yapılan araştırmalara göre 351,7 milyon insanın DM ye sahip olduğu bu sayının 2030 da ise 417,3 milyona ulaşacağı öngörülmektedir. DM ilerleyen süreçte felç, kardiyovasküler ve böbrek hastalıkları, körlük ve alt ekstremiteler de amputasyona varan komplikasyonlara sebep olmaktadır. Bu durum, özellikle diyabetli kişilerin %79 unun yaşadığı düşük ve orta gelirli ülkelerde, aileler ve ekonomiler üzerinde ağır bir yük oluşturmaktadır.

DM sonucu görülen ciddi mikrovasküler komplikasyonlardan biri olan diyabetik nefropati, son dönemde dünya çapında artış gösteren böbrek yetmezliğinin ana nedenleri arasında yer alır ve diyabet hastalarında yaklaşık %45 gibi yüksek bir oranda

görülmektedir.

Kronik hiperglisemi böbrek dokusunda oksidatif strese ve inflamatuvar yanıtın oluşmasına sebep olur. Bu durum podosit lezyonları, glomerüloskleroz ve azalmış glomerüler filtrasyon hızına (GFR) bağlı tubulointerstisyel fibrozis gibi böbrek histolojik yapısında değişikliklere yol açar. Bu değişiklikler kronik hipergliseminin neden olduğu reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu ile bağlantılı olup glukoz oto-oksidasyon, Fenton reaksiyonu, antioksidan kaynakların tükenmesi gibi enzimatik ve enzimatik olmayan sistemlerden kaynaklanır.

Crocus sativus L. (safran) tıbbi amaçlı kullanılan 150'den fazla uçucu olan ve olmayan bileşenleri içeren aromatik bir bitkidir. Safranın biyoaktif bileşenleri arasındaki antioksidan ve radikal süpürücü özelliği olan krosin, oksidatif strese karşı koruyucu bir role sahiptir. Ayrıca anti-kanserojen, antiinflamatuvar, hepatositlerin toksinlerden korunması, nörodejeneratif ve nefrotoksik bozuklukların tedavisi gibi geleneksel tıpta birçok alanda kullanılmaktadır.

Çalışmamızda, deneyin ilk gününde ratlara pinealektomi işlemi uygulanarak melatonin yoksunluğu oluşturuldu. Pinealektomiye takip eden 30. günde diyabet indüksiyonu için intraperitoneal (i.p) olarak tek doz streptozotosin (STZ) enjeksiyonu yapıldı. STZ uygulamasını takiben 3. günde kuyruk kanından glukoz ölçümü yapılarak diyabet doğrulanmasının ardından 15 gün süreyle krosin tedavisi yapılan Wistar albino ratların böbrek dokusu ve serumundaki biyokimyasal parametreler ve oksidatif stres belirteçlerini ayrıca histopatolojik ve böbrek dokusunun immünohistokimyasal değerlendirmeler göz önünde bulundurularak, STZ ile kombine edilmiş krosin tedavisinin nefrotoksisite üzerindeki olası etkilerini ve STZ kaynaklı nefrotoksisite patogenezinin olası rolünü değerlendirmeyi amaçladık. Bu amaçla altmış rat altı gruba ayrıldı; (a) Kontrol; %0,9 serum fizyolojik i.p olarak aldı, (b) STZ; deneyin 30. günün sonunda periton içi 50 mg/kg STZ enjeksiyonu ile deneysel diyabet oluşturulduktan sonra 15 gün süreyle i.p olarak serum fizyolojik aldı, (c) PX; epifiz bezi pinealektomi ile alındıktan sonra 15 gün süreyle i.p olarak serum fizyolojik aldı, (d) PX+STZ; epifiz bezi pinealektomi ile alındıktan sonra deneyin 30. günün sonunda periton içi 50 mg/kg dozda STZ enjeksiyonu ile deneysel diyabet oluşturulduktan sonra 15 gün süreyle i.p

olarak serum fizyolojik uygulandı, (e) PX+Krosin; epifiz bezi pinealektomi ile alındıktan sonra deneyin 30. gününün sonundan itibaren 15 gün süreyle 50 mg/kg dozda i.p olarak krosin uygulandı, (f) PX+STZ+Krosin; epifiz bezi pinealektomi ile çıkarıldıktan sonra 30. günün sonunda periton içi 50 mg/kg dozda STZ enjeksiyonu ile deneysel diyabet modeli oluşturulduktan sonra 15 gün süreyle 50 mg/kg dozda i.p olarak krosin uygulandı.

Çalışmamıza göre STZ ile indüklenen pinealektomize diyabetik ratlarda böbrek fonksiyon parametrelerinde (BUN ve Kreatinin) önemli artışlar görüldü. Dahası STZ oksidatif stres parametrelerinde (malondialdehit, toplam oksidan seviyesi ve oksidatif stres indeksi) önemli artışlara ve ayrıca antioksidan savunma sistemlerinden (redükte glutasyon, süperoksit dismutaz, katalaz ve toplam antioksidan seviyesi) azalmaya neden oldu. Çalışmamızda yine pinealektomize ve STZ ile diyabet yapılan ratlarda krosin tedavisi edildiğinde, krosin ile tedavi edilmeyenlere kıyasla böbrek fonksiyon parametrelerini ve biyokimyasal parametreleri önemli ölçüde iyileştirdiğini göstermiştir. Histopatolojik ve immünohistokimyasal değerlendirmeler de sonuçlarımızı desteklenmiştir. Sonuç olarak, krosinin diyabetik nefropati üzerindeki koruyucu etkileri, güçlü antioksidan özellikleri, doku antioksidan durumunu iyileştirme yeteneği ve inflamatuvar yolları önleme yeteneği ile ilişkili olabileceğini ortaya koymaktadır.

Anahtar Sözcükler : Pinealektomi, Krosin, Böbrek Hasarı, Tümör Büyüme Faktörü, Streptozotosin, Oksidatif Stres

Bilim Kodu : 1090

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

INVESTIGATION OF THE PROTECTIVE EFFECTS OF CROCIN ON NEPHROPATHY IN PINEALACTOMIZED AND STREPTOZOTOCIN INDUCED DIABETIC RATS

Rihab Mudhafar Ali HAMMOOD KEELO

Karabük University

Institute of Graduate Programs

Department of Medical Biochemistry

Thesis Advisor:

Prof. Dr. Eyüp ALTINÖZ

November 2021, 95 pages

Diabetes melilitus (DM) is known for the lack or absence of insulin and is one of the most important global health problems of the 21st century. In a study conducted in 2019, it was reported that 351.7 million people between the ages of 20 and 64 have DM, and this number will reach 417.3 million in 2030. Uncontrolled DM causes complications including stroke, cardiovascular and kidney diseases, blindness, and amputation of the legs. DM imposes enormous costs on families and economies, especially in low- and middle-income countries where the proportion of people with diabetes is 79%.

Renal failure, one of the most important complications of DM, is seen in approximately 45% of diabetic patients and DM causes diabetic nephropathy as a result of microvascular complications.

Chronic hyperglycemia causes oxidative stress and inflammatory response in kidney tissue. This leads to changes in kidney histological structure such as podocyte lesions, glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis due to decreased glomerular filtration rate (GFR). These changes are associated with the formation of reactive oxygen species (ROS) caused by chronic hyperglycemia and are produced by enzymatic and non-enzymatic systems such as glucose auto-oxidation, Fenton reaction, and depletion of antioxidant sources.

Crocus sativus L. (saffron) is an aromatic plant used for medicinal purposes and has more than 150 volatile and non-volatile components. Crocin, one of the main components of saffron, has a protective role against oxidative stress with its antioxidant and radical scavenging properties. In addition, it is used in many diseases in traditional medicine due to its anti-carcinogenic, anti-inflammatory, hepatoprotective, neuroprotective and nephroprotective properties.

In our study, melatonin deprivation was created by removing the pineal glands of the rats on the first day of the experiment. On the 30th day following pinealectomy, a single intraperitoneal (i.p) injection of streptozotocin (STZ) was performed for diabetes induction. On the 3rd day following the STZ application, diabetes was confirmed by measuring glucose from the tail blood, and then crocin treatment was applied for 15 days. We aimed to evaluate the possible effects of crocin therapy combined with STZ on nephrotoxicity and its possible role in the pathogenesis of STZ-induced nephrotoxicity by measuring biochemical parameters and oxidative stress markers in kidney tissue and serum of Wistar albino rats, as well as histopathological and immunohistochemical evaluations of kidney tissue.

For this purpose, sixty rats were divided into six groups; (a) Control; 0.9% saline received as ip, (b) STZ; received saline as ip for 15 days after experimental diabetes was established by intraperitoneal injection of 50 mg/kg STZ at the end of the 30th day of the experiment, (c) PX; Pineal gland was removed by pinealectomy and received saline as ip for 15 days, (d) PX+STZ; Pineal gland was removed by pinealectomy, experimental diabetes was induced by intraperitoneal injection of 50 mg/kg STZ on the 30th day of the experiment. and saline was applied as ip for 15 days,

(e) PX+ Crocin; After the pineal gland was removed by pinealectomy, 50 mg/kg crocin was applied as ip for 15 days, (f) PX+STZ+Crocin; Pineal gland was taken with pinealectomy on the 30th day of the experiment, an experimental diabetes model was created by intraperitoneal injection of 50 mg/kg STZ and crocin was administered at a dose of 50 mg/kg ip for 15 days.

In our study, significant increases in renal function parameters (BUN and creatinine) were observed in pinealectomized diabetic rats induced by STZ. Moreover, STZ caused significant increases in oxidative stress parameters (malondialdehyde, total oxidant status and oxidative stress index) as well as a decrease in antioxidant defense systems [reduced glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and total antioxidant status (TAS)]. On the other hand, treatment of pinealectomized diabetic rats with crocin significantly improved renal function parameters and biochemical parameters compared to untreated pinealectomized diabetic rats. Histopathological and immunohistochemical evaluations also supported our results. In conclusion, the protective effects of crocin on diabetic nephropathy may be related to its potent antioxidant properties, ability to improve tissue antioxidant status, and ability to inhibit inflammatory pathways.

Key Words : Pinealectomy, Crocin, Kidney Damage, Tumor Growth Factor, Streptozotocin, Oxidative Stress

Science Code : 1090

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının planlanmasında, araŐtırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalıŐmamı bilimsel temeller ışığında Őekillendiren sayın hocam Prof. Dr. Eyüp ALTINÖZ'e sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

Deneyimiz esnasında pinealektomi modeli oluşturulmasında Karabük Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Dr. Öğretim Üyesi Mehmet DEMİR, histoloji ve immünohistokimyasal incelemeleri yaparak tezimin tamamlanmasında yardımcı olan Muęla Sıtkı KOÇMAN Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Hülya ELBE' ye teşekkür ederim.

Yüksek lisans tez çalıŐmalarım esnasında maddi destek sağlayan Karabük Üniversitesi Bilimsel AraŐtırma Projeleri Birimi'ne (Proje No: TYL-2020-2350) teşekkür ederim.

Sevgili aileme manevi hiçbir yardımını esirgemedен yanımda oldukları için tüm kalbimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL.....	ii
ÖZET	iv
ABSTRACT	viii
TEŞEKKÜR	x
İÇİNDEKİLER.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvi
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2	4
PANKREAS	4
İNSÜLİN HORMONU VE BİYOSENTEZİ.....	5
DİYABETES MELLİTUS (DM).....	6
2.1. DİYABETES MELLİTUSUN SINIFLANDIRILMASI.....	7
2.1.1. Tip 1 Diyabetes Mellitus (T1DM)	9
2.1.2. Tip 2 Diyabetes Mellitus (T2DM)	9
2.1.3. Gestasyonel Diyabetes Mellitus (GDM)	10
2.1.4. Diğer Spesifik Diyabetes Mellitus Tipleri.....	11
2.2. DİYABETES MELLİTUSUN TANI KRİTERLERİ.....	11
2.3. DİYABETES MELLİTUSUN KRONİK KOMPLİKASYONLARI	13
2.3.1. Diyabetik Retinopati	14
2.3.2. Diyabetik Nöropati.....	14
2.3.3. Diyabetik Nefropati.....	15
2.3.3.1. Diyabetik Nefropati ve Klinik Evreleri.....	15
2.3.3.2. Diyabetik Nefropati ve Nefrondaki Yapısal Değişiklikler	15
2.3.3.3. Diyabetik Nefropati ve Oksidatif Stres.....	16

	<u>Sayfa</u>
BÖLÜM 3	19
3.1. MELATONİN BİYOSENTEZİ	21
BÖLÜM 4	25
SAFRAN (<i>Crocus sativus</i> , L.).....	25
4.1. KROSİN.....	28
BÖLÜM 5	31
OKSİDATİF STRES VE ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ	31
5.1. OKSİDATİF STRES VE REAKTİF OKSİJEN SEVİYELERİ	31
5.2. ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ.....	32
5.2.1. Enzimatik Antioksidanlar	32
5.2.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	34
BÖLÜM 6	36
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	36
6.1. GEREÇLER	36
6.1.1. Kimyasal Malzemeler ve Kullanılan Yöntemler	36
6.2. YÖNTEMLER	36
6.2.1. Streptozotosin ve Krosin Hazırlanması	36
6.2.2. Ratların Temini ve Bakımı	37
6.2.3. Rat Deney Protokolü	37
6.2.3.1. Pinealektomi İşlemi	38
6.2.3.2. Diyabet Modeli.....	39
6.2.4. Ratlardan Numune Alınması	39
6.2.5. Biyokimyasal Analizler	39
6.2.5.1. Numunelerin Hazırlanması	39
6.2.5.2. Oksidatif Stres Belirteçlerinin Analizi.....	40
6.2.5.3. Böbrek Fonksiyon Testlerinin Ölçümü.....	42
6.2.6. Serum Melatonin Seviyelerinin Ölçümü	42

	<u>Sayfa</u>
6.2.7. Histopatolojik Analiz	42
6.2.8. İmmünohistokimyasal Analiz	45
6.2.9. İstatistiksel Analiz	46
BÖLÜM 7	47
DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA.....	47
7.1. BİYOKİMYASAL BULGULAR	47
7.1.1. Oksidatif Stres Belirteçlerinin Düzeyleri	47
7.1.1.1. Böbrek Dokusu MDA ve GSH Düzeyleri.....	48
7.1.1.2. Böbrek Dokusu SOD ve CAT Aktivite Düzeyleri	49
7.1.1.3. Böbrek Dokusu TAS, TOS ve OSİ Aktivite Düzeyleri	50
7.1.2. Böbrek Fonksiyon Parametre Düzeyleri	52
7.1.2.1. BUN ve Kreatinin Değerleri Düzeyleri	52
7.1.3. Pinealektominin Serum Melatonin Düzeylerine Etkisi	54
7.1.4. Grupların STZ Öncesi ve STZ Sonrası Kan Glukoz Değerlerinin Karşılaştırılması.....	55
7.2. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR	57
7.3. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR	60
7.3.1. TGF-β1 İmmünoreaktivitesi	60
7.4. TARTIŞMA	61
KAYNAKLAR.....	68
EK AÇIKLAMALAR ETİK KURUL İZİNİ	93
ÖZGEÇMİŞ.....	95

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1.	Pankreasın anatomis, ekzokrin ve endokrin hücreleri.....	6
Şekil 2.2.	İnsülin hormonu.	11
Şekil 2.3.	Böbrek glomerulus yapısı ve DM’da görülen yapısal değişiklikler.....	12
Şekil 2.4.	Diyabetik komplikasyonlarda ROS’un rolü.....	16
Şekil 3.1.	Pineal bez ve anatomik yapısı.....	17
Şekil 3.2.	Suprakiazmik nükleus-melatonin döngüsü.....	22
Şekil 3.3.	Melatoninin plazma konsantrasyonlarının sirkadiyen profili..	23
Şekil 3.4.	Melatoninin kimyasal yapısı.....	37
Şekil 3.5.	Melatoninin sentez basamakları.....	38
Şekil 3.6.	Melatoninin antioksidan mekanizmalarından birisi.....	39
Şekil 4.1.	<i>Crocus sativus</i> L. (Safran bitkisi).....	40
Şekil 4.2.	<i>Crocus sativus</i> ’a ait stigma.....	42
Şekil 4.3.	Krosin, krosetin, pikrokrosin ve safranalin kimyasal yapısı.....	43
Şekil 4.4.	Krosin ve diğer türlerinin kimyasal yapıları.....	44
Şekil 5.1.	Başlıca ROS’lar ve detoksifikasyon yolları.....	46
Şekil 5.2.	Enzimatik antioksidanlar ve gerçekleştirdiği reaksiyonlar.....	47
Şekil 7.1.	Böbrek dokusunda MDA seviyesi ve GSH aktivitesi.....	48
Şekil 7.2.	Böbrek dokusunda SOD ve CAT aktivitesi.....	49
Şekil 7.3.	Böbrek dokusunda TAS değerleri.....	51
Şekil 7.4.	Böbrek dokusunda TOS değerleri.....	51
Şekil 7.5.	Böbrek dokusunda OSI değerleri.....	52
Şekil 7.6.	Serum BUN değerleri.....	53
Şekil 7.7.	Serum Kreatinin değerleri.....	54
Şekil 7.8.	Serum melatonin düzeyleri.....	55
Şekil 7.9.	Grupların kan glukoz değerleri.....	56
Şekil 7.10.	Böbrek histopatolojisi hasar skoru.....	58
Şekil 7.11.	TGF-β1 immünoreaktivitesi H-skoru.....	58
Şekil 7.12.	Böbrek histopatolojisini gösteren fotomikrograf.....	59
Şekil 7.13.	Böbrek dokusunda TGF-β1 immünohistokimyasal boyaması.....	60

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1. DM etiyojik sınıflandırılması.....	33
Çizelge 1.2. DM için tanı kriterleri.....	444
Çizelge 6.1. Hematoksilen&Eozin boyama protokolü	36
Çizelge 6.2. Pas boyama protokolü.	40
Çizelge 6.3. IHC boyama protokolü.	41
Çizelge 7.1. Ortalama doku oksidan-antioksidan parametrelerin karşılaştırılması. ...	47
Çizelge 7.2. Ortalama doku TAS, TOS ve OSI değerlerinin karşılaştırılması.	50
Çizelge 7.3. Serum böbrek fonksiyon değerlerinin karşılaştırılması.....	53
Çizelge 7.4. Ortalama açlık kan glukoz değerlerinin karşılaması	56
Çizelge 7.5. Ortalama histopatolojik hasar skoru ve TGF-β1 immünoreaktivitesi	57

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

Na_2HPO_4	: disodyumdihidrojen fosfat
H_2O_2	: hidrojen peroksit
Na_2EDTA	: disodyum etilendiamin tetraasetik asit
H_3PO_4	: fosforik asit
O_2	: oksijen
O_2^-	: süperoksit radikali
HOCl	: hipokloröz asit
ONOO^-	: peroksinitrit radikali
$\text{C}_{44}\text{H}_{64}\text{O}_{24}$: krosin
$\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_4$: krosetin
$\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_7$: pikrokrosin
$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}$: safranal
CPR	: sitokrom P450 redüktaz
$\text{OH}\cdot$: hidroksil radikali
$\text{NO}\cdot$: nitrik oksit radikali

KISALTMALAR

- DM : Diabetes Mellitus
STZ : Streptozotosin
T1DM : Tip 1 Diabetes Mellitus
T2DM : Tip 2 Diabetes Mellitus
GFR : Glomerüler Filtrasyon Hızı
MDA : Malondialdehit
TAS : Total Antioksidan Seviyesi
TOS : Total Oksidan Seviyesi
OSI : Oksidatif Stres İndeksi
GSH : Redükte Glutasyon
SOD : Süperoksit Dismutaz
CAT : Katalaz
TGF- β 1 : Dönüştürücü Büyüme Faktörü- β 1
IDDM : İnsüline Bağımlı Diyabetes Mellitus
NIDDM : İnsüline Bağımlı Olmayan Diyabetes Mellitus
WHO : Dünya Sağlık Örgütü
APG : Açlık Plazma Glukozu
OGTT : Oral Glukoz Tolerans Testi
HbA1c: Glukozillenmiş Hemoglobin A1c
EASD : Avrupa Diyabet Çalışma Birliği
ADA : Amerikan diyabet derneği
IDF : Uluslararası Diyabet Çalışma Birliği
FIGO : Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu
HIP : Gebelikte Hiperglisemi
DIP : Gebelikte Diyabet
GDM : Gestasyonel Diyabetes Mellitus
SDRH : Son Dönem Renal Hastalık
GR : Glutasyon Redüktaz
ROS : Reaktif Oksijen Türleri
GST : Glutasyon-S-Transferaz
AGE : İleri Glikasyon Son Ürünleri

DAG : Diaçilgliserol
DHAP : Dihidroksiaseton Fosfat
GFAT : Glutamin Fruktoz-6-fosfat Amidotransferaz
GP_x : Glutasyon Peroksidaz
NF-κB, Nükleer Faktör-Kappa B
PKC : Protein kinaz C
RAGE : AGE Reseptörü
UDP-GLcNAc: Üridin Difosfat N-asetilglukozamin
eNOS : İndüklenmiş Nitrik Oksit Sentaz
PARP : PoliADP Riboz Polimeraz
GAPDH: Gliseraldehit-3-Dehidrojenaz
GLUT : Kolaylaştırılmış Glukoz Taşıyıcısı
NO : Nitrik Oksit
RAAS : Renin-Anjiotensin-Aldosteron Sistemi
CVO : Sirkumventriküler Organ
SCN : Süprakiazmatik nucleus
MRGC: Melanopsin İçeren Retinal Ganglion Hücreler
RHT : Retinohipotalamik Yol
PVN : Paraventricüler Nükleus
IMCC : İntermediolateral Hücre Kolonu
SCG : Sempatik Servikal Ganglion
PG : Pineal Bez
Mel : Melatonin
AA-NAT: Arilalkilamin-N-asetiltransferaz
ASMT : Asetilserotonin-O-metiltransferaz
AFMK: N1-asetil-N2-formil-5-metoksikinüramin
AFA : Arilamin Formamidaz
TBA : Tiyobarbitrik Asit
DTNB : Dithiobis-2 Nitrobenzoik Asit
BSA : Bovine Serum Albumin
SF : Serum Fizyolojik
i.p : İntroperitoneal
BUN : Kan Üre Azotu

NBT : Nitro Blue Tetrazolium

NTF : Nötral Tamponlanmış Formalin

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Diabetes mellitus (DM), yüksek glukoz seviyeleri ile karakterize olan ve tüm dünyada milyonlarca insanı etkileyen en yaygın metabolik hastalıklardan biridir [1]. DM, β -hücrelerinin kaybından (Tip 1 DM) kaynaklanabileceği gibi, insülin yetersizliği ve/veya insülin reseptörlerine karşı direncin gelişmesi (Tip 2 DM) sonucu görülür [2]. Tedavi edilmeyen DM, nöropati, retinopati ve nefropati gibi ciddi komplikasyonlarda artışa yol açar [3]. DM'nin iyi bilinen komplikasyonlarından biri diyabetik nefropatidir ve esas olarak son dönem böbrek yetmezliğine neden olan renal glomerüllerin mikrovasküler lezyonları ile kendini gösterir [4]. Çalışmalar, diyabetik nefropatinin DM hastalarının üçte birinde yaygın bir komplikasyon olduğunu ve dünya çapında bir tıbbi sorun olduğunu göstermektedir [5, 6]. Glomerüler hiperfiltrasyon, afferent arteriyolün efferent arteriole göre vazodilatasyonu yoluyla hiperglisemiden kaynaklanır ve renal arter kan basıncının artmasına ve glomerülden proksimal tübüllere daha fazla sıvı geçmesine neden olur [7].

Kronik hiperglisemi, böbrek dokusunda oksidatif strese ve inflamatuvar yanıtla neden olarak, podosit lezyonları, glomerüloskleroz ve azalmış glomerüler filtrasyon hızına (GFR) bağlı tübülointersitiyel fibrozis dahil olmak üzere böbrek yapısında değişikliklere yol açar [8]. Mikroalbüminüri, hipertansiyon ve ödem gibi çeşitli klinik semptomlar, diyabetik nefropatinin klinik belirtileri ve semptomlarıdır [9]. Diyabetik nefropati, hücre dışı matriksin artan birikimi, tübüler hücrelerin ve glomerulusun bazal membranlarının kalınlığı ve mezanjiyal hücre proliferasyonu ile karakterize edilir [10].

Diyabetik komplikasyonlarla ilgili en önemli patogenezlerden biri, protein denatürasyonunu, lipid peroksidasyonunu ve mitokondride DNA hasarı oluşturarak hücre disfonksiyonuna ve oksidatif hasara neden olan ROS oluşumundan kaynaklanmaktadır [11]. Endotelial ve mezanjial hücreler gibi diyabetik böbrek hücrelerine ROS saldırısı, ATP sentezinde değişikliklere, hücre içi kalsiyum bozulmasına böylece apoptoz veya nekroz yoluyla hücre ölümüne aracılık eden hücre zarı geçirgenliğinde değişikliklere neden olur [12].

Diyabetik nefropatinin oluşumunda ve ilerlemesinde anahtar rol oynayan yüksek kan şekeri, oksidatif stres ve çeşitli inflamasyon yolları dahil olmak üzere çeşitli yolları geleneksel terapötik ajanlarla düzenleyerek diyabetik nefropatinin önlenebileceği varsayılabilir. *Crocus sativus*' un ana bileşenlerinden biri olan krosin, anti-inflamatuar, antikanser, nöroprotektif, antihipertansif ve radikal süpürücü özelliklere sahip güçlü bir antioksidandır [13]. Önceki çalışmalar, diyabetik sıçanlardaki krosinin, yüksek kan şekeri seviyelerini ve oksidatif stres belirteçlerini azalttığının yanı sıra insülin seviyelerinin ve antioksidan savunma sistemlerini artırdığını bildirilmiştir [14, 15].

Yaşlanma, bireysel ritmi olan doğal bir olaydır ve biyopsikososyal faktörlerden etkilendiği bilinmektedir. DM gibi bulaşıcı olmayan kronik hastalıklar doğal olarak yaşlanma ile ilişkili olmasada, daha yaşlı insanların çeşitli hastalıklara yakalanma olasılığını artırmaktadır. Yaşlılarda epifiz bezi küçülür ve melatonin sentezleme yeteneği azalır, bu da serum melatonin konsantrasyonunun düşmesine neden olur. Diurnal ritimle salgılanan bir hormon olan melatoninin, güçlü antioksidan özelliği ile serbest radikal süpürücü özelliğinin yanı sıra nötrofil birikimini azalttığı kanıtlanmıştır. Ayrıca melatonin, süperoksit dismutaz (SOD) dahil olmak üzere antioksidan enzimleri uyarır, çeşitli koruyucu proteinlerin gen ekspresyonunu düzenler ve lipid peroksidasyonunu engeller.

Bu çalışmada, cerrahi pinealektomi yoluyla ratları yaşlanma sürecine maruz bıraktıktan ve kronik fizyolojik melatonin yoksunluğunda böbrek dokusunda streptozotosin ile deneysel bir diyabet modelinin ardından krosinin ratlarda diyabetik nefropati gelişimi üzerindeki etkilerini inceledik. Bunun için pinealektomize edilmiş

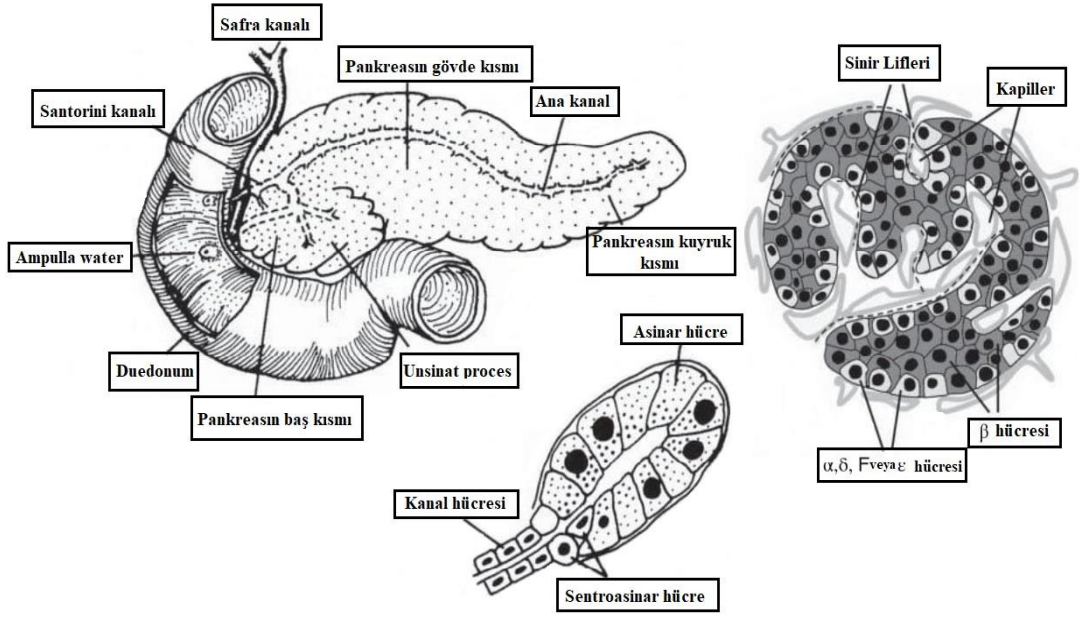
diyabetik ratların böbrek dokularında başta malondialdehit (MDA), indirgenmiş glutatyon (GSH), toplam antioksidan seviyesi (TAS), toplam oksidan seviyesi (TOS), oksidatif stres indeksi (OSI), katalaz (CAT) ve SOD düzeyleri olmak üzere oksidatif stres belirteçleri analiz edildi. Ayrıca tümör büyüme faktörü beta-1 (TGF- β 1) düzeyindeki değişiklikler immünohistokimyasal yöntemlerle değerlendirildi, böbrek dokusundaki histopatolojik değişiklikler de ışık mikroskobu ile gözlemlenerek değerlendirildi.

BÖLÜM 2

PANKREAS

Pankreas, üst karın boşluğunda duodenum ve dalağa yakın bir yerde bulunur. İnsanlarda pankreas ağırlığı yaklaşık 40-150 g dır [16, 17]. Baş, gövde ve kuyruk olmak üzere üç kısımdan oluşur. Embriyonik olarak primitif ön bağırsak endoderminden köken alır. İşlevsel olarak pankreas, ekzokrin ve endokrin hücrelerden oluşur. Şekil 2.1 de pankreasın anatomik yapısı, ekzokrin ve endokrin hücreler gösterilmiştir [18].

Pankreasın ekzokrin hücreler içeren kısmı, pankreasın büyük bir çoğunluğunu oluşturur ve her biri bir kanal ağına bağlanan asini içeren lobüllerden oluşur. Asiner hücreler yoğun zimojen granüller içerir ve geniş bir endoplazmik retikulum ağına sahiptir. Bu hücreler pankreatik duktal sistem yoluyla bağırsak içine amilaz ve tripsin dahil olmak üzere sindirim enzimlerini salgırlar. Pankreasın endokrin hücreler içeren kısmı ise, hormon üreten hücreleri içeren küresel yapıya sahip Langerhans adacıklarından oluşur. Ayrıca endokrin hücreler bol miktarda mitokondri ve endoplazmik retikulum (asiner hücrelerindeki kadar yoğun olmasa da) içerir. Langerhans adacıkları pankreas kütesinin sadece küçük bir kısmını oluşturmasına rağmen her bir adacık yaklaşık 2000-4000 hücre içerir [19-21]. Bu adacıklar glukoz homeostasisinin korunması için kritik bir öneme sahiptir. Bu ilk olarak 1890 yılında köpeklerde yapılan pankreatektomilerin diyabetle sonuçlandığı çalışmalarla gösterilmiştir [22]. Langerhans adacıklarında yer alan hücre tipleri ve işlevleri şunlardır: İnsülin salgılayan β hücreleri, glukagon salgılayan α hücreleri, somatostatin salgılayan δ hücreleri, pankreatik polipeptit salgılayan F hücreleri, ghrelin salgılayan ϵ hücreleridir [19].

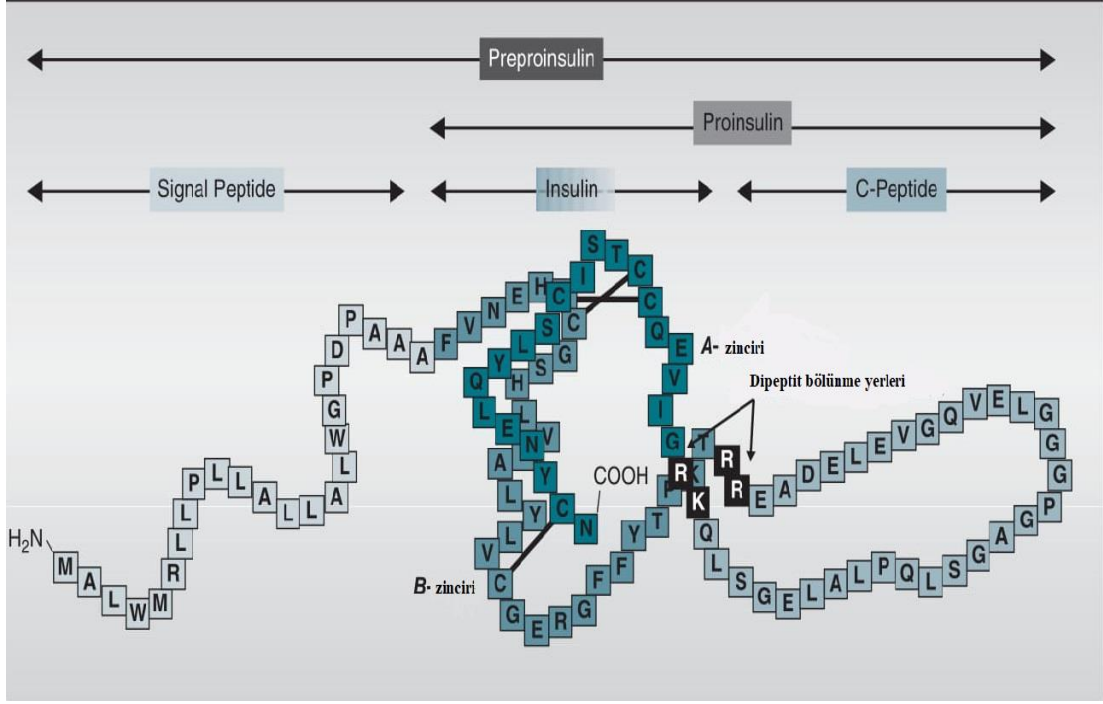


Şekil 2.1. Pankreasın anatomisi, ekzokrin ve endokrin hücreleri [20].

İNSÜLİN HORMONU VE BİYOSENTEZİ

İnsülin 21 aminoasitlik A zinciri ve 30 aminoasitlik B zincirinden oluşan bir polipeptit hormondur ve β hücreleri tarafından salgılanır. A7-B7 ve A20-B19 arasında iki disülfid köprüsüyle birbirine bağlıdır [23, 24]. Şekil 2.2 de insülin hormonunun yapısı gösterilmiştir [28].

İnsülin preprohormon olarak sentezlendikten sonra 23 aminoasitlik hidrofobik prekısı molekülün endoplazmik retikuluma yönelmesini sağlayarak ayrılır. Proinsülindeki 31 aminoasitten oluşan C zinciri, A ve B zincirleri arasındaki disülfid köprüleri oluşumu için gerekli ortamı hazırlar. Proinsülin golgi aygıtına taşınarak granüllerde depolanır. Proinsülinin %95 i insüline çevrilir. Proinsülin aktivitesi insülin aktivitesinden %5 daha azdır [25-27].



Şekil 2.2. İnsülin hormonu [28].

DİYABETES MELLİTUS (DM)

Diyabetes mellitus (DM), insülin direnci, yetersiz insülin sekresyonu veya aşırı glukagon sekresyonundan kaynaklanan yüksek kan şekeri seviyeleri (hiperglisemi) ile karakterize olan ve bir grup fizyolojik fonksiyon bozukluklarına neden olan kronik metabolik bir hastalık tablosudur [29, 30].

İnsülin pankreas tarafından üretilen temel bir hormondur. Pankreastan salgılanan insülin hormone kan dolaşımından vücut hücrelerine (kas ve yağ doku) glukoz girişine izin verir ve glukoz hücrelerde enerjiye dönüştürülür. İnsülin ayrıca protein ve yağ metabolizması için gereklidir. İnsülin eksikliği veya hücrelerin buna yanıt verememesi, diyabetin klinik göstergesi olan hiperglisemiye yol açar. Hiperglisemi, eğer uzun süre için kontrol altına alınmazsa, çeşitli vücut organlarında hayati risk içeren örneğin kardiyovasküler hastalık, nöropati, retinopati, nefropati gibi komplikasyonlarına neden olabilir [31, 32].

DM yüksek yaygınlıkla birlikte ciddi bir küresel sağlık problemidir. Nüfusun yaşlanması, kentleşme, beslenme değişiklikleri, azalan fiziksel aktivite ve diğer sağlıksız davranışlar gibi hızlı sosyal ve kültürel değişikliklerle birlikte artmıştır ve yaşam kalitesini azaltan çeşitli komplikasyonlarla ilişkilendirilebildiği gibi yaşam süresini ve kalitesini bozmaktadır.[33]

Uluslararası Diyabet Federasyonunun 2019 yılında 20 ile 64 yaş arasında yaptığı çalışma ile 351,7 milyon insanın DM'a sahip olduğu belirlendi. Ayrıca gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerdeki yaygınlığı sebebiyle de bu sayının 2030'a kadar 417,3 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir.[31]

2.1. DİYABETES MELLİTUSUN SINIFLANDIRILMASI

WHO, 1965 yılında diyabet için ilk tanı sınıflandırma sistemini insanlar için dört yaş kategorisinde; çocuk (0-14 yaşları arası); genç (15-24 yaşları arası); yetişkin (25-64 yaşları arası); ve yaşlı (65 yaş ve üzerinde) olmak üzere yayınlamıştır. Ayrıca DSÖ, diyabeti yaş kategorisine göre sınıflandırmanın yanı sıra diğer diyabet çeşitlerini de tanımlamıştır: juvenil tip; düzensiz tip; insüline dirençli tip; gebelik tipi; pankreas; endokrin ve iyatrojenik tipler [34].

WHO, yaygın ve küresel olarak kabul edilen ilk diyabet sınıflandırmasını 1980'de ve bunun güncellenmiş bir versiyonunu da 1985'te yayınladı. Bu sınıflandırmalar iki ana diyabet sınıfını içeriyordu: insüline bağımlı diyabetes mellitus (IDDM) veya tip 1 diyabetes mellitus (T1DM); ve insüline bağımlı olmayan diabetes mellitus (NIDDM) veya tip 2 diyabetes mellitus (T2DM). Daha sonra bu ve bunun gibi eski ve kafa karıştırıcı olan bütün bu tanımlamalar ortadan kaldırılarak bugün dünyaca kabul edilen son sınıflandırma sistemi ile diyabetin 4 tipi tanımlanarak: tip 1, tip 2, gestasyonel diyabet ve diğer spesifik tipler olarak son şeklini almıştır [35-38]. Çizelge 1.1. Diyabetes Mellitusun tüm tiplerinin etiyolojik sınıflandırılmasına yer verilmiştir [34].

Çizelge 1.1. Diyabetes Mellitusun Etiyolojik Sınıflandırılması [34]

1. Tip 1 Diyabetes Mellitus (Genellikle mutlak insülin eksikliğine neden olan β -hücre yıkımı vardır)	
a. İmmünolojik tip	
b. İdiyopatik tip	
2. Tip 2 Diyabetes Mellitus (İnsülin direnci zemininde ilerleyici insülin sekresyon defekti ile karakterizedir)	
3. Gestasyonel Diyabetes Mellitus (Gebelik sırasında ortaya çıkan ve genellikle doğumla birlikte düzelen diyabet)	
4. Diğer Spesifik Diyabet Tipleri:	
<p>a) β-hücre fonksiyonlarının genetik defekti (monogenik diyabet formları)</p> <ul style="list-style-type: none"> • 20. Kromozom, HNF-4 α (MODY1) • 7. Kromozom, Glukokinaz (MODY2) • 12. Kromozom, HNF-1 α (MODY3) • 13. Kromozom, IPF-1 (MODY4) • 17. Kromozom, HNF-1 β (MODY5) • 2. Kromozom, NeuroD1 (MODY6) • 2. Kromozom, KLF11 (MODY7) • 9. Kromozom, CEL (MODY8) • 7. Kromozom, PAX4 (MODY9) • 11. Kromozom, INS (MODY10) • 8. Kromozom, BLK (MODY11) • Mitokondriyal DNA • 11. Kromozom, Neonatal DM • 11. Kromozom, KJN11 (MODY13) • 3. Kromozom, APL11 (MODY14) <p>b) İnsülinin etkisindeki genetik defektler</p> <ul style="list-style-type: none"> • Leprechaunizm • Lipoatrofik diyabet • Rabson-Mendenhall sendromu • Tip A insülin direnci <p>c) Pankreasın ekzokrin doku hastalıkları</p> <ul style="list-style-type: none"> • Fibrokalkülöz pankreatopati • Hemokromatoz • Kistik fibroz • Neoplazi • Pankreatit • Travma/pankreatektomi <p>d) Endokrinopatiler</p> <ul style="list-style-type: none"> • Akromegali • Aldosteronoma • Cushing sendromu • Feokromositoma • Glukagonoma • Hipertiroidi • Somatostatinoma 	<p>e) İlaç ve kimyasal ajanlar</p> <ul style="list-style-type: none"> • Atipik anti-psikotikler • Anti-viral ilaçlar • β-adrenerjik agonistler • Diazoksid • Fenitoin • Glukokortikoidler • α-İnterferon • Nikotinik asit • Pentamidin • Proteaz inhibitörleri • Tiyazid grubu diüretikler • Tiroid hormonu • Vacor • Statinler <p>f) İmmun aracılıklı nadir diyabet formları</p> <ul style="list-style-type: none"> • Anti insülin-reseptör antikorları • "Stiff-man" sendromu <p>g) Diyabetle ilişkili genetik sendromlar</p> <ul style="list-style-type: none"> • Alström sendromu • Down sendromu • Friedreich tipi ataksi • Huntington korea • Klinefelter sendromu • Laurence-Moon-Biedl sendromu • Miyotonik distrofi • Porfiriya • Prader-Willi sendromu • Turner sendromu • Wolfram (DIDMOAD) sendromu <p>h) Enfeksiyonlar</p> <ul style="list-style-type: none"> • Konjenital rubella • Sitomegalovirus • Koksaki B

2.1.1. Tip 1 Diyabetes Mellitus (T1DM)

Tip 1 diyabetes mellitus (T1DM), pankreasın β hücrelerine otoimmün saldırı sonucu kaybı meydana gelen insülin eksikliğine bağlı olarak yüksek kan şekeri seviyeleri (hiperglisemi) ile karakterize kronik bir hastalıktır. [39-41]. T1DM dünya çapında tüm diyabet vakalarının yaklaşık %10'unu oluşturan diyabet türüdür. Burada vücudun immün sistemi pankreasın β hücrelerini yabancı bir doku gibi algılayarak onlara saldırır ve pankreasın β hücrelerini yok eder. Bu yıkıcı sürecin nedenleri tam olarak anlaşılammakla birlikte genetik yatkınlık ve çevresel tetikleyici faktörlerin etkisiyle örneğin viral enfeksiyon, toksinler veya bazı beslenme özellikleri gibi ilişkili durumlar olabilir [42].

T1DM her yaşta gelişebilir ancak tip 1 diyabet en sık çocuklarda ve genç yetişkinlerde görülür [42]. T1DM sahip kişiler bu otoimmün mekanizmalarla ilişkili olarak genellikle insülini ya hiç üretemezler ya da çok az üretirler. Hipoglisemi ve ketoasidoz gibi ciddi akut komplikasyonların daha sık yaşandığı diyabet tipi olmakla birlikte bu kişiler glukoz seviyelerini uygun aralıkta tutmak için günlük insülin enjeksiyonuna ihtiyaç duyarlar [43, 44] .

T1DM belirtileri genellikle ; çok fazla su içme isteği ve ağız kuruluğu, sık idrara çıkma, halsizlik ve yorgunluk, sürekli açlık, gece idrar kaçırma, ani kilo kaybı ve bulanık görme şeklinde ortaya çıkar [44].

2.1.2. Tip 2 Diyabetes Mellitus (T2DM)

Tip 2 diyabetes mellitus (T2DM), dünya çapında tüm diyabet vakalarının yaklaşık %90'ını oluşturan en yaygın diyabet türüdür. T2DM en sık yaşlı erişkinlerde görülür, ancak son zamanlarda artan obezite, fiziksel hareketsizlik, dengesiz beslenme gibi nedenlerle çocuklarda ve genç erişkinlerde giderek daha fazla görülmeye başlandı. [45-47].

T2DM' de 3 olası durum söz konusudur. Bunlardan ilki; karaciğerden açlıkta salgılanan glukozun gereğinden fazla olmasıyla gelişen hiperglisemidir. Obez bireylerde gelişen periferik insülin direnci de hiperglisemiye eşlik eder. İkincisi; hücrelerin insüline direnç kazanmasıyla pankreasın β hücrelerinin ürettiği aşırı insülinin kanda yükselmesiyle ortaya çıkan hiperinsülinemidir. Üçüncüsü; pankreasın β hücrelerinin iflasıdır ki insülin salınımı artık bozulmuştur ve bazal hiperinsülinemiye karşın intravenöz olarak verilen glukozu akut faz insülin cevabının olmadığı saptanmıştır [48]. T2DM'li kişilerin genellikle insülin gereksinimleri yoktur. Genellikle, diyetlerini kontrol ederek, düzenli egzersiz yaparak veya ağızdan ilaç olarak bu durumu kontrol edebilirler [49].

T2DM belirtileri genellikle; açlık hissi, çok yemek yeme bulanık görme ağız kuruluğu ve çok su içme isteği, sık idrara çıkma (özellikle geceleri 2-3 defadan fazla), cildin kuruması ve kaşıntılar, yorgunluk, el ve ayaklarda uyuşma ve karıncalanma hissi, yaraların geç iyileşmesi, sık gelişen cilt enfeksiyonları şeklinde ortaya çıkar [50].

2.1.3. Gestasyonel Diyabetes Mellitus (GDM)

Gestasyonel Diyabetes Mellitus (GDM) ilk kez gebelikte ortaya çıkan veya gebelik sırasında teşhis edilen glukoz intoleransıdır. GDM, plasenta tarafından üretilen hormonlar nedeniyle insülin etkisinin azalmasıyla (insülin direnci) ortaya çıkar [51].

WHO ve Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu'na (FIGO) göre, gebelikte hiperglisemi (HIP), gestasyonel diyabetes mellitus (GDM) veya gebelikte diyabet (DIP) olarak sınıflandırılabilir [51, 52]. DIP, hamileliğin ilk üç ayı da dahil olmak üzere herhangi bir zamanda ortaya çıkabilirken; GDM de genellikle 24. hafta veya onu izleyen haftalarda hiperglisemi gelişebilir [53]. Hamilelik sırasındaki hiperglisemi vakalarının yaklaşık %75-90'ının gestasyonel diyabetes mellitus olduğu tahmin edilmektedir [54].

Gebelikte GDM öyküsünün sebepleri arasında ileri yaş, aşırı kilo veya obezite, gebelik sırasında aşırı kilo alımı gibi sebepleri içerir [55]. GDM, genellikle geçici bir durum olup hamilelik sona erdiğinde düzelir. Ancak hiperglisemisi olan hamile kadınların

sonraki gebeliklerinde de GDM tekrarlama riski yüksektir ve bu kadınların yarısında doğumdan sonraki beş ile on yıl içerisinde T2DM gelişebilir. GDM'li annelerden doğan bebeklerin de yaşam boyu obezite ve T2DM'a yakalanma riski daha yüksektir [56-58].

2.1.4. Diğer Spesifik Diyabetes Mellitus Tipleri

WHO' nun yakın zamanda yayınladığı raporunda, diğer spesifik diyabet türlerinden söz ederek yapmış olduğu son sınıflandırmaya eklemiştir [34].

Diğer spesifik diyabetes mellitus türleri;

- Pankreatit, travma, pankreas kanseri ve pankreatektomi gibi ekzokrin pankreas hastalıklarının neden olduğu diyabet,
- İnsülini antagonize eden hormonların aşırı salgılanmasına neden olan endokrin bozukluklarına bağlı diyabet,
- İnsülin sekresyonunu veya insülin etkisini bozan ilaçlardan ilaç ve kimyasal kaynaklı diyabet,
- β hücre yıkımı ile ilişkili viral kaynaklı enfeksiyona bağlı diyabet,
- İmmün aracılı diyabetin yaygın olmayan spesifik formları,
- İnsülin etkisindeki genetik defektler (Lipoatrofik diyabet, Rabson-Mendenhall sendromu gibi)
- β hücre fonksiyonlarının genetik defektler (HNF-1 α , Neuro D1 gibi)

Diyabetle ilişkili diğer genetik sendromlar (Prader-Willi sendromu, Down sendromu, Friedreich ataksisi gibi) [34].

2.2. DİYABETES MELLİTUSUN TANI KRİTERLERİ

DM tanı kriterleri uzun zamanlardan beri tartışılmakta ve her geçen yıl güncellenmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) mevcut kriterlerine göre yüksek kan glukoz düzeylerinin belirlenmesiyle diyabet teşhisi konulması gerektiği belirtilmektedir [59].

Diyabet veya prediyabet tanısı; açlık plazma glukozu (APG), 2 saatlik oral glukoz tolerans testi (OGTT) ve glukozillenmiş hemoglobin A1c (HbA1c) ölçümleri ile yapılmaktadır. Bir test ile tanı koymadan önce, test tekrarlanarak veya destekleyici başka bir testle doğrulanarak tanı konmalıdır. Diabetes mellitus için tanı kriterleri Çizelge 1.2’de yer almaktadır [60-62].

Genellikle APG düzeyine bakılarak tanı konulsa da 2009 yılında Avrupa Diyabet Çalışma Birliği (EASD), Amerikan Diyabet Derneği (ADA) ve Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF) örgütleri tarafından oluşturulmuş uluslararası uzman diyabet komitesi HbA1c değerinin de tanı koymada kullanılabilecek bir seçenek olduğunu ortaya koymuştur [63].

HbA1c, esas olarak glukozun hemoglobine enzimatik olmayan bağlanmasıyla oluşan glikohemoglobinden oluşan bir hemoglobin varyantıdır [64]. Bu sebeple HbA1c’nin tanı araçları içerisinde kullanılmasının birtakım avantajları vardır. Bunlar HbA1c, gün içerisinde vücuttaki açlık veya 2 saatlik glukoz düzeyi değişimlerinden daha az etkilenmesi, kan glukozunu ölçmek için aldığımız florür okzalattlı tüpler her ne kadar glikolizi durdursada glukozun bir miktarının kullanılmasına devam etmesine rağmen HbA1c aldığımız tüpler oda sıcaklığında bir hafta herhangi bir değişiklik olmadan saklanabilir. Ayrıca glukoz seviyesinin belirlenmesi için ölçülen HbA1c’ de hastanın aç kalmasına gerek yoktur. Son olarak ise, HbA1c 3 ila 4 aylık bir süre boyunca glisemiyi yansıtırken, glukoz seviyeleri de kısa süreli/anlık yaşam tarzı değişikliğine (heyecan, korku, stres) karşı duyarlıdır [65, 66].

Çizelge 1.2. Diyabetes Mellitus İçin Tanı Kriterleri [62]

1) Açlık Plazma Glukozu (APG) \geq 126 mg/dl (7,0 mmol/L). En az 8 saat olmak üzere hiçbir enerji alımı olmamalıdır.
VEYA
2) 2 saat plazma glukozu \geq 200 mg/dL (11,1 mmol/L) OGTT sırasında. Bu test DSÖ' nün belirlediği şekilde, su içinde çözülmüş 75 g toz glukoz çözeltisinin hastaya oral yolla yüklenmesi şeklinde uygulanmalıdır. *
VEYA
3) Hipergliseminin genel semptomları veya hiperglisemi krizi geçiren bir hastada, rastgele plazma glukozu \geq 200 mg/dL (11,1 mmol/L) ise tanı konulabilir.
VEYA
4) HbA1c \geq %6,5 bu test, bir laboratuvarında, Ulusal Glikohemoglobin Standardizasyon Programı sertifikalı ve Diyabet Kontrol ve Komplikasyonları Çalışmasına göre standardize edilmiş bir metot kullanılmalıdır. *

*Hipergliseminin kesin yokluğunda sonuçlar, tekrar testleriyle doğrulanmalıdır.

2.3. DİYABETES MELLİTUSUN KRONİK KOMPLİKASYONLARI

Tüm diyabet tipleri doğru tedavi ve uygun diyetle desteklenmezse, vücudun birçok bölgesinde komplikasyonlara neden olur. Bunun sonucunda da kişinin tıbbi bakım maliyetleri artmakla birlikte azalan yaşam kalitesi sonucu hastaneye yatış sıklığı artarken ilerleyen zamanda erken ölümler görülebilir. Sürekli artan kan şekeri seviyeleri kalbi, gözleri, böbrekleri ve sinirleri etkileyen genel damar hasarına neden olur. DM kardiyovasküler hastalıklar, körlük, böbrek yetmezliği ve alt ekstremitte amputasyonunun en önde gelen nedenlerinden biridir. Gebelikte kontrol altına alınmayan diyabet, maternal ve fetal komplikasyon riskini artırır [67, 68].

DM, kronik komplikasyonları; mikrovasküler (retinopati, nefropati, nöropati, diyabetik ayak ülserleri) ve makrovasküler (ateroskleroz, hipertansiyon, serebrovasküler ataklar, iskemik kalp hastalığı) komplikasyonlar olarak ikiye ayrılmaktadır. Diyabetlilerin %60'ında kronik komplikasyonlar görülür [69].

2.3.1. Diyabetik Retinopati

Diyabetik retinopati, kronik yüksek kan şekeri düzeylerinin retina kılcal damarlarına doğrudan zarar vererek kılcal sızıntı ve tıkanmaya yol açması sonucu ortaya çıkan diyabetin çok korkulan komplikasyonlarından biridir. Görme kaybına ve sonunda körlüğe neden olabilir [70].

Diyabetik göz hastalığı, ağırlıklı olarak diyabetik retinopati , diyabetik maküler ödem, katarakt ve glokomdan oluşan, aynı zamanda çift görme ve odaklanamamayı da içerir [71]. Diyabetik retinopati, çoğu ülkede potansiyel olarak önlenabilir ve tedavi edilebilir olmasına rağmen kişisel yıkımı ve sosyoekonomik sonuçlarıyla çalışma çağındaki popülasyonda (25-65 yaş) körlüğün önde gelen nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir [72].

2.3.2. Diyabetik Nöropati

Diyabetin uzun vadede ortaya çıkan ve en sık görülen komplikasyonlarından biri olan diyabetik nöropati; çeşitli klinik belirtileri içermekle birlikte sinir sisteminin farklı bölümlerinin etkilenmesi sonucu görülen komplikasyonlardan biridir. En sık görülen belirtiler ayaklarda ve ellerde uyuşma, yanma, karıncalanma, ağrı ve güçsüzlüktür. Nöropatiler arasında en yaygın olanı kronik sensorimotor distal simetrik polinöropati primer nöropati tipidir [73]. Diyabetik nöropati, başlangıçta tırnak ve distal ayak kısımlarını etkilemekle birlikte ilerleyen zamanlarda ayak ve bacakların proksimal kısımlarını da etkileyebilir. Diyabetik nöropati, hissizliğe, ağrı ve ısı algılanmasının bozulmasına neden olarak diyabetlilerin kimyasal ve fiziksel travmaları fark edememesine, bunun sonucu olarak da ayak yaralanmalarında artışa yol açabilir [74].

2.3.3. Diyabetik Nefropati

Diyabetik nefropati, albüminüri artışı ve glomerüler filtrasyon hızının devamlı azalması ile karakterize olan ilerleyici kronik bir böbrek hastalığıdır [75]. Diyabetin neden olduğu ciddi ve en çok korkulan mikrovasküler komplikasyonlardan biri olan diyabetik nefropati, son dönemde dünya çapında artış gösteren böbrek yetmezliğinin başlıca nedenlerinden biridir ve tüm diyabet hastalarının yaklaşık %45 inde görülür [76, 77].

2.3.3.1. Diyabetik Nefropati ve Klinik Evreleri

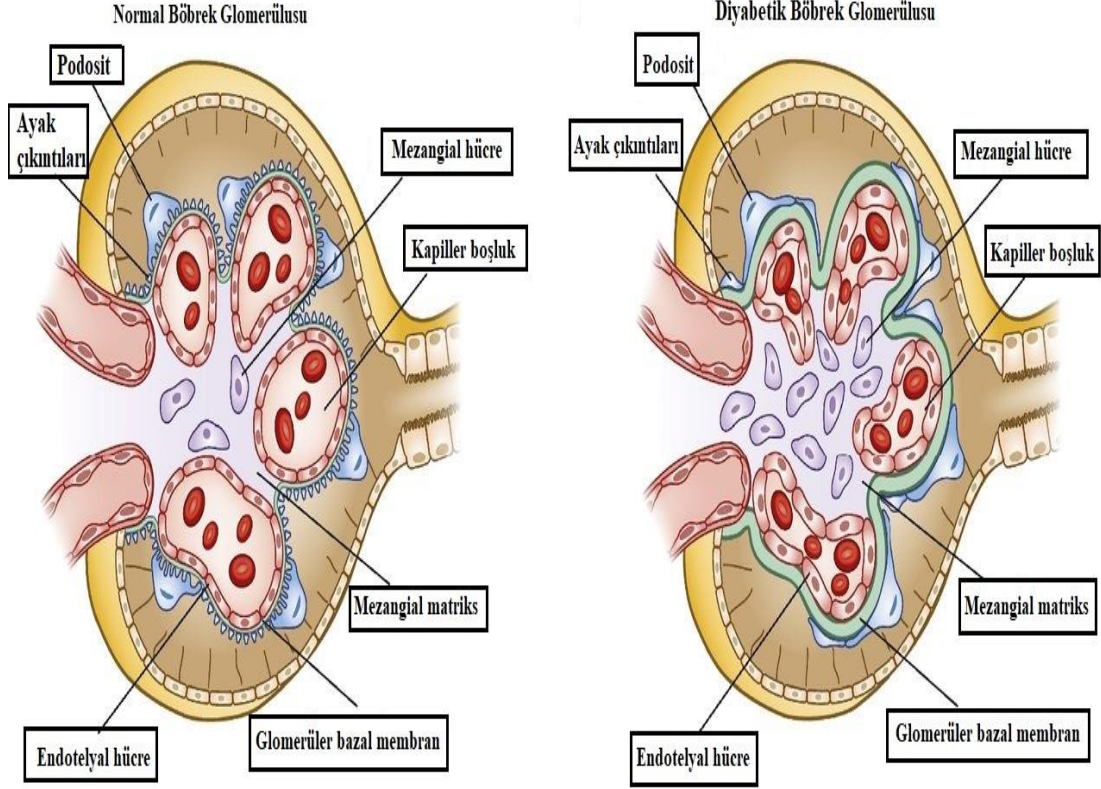
Geleneksel olarak diyabetik nefropatinin, glomerüler filtrasyon hızı ve idrar albüminüri atılımına dayalı 5 evresi vardır. Bunlar sırasıyla aşağıdaki gibidir.

- 1. Evre: Glomerüler hiperfiltrasyon ve hipertrofi gelişir,
- 2. Evre: Mikroalbuminüri olmadan böbrekte yapısal değişiklikler izlenir,
- 3. Evre: Mikroalbuminürinin görüldüğü dönemdir. Yeni başlayan diyabetik nefropati dönemi olarak idrarda günlük 30-300 mg albümin saptanır,
- 4. Evre: Aşikâr proteinüriyle beraber ilerleyici renal fonksiyon bozukluğu görülür. İdrarda günlük 300 mg dan fazla albümin saptanır,
- 5. Evre: Son Dönem Renal Hastalık (SDRH) denilen kronik böbrek yetmezliğinin gerçekleştiği dönemdir. Hastalar diyaliz tedavisi alırlar [77].

2.3.3.2. Diyabetik Nefropati ve Nefrondaki Yapısal Değişiklikler

Diyabetik nefropatinin gelişimi, böbreğin bütün alanlarında hem glomerüllerinde hem de tübüler yapıda bir dizi değişikliklere sebep olur. En erken tutarlı değişiklik, T1DM tanısından 1.5-2 yıl sonra ortaya çıkan glomerüler bazal membran da kalınlaşmanın görülmesidir [78-80]. Takip eden 5-7 yıl içinde de mezangial hacim genişlemesi saptanabilir. Diğer glomerüler değişiklikler ise, endotelial fenestrasyonların kaybı, mezangial matriks genişlemesi ve ayak çıkıntılarının silinmesiyle birlikte podositlerin

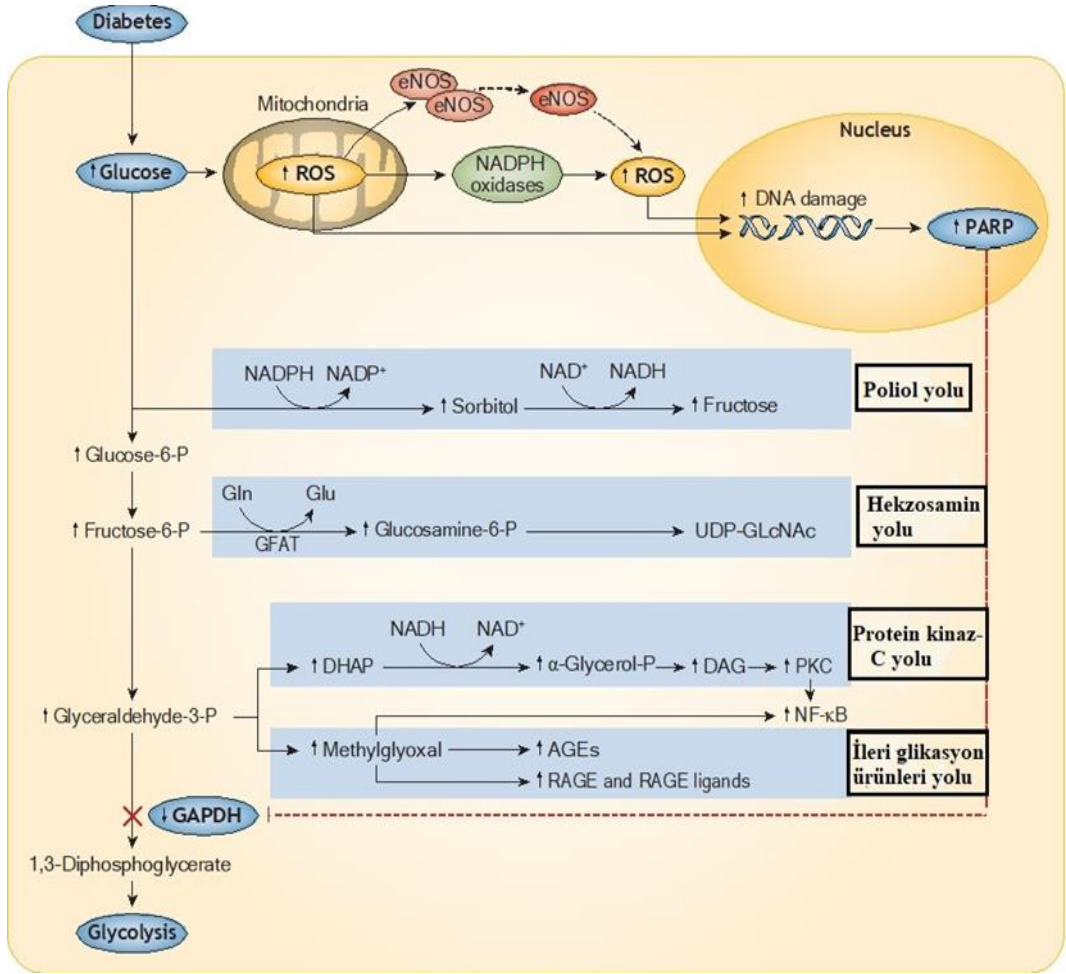
kaybını içerir [78, 79, 81]. Şekil 2.3'te böbreğin glomerulus yapısı ve DM da görülen yapısal değişiklikler verilmiştir [78].



Şekil 2.3. Böbrek glomerulus yapısı ve DM da görülen yapısal değişiklikler [78].

2.3.3.3. Diyabetik Nefropati ve Oksidatif Stres

Oksijen metabolizması, aerobik yaşamı sürdürmek için gereklidir ve normal hücresel homeostaz, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu ve ortadan kaldırılması arasında ince bir denge üzerinde çalışır. Aşırı ROS üretiminin ve antioksidan savunma sistemi tarafından ROS uzaklaştırılmasının baskılanmasının sitopatik bir sonucu olan oksidatif stres, diyabet ve komplikasyonları dahil olmak üzere birçok hastalığın gelişiminde rol oynar [82].



Şekil 2.4. Diyabetik komplikasyonlarda reaktif oksijen türlerinin rolü. AGE, İleri glikasyon son ürünleri; DAG, diaçilgliserol; DHAP, dihidroksiaseton fosfat; GFAT, glutamin fruktoz-6-fosfat amidotransferaz; NF- κ B, nükleer faktör-kappa B; PKC, protein kinaz C; RAGE, AGE reseptörü; UDP-GLcNAc, üridin difosfat N-asetilglukozamin [83].

Şekil 2.4 de görüldüğü gibi reaktif oksijen türlerinin mitokondriyal üretimi, hücre içi glukozdaki bir artışa yanıt olarak hızlanır. Ek olarak, ROS ile indüklenen nitrik oksit sentaz (eNOS) ayrışması ve NADPH oksidazların inaktivasyonu yoluyla patojenetik ROS da üretilir. ROS, poliADP riboz polimerazı (PARP) aktive eden DNA hasarına aracılık edebilir. PARP tarafından gliseraldehit-3-dehidrojenazın (GAPDH) poliADP-ribozilasyonu, bu önemli glikolitik enzimin inhibisyonuna ve ardından glikolizde bir darboğaza yol açar. Sonuç olarak, erken glikolitik ara ürünler birikir ve daha sonra patojenetik sinyal yollarına yönlendirilir. Oluşan bu glikolitik ürünler sonucu oluşan patojenetik sinyal yolları ise şunlardır: Polioli yolu, heksosamin yolu, protein kinaz C yolu ve ileri glikasyon son ürünleri yoludur [83].

İn vitro ve in vivo deneysel diyabet modelleri, metabolik (hiperglisemi, dislipidemi) ve hemodinamik (sistemik ve glomerüler hipertansiyon) bozuklukların diyabetik böbrekte oksidatif stresin iki ana sebebini temsil ettiğini ortaya koymuştur. Böbrek, dolaşımdaki yüksek glukoz seviyelerinin neden olduğu hasara karşı özellikle savunmasızdır. Çünkü nefron (glomerüller ve tübüller) insülden bağımsız bir organdır. Bu hücelere glukoz akışı ortamdaki glukoz seviyeleri ve kolaylaştırılmış glukoz taşıyıcıları (özellikle GLUT1) tarafından düzenlenir [84].

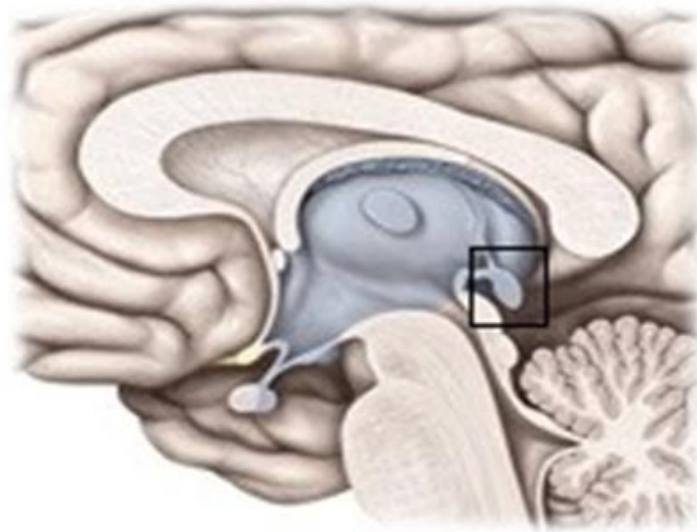
Nefronlardaki yüksek glukoz reaktif oksijen türlerinin de içinde olduğu toksik ara maddelerin oluşumuna yol açar. Örneğin artan mitokondriyal substrat oksidasyonu ve buna bağlı olarak artan mitokondriyal membran potansiyeli, aşırı süperoksit üretimine yol açar. [85]. Yine aşırı glukoz varlığında, oksidan türlerin üretimi yoluyla vasküler nitrik oksit (NO) ve dönüştürücü büyüme faktörünün (TGF- β 1) hiperglisemi aracılı artışı afferent ve efferent glomerüler arteriyellerin her ikisindeki vazodilatasyon ile ilişkilendirilir. Hiperglisemi ayrıca lokal doku Renin-Anjiotensin-Aldosteron (RAAS) sistemini aktive eder. RAAS'ın lokal (glomerüler) düzensizliği yine lokal aşırı anjiotensin II üretimine sebep olur. Artan anjiotensin II' nin vazokonstriktif etkisine karşı arteriyel tonusta dengesizliğe neden olur bu da daha yüksek glomerüler kapiller basınçla sonuçlanır [86-91].

Böbrek fonksiyonunu çok sayıdaki fibrojenik faktör etkilemekle birlikte, TGF- β 1, Smad yolu, mitojenle aktive olan protein kinaz, fosfotidilinositol 3-kinaz/AKT gibi çoklu sinyal yollarıyla epitelyal mezenkimal geçiş/aktarım ve tübüler interstisyel fibrozda etkilidir [92, 93]. TGF- β 1, reseptörüne bağlandıktan sonra, Smads proteinleri yoluyla hücelere sinyaller iletebilir, glomerüler ve tübüler hücrelerin hipertrofisini indükleyebilir, ekstraselüler matriks birikimini teşvik edebilir ve epitelyal mezenkimal geçiş/aktarım oluşumuna ve interstisyel fibrozise neden olabilir [94]. Öte yandan, TGF- β 1'in tübüler hasara neden olarak proteinüri ve glomerüler skleroza katkıda bulunduğu dair kanıtlar vardır [95].

BÖLÜM 3

MELATONİN

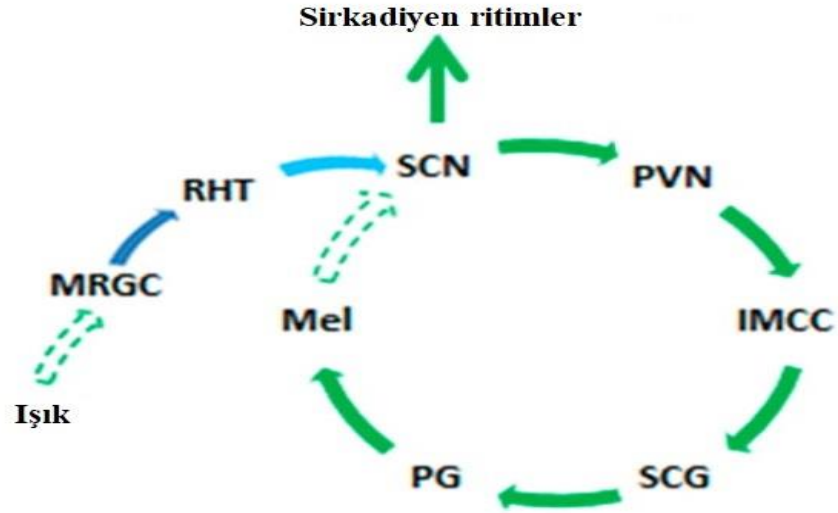
Pineal bez, insan beyninin merkezinde posterior komissür ve dorsal habenular komissür arasında yer alan ve doğrudan üçüncü ventriküle bağlı olan küçük, tek parça beyin bir uzantısıdır; sirkumventriküler organ (CVO) olarak sınıflandırılır ve omurgalılarda sirkadiyen ritmin düzenlenmesinde rol alır [96]. Sirkadiyen ritim uyku-uyanıklık durumu, açlık/tokluk, solunum sistemi, immün sistemi, endokrin sistemi, birçok genin ekspresyonunu, kardiyovasküler ve metabolik sistemleri ve gastrointestinal sisteminde dahil olduğu önemli fizyolojik olayları düzenler [97]. Şekil 3.1 de pineal bez ve anatomik yapısı gösterilmiştir [98].



Şekil 3.1. Pineal bez ve anatomik yapısı [98].

Melatonin sentezi ve salgılanması karanlıkta artar ve ışıkla engellenir [99]. Işığın varlığı hakkındaki bilgi, hipotalamusun suprakiazmatik nükleus (SCN) aracılığıyla retinadan pineal beze iletilir. Sirkadiyen ritmi düzenleyen süprakiazmatik nükleus (SCN)-melatonin döngüsü; melanopsin içeren retinal ganglion hücreleri (MRGC),

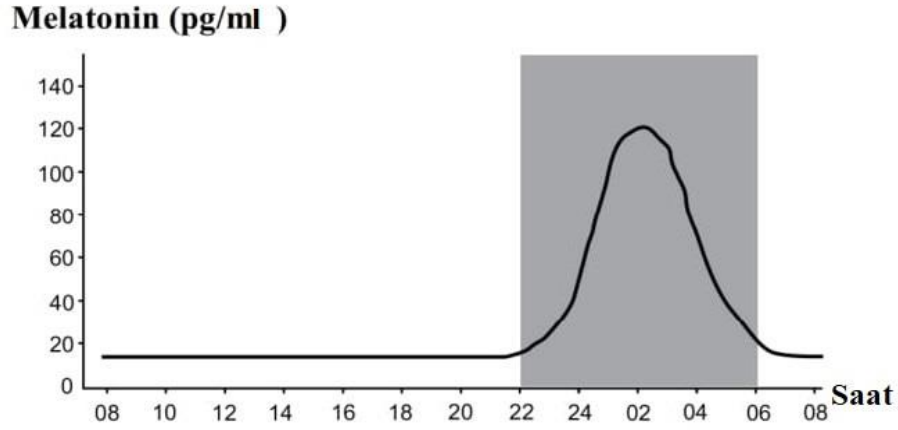
retinohipotalamik yol (RHT), SCN, paraventriküler nükleus (PVN), intermediolateral hücre kolonu (IMCC), sempatik servikal ganglionlar (SCG), pineal bez (PG) ve melatonin (Mel) salgılanmasını içerir (Şekil 3.2) [100-103].



Şekil 3.2. Suprakiazmik nükleus-melatonin döngüsü [103].

Omurgalıların sirkadiyen ritimlerini düzenleme de önemli olan bu döngüdeki herhangi bir kusur, melatonin-sirkadiyen ritmin azalmasına ve kronobiyojinin bozulmasına neden olur. Örneğin, SCN veya PVN lezyonları, servikal gangliyon blokajı veya pinealektomi, omurgalılarda melatonin kaybına neden olur [104-107].

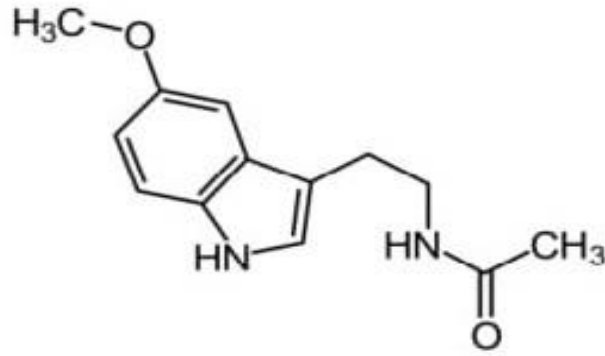
Şekil 3.3'te görüldüğü gibi insanlarda, melatonin salgısı gün batımından hemen sonra başlar, gecenin ortasında (sabah 2 ile 4 arasında) zirveye ulaşır ve gecenin ikinci yarısında giderek azalır [108]. Melatoninin yaklaşık %80'i geceleri sentezlenir ve serum konsantrasyonları 80 ile 120 pg/ml arasında değişir. Gündüz saatlerinde ise serum konsantrasyonları 10-20 pg/ml arasında değişir [109].



Şekil 3.3. Melatonin plazma konsantrasyonlarının sirkadiyen profili (gri alan, geceyi temsil eder) [108].

3.1. MELATONİN BİYOSENTEZİ

Melatonin veya N-asetil-5 metoksitriptamin 1958 yılında Aaron Lerner tarafından ilk kez sığır pineal bezinden izole edilmiştir (Şekil 3.4) [110].



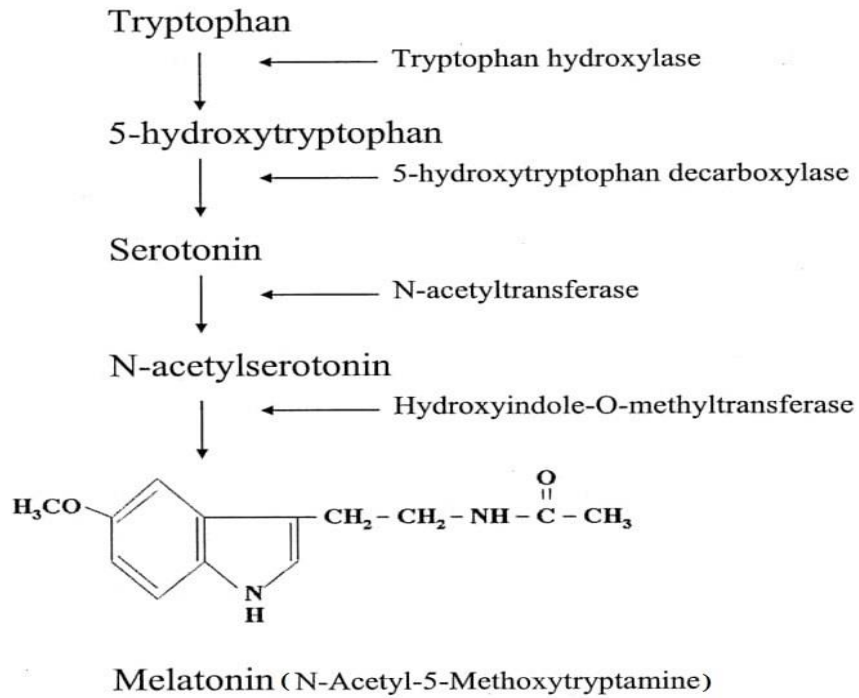
Şekil 3.4. Melatoninin kimyasal yapısı [110].

Melatonin, pineal bez tarafından salgılanan bir hormon olmasına rağmen; ekstrapineal melatonin kaynaklarının retina, kemik iliği hücreleri, trombositler, deri, lenfositler, Harder bezi, beyincik ve özellikle omurgalı türlerinin gastrointestinal mukoz membranında varlığı rapor edilmiştir [111-117]. Melatonin, pineal bezde sentezlendikten sonra hızlıca kan dolaşımına ve oradan da tükürük, safra, beyin

omurilik sıvısı, yumurtalık foliküler sıvısı, semen ve amniyotik sıvı gibi diğer vücut sıvılarına salınır [118-125].

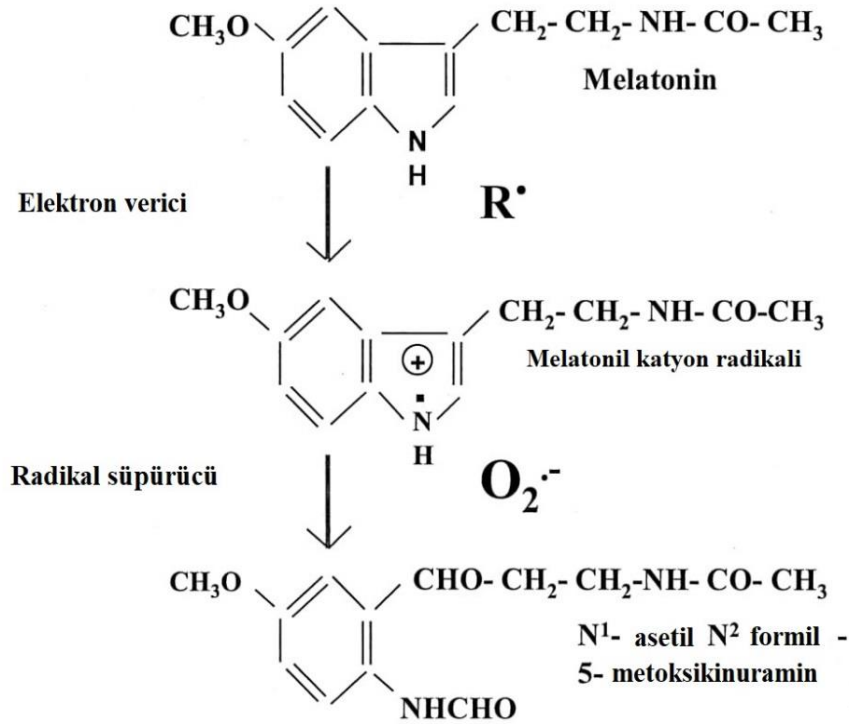
Melatonin esas olarak pinealositler tarafından triptofan amino asitinden sentezlenir. Triptofan esansiyel bir aminoasit olup dışardan alınmalıdır. Daha sonra triptofan, triptofan hidroksilaz (tetrahidrobiopterin ve süperoksiti kofaktör; vitamin B6 yı da koenzim olarak kullanır) ile 5-hidroksitriptofana dönüştürülür. 5-hidroksitriptofan kan-beyin bariyerini kolayca geçtikten sonra dekarboksillenerek (5-hidroksitriptofan dekarboksilaz tarafından) serotonin sentezlenir. Pineal bezde bulunan 2 enzim serotoninini melatonine dönüştürür [126, 127].

Serotonin ilk olarak arilalkilamin-N-asetiltransferaz (AA-NAT, "Timezyme" olarak adlandırılır ki bu melatonin sentezi için hız sınırlayıcı enzimdir) tarafından N-asetilserotonin formuna asetillenir. N-asetilserotonin ise asetilserotonin-O-metiltransferaz (ASMT, ayrıca hidroksiindol-O-metiltransferaz veya HIOMT olarak adlandırılır) tarafından metillenerek melatonin sentezlenir (Şekil 3.5.) [127].



Şekil 3.5. Melatoninin sentez basamakları [128].

Melatoninin serbest radikal süpürücüsü olduğunun keşfi 1993 yılında yapılmış olup DNA'yı serbest radikal hasarından koruma yeteneğini doğrulayan birçok makale yayımlanmıştır [129-132]. Ayrıca melatoninin in vitro olarak doğrudan hidroksil radikali (OH•), hidrojen peroksit (H₂O₂), süperoksit radikali (O₂•⁻), nitrik oksit radikali (NO•), peroksinitrit radikali (ONOO•) gibi makromoleküllerin oksidatif hasarını azalttığı ve lipid peroksidasyonunu engellediğine dair çalışmalar vardır [133-139]. Melatonin, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve katalaz dahil olmak üzere bir dizi antioksidan enzimin sentezini uyarır. Melatonin, glutatyon sentezindeki bu hız sınırlayıcı enzim olan γ -glutamilsistein sentazı uyararak hücre içi glutatyon düzeylerini arttırdığı ve prooksidatif enzimler olan nitrik oksit sentaz ve lipoksijenazı inhibe ettiği gösterilmiştir [136, 140-142]. Melatoninin serbest radikal süpürücü mekanizmalarından biri Şekil 3.6'te verilmiştir [139].



Şekil 3.6. Melatoninin antioksidan mekanizmalarından birisi [139]

Melatonin O₂•⁻ ve H₂O₂ varlığında radikal süpürücü özellik gösteren N1-asetil-N2-formil-5-metoksikinuramin (AFMK) oluşturur. Daha sonra AFMK, Arilamin Formamidaz (AFA)'ın katalizlediği reaksiyon sonucu N1-asetil-5-metoksikinuramine

çevrilir. Hem AFMK hem de AFMK'ı bir kinüramin türevi olup aynı zamanda melatonin gibi antioksidan ve de anti-inflamatuar özelliğe sahiptirler [143].

Kemirgenlerde yapılan çalışmalar, melatoninin glukoz homeostazı üzerinde genel olarak faydalı bir rolü olduğunu göstermektedir [144, 145]. Diyabet ve oksidatif stres arasında ilişki olduğu saptanmıştır. Hiperglisemi ve oksitlenmiş lipidler, serbest radikallerin üretimini artmasına ve ayrıca antioksidanlarda değişikliklere yol açarak doku ve hücrel işlev bozukluğuna neden olur [146]. Pinealektomize hayvanlarda melatonin yokluğu, melatonin tedavisi ile tersine çevrilen GLUT4 gen ekspresyonunda ve protein içeriğinde, glukoz intoleransında ve periferik ve merkezi insülin direncinde bir azalmaya yol açar [144, 145]. Çok sayıdaki çalışma, melatoninin diyabeti ve kimyasal olarak indüklenen oksidatif stresi iyileştirdiği bildirmektedir [147-149]. Montilla ve arkadaşlarının çalışmaları, melatoninin streptozotosin (STZ) ile indüklenen diyabetik ratlarda hiperglisemi ve hiperlipidemi azalttığını göstermiştir [150]

BÖLÜM 4

SAFRAN (*Crocus sativus* L.)

Günümüzde bilim insanları, bitkileri ve onların bileşenlerini kimyasal ilaçlara kıyasla daha az yan etkiye sahip olmaları sebebiyle tıbbi kullanım amaçlı araştırmaya odaklanmışlardır. WHO, tıbbi bitkilerin kullanımının tercih edilmesindeki sıklığın küresel olarak her geçen gün daha da arttığını rapor etmiştir [151]. *Crocus sativus* L. (safran) tıbbi amaçlı ve aromatik olarak kullanılan bitki türlerinden biridir (Şekil 4.1) [152].



Şekil 4.1. *Crocus sativus* L. (Safran bitkisi) [153].

Crocus cinsi dünya çapında ortalama 80 tür içerir ve bunlardan yaklaşık 32 tanesi Türkiye florasında kayıtlıdır. Bu türlerden biri olan safran (*Crocus sativus* L.) dünyadaki en yüksek ekonomik değere sahip baharatlardan biri olarak bilinmektedir [152].

Liliales takımı, *Iridaceae* familyası ve *Crocus* cinsi, *Crocus sativus* türü şeklinde taksonomik bir sistematige sahiptir [154]. Safran, Yunanistan, Küçük Asya ve İran kökenli monokotiledon bir tür olup şu an da İran, Cezayir, İtalya, Hindistan, Fransa, Rusya, Fas İspanya ve Türkiye (Safranbolu) dahil olmak üzere birçok ülkede üretilmektedir. Yüksek adaptasyonu nedeniyle geniş bir alana yayılmıştır [154, 155]. Safran, deniz seviyesinden yaklaşık 2000 m'ye kadar ki yüksekliklerde yetişebilirken daha çok tepelere, dağ vadilerine ve 600-1700 m arasında değişen yaylalara uyum sağlamıştır Ayrıca bu bitki, yaz aylarında kuraklığının yaygın olduğu bölgelerde de yetiştirilebilir [156].

Soğanlı bir bitki olan safran (*Crocus sativus* L.), stigmaları baharat olarak kullanılan menekşe renkli çiçeklere sahiptir (Şekil 4.1). Safranın stigma rengi koyu kırmızı ile kırmızımsı kahverengidir. Pistil sarımsı-kahverengi ile sarımsı-turuncudur. Kokusu güçlü, karakteristik ve aromatiktir. Tadı karakteristik ve acıdır. Stigmalar 25 mm uzunluğunda ve her bir çiçekte sadece üç tane vardır (Şekil 4.2). Stiller yaklaşık 10 mm uzunluğundadır ve silindir şeklindedir [153].



Şekil 4.2. *Crocus sativus*' a ait stigma [157].

Çiçeklenme Ekim ayında gerçekleşir ve Kasım ayının ortalarına kadar devam eder. Çiçeklenme sonrası ana soğanların yerini yavru soğanlar alır [158]. 1 kilogram kuru safran üretmek için yaklaşık 80 kilogram safran (*Crocus sativus* L.) çiçeğine ihtiyaç

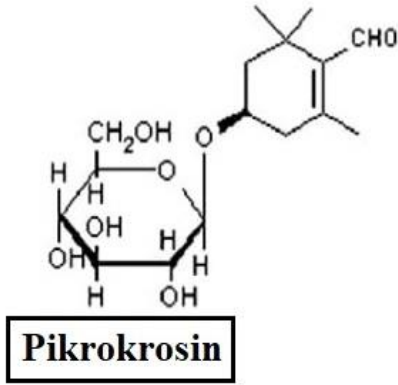
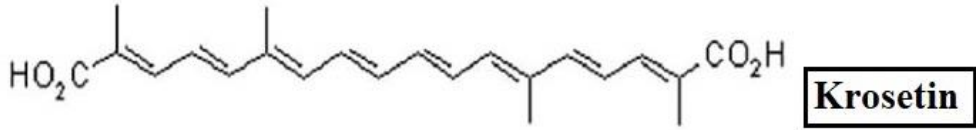
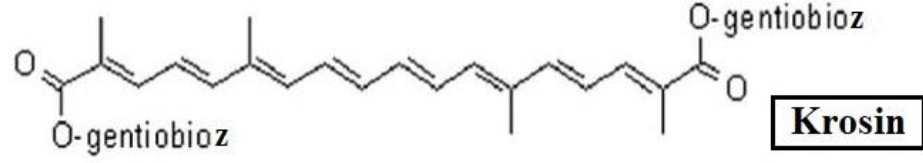
duyulmaktadır. 1000 çiçeğin toplanması ortalama 14-55 dakika sürerken stigmaların kurutulmak için çıkartılması 100-130 dakika daha sürer. 1 kilogram kurutulmuş safran üretmek için genel olarak tüm işlem yaklaşık 370-470 saat sürer. [159, 160].

Safran, 150'den fazla uçucu, uçucu olmayan ve aroma veren bileşikler içerir. Bu bileşikler su, lipofilik ve hidrofilik karbonhidratlar, proteinler, aminoasitler, mineraller, glukozitler, monoterpenler, aldehitler, vitaminler (özellikle riboflavin ve tiamin) içerirken; krosin, antosiyanin, karoten, likopen, flavonoidler ve diğer kimyasal bileşenleri içeren pigmentlere sahiptir. Safranın önemi içerisindeki krosin, krosetin, pikrokrosin ve safranalın varlığından gelir. Şekil 4.3'te safranın bileşiminde yer alan krosin, krosetin, pikrokrosin ve safranalın kimyasal yapısı verilmiştir. [161-165].

Krosetin, sıradışı bir lipofilik karotenoiddir. Çoklu doymamış olefin asit konjugatlarından oluşur. Krosetinin moleküler formülü $C_{20}H_{24}O_4$ 'tür. $285^{\circ}C$ 'lik bir erime noktasına sahiptir. Krosetin, kardiyovasküler iyileşme, antikanserojen ve antidepresan aktivite gibi sağlığı korumaya yardımcı olan etkilere sahiptir [166-169].

Pikrokrosin, safranın kendine özgü aromasından sorumludur. Krosinden biraz daha az miktarda bulunur. Safranın kuru maddesinin yaklaşık %1-13'ünü oluşturur. Pikrokrosinin moleküler formülü $C_{16}H_{26}O_7$ 'dir. Pikrokrosin, safranalın bir öncüsü ve bir monoterpen glukozittir. Safran'ın acı tadından sorumludur [170-173].

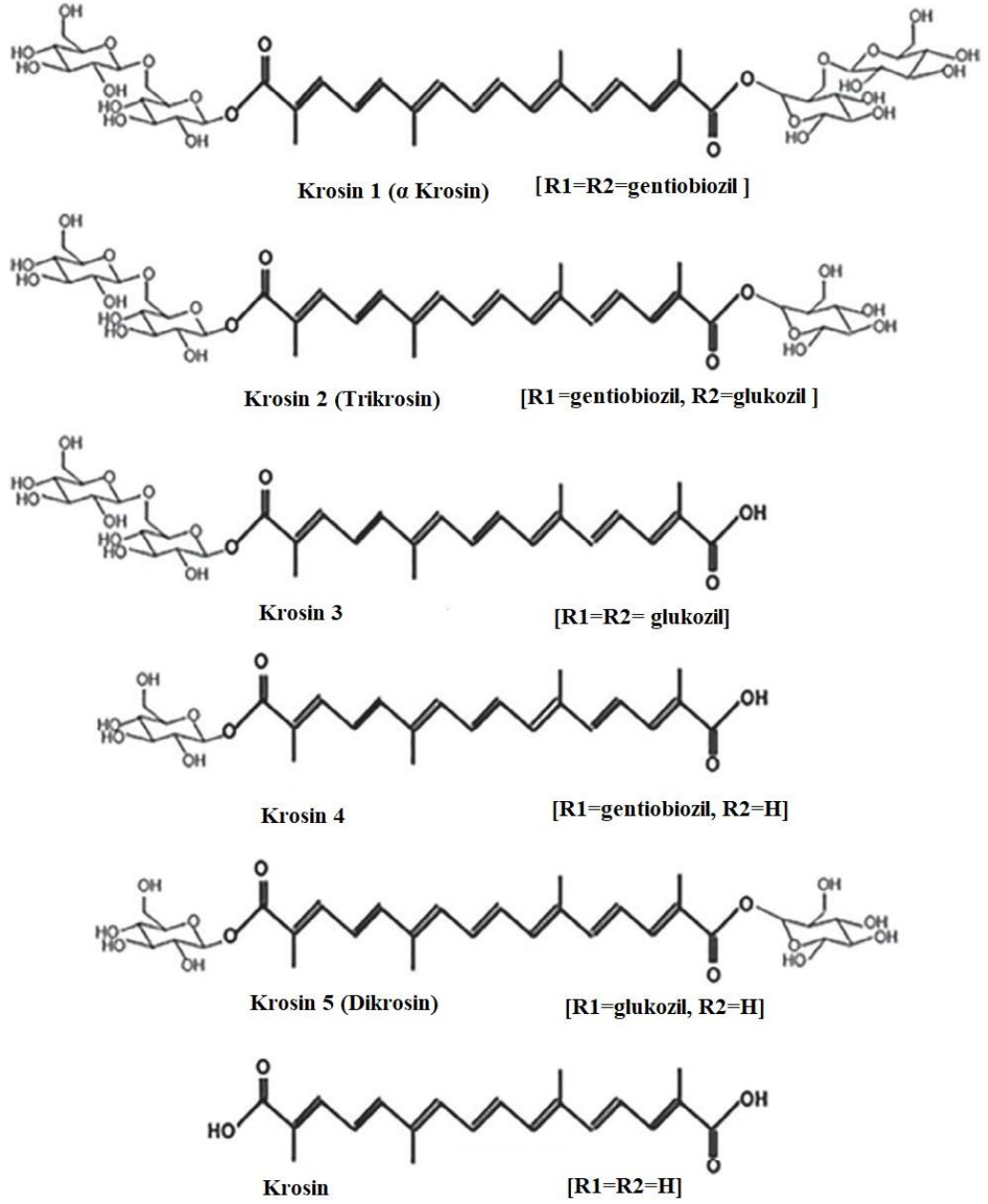
Safranal, safranın uçucu yağının ana bileşenidir. Safran aromasından sorumludur. Safranalın moleküler formülü $C_{10}H_{14}O$ 'dur. Bir monoterpen aldehit olup pikrokrosin aglikonudur. Taze safran stigmalarının safranal içermezken hasattan sonra dehidrasyon ve depolama sırasında β -glukozidazın pikrokrosin üzerindeki etkisiyle oluşur. Safranal, safranın esansiyel yağının ortalama %30-70'ini ve kuru maddesinin %0,001-0,006'sını içerir [171, 174, 175].



Şekil 4.3. Krosin, krosetin, pikrokrosin ve safranalin kimyasal yapısı [161].

4.1. KROSİN

Krosin önemli bir safran pigmenti olmakla birlikte safranın toplam kimyasal bileşenlerinin yaklaşık %80'nini oluşturur. Suda çözünebilir. Krosinin moleküler formülü $C_{44}H_{64}O_{24}$ 'tür. Safranın göz kamaştırıcı altın sarısı-kırmızımsı renginden sorumludur [153, 172]. Krosin, krosetinin şeker ile esterifikasyonu sonucu elde edilir ve $186^{\circ}C$ erime noktasına sahip kristaller oluşturur. Kuru stigmaların %6-16'sını oluştururlar. 5 tip krosin vardır ve Krosin-1 haricindekiler cis-trans izomerik formunda bulunur (Şekil 4.4) [170, 176, 177].



Şekil 4.4. Krosin ve türlerinin kimyasal yapıları [170].

Krosin safranın aktif bileşenleri arasında en çok antioksidan özellik gösteren bileşeni olup oksidatif strese karşı potansiyel bir role sahiptir [178]. Krosin, güçlü antioksidan özelliğinden dolayı spermelerin donduralarak saklanması, hepatositlerin toksinlerden korunması, nörodejeneratif bozuklukların tedavisi için de uygundur. Glutasyon peroksidaz (GPx), glutasyon S-transferaz (GST), katalaz ve süperoksit dismutaz gibi enzim aktivitesindeki değişiklikler ve hücrel redoks sisteminin translyasyon seviyesindeki değişiklikler krosinin antioksidan potansiyel mekanizmaları

olarak gösterilmektedir. Ayrıca, monositlerdeki serbest radikallerin sinyal yollarını etkileme, enzimlerle (peroksidazlar) etkileşim ve çeşitli proteinlerin antioksidan bileşiklerle etkileşimi sırasında reaktif oksijen türlerinin inhibisyonu gibi farklı etki mekanizmalarına da sahiptir [179-181].

Langerhans adacıklarındaki β -hücrelerinin STZ ile yok edilmesi mekanizmasının hem sistemik hem de lokal olarak oksidatif ve nitrozatif stresin indüksiyonu ile sıkı bir şekilde ilişkili olduğu görülmüştür. Bu nedenle pankreas, özellikle STZ'nin etkisi ve sonucundaki serbest radikal hasarına karşı hassastır. Safran ekstraktlarının hipoglisemik etkisi araştırıldığında, periferik dokular tarafından glukoz alımının uyarılması, bağırsak glukoz emiliminin inhibisyonu, hem karaciğer hem de böbrekte insülinaz aktivitesinin inhibisyonu, endojen glukoz üretiminin inhibisyonu, renal glukoz reabsorpsiyonunun inhibisyonu veya Langerhans adacıklarının β -hücrelerinin uyarılması ile insülin direncinin kırılması gibi mekanizmalarda yer aldığı görülmüştür [182-188].

Xi vd. (2005), safranın insülin direnci üzerindeki etkisinden dolayı geleneksel tıpta diyabet tedavisinde kullanıldığını ortaya koymuştur Safran ekstraktlarından biri olan krosetinin bozulmuş olan insülin direncine karşı insülin duyarlılığını artırdığı ve yüksek fruktozlu bir diyetin neden olduğu hiperinsülinemi gibi anormallikleri iyileştirdiğini belirtmişlerdir [189-193].

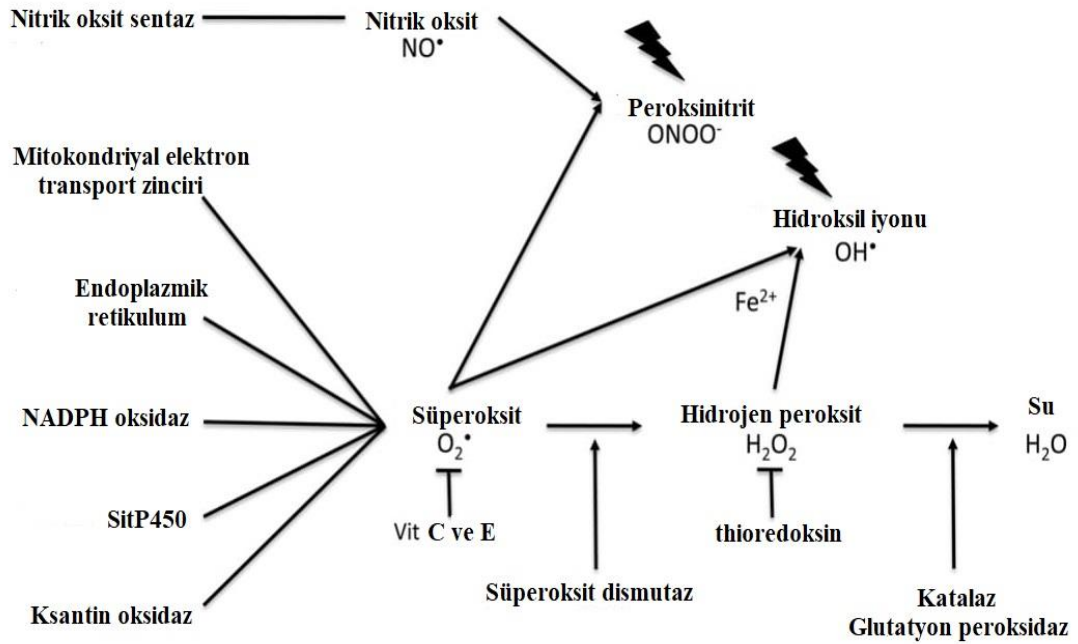
Bazı deneysel DM modellerinde safranal (4 hafta boyunca 0.25, 0,5 ve 0,75 mg/kg/gün) uygulamalarının glukoz, MDA ve NO içeriğinde önemli bir azalmaya yol açtığını, plazma GSH içeriğinde, SOD ve CAT faaliyetlerinde önemli bir artışa yol açtığını gösterilmiştir. Bu bulgular safranalın STZ diyabetik ratlarda oksidatif stresi modüle ederek anti-hiperglisemik ve hipoglisemik özellikler gösterdiği görülmüştür [194-197].

BÖLÜM 5

OKSİDATİF STRES VE ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

5.1. OKSİDATİF STRES VE REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ

Oksidatif stres, biyolojik bir sistemdeki oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin oksidanlar lehine bozulması sonucu ortaya çıkan durumdur. Dengesizlik, ROS'un fazla üretimi veya antioksidan sistem işleyişinde bir hata sonucu ortaya çıkar [198]. Serbest radikaller ise bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren molekül veya atomlar olarak tanımlanır ve bu eşleşmemiş elektronlar son derece reaktiftir. Serbest radikal oluşumuna birçok element sebep olabilir ancak biyolojik sistemlerde en çok hasara sebep olanlar oksijen ve nitrojen içerenleridir. Şekil 5.1 de başlıca reaktif oksijen türleri ve onların detoksifikasyon yolları özetlenmiştir. [199].



Şekil 5.1. Başlıca ROS' lar ve detoksifikasyon yolları [199].

Moleküler oksijenin biyoloji sistemlerdeki kritik rolü, hücrel işleyişi ve tüm organizmaların yaşamsal faaliyetleri açısından gerekli olduğu için çok önemlidir. Oksijen sinyal iletimi, gen transkripsiyonu ve diğer hücrel aktiviteler gibi yaşam için çok önemli fonksiyonlarda yer almasına rağmen aynı zamanda serbest radikal ve reaktif oksijen türleri formunda biyomoleküller üzerinde zararlı bir etkiye sahiptir. Oksijenin bu olumsuz etkisi, reaktif oksijen türlerinin oluşumundan sorumlu olan bir değerlikli metabolik indirgeme durumunun sonucudur. Reaktif oksijen türleri arasındaki en önemli tür ise vasküler düz kas hücrelerinin gevşemesi ve çoğalması, lökosit adezyonu, anjiyogenez, trombosit agregasyonu, tromboz, vasküler tonus ve hemodinamik düzenleyici işlevlerini yerine getiren nitrik oksittir [200, 201].

Oksidatif stres, bir dizi hücrel işlevi bozarak AIDS, yaşlanma, artrit, astım, otoimmün hastalıklar, karsinogenez, kardiyovasküler disfonksiyon, katarakt, diyabet, nörodejeneratif hastalıklar, Alzheimer, Parkinson gibi çeşitli patolojik durumlara yol açar [202-208].

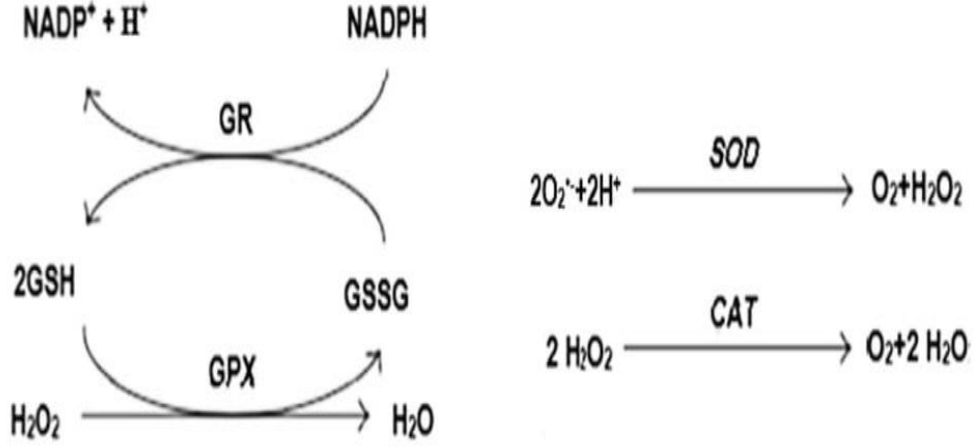
5.2. ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engellemek, bu maddelerin meydana getirdiği hasarları önlemek ve detoksifikasyonu sağlamak üzere vücutta görev yapan savunma sistemlerine “antioksidan savunma sistemleri” ya da “antioksidanlar” adı verilir [200]. Antioksidanlar, vücudun hassas oksidan/antioksidan dengesini korumaya yardımcı olan aşırı ROS'u detoksifiye eden temizleyicilerdir. İki çeşit antioksidan savunma sistemleri vardır: enzimatik antioksidanlar ve enzimatik olmayan antioksidanlar.

5.2.1. Enzimatik Antioksidanlar

Enzimatik antioksidanlar, detoksifikasyon işlemi sırasında moleküllerin son yörüngesindeki elektronları dengelemek için elektron transfer ederek onlara farklı değerler alma yeteneği veren metalik bir merkeze sahiptir. Fazla ROS'u nötralize ederler hücre yapılarına zarar gelmesini önlerler. Endojen antioksidan enzimler arasında süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz (GPx) bulunur. Şekil 5.2

de enzimatik antioksidanlar ve onların gerçekleştirdiği reaksiyonlar verilmiştir [209, 210].



Şekil 5.2. Enzimatik antioksidanlar ve gerçekleştirdiği reaksiyonlar [209].

Süperoksit anyonunun süperoksit dismutaz (SOD) tarafından H₂O₂'ye dismutasyonu (Şekil 5.2), anti-oksidatif reaksiyonlar için temeldir. SOD enzimi üç izoenzim halinde bulunur: SOD 1, SOD 2 ve SOD 3. SOD 1, metal kofaktörleri olarak Cu ve çinko (Zn) içerir ve sitozolde bulunur. SOD 2, manganez (Mn) içeren bir mitokondriyal izoformdur. SOD 3 ise hücre dışı formu kodlar. SOD 3, kofaktör olarak Cu ve Zn içerdiğinden yapısal olarak Cu, Zn-SOD'a benzer [209, 210].

Glutasyon (GSH) enzim ailesi, glutasyon peroksidaz (GPx), glutasyon S-transferaz (GST) ve glutasyon redüktaz (GR) enzimlerini içerir. GPx, peroksitleri parçalamak için H⁺ donörü olarak indirgenmiş GSH formunu kullanır. GSH'nin tükenmesi, DNA hasarına ve H₂O₂ konsantrasyonlarının artmasına neden olur; bu nedenle, GSH önemli bir antioksidandır. H₂O₂'nin H₂O ve O₂'ye indirgenmesi esnasında GPx tarafından kullanılan GSH, okside glutasyon (GSSG)'a oksitlenir. Glutasyon redüktaz ters reaksiyona katılır ve bir donör protonun NADPH'den GSSG'ye aktarılmasıyla GSH' a yeniden dönüştürülür (Şekil 5.2) [209, 211, 212].

Glutasyon peroksidaz vücutta beş izoform halinde bulunur: GPx1, GPx2, GPx3, GPx4 ve GPx5. GPx1, dokularda yaygın olarak dağılan sitozolik izoform iken GPx2,

gastrointestinal bir form olarak kodlanır; GPx3, plazma ve epididim sıvısında bulunur. GPx4, biyolojik membranlar içindeki fosfolipid hidroperoksiti spesifik olarak detoksifiye eder. E Vitamini (α -tokoferol), GPx4 eksikliği olan hücreleri, hücre ölümünden korur. GPx5 epididimde bulunur. Glutasyon, hücrelerdeki ana tiyol tamponudur ve sitozolde sistein, glutamat ve glisin tarafından oluşturulur. Seviyeleri, γ -glutamilsistein sentetaz ve glutasyon sentetaz enzimleri tarafından katalize edilen de-novo oluşumu ile düzenlenir. GSH, hücrelerin bazı tehlikeli endojen ve ksenobiyotik bileşiklerle konjugatlara karşı korunmasında ve hücrelerin oksidanlara karşı redükte durumda tutulmasında rol oynar [211-213].

Katalaz, peroksidaz aktivitesi ile H_2O_2 'den H_2O ve O_2 oluşturmak için ve H^+ donörleri (metanol, etanol, formik asit veya fenoller) ile çok etkili bir şekilde reaksiyona giren bir enzimdir (Şekil 5.2) [214, 215].

5.2.1. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Enzimatik olmayan antioksidanlar, C vitamini, GSH, E vitamini, beta-karoten ve flavonoidler gibi antioksidanlardan oluşur [216, 217].

C vitamini, hücre içi ve hücre dışı matrislere difüzyonunu kolaylaştıran suda çözünür bir antioksidandır. Antioksidan potansiyeli, $O_2^{\cdot-}$ ve OH^{\cdot} 'nin doğrudan uzaklaştırılması ile ilgilidir. Ayrıca, oksitlenmiş E vitamininin yenilenmesine katkıda bulunur. C vitamini ayrıca prooksidan aktiviteye sahiptir. OH^{\cdot} 'ye ek olarak Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ya dönüştürebilen ve daha sonra H_2O_2 ile reaksiyona girerek OH^{\cdot} oluşturabilen tek bileşik olabilir [218-221].

E Vitamini (α -tokoferol) zincir taşıyan peroksil radikallerini hızla temizler ve zincir yayılmasını durdurur. Bu reaksiyon sırasında E vitamini, lipit radikalinden daha az reaktif olan ve askorbik asidin etkisiyle tekrar tokoferole dönüştürülmek üzere membran yüzeyine göç eden tokoferil adı verilen serbest bir radikal haline gelir. Bununla birlikte, yüksek konsantrasyonlarda, tokoferil radikali bir prooksidan olarak hareket edebilir [220, 222, 223].

β -karoten, A vitamininin öncü maddesi olan hidrofilik bir prekürsördür öncüsüdür ve belirli dokuların hücre membranlarında yüksek konsantrasyonlarda birikir. β -karotenin antioksidan aktivitesi, lipid peroksidasyonu sırasında oluşan $O_2^{\bullet-}$ ve serbest radikallerin uzaklaştırılması ile ilgilidir [224-226].

GSH sitozolde, mitokondride, bulunur. Oksidatif hasara karşı hücreleri koruma da önemli role sahiptir. Çekirdekteki GSH, DNA ekspresyonu ve onarımı için gerekli olan sülfhidril proteinlerinin redoks durumunu korur [227].

Flavonoidler radikal süpürme için ideal yapıya sahiptir. C ve E vitaminlerinden daha etkili antioksidanlardır. Flavonoid antioksidan aktivite yapısına bağlıdır ve beş faktör tarafından belirlenebilir: H^+ ve elektronların donör ajanı olarak reaktivite; oluşan flavanol radikalinin stabilitesi; diğer antioksidanlara kıyasla reaktivitesi; şelat geçiş metalleri kapasitesi; çözünürlük ve membranlarla etkileşimidir. Flavonoid oksidasyon potansiyeli ne kadar küçükse, serbest radikal süpürücü olarak aktivitesi o kadar fazladır [222].

BÖLÜM 6

GEREÇ VE YÖNTEMLER

6.1. GEREÇLER

6.1.1 Kimyasal Malzemeler ve Kullanılan Yöntemler

Tez çalışması sırasında kullanılan kimyasallar; disodyumhidrojen fosfat (Na_2HPO_4), tiyobarbutirik asit (TBA), fosforik asit, n-butanol, 5,5' dithiobis-2 nitrobenzoik asit (DTNB), hidrojen peroksit (H_2O_2), disodium etilendiamin tetraasetik asit (Na_2EDTA), potasyum sodyum tartarat, bakır (II) sülfat, sodyum hidroksit, ksantin oksidaz, bakır (II) klorür, bovine serum albumin (BSA), krosin, ksantin, sodyum karbonat, Total Antioksidan Seviyesi (TAS) ve Total Oksidan Seviyesi (TOS), TGF- β kiti kullanıldı.

Çalışmada kullanılan aletler; manyetik karıştırıcı (Termal N11150M), otomatik pipetler (Brand), hassas terazi (RADWAG AS 220.R2), vorteks (Velp Scientifica), soğutmalı santrifüj (Nüve NF 1200R), mikrosantrifüj (Nüve NF 048), spektrofotometre (Thermo Fisher Multiskan Go 1510), UV/VIS Spektrofotometre (PG Instruments), pH metre (Adwa 1000), homejenizatör (Hangzhou Bioprep-24), sallayıcılı su banyosu (Nüve ST 30), mikroplaka yıkayıcı (Thermo Fisher Wellwash 888).

6.2. YÖNTEMLER

6.2.1. Streptozotosin ve Krosin Hazırlanması

Streptozotosin (STZ), 0.01 M sodium sitrat buffer (pH 4.5) içerisinde çözüldükten sonra 50 mg/kg olacak şekilde intraperitoneal (i.p) enjeksiyona hazır hale getirildi.

Krosin 50 mg/ kg olacak şekilde serum fizyolojik içerisinde çözüldükten sonra i.p enjeksiyona hazır hale getirildi [228, 229]

6.2.2. Ratların Temini ve Bakımı

Bu araştırmada, ağırlıkları 225-250 gram olan 60 adet erkek Wistar albino türü rat Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi (ZBEÜN-DEHAM) biriminden temin edildi. Çalışmaya Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu onayı (Protokol No:2020-21-03/09) alınarak başlandı ve tüm uygulamalar bu protokole uygun olarak yapılmıştır. İçme suları günlük olarak değiştirilirken kafes temizliği gün aşırı olarak yapıldı. Ratlar sıcaklığın 21°C, ortam neminin %55-60 olduğu, 12 saat ışık (08:00-20:00 saatleri) ve 12 saat karanlık uygulanan odalarda bakıldı. Ratlar çalışma süresince standart pellet yemle ad libitum olarak beslendi.

6.2.3. Rat Deney Protokolü

Araştırmada veri toplanacak ratlar her grupta 10 adet olmak üzere rastgele seçimlerle 6 gruba ayrılmıştır. Bu gruplar:

Grup 1: Kontrol grubu (K); %0.9 serum fizyolojik (SF) intraperitoneal (i.p) olarak uygulandı.

Grup 2: Streptozotosin (STZ) grubu; Bu gruba 30. günün sonunda periton içi 50 mg/kg dozda STZ enjeksiyonu ile deneysel diyabet modeli oluşturulduktan sonra 15 gün süreyle i.p. olarak serum fizyolojik uygulandı [228].

Grup 3: Pinealaktomi (PX) grubu; Epifiz bezi pinealaktomi ile çıkarıldıktan sonra 30. günün sonundan itibaren 15 gün süreyle i.p. olarak serum fizyolojik uygulandı [230].

Grup 4: PX+STZ grubu; Epifiz bezi pinealaktomi ile çıkarıldıktan sonra 30. günün sonunda periton içi 50 mg/kg dozda STZ enjeksiyonu ile deneysel diyabet modeli oluşturulduktan sonra 15 gün süreyle i.p. olarak serum fizyolojik uygulandı [228, 230].

Grup 5: PX+Krosin grubu; Epifiz bezi pinealaktomi ile çıkarıldıktan sonra 30. günün sonundan itibaren 15 gün süreyle 50 mg/kg dozda i.p. olarak krosin uygulandı [229, 230].

Grup 6: PX+STZ+Krosin grubu; Epifiz bezi pinealaktomi ile çıkarıldıktan sonra 30. günün sonunda periton içi 50 mg/kg dozda STZ enjeksiyonu ile deneysel diyabet modeli oluşturulduktan sonra 15 gün süreyle 50 mg/kg dozda i.p. olarak krosin uygulandı [228-230].

Pinealektomi işleminden sonra endojen melatonin hormonunun vücuttaki yoksunluğu 30 gün sürer [231]. Bu sebeble de çalışmamızda endojen melatonin yoksunluğundaki STZ'nin etkilerini gözlemlemek için tek doz STZ uygulaması pinealektomi işlemini takiben 30. günün sonunda yapılmıştır. Tüm kimyasallar günlük olarak hazırlanmış ve hergün aynı saatlerde her bir hayvana 1 ml/kg olacak şekilde i.p olarak uygulanmıştır.

6.2.3.1. Pinealektomi İşlemi

Sıçanlar, intraperitoneal olarak 80 mg/kg ketamin ve 8 mg/kg xylazine ile anestezi altına alındılar [232]. Lambda ortaya çıkacak şekilde, kafatası derisine bir kesi yapılarak kafatasının üst kısmına mikro freze matkap (Proxxon MICROMOT 50/E, Almanya) ile 3 mm çapında dairesel bir delik açıldı. Kesi yapılan yerden pens ile girilerek venöz sinüs altında yer alan pineal bez pensle tek parça halinde çıkarılmıştır. Daha sonra kesilmiş olan kemik parçası yerine yerleştirilerek kafa derisi dikilmiş ve % 10 povidon iyod ile pansuman yapılmıştır [230]. Pinealektomi işlemi sonrası hayvanlara ağrı kesici olarak 1 mg/kg i.p. enjeksiyonu ile novalgine uygulaması yapılmıştır.

6.2.3.2. Diyabet Modeli

Ratlarda diyabet geliştiğini ortaya koymak için STZ enjeksiyonundan 3 gün sonra kuyruktan alınan kan glukoz seviyesi bir glukometre (GlukoDr, EU Representative MT Promedt Consulting GmbH Altenhofstr. 80, d-66386 St. Ingbert, Almanya) ile ölçüldü ve kan glukoz değerleri 270 mg/dl ve üstünde olanlar diyabetik olarak kabul edildi.

6.2.4. Ratlardan Numune Alınması

Deney sonunda deneklere intraperitoneal yoldan 90 mg/kg ketamin (Ketalar-Eczacıbaşı/Türkiye), 10 mg/kg xylazine (Rompun-Bayer/Türkiye) ile anestezi uygulandıktan sonra laparotomi işlemi ile abdominal ven'den tüplere kan alınarak hayvanlar dekapite edildi. Böbrek dokuları steril bir şekilde dış zarından ayrıldıktan sonra serum fizyolojik içerisinde yıkanarak fazlalık kanın uzaklaştırılması sağlandı. Daha sonra böbrek dokusu iki eşit parçaya ayrılarak bir parçası % 10'luk formol solusyonuna konarak histolojik inceleme için ayrıldı. Geriye kalan böbrek dokusu ise alüminyum folyoya sarıldıktan sonra analiz gününe kadar -80 C°'de derin dondurucuda muhafaza edildi. Tüplere alınan kan numuneleri pıhtılaşmanın gerçekleşmesi için oda ısısında yaklaşık olarak bir saat kadar bekletildikten sonra 4000 rpm'de 20 dakika santrifüj işlemi yapılarak serum numuneleri elde edildi. Serum numuneleri böbrek fonksiyon testlerini yapmak üzere ependorf tüplere alındıktan sonra analiz gününe kadar -80 C°'de derin dondurucuda saklandı.

6.2.5. Biyokimyasal Analizler

6.2.5.1. Numunelerin Hazırlanması

Çalışma günü böbrek dokuları derin dondurucudan alınarak malondialdehit (MDA), indirgenmiş glutatyon (GSH), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) analizi ile toplam antioksidan seviyesi (TAS), toplam oksidan seviyesi (TOS), oksidatif stres indeksi (OSI) hemen ve protein seviyelerini belirlemek için tartıldı. Fosfat tampon (pH:7.5) ilavesi ile %10 homojenatlar elde edildi ve numuneler 12.000 rpm'de 1-2

dakika süreyle otomatik homojenizatör (Hangzhou Bioprep-24) ile homojenizasyon işlemi gerçekleştirildi. Böbrek dokusuna ait MDA seviyeleri bu homojenatlarda belirlendi. Daha sonra doku homojenatları +4 °C'de 5000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant elde edildi. Elde edilen süpernatantlar, GSH, SOD, CAT, TAS, TOS, OSI ve protein seviyelerini belirlemek için kullanıldı. Çalışma günü derin dondurucudan çıkarılan serum örnekleri oda ısısına getirildikten sonra uygun kitler kullanılarak otoanalizörde böbrek fonksiyon testleri olan kan üre azotu (BUN) ve kreatinin değerleri belirlendi.

6.2.5.2. Oksidatif Stres Belirteçlerinin Analizi

Böbrek Dokusu Malondialdehit (MDA) Analizi

Böbrek homojenatındaki MDA analizi Ohkawa vd. [233] tarif ettiği yönteme bağlı kalınarak yapıldı. Böbrek homojenatları, kapaklı cam tüp içersinde %1'lik fosforik asit (H_3PO_4) ve %0.6'lık tiyobarbitürik asit ile karıştırıldıktan sonra tüp kapaklarının üzeri alüminyum folyo ile sıkıca sarıldıktan sonra 45 dakika boyunca kaynar su banyosunda inkübe edildi. Daha sonra karışım, n-bütanol ile ekstrakte edildikten sonra santrifüj işlemiyle n-bütanol fazında ayrılan pembe renk deney gruplarına göre mikropilaya kuyucuklarına yerleştirilerek ELİSA okuyucuda 535 nm dalga boyunda ölçüldü ve MDA seviyesini hesaplamak için kullanıldı. Kör olarak n-bütanol ve standart olarak tetrametoksipropan kullanıldı. Sonuçlar nanomol/g yaş doku olarak sunulmuştur.

Böbrek Dokusu Redükte-Glutatyon (GSH) Analizi

Böbrek süpernatantındaki redükte glutatyon (GSH) analizi Ellman'ın [234] tarif ettiği yönteme bağlı kalınarak yapıldı. Böbrek süpernatantları deproteinize edildikten sonra ependorf tüp içersinde 5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoik asit (DTNB) ile reaksiyona sokularak sarı-yeşil renk oluşması için inkübasyona bırakıldı. Oluşan renkli ürün deney gruplarına göre mikropilakalara yerleştirilerek ELİSA okuyucuda 410 nm dalga boyunda ölçüldü ve GSH seviyesini hesaplamak için kullanıldı. Kör olarak distile su ve standart olarak 5mM/L'lik stok GSH çözeltisinden hazırlanan farklı dilüsyonlar kullanıldı. Sonuçlar nanomol/g yaş doku olarak elde edildi.

Böbrek Dokusu Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesi Analizi

Böbrek süpernatantındaki SOD aktiviteleri, Sun vd. [235] yöntemine bağlı kalınarak yapıldı. Deney ortamında ksantin-ksantin oksidaz reaksiyonu ile süperoksit radikalleri oluşur. Oluşan bu radikaller ortamdaki NBT'yi (nitro blue tetrazolium) indirgeyerek mavi renkli formazan oluşmasına neden olur. Doku SOD aktiviteleri oluşan bu mavi renkli formazanın 560 nm'de ELİSA okuyucuda ölçülmesi ile yapıldı. Sonuçlar U/g protein olarak elde edildi.

Böbrek Dokusu Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesi Analizi

Böbrek süpernatantındaki CAT aktiviteleri Aebi vd. [236] yöntemine bağlı kalınarak yapıldı. Deney ortamında süpernatant ile H₂O₂ içeren fosfat tamponu (pH: 7.5 mM) karıştırıldı. Süpernatandaki CAT aktivitesi ile H₂O₂, H₂O ve O₂' e parçalanır. Ortamdaki hidrojen peroksitlerin yıkımlanması 240 nm'de absorbanstaki azalmasına neden olur. CAT aktivitesini hesaplamak için absorbanstaki azalma 1 dakika boyunca gözlemlendi. Sonuçlar K/g protein olarak elde edildi.

Böbrek Dokusu Protein Analizi

Böbrek süpernatantlarında SOD ve CAT enzim aktivitelerinin hesaplanması için protein düzeyleri Lowry vd [237] yöntemine bağlı kalınarak yapıldı. Oluşan mavi renk 540 nm dalga boyunda ELİSA okuyucuda ölçülerek protein içeriğinin hesaplanmasında kullanıldı. Sonuçlar mg/ml olarak elde edildi.

Böbrek Dokusu Total Oksidan Seviyesi (TOS) Analizi

Böbrek süpernatantında TOS düzeylerinin ölçülmesi Erel'in metoduna bağlı kalınarak yapıldı [238]. Total Oksidan Seviyeleri, kit (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep Türkiye) prosedürüne bağlı kalınarak kullanılarak çalışıldı. Oluşan renkli bileşikler 660 nm dalga boyunda ELİSA okuyucu ile ölçülerek böbrek TOS seviyelerinin hesaplanmasında kullanıldı. Standart olarak 20 µmol/L'lik H₂O₂ solusyonu kullanıldı. Sonuçlar µmol H₂O₂ equiv /L olarak elde edildi.

Böbrek Dokusu Total Antioksidan Seviyesi (TAS) Analizi

Böbrek süpernatantında TAS düzeylerinin ölçümü Erel'in metoduna bağlı kalınarak yapıldı [239]. Total Antioksidan seviyeleri, kit (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, Türkiye) prosedürüne bağlı kalınarak çalışıldı. Kit talimatlarına göre mikropalakalara konan süpernatant üzerine reaktif 1 eklenerek 660 nm'de birinci okuma ve reaktif 2 ilave edilerek ikinci okuma yapıldı. Elde edilen iki absorbans arasındaki farklar belirlenerek böbrek TAS düzeylerinin hesaplanmasında kullanıldı. Kalibratör olarak E vitamininin suda çözünür bir analogu olan Trolox kullanıldı. Sonuçlar mmol Trolox Equiv/L olarak belirlendi.

Böbrek Dokusu Oksidatif Stres İndeksinin (OSI) Ölçümü

Böbrek süpernatantında OSI ölçümü, Erel'in metoduna [239] bağlı kalınarak hesaplandı. OSI, TOS'un TAS'a bölünmesine eşittir: $OSI \text{ (Arbitrary Unit)} = \frac{TOS}{TAS} \times 10$ (TAS (mmol Trolox eqv/l)x10). Sonuçlar Arbitrary Unit (AU) olarak belirlendi.

6.2.5.3. Böbrek Fonksiyon Testlerinin Ölçümü

Serum üre ve kreatinin düzeylerini belirlemek için analiz kitleri (Abbott, Abbott Park, Illinois, ABD) ve otoanalizör (Architect C8000) kullanılarak enzimatik kolorimetrik yöntemle ölçüm yapıldı. Sonuçlar mg/dl olarak belirlendi.

6.2.6. Serum Melatonin Seviyelerinin Ölçümü

Serum melatonin seviyeleri Bioassay Technology Laboratory'den (BT LAB, CHINA) satın alınan Rat Melatonin ELISA kiti (Cat.No: E0601Ra) ile ölçüldü. Veriler ng/L olarak sunuldu.

6.2.7. Histopatolojik Analiz

Böbrek dokuları fikse olması için %10'luk nötral tamponlanmış formaline (NTF) (104003, Formaldehyde solution %37, Merck, ABD) konuldu. Örnekler daha sonra 3-4 mm'lik daha küçük parçalara ayrılıp, plastik doku takip kasetlerine konularak NTF'de 48 saat süre ile fikse edildi. Fiksasyon işleminin bitmesini takiben parçalar 24 saat boyunca akan çeşme suyunda yıkandılar. Dokuların trimleri gerçekleştirildikten sonra 2x45 dakika %70, %80, %95 ve %96'lık artan alkol serilerinden geçirildi (Etanol, 1.00971.2500, Merck, ABD). Şeffaflama 2x30 dakika ksilol (108661, Merck, USA) ile gerçekleştirildi. Ardından 2x30 dakika parafin (Surgipath EM-400, Leica, GER) içerisinde bekletildi. Doku takibi için Leica TP 1020 (Leica, GER) doku takibi cihazı kullanıldı (GER). Gömme işlemi sonrası bloklar soğumaya bırakıldı. Parafin bloklardan Leica FINESSE ME+ (Leica, GER) mikrotomu ile 5 µm'lik kesitler ışık mikroskopik ve immunohistokimyasal yöntemler için jelatin kaplı lamlara alındı. Hazırlanan bu lamlar dokunun lama adezyonunu artırmak için 37°C'lik etüvde 2 saat bekletildi. Kesitlere genel histolojik yapıyı gözlemlemek amacıyla Hematoksilen-Eozin (H-E) ve glikojen içeriğini ve bazal membran yapısını incelemek için Periyodik Asid Schiff (PAS) boyama yöntemleri uygulandı. Kesitler deparafinizasyon aşaması için sırasıyla 60°C etüvde ve 60°C sıcaklıktaki ksilol içerisinde 1 saat bekletildi. Ardından boyama protokolleri uygulandı. Renal hasar, tubuler ve glomerüler değişikliklerin derecesi ve yaygınlığına göre semikantitatif olarak belirlendi. Buna göre; infiltrasyon, glomerüler büzüşme, tubul epitel hücrelerinde vakuolizasyon ve mikrovillus kaybı yönünden incelendi. Her kesitten X20'lik büyütmede 10 alan incelendi. Hasarın şiddetine göre; 0 (değişiklik yok), 1 (hafif), 2 (orta) ve 3 (ağır) olarak skorlandı. Maksimum hasar skoru 12 idi. Preparatlar Nikon Eclipse 80i ışık mikroskobu ve Nikon görüntü analiz sistemi ile incelenerek skorlandı ve fotoğrafları çekildi. Hematoksilen & Eozin boyama protokolü Çizelge 6.1 deki ve Pas boyama protokolü Çizelge 6.2 deki gibi uygulandı.

Çizelge 6.1. Hematoksilen & Eozin boyama protokolü.

% 100 Alkol	2 dakika
% 96 Alkol	2 dakika
% 80 Alkol	2 dakika
% 80 Alkol	2 dakika
Distile suda yıkama	3 dakika
Hematoksilen	3 dakika
Akarsu	5 dakika
Akarsuda yıkama	Daldır çıkar
Amonyaklı su	Doku mor renk alana kadar
Akarsu	Daldır çıkar
Distile suda yıkama	5 dakika
Eozin	1.5 dakika
% 80 Alkol yıkama	3 dakika+ 3 dakika
% 96 Alkol yıkama	3 dakika+ 3 dakika
% 96 Alkol yıkama	3 dakika+ 3 dakika
Ksilol	5 dakika+ 5 dakika+ 5 dakika
Boyalı preparatlar entellan damlatılarak kapatıldı	

Çizelge 6.2. Pas boyama protokolü.

% 100 Alkol	2 dakika
% 96 Alkol	2 dakika
% 80 Alkol	2 dakika
% 80 Alkol	2 dakika
Çeşme suyunda yıkama	2 dakika
Distile suda yıkama	2 dakika
Periyodik asid	5 dakika
Distile suda yıkama	2 dakika
Schieff solusyonu	15 dakika
Çeşme suyunda yıkama	10 dakika
% 80 Alkol yıkama	3 dakika + 3 dakika
% 96 Alkol yıkama	3 dakika + 3 dakika
% 96 Alkol yıkama	3 dakika + 3 dakika
Ksilol	5 dakika + 5 dakika + 5 dakika
Boyalı preparatlar entellan damlatılarak kapatıldı.	

6.2.8. İmmünohistokimyasal Analiz

Kesitler deparafinizasyon aşaması için sırasıyla 60°C etüvde ve 60°C sıcaklıktaki ksilol içerisinde 1 saat bekletildi. Ardından aşağıdaki IHC boyama protokolü uygulandı. Preparatlar entallen ile kapatılarak Nikon Eclipse 80i digital kamera takılı ışık mikroskobu (Nikon, JAP) ile fotoğraflandı. Tüm gruplar için, her X20 büyütme alanında en az 100 hücre işaretlendi. Kesitlerde, boyanan hücrelerin yüzdesi ve boyanma derecesinin kriter olarak alındığı semikantitatif bir yöntemle skorlama yapıldı. Boyanma derecesi: 0 (boyanma yok), 1 (zayıf boyanma), 2 (orta boyanma), 3 (güçlü boyanma) olarak değerlendirildi. Her kesit için immünohistokimyasal boyanma skorlaması, H-SCORE adı verilen ve $(I \times PC)$, (I: boyanmanın derecesi, PC: her derecede boyanan hücrelerin yüzdesi) formülüyle hesaplanan bir skorlama algoritması kullanılarak yapıldı. IHC boyama protokolü Çizelge 6.3 deki gibi uygulandı

Çizelge 6.3. IHC boyama protokolü.

Sodyum sitrat solüsyonu 800 Watt mikrodalga fırın	10 dk
Soğuk su banyosu	20 dk
Distile su	5 dk
%3' lük H2O2 solüsyonu	10 dk
PBS ile yıkandı	2x3 dk
Dokuları etrafı pappen ile çizildi ve Serum bloking solüsyonu damlatıldı.	10 dk
Serum bloking solüsyonu dokudan uzaklaştırdı. Anti-TGFβ1 (Bt Lab, Cat no: BT-Apo8976) primer antikorunu 1/100 oranında seyreltilerek damlatıldı, nemli ortamda +4°C' de inkübe edildi.	Gece boyu
PBS ile yıkandı	2x3 dk
Primer ile uyumlu biyotinlenmiş sekonder antikor	30 dk
PBS ile yıkandı	2x3 dk
Streptoavidin ile işaretli antikor (HRP)	30 dk
PBS ile yıkandı	2x3 dk
DAB (3,3-diaminobenzidine)	Gözle takip
Distile su ile yıkama	3 dk
Mayer's Hematoksilin	1 dk
Çeşme suyu ile yıkama	5 dk
Distile su ile yıkama	2 dk

6.2.9. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS (SPSS for Windows version 14.0) istatistiksel yazılım programı ile yapıldı. Tüm sonuçlar aritmetik ortalama \pm standart hata (SE) olarak ifade edildi. Tüm gruplardaki ölçülebilir değişkenlerin Shapiro Wilk normallik testine göre normal dağılım göstermediği saptandı ($p>0.05$). Bu nedenle istatistiksel değerlendirmede parametrik olmayan testlerden Kruskal Wallis varyans analizi tüm değişkenler yönünden grupların genel karşılaştırılmasında kullanılırken, grupların ikili karşılaştırılmasında ise Mann-Whitney U testi kullanıldı. $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BÖLÜM 7

DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

7.1. BİYOKİMYASAL BULGULAR

7.1.1 Oksidatif Stres Belirteçlerinin Düzeyleri

Pinealektomi ve diyabet modeli oluşturulmuş ratlarda ve krosin uygulaması ile böbrek dokularında oksidan-antioksidan düzeylerini ortaya koymak için doku MDA, GSH, SOD, CAT düzeyleri çalışıldı. Böbrek dokusuna ait veriler Çizelge 7.1'de sunulmuştur.

Çizelge 7.1. Ortalama doku oksidan-antioksidan parametrelerin karşılaştırılması.

Gruplar	MDA (nmol/g yaş doku)	GSH (nmol/g yaş doku)	SOD (U/g protein)	CAT (K/g protein)
Grup 1: Kontrol	658.81±31.99	843.31±51.40	95.52±6.80	66.09±7.33
Grup 2: STZ	880.58±15.07 ^a	491.96±29.27 ^a	36.39±4.23 ^a	22.68±5.04 ^a
Grup 3: PX	838.75±11.87 ^b	724.41±8.94 ^{b,d}	53.64±4.50 ^{a,c}	45.33±4.01 ^{b,c}
Grup 4: PX+STZ	1014.04±50.84 ^{a,c,e}	453.26±15.71 ^{a,e}	24.10±3.41 ^{a,c,f}	9.62±1.72 ^{a,e}
Grup 5: PX+Krosin	725.88±26.04 ^{d,f,g}	728.41±41.17 ^{c,g}	67.89±4.84 ^{b,d,f,g}	58.51±4.97 ^{d,f,g}
Grup 6: PX+STZ+Krosin	777.53±8.59 ^{b,d,e,g}	746.44±10.97 ^{d,g}	45.95±6.34 ^{a,i,h}	36.30±5.10 ^{b,g,h}

Veriler aritmetik ortalama±SE olarak ifade edildi (n=10).

^ap< 0.001 vs grup 1

^bp< 0.05 vs grup 1

^cp< 0.05 vs grup 2

^dp< 0.001 vs grup 2

^ep< 0.001 vs grup 3

^fp< 0.05 vs grup 3

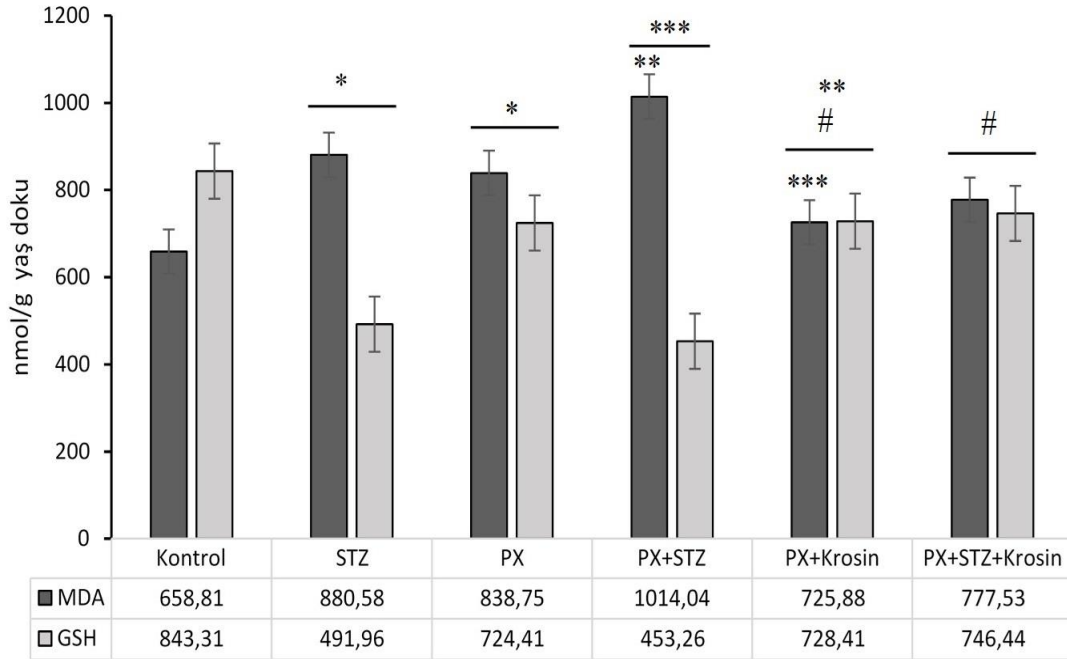
^gp< 0.001 vs grup 4

^hp< 0.05 vs grup 5

ⁱp< 0.05 vs grup 4

6.1.1.1. Böbrek Dokusu MDA ve GSH Düzeyleri

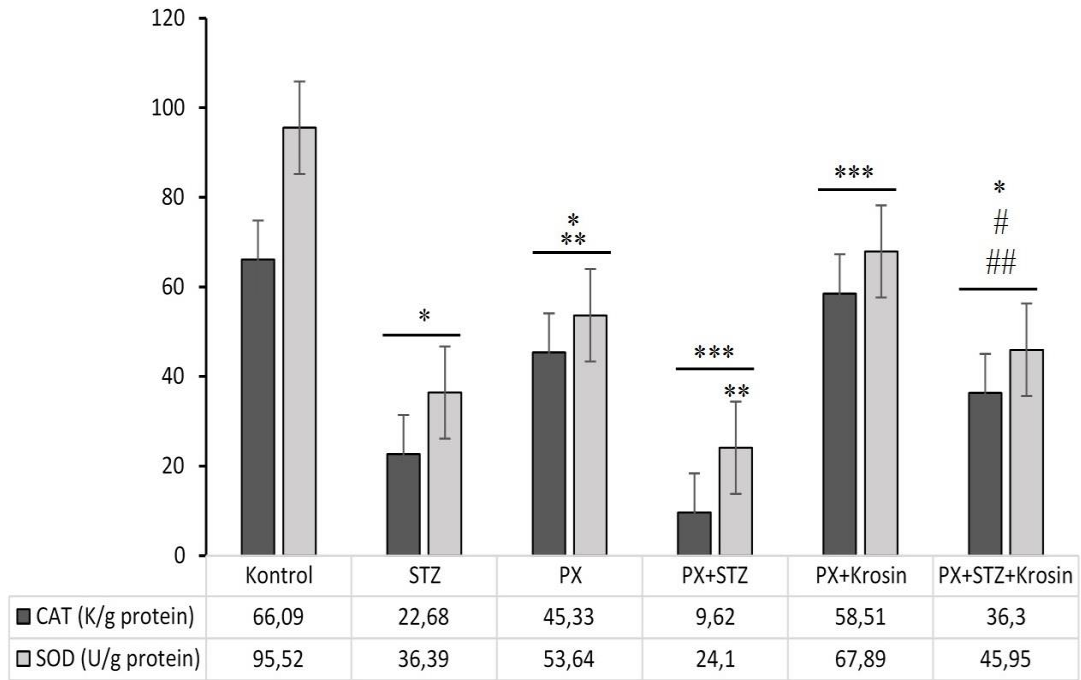
STZ enjeksiyonu böbrek dokusu MDA düzeylerini kontrol grubuna göre ciddi şekilde artırırken ($p < 0.001$), GSH düzeylerinde ise ciddi düşüşler ($p < 0.001$) gözlenmiştir. Ratlarda pinealektomi işlemi uygulanması kontrol grubuna göre MDA düzeylerinde artışa ($p < 0.05$) neden olurken GSH düzeylerinde de düşümlere ($p < 0.05$) sebep olmuştur. Pinealektomi işleminden sonra STZ enjeksiyonu ile diyabet modeli oluşturulması ise PX grubuna göre MDA seviyelerini anlamlı olarak ($p < 0.001$) artırırken GSH seviyesini ise ciddi derecede düşürmüştür. Pinealektomi ve STZ enjeksiyonu sonrası krosin tedavisi yapıldığında ise PX+STZ grubuna göre MDA düzeylerinde ciddi düşümler ($p < 0.001$) görülürken, GSH seviyelerinde ise anlamlı artışlar ($p < 0.001$) tespit ettik. Böbrek dokusunda MDA seviyesi ve GSH aktivitesi Şekil 7.1’de sunulmuştur.



Şekil 7.1. Böbrek dokusunda MDA seviyesi ve GSH aktivitesi. Üst simgeler istatistiksel olarak anlamlı farkı temsil eder: * $p < 0.05$, Kontrol ile karşılaştırıldığında; ** $p < 0.05$, STZ ile karşılaştırıldığında; *** $p < 0.05$, PX ile karşılaştırıldığında; # $p < 0.05$, PX+STZ ile karşılaştırıldığında; ## $p < 0.05$, olduğunda PX+Krosin karşılaştırıldığında.

7.1.1.2. Böbrek Dokusu SOD ve CAT Aktivite Düzeyleri

STZ enjeksiyonu, böbrek dokusu SOD ve CAT aktivitelerinde kontrol grubuna göre ciddi derecede düşüşe ($p < 0.001$) neden olduğunu gözlemledik. Ayrıca pinealektomi uygulaması böbrek dokusu CAT aktivitesinde kontrol grubuna göre anlamlı düşümlere ($p < 0.05$) neden olurken, SOD aktivitesinde ise ciddi düşümler ($p < 0.05$) olduğu tespit edilmiştir. Pinealektomi işleminden sonra STZ enjeksiyonu ile diyabet modeli oluşturulması ise PX grubuna göre böbrek dokusu CAT aktivitelerinde ($p < 0.001$) ve SOD aktivitelerinde ($p < 0.05$) ciddi düşümler görülmüştür. Diğer yandan, pinealektomi ve STZ enjeksiyonu sonrası krosin tedavisi yapıldığında ise PX+STZ grubuna göre CAT aktivitelerinde ($p < 0.001$) ve SOD aktivitelerinde ($p < 0.05$) ciddi iyileşmeler olduğunu tespit ettik. Böbrek dokusunda SOD ve CAT aktivitesi Şekil 7.2 ve Çizelge 7.1’ de sunulmuştur.



Şekil 7.2. Böbrek dokusunda SOD ve CAT aktivitesi. Üst simgeler istatistiksel olarak anlamlı farkı temsil eder: * $p < 0.05$, Kontrol ile karşılaştırıldığında; ** $p < 0.05$, STZ ile karşılaştırıldığında; *** $p < 0.05$, PX ile karşılaştırıldığında; # $p < 0.05$, PX+STZ ile karşılaştırıldığında; ## $p < 0.05$, PX+Krosin karşılaştırıldığında.

7.1.1.3. Böbrek Dokusu TAS, TOS ve OSI Aktivite Düzeyleri

STZ enjeksiyonu böbrek dokusu TAS değerlerinde kontrol grubuna göre ciddi düşüşe ($p < 0.001$) neden olurken, TOS ve OSI değerlerinde ise ciddi artışa ($p < 0.001$) neden olmuştur. İlave olarak pinealektomi uygulaması böbrek dokusu TAS değerlerinde kontrol grubuna göre anlamlı düşümlere ($p < 0.05$) neden olurken TOS ve OSI değerlerinde ise ciddi artışlar elde edilmiştir. Pinealektomi işleminden sonra STZ enjeksiyonu yapılması ise PX grubuna göre TAS değerlerinde daha da düşüşe ($p < 0.001$) neden olurken, TOS ve OSI değerlerinde ise artışın sürdüğünü ($p < 0.001$) tespit ettik. Diğer yandan PX ve STZ enjeksiyonu sonrası krosin tedavisi yapıldığında ise TAS değerlerinin anlamlı iyileşmeler ($p < 0.05$) gözlemlenirken TOS ve OSI değerlerinde ise düşüşler ($p < 0.05$) olduğunu tespit ettik. Kalp dokusu ortalama TAS, TOS ve OSI değerleri Şekil 7.3, Şekil 7.4, Şekil 7.5 ve Çizelge 7.2’de sunulmuştur.

Çizelge 7.2. Ortalama doku TAS, TOS ve OSI değerlerinin karşılaştırılması.

Gruplar	TAS (mmol Trolox eqv/L)	TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv. /L)	OSI (AU)
Grup 1: Kontrol	1.32 \pm 0.02	8.68 \pm 0.35	65.88 \pm 2.25
Grup 2: STZ	1.10 \pm 0.00 ^a	15.81 \pm 0.52 ^a	143.00 \pm 5.09 ^a
Grup 3: PX	1.23 \pm 0.01 ^{b,d}	10.08 \pm 0.36 ^{b,d}	82.31 \pm 3.79 ^{b,d}
Grup 4: PX+STZ	1.06 \pm 0.00 ^{a,c,e}	20.77 \pm 0.97 ^{a,d,e}	194.78 \pm 9.51 ^{a,d,e}
Grup 5: PX+Krosin	1.43 \pm 0.04 ^{d,f,g}	9.98 \pm 0.96 ^{d,g}	70.91 \pm 8.47 ^{d,g}
Grup 6: PX+STZ+Krosin	1.25 \pm 0.03 ^{b,c,g,h}	12.95 \pm 0.52 ^{a,c,e,g,h}	104.06 \pm 6.38 ^{a,d,f,g,h}

Veriler aritmetik ortalama \pm SE olarak ifade edildi (n=10).

^a $p < 0.001$ vs grup 1

^b $p < 0.05$ vs grup 1

^c $p < 0.05$ vs grup 2

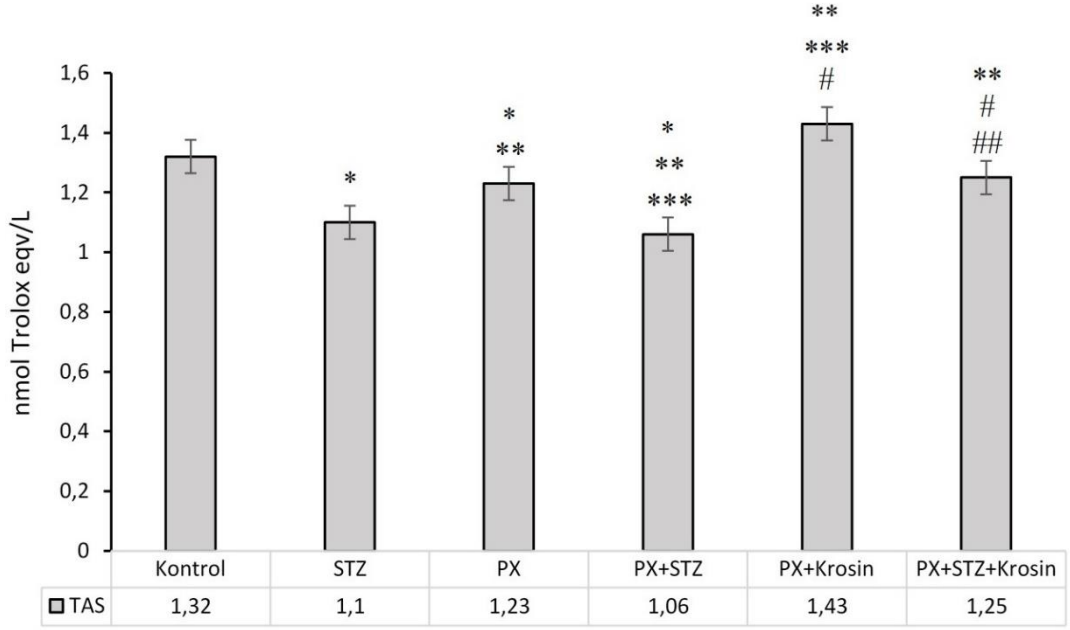
^d $p < 0.001$ vs grup 2

^e $p < 0.001$ vs grup 3

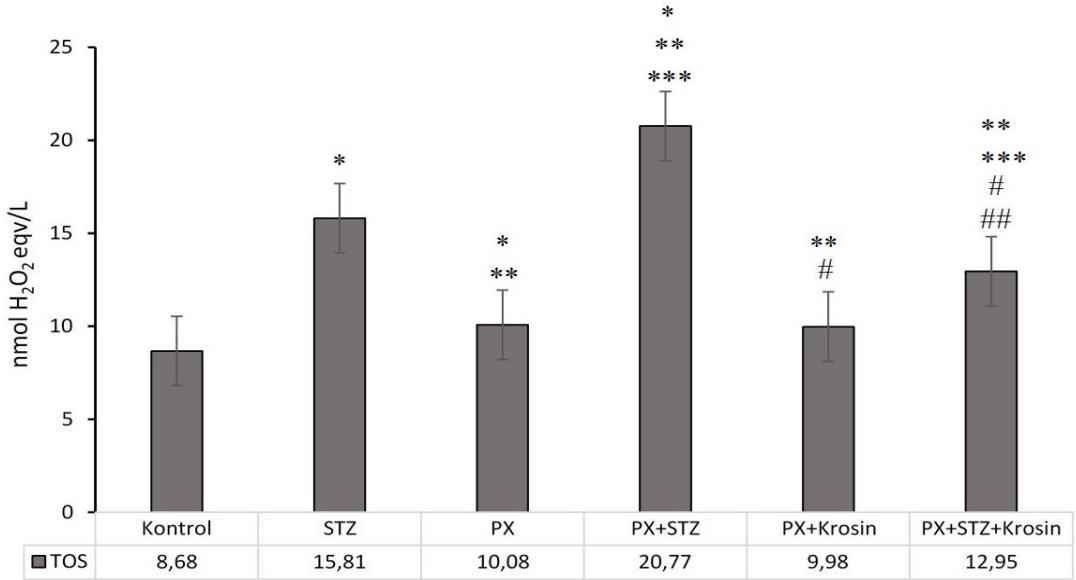
^f $p < 0.05$ vs grup 3

^g $p < 0.001$ vs grup 4

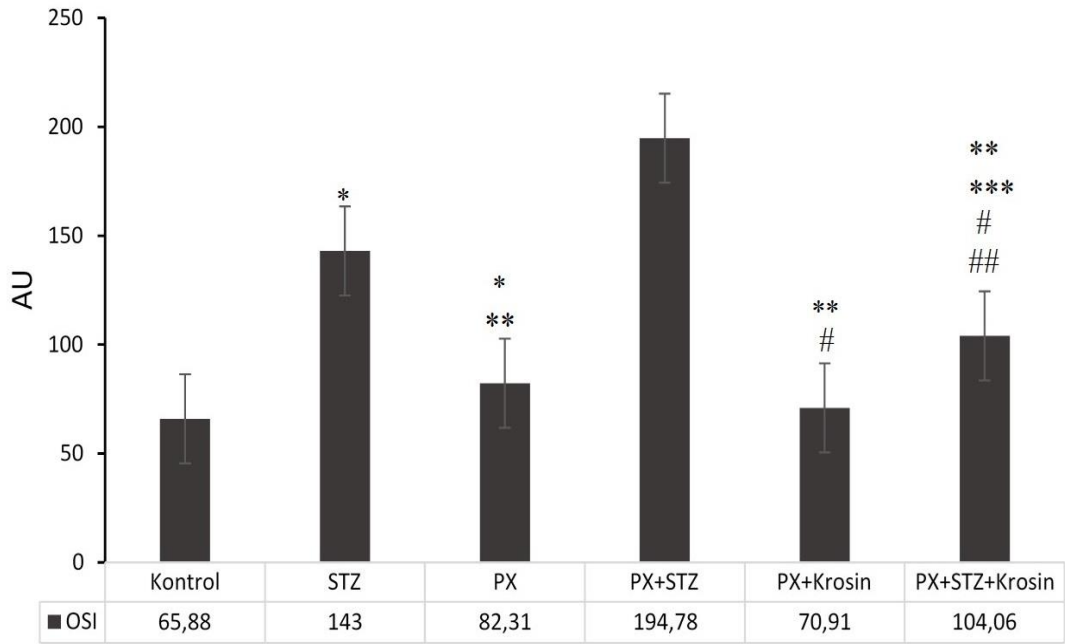
^h $p < 0.05$ vs grup 5



Şekil 7.3. Böbrek dokusunda TAS değerleri. Veriler, aritmetik ortalama \pm SE (n = 10) olarak ifade edilir. Üst simgeler istatistiksel olarak anlamlı farkı temsil eder: * p < 0.05 Kontrol ile karşılaştırıldığında, ** p < 0.05 STZ ile karşılaştırıldığında; PX ile karşılaştırıldığında; *** p < 0.05, PX+STZ ile karşılaştırıldığında; #p < 0.05, ##p < 0.05, PX+Krosin ile karşılaştırıldığında.



Şekil 7.4. Böbrek dokusunda TOS değerleri. Veriler, aritmetik ortalama \pm SE (n = 10) olarak ifade edilir. Üst simgeler istatistiksel olarak anlamlı farkı temsil eder: * p < 0.05 Kontrol ile karşılaştırıldığında, ** p < 0.05, STZ ile karşılaştırıldığında, *** p < 0.05, PX ile karşılaştırıldığında; #p < 0.05, PX+STZ ile karşılaştırıldığında; ##p < 0.05, PX+Krosin ile karşılaştırıldığında.



Şekil 7.5. Böbrek dokusunda OSI değerleri. Veriler, aritmetik ortalama \pm SE (n = 10) olarak ifade edilir. Üst simgeler istatistiksel olarak anlamlı farkı temsil eder: * p< 0.05, Kontrol ile karşılaştırıldığında; ** p<0.05, STZ ile karşılaştırıldığında; *** p < 0.05, PX ile karşılaştırıldığında; #p < 0.05, PX+STZ ile karşılaştırıldığında; ##p <0.05, PX+Krosin ile karşılaştırıldığında.

7.1.2 Böbrek Fonksiyon Parametre Düzeyleri

7.1.2.1. BUN ve Kreatinin Düzeyleri

STZ enjeksiyonu ile diyabet oluşturulması serum böbrek fonksiyon parametrelerinden BUN ve kreatinin değerlerinde kontrol grubuna göre ciddi artış (p< 0.001) olduğunu tespit ettik. Ayrıca pinealektomi işleminden sonra STZ enjeksiyonu yapılması pinealektomi grubuna göre BUN ve Kreatinin değerlerinde artışa (p< 0.001) neden olmuştur. Diğer yandan pinealektomi ve STZ enjeksiyonu yapılmış hayvanların krosin ile tedavi edilmesi, krosin tedavisi yapılmayan gruba (PX+STZ) serum BUN ve kreatinin değerlerinde ciddi iyileşmelere (p< 0.001) sebep olmuştur. Serum böbrek fonksiyon parametrelerinin değerlerinin karşılaştırılması Çizelge 7.3'te sunulmuştur. Ortalama serum BUN ve Kreatinin değerleri Şekil 7.6 ve Şekil 7.7'te sunulmuştur.

Çizelge 7.3. Serum böbrek fonksiyon değerlerinin karşılaştırılması.

Gruplar	BUN (mg/dl)	Kreatinin (mg/dl)
Grup 1: Kontrol	36.75±0.88	0.24±0.01
Grup 2: STZ	94.62±6.97 ^a	0.61±0.03 ^a
Grup 3: PX	39.37±1.13 ^c	0.30±0.01 ^{b,c}
Grup 4: PX+STZ	124.00±12.65 ^{a,e}	0.71±0.02 ^{a,e}
Grup 5: PX+Krosin	35.87±0.85 ^{d,c,f,g}	0.31±0.01 ^{b,c,g}
Grup 6: PX+STZ+Krosin	71.00±7.55 ^{a,d,e,g,h}	0.38±0.02 ^{b,c,f,g,i}

Veriler aritmetik ortalama±SE olarak ifade edildi (n=10).

^a p< 0.001 vs grup 1

^b p< 0.05 vs grup 1

^c p< 0.001 vs grup 2

^d p< 0.05 vs grup 2

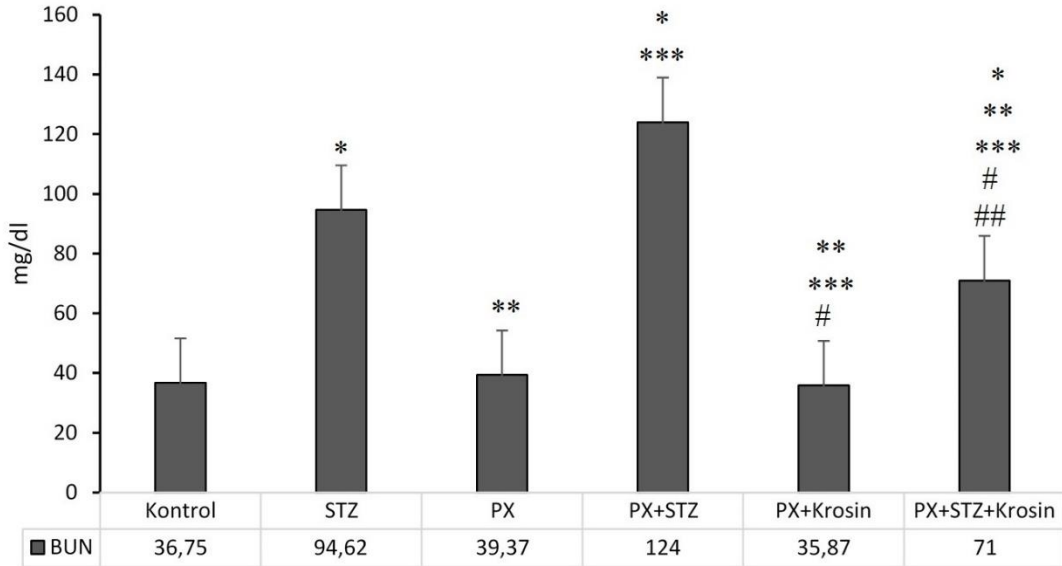
^e p< 0.001 vs grup 3

^f p< 0.05 vs grup 3

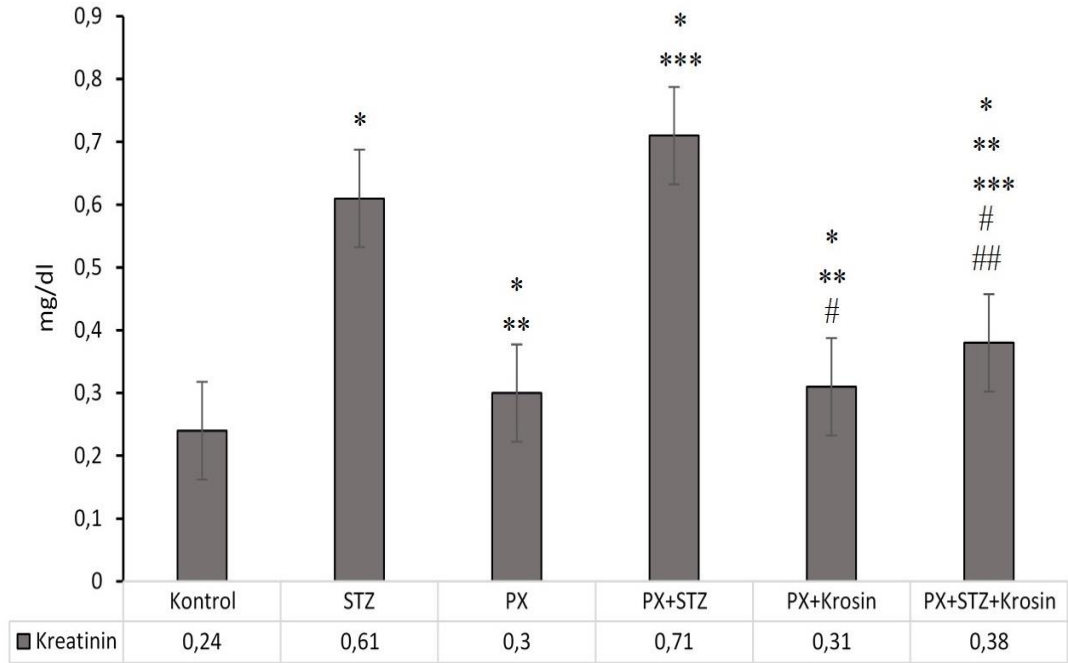
^g p< 0.001 vs grup 4

^h p< 0.001 vs grup 5

ⁱ p< 0.05 vs grup 5



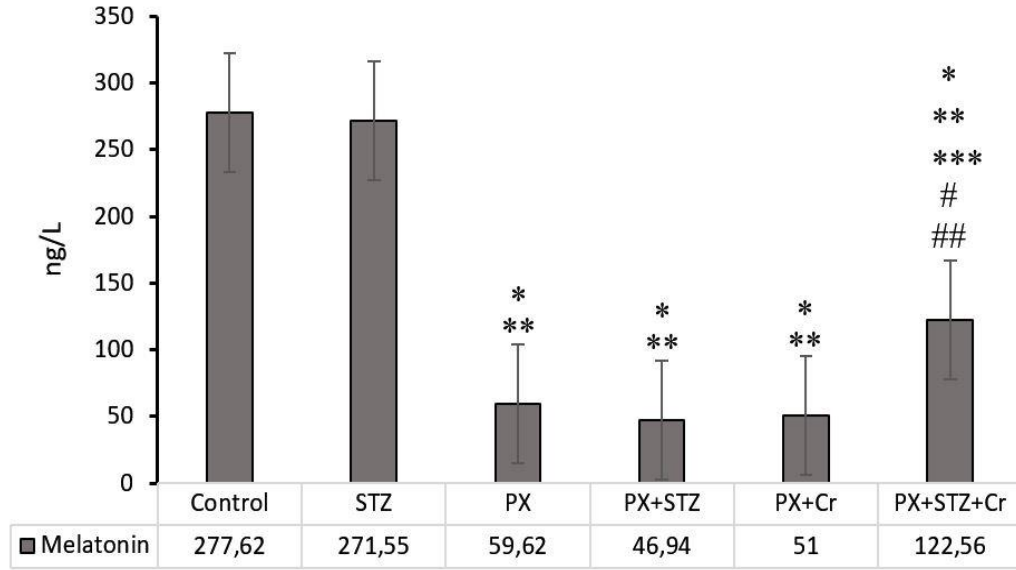
Şekil 7.6. Serum BUN değerleri. Veriler, aritmetik ortalama ± SE (n = 10) olarak ifade edilir. Üst simgeler istatistiksel olarak anlamlı farkı temsil eder. * p<0.05, Kontrol ile karşılaştırıldığında; ** p<0.05, STZ ile karşılaştırıldığında; *** p<0.05, PX ile karşılaştırıldığında; #p<0.05, PX+STZ ile karşılaştırıldığında; ##p<0.05 PX+Krosin ile karşılaştırıldığında.



Şekil 7.7. Serum Kreatinin değerleri. Veriler, aritmetik ortalama \pm SE (n = 10) olarak ifade edilir. Üst simgeler istatistiksel olarak anlamlı farkı temsil eder. * p<0.05, Kontrol ile karşılaştırıldığında; ** p<0.05, STZ ile karşılaştırıldığında; *** p<0.05, PX ile karşılaştırıldığında; #p<0.05, PX+STZ ile karşılaştırıldığında; ##p <0.05, PX+Krosin ile karşılaştırıldığında.

7.1.3. Pinealektominin Serum Melatonin Düzeylerine Etkisi

Pinealektomi sonrası serum melatonin seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldı. Öte yandan, pinealektomize diyabetik ratların krosin ile tedavisi, PX+STZ grubuna kıyasla serum melatonin düzeylerinde artışa neden oldu. Gruplara göre serum melatonin düzeylerinin değişimi Şekil 7.8' da verilmiştir.



Şekil 7.8. Serum Melatonin düzeyleri. Veriler, aritmetik ortalama \pm SE (n = 10) olarak ifade edilir. Üst simgeler istatistiksel olarak anlamlı farkı temsil eder: * p < 0.05, Kontrol ile karşılaştırıldığında; ** p < 0.05, STZ ile karşılaştırıldığında; *** p < 0.05, PX ile karşılaştırıldığında; #p < 0.05, PX+STZ ile karşılaştırıldığında; ## p < 0.05, PX+Krosin ile karşılaştırıldığında.

7.1.4. Grupların STZ Öncesi ve STZ Sonrası Kan Glukoz Değerlerinin Karşılaştırılması

Deney hayvanları çalışmadan 12 saat öncesinde yemleri önlerinden kaldırıldı ve çalışma günü tüm hayvanların kuyruklarından alınan kan numunelerinde tüm grupların kan glukoz değerlerinin birbirine yakın olduğu gözlemlendi. Daha sonra diyabet modeli oluşturmak için ilgili gruplardaki hayvanlara STZ enjeksiyonu yapıldı ve 3 gün sonrasında ilgili gruplardan alınan kuyruk kanlarında glukoz ölçümü yapıldığında diğer gruplara göre ciddi derecede artışlar olduğu tespit edildi. Diğer taraftan ratların dekapitasyon öncesi açlık kan şekeri ölçümü yapıldı ve pinealektomize diyabetik ratların serum glukoz düzeylerinde krosin tedavisi uygulanan grupta, PX+STZ ve STZ gruplarına göre anlamlı derecede düşüşler gözlemlendi. Ortalama açlık kan glukoz değerleri Şekil 7.9 ve Çizelge 7.4'te sunulmuştur.

Çizelge 7.4. Ortalama açlık kan glukoz değerlerinin karşılaştırılması.

Gruplar	STZ öncesi kan glukozu (mg/dl)	STZ sonrası kan glukozu (mg/dl)	Kesim öncesi kan glikozu (mg/dl)
Grup 1: Kontrol	86.25±2.75	74.50±2.45	81.25±3.33
Grup 2: STZ	79.75±1.16	361.00±18.78a	343.62±10.42 ^a
Grup 3: PX	80.50±2.69	72.37±2.64c	74.5±2.46 ^c
Grup 4: PX+STZ	83.50±2.77	323.00±8.61a,d	384.12±16.97 ^{a,d}
Grup 5: PX+Krosin	79.75±1.16	83.62±4.20b,c,e	79.62±3.19 ^{c,e}
Grup 6: PX+STZ+Krosin	87.50±2.44	358.62±16.11a,d,f	202.62±22.46 ^{a,c,d}

Veriler aritmetik ortalama±SE olarak ifade edildi (n=10).

^ap< 0.001 vs grup 1

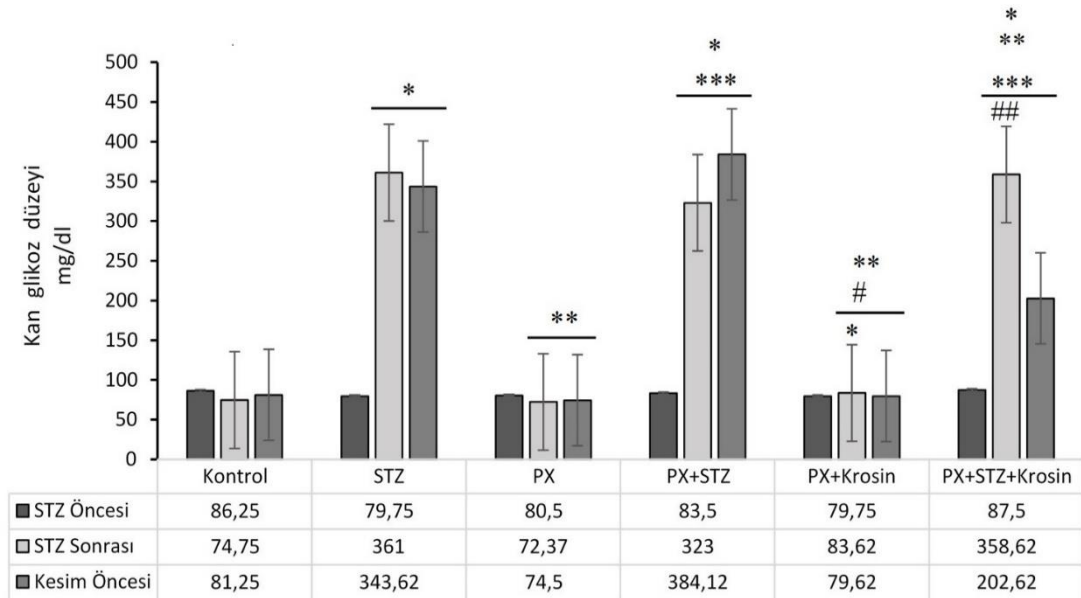
^bp< 0.05 vs grup 1

^cp< 0.001 vs grup 2

^dp< 0.001 vs grup 3

^ep< 0.001 vs grup 4

^fp< 0.001 vs grup 5



Şekil 7.9. Grupların kan glukoz değerleri. Veriler, aritmetik ortalama ± SE (n = 10) olarak ifade edilir. Üst simgeler istatistiksel olarak anlamlı farkı temsil eder: * p < 0.05, Kontrol ile karşılaştırıldığında; ** p<0.05, STZ ile karşılaştırıldığında; *** p < 0.05, PX ile karşılaştırıldığında; #p < 0.05, PX+STZ ile karşılaştırıldığında; ##p <0.05, PX+Krosin ile karşılaştırıldığında.

7.2. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

Kontrol grubu normal histolojik görünümdeydi (Şekil 7.12 a, b). STZ ile diyabet oluşturulan grupta renal hasar şiddetliydi. Tübül epitel hücrelerinde sitoplazmik vakuolizasyon, proksimal tubul epitelinde mikrovillus kaybı, tubuler deskuamasyon, peritübüler ve glomerüler alanda inflamatuvar hücre infiltrasyonu saptandı. Ayrıca glomerüllerde büzüşme ve PAS (+) materyal birikimi tespit edildi (Şekil 7.12 c-e). STZ grubunun ortalama histopatolojik hasar skoru 6.37 ± 0.18 idi. Kontrol ile STZ grubu karşılaştırıldığında hasar skorunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulundu ($p < 0.001$). PX grubu kontrol grubuna yakın görünümdeydi (Şekil 7.12 f). Pinealektomi uygulanmış (PX) ve STZ ile diyabet oluşturulmuş grupta hasarın şiddeti artmıştı ve hasar skoru 7.37 ± 0.26 idi (Şekil 7.12 g, h). PX+STZ+Krosin grubunda histopatolojik değişikliklerin belirgin olarak azaldığı tespit edildi (Şekil 7.12 i). Grupların ortalama histopatolojik hasar skoru ve TGF- β 1 immünoaktivitesi (H-SCORE) Şekil 7.10, Şekil 7.11, Şekil 7.12 ve Çizelge 7.5' de verilmiştir.

Çizelge 7.5. Ortalama histopatolojik hasar skoru ve TGF- β 1 immünoaktivitesi (H-SCORE).

Gruplar	Hasar Skoru	TGF- β 1 immünoaktivitesi (H-SCORE)
Grup 1: Kontrol	0.12 ± 0.12	202.33 ± 1.64
Grup 2: STZ	6.37 ± 0.18^a	275.16 ± 2.50^b
Grup 3: PX	$1.25 \pm 0.36^{b,c}$	$234.33 \pm 3.29^{b,d}$
Grup 4: PX+STZ	$7.37 \pm 0.26^{a,d,e}$	$371.67 \pm 1.85^{b,d,f}$
Grup 5: PX+Krosin	$1.00 \pm 0.26^{b,d,f,g}$	$218.67 \pm 3.23^{b,d,f,h}$
Grup 6: PX+STZ+Krosin	$4.00 \pm 0.37^{a,c,g,i}$	$233.17 \pm 0.40^{b,d,h,j}$

Aritmetik ortalama \pm SE (n=8).

^a $p < 0.001$ vs grup 1

^b $p < 0.05$ vs grup 1

^c $p < 0.001$ vs grup 2

^d $p < 0.05$ vs grup 2

^e $p < 0.001$ vs grup 3

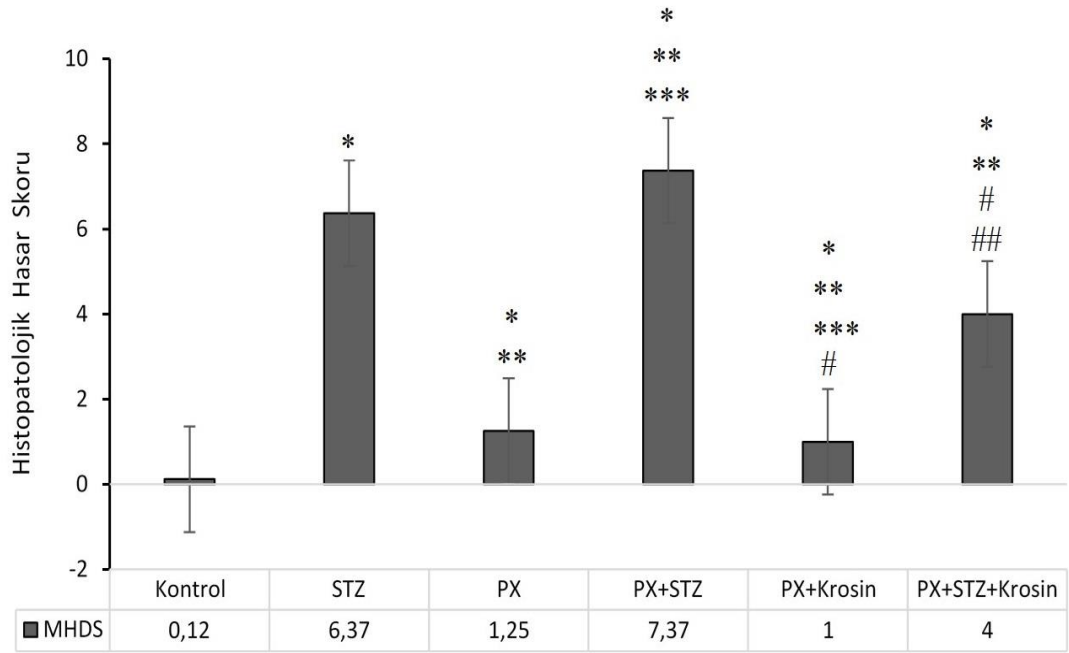
^f $p < 0.05$ vs grup 3

^g $p < 0.001$ vs grup 4

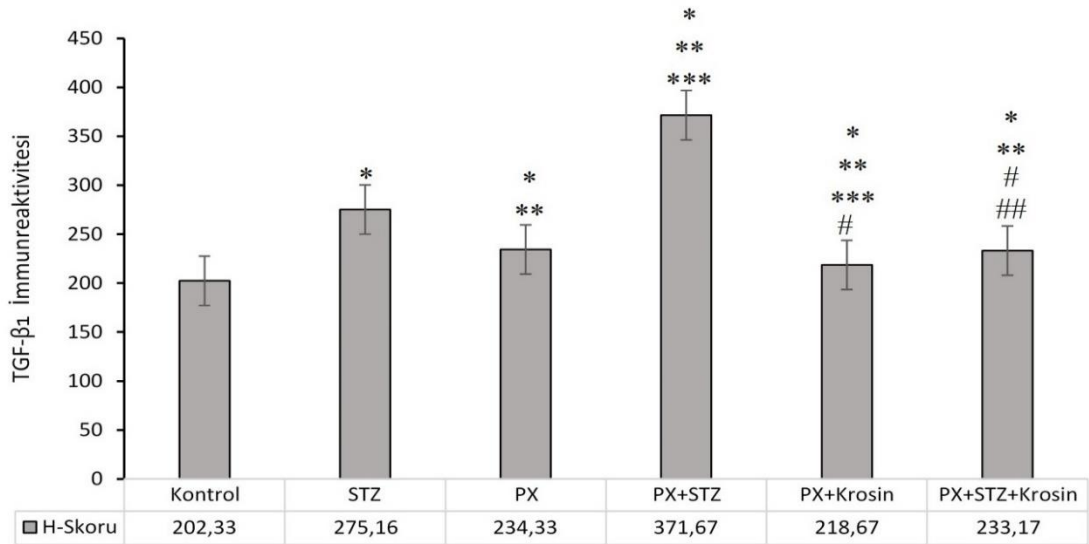
^h $p < 0.05$ vs grup 4

ⁱ $p < 0.001$ vs grup 5

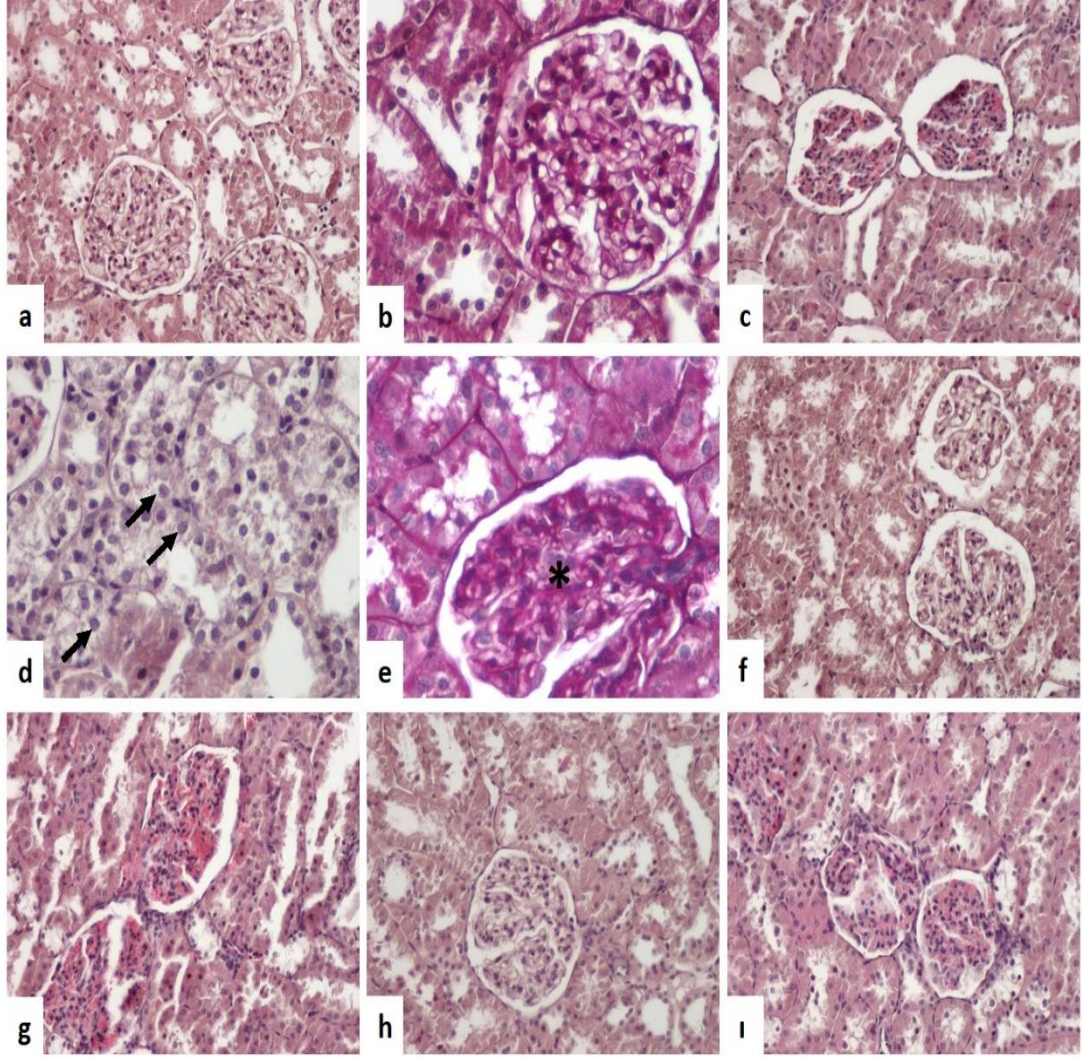
^j $p < 0.05$ vs grup 5



Şekil 7.10. Böbrek histopatolojisi hasar skoru. Veriler ifade edilir ortalama \pm SE (n = 10). Üst simgeler istatistiksel olarak anlamlı farkı temsil eder: * p < 0.05, Kontrol ile karşılaştırıldığında; ** p < 0.05, STZ ile karşılaştırıldığında; *** p < 0.05, PX ile karşılaştırıldığında; #p < 0.05, PX+STZ ile karşılaştırıldığında; ##p < 0.05, PX+Krosin ile karşılaştırıldığında.



Şekil 7.11. TGF- β 1 immünoreaktivitesi H-skoru. Veriler ifade edilir ortalama \pm SE (n = 10). Üst simgeler istatistiksel olarak anlamlı farkı temsil eder: * p < 0.05, Kontrol ile karşılaştırıldığında; ** p < 0.05, STZ ile karşılaştırıldığında; *** p < 0.05, PX ile karşılaştırıldığında; #p < 0.05, PX+STZ ile karşılaştırıldığında; ##p < 0.05, PX+Krosin ile karşılaştırıldığında.



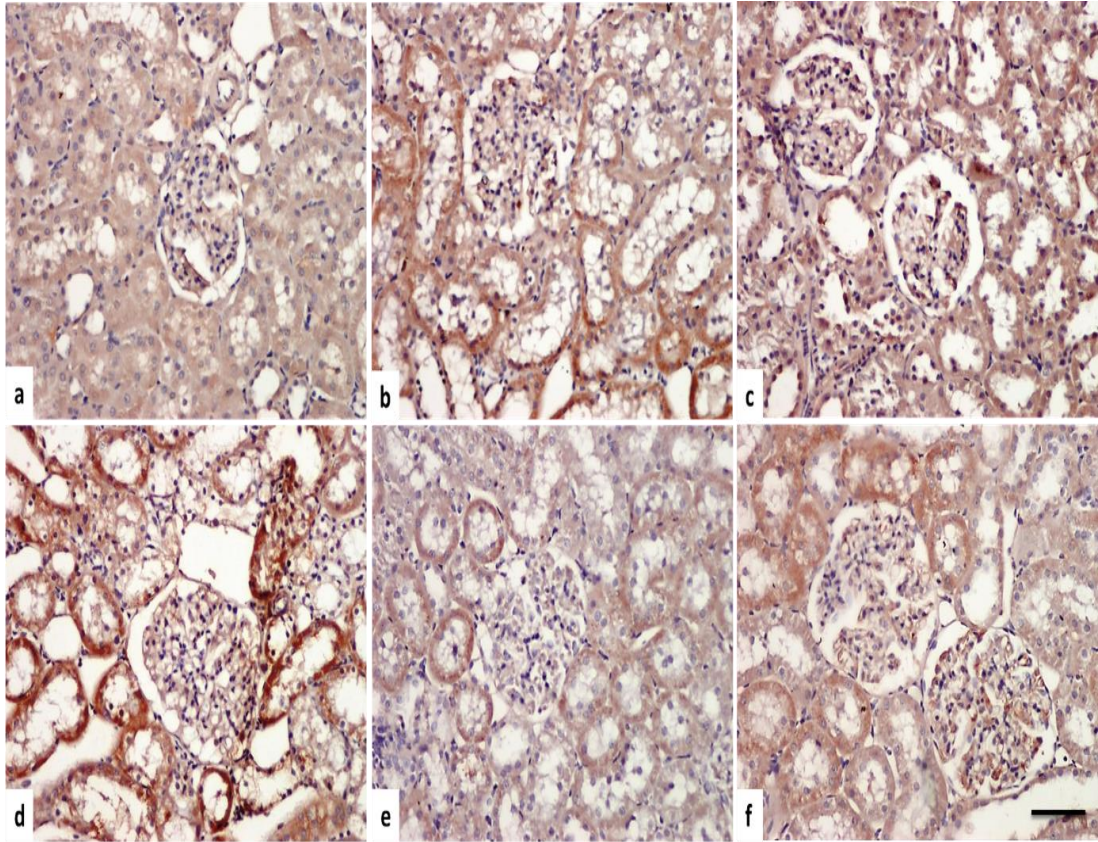
Şekil 7.12. Böbrek histopatolojisini gösteren fotomikrograf. a) Kontrol, H-E; X20. b) Kontrol, PAS; X40. c) STZ, H-E; X20. d) STZ, H-E; X40. e) STZ, PAS; X40. f) PX, H-E; X20 g) PX+STZ, H-E; X20. h) PX+Krosin, H-E; X20. i) PX+STZ+Krosin, H-E; X20.

Kontrol grubuna ait böbrek dokuları normal histolojik görünümdeydi. STZ uygulaması ile diyabet oluşturulan böbrek dokusunda; tubul epitel hücrelerinde sitoplazmik vakuolizasyon (Şekil 7.12-d, oklar), proksimal tubul epitelinde mikrovillus kaybı, tubuler deskuamasyon, peritubuler ve glomerüler alanda inflamatuvar hücre infiltrasyonu, glomerüllerde büzüşme (Şekil 7.12-e, asterisk) içeren hasarlı alanlar bulunmaktaydı. PX+STZ grubunda hasarın şiddeti artmıştı (Şekil 7.12-i). Pinealektomi ve STZ kaynaklı renal hasarda krosinin etkisiyle histopatolojik değişiklikler belirgin olarak azalmıştı.

7.3. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

7.3.1 TGF- β 1 İmmünoreaktivitesi

Böbrek dokularındaki immünohistokimyasal TGF- β 1 ifadesi ağırlıklı olarak proksimal tübüller olmak üzere distal tübüller ve glomerulus mezengiumunda gözlemlendi. Deney grupları arasındaki TGF- β 1 immünoreaktivitelerinin karşılaştırılması, gruplara ait H-SCORE değerleri üzerinden gerçekleştirildi. En düşük H-SCORE kontrol grubuna aitti. En yüksek immünohistokimyasal TGF- β 1 ifadesi PX+STZ grubunda saptandı. PX+STZ+Krosin grubunda ise ifadenin orta şiddette olduğu görüldü. Gruplar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı sonuç tespit edildi ($p < 0.05$) (Şekil 7.13) Grupların ortalama TGF- β 1 (H-SCORE) immünreaktivite sonuçları Çizelge 7.5' de verilmiştir



Şekil 7.13. Böbrek dokusunda TGF- β 1 immünohistokimyasal boyaması. a) Kontrol grubu b) STZ grubu c) PX grubu d) PX+STZ grubu e) PX+Krosin grubu f) PX+STZ+Krosin grubu; X20.

Kontrol grubunda az yoğunlukta boyanma vardı. PX+STZ grubunda ise boyanma en belirgindi. PX+STZ+Krosin grubunda boyanma yoğunluğu krosinin etkisi ile azalmıştı.

7.4. TARTIŞMA

Diyabetes mellitus (DM), insülin direnci, yetersiz insülin sekresyonu veya aşırı glukagon sekresyonundan kaynaklanan hiperglisemi ile karakterize olan ve dünya çapında birçok insanı etkileyen bir hastalıktır. Diyabetes mellitusun kronik komplikasyonlarından biri olan mikrovasküler komplikasyonlar içinde en sık karşılaşılanı diyabetik nefropatidir. [69]. Diyabetik nefropatinin patogenezinde genetik faktörler, hemodinamik faktörler gibi etkilerin yanı sıra artmış oksidatif stresinde son derece önemli rol oynadığı bilinmektedir [240, 241]. Bu çalışmada deneysel diyabet oluşturulan ve pinealektomi ile vücudun en güçlü antioksidan özelliğine sahip olan melatonin hormonunun sentezini ortadan kaldırarak oksidan saldırılara açık hale getirilen ratların böbreklerinde bozulan oksidan-antioksidan durumu, böbrek histopatolojisi, immünohistokimyası ve hemodinamikleri üzerine antioksidan özelliği bilinen krosinin koruyucu ve tedavi edici etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Deneysel diyabet modelleri diyabete bağlı komplikasyonların tanı ve tedavisinin belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Pankreasın β hücrelerinde sitotoksik etki oluşturularak tahrip edilmesi yoluyla oluşturulan tip 1 deneysel diyabet modelinde kullanılan kimyasal ajanlardan bazıları alloksan ve streptozotosindir [242, 243]. Ratlarda streptozotosinle oluşturulan deneysel diyabet modelinde tek doz intraperitoneal olarak 45-70 mg/kg STZ uygulanmaktadır [244]. Çalışmamızda, *Streptomyces achromogenes* türünden elde edilen bir antibiyotik olan streptozotosini tek doz şeklinde intraperitoneal olarak 50 mg/kg olarak uyguladık. STZ' nin pankreasın β hücrelerinde yapmış olduğu hasar sonucu kalıcı hiperglisemi gelişmektedir [244]. Yaptığımız bu çalışmada, pinealektomi uygulanmış ve STZ ile diyabet oluşturulmuş ratlarda deneyin 30. gününden sonuna kadar belirgin bir hiperglisemi tablosu izlendi. Çalışmamızda, ratların açlık kan şekeri pinealektomi işleminden sonraki 30. günde tek doz STZ enjeksiyonundan önce ölçüldü ve STZ

enjeksiyonundan 3 gün sonra yapılan ölçümlerde açlık kan şekeri 270' in üzerinde olanları diyabetik olarak kabul ettik. Diyabetik pinealektomize ratlar, krosin ile tedavi edildi ve dekapitasyondan önce açlık kan şekerinin ölçülmesi, STZ grubuna kıyasla tedavi grubunda kan glukoz seviyelerinin önemli ölçüde azaldığını gösterdi. Su vd. [245]'nin yaptığı çalışma da diyabetik ratlara intragastrik kurkumin uygulamasını takiben 30. dakika, 60. dakika ve 120. dakikadaki açlık kan şekeri seviyesinin model grubuna kıyasla önemli ölçüde azaldığını bildiren sonuçları ile bizim çalışmamız uyumludur.

STZ pankreasın β hücrelerine glukoz taşıyıcı-2 (GLUT-2) aracılığıyla girer ve DNA alkilenmesine neden olur. Bu alkilenme, STZ'nin yapısında bulunan metil-etil grupları tarafından DNA iskeletindeki fosfatlara bağlanarak gerçekleştirilir. Ayrıca ATP' nin defosforilasyonuna, Krebs döngüsünün baskılanmasına, mitokondride oksijen tüketiminin azalmasına, nitrik oksit oluşumunun artmasına ve neticede DNA hasarı sonucu pankreasın β hücrelerinin nekroze olmasına yol açar. Böylece insülin salgısının kaybına neden olur [246-248]

STZ β hücrelerinde, diğer doku hücrelerine kıyasla SOD, CAT ve GPx gibi antioksidan enzimlerin aktivitesinin daha düşük olması sebebiyle H_2O_2 gibi serbest radikallerin oluşumunu uyarır. [249-251]. Yine DNA hasarı sonucu STZ, hücrede ADP-ribolizasyonu aktivasyonu meydana gelerek hücresel NAD ve ATP yıkımı meydana gelir. Artan ATP defosforilasyonu sonucu da O_2^- radikali oluşumuna yol açar [249]. Sonuç olarak, STZ pankreasın β hücrelerinde diyabetojenik etki göstererek serbest radikallerin üretimine neden olduğu bilinmektedir. Bizim çalışmamızda da pinealektomi sonrası melatonin hormonu yoksunluğuna ek olarak STZ uygulaması ile diyabetojenik hale gelen β hücreleri oksidan saldırılara daha da açık hale gelmiştir.

Melatoninin glukoz ve insülin homeostazisinin düzenlenmesi ile ilişkili olduğu ve pinealektomize ratlarda insülin direncinin ve glukoz intoleransının gözlemlendiği bildirilmiştir [252]. Ayrıca T2DM' de iyi bilinen bir model olan Goto Kakizaki ratlarda gece melatonin seviyeleri azalmış, tam tersine insülin seviyeleri normalden daha yüksek çıkmıştır. Artmış insülin sekresyonunun T2DM'nin ayırt edici özelliklerinden biridir [253]. Hayvan modelleriyle uyumlu olarak, T2DM'li hastaların

da melatonin düzeylerinin azaldığı ve insülin düzeylerinin arttığı bulunmuştur [254]. Ayrıca, melatonin düzeylerinin T1DM'de kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu bulunmuştur [255]. Antioksidan, hipolipemik, anti-inflamatuar ve anti-kanserojen etkiler gibi çeşitli etkileri olduğu bildirilen krosin de geleneksel ve halk hekimliğinde uzun süredir kullanılmaktadır [256]. Ayrıca krosinin antidiyabetik potansiyele sahip olduğu da gösterilmiştir [257]. Bu çalışmada, ilk kez, pinealektomize edilmiş ratlarda streptozotosin kaynaklı bir diyabet modeli oluşturularak krosin ile tedavinin diyabetik nefropati gelişimi üzerindeki etkisini gösterdik.

Lipid peroksidasyonu membran fosfolipitlerinin oksidatif değişim sürecidir. Serbest radikallerin oksijen varlığında hücre membranlarında yer alan doymamış yağ asitlerini okside ederek malondialdehit (MDA) oluşumuna sebep olurlar. Diabetes mellitus hastalarında da artmış serum MDA seviyeleri ile ilgili birçok çalışma mevcuttur [258-261]. Bizim çalışmamızda da Çizelge 7.1 incelendiğinde pinealektomi sonrası melatonin yoksunluğunda oksidatif saldırılara açık hale gelen böbrek dokusunda STZ uygulamasını takiben MDA düzeyleri incelendiğinde lipid peroksidasyon düzeylerinde yükselmeler olduğu gözlemlendi. Ek olarak, pinealektomi ve STZ enjeksiyonu sonrası krosin tedavisi uygulandığında ise MDA düzeylerinde ciddi düşüşler olduğu görüldü. Kapucu ve Altınöz vd.'nin yaptığı çalışmalarındaki MDA düzeylerindeki sonuçlar bizim çalışmamızı destekler nitelikte olup bizim çalışmamızdakiyle benzerlik göstermektedir [14, 228]. Serbest radikal oluşumunun neden olduğu STZ kaynaklı nefropatiye karşı antioksidan savunma sistemini güçlendirerek bu hasara karşı korumada antioksidan özelliği ile ön plana çıkan krosinin önemli rolü olduğu görülmektedir.

Normal fizyolojik koşullar altında, insan vücudu hafif derecedeki oksidatif stresi telafi edebilir ve bunu gerçekleştirirken CAT, GSH, SOD gibi antioksidan enzimleri aktive ederek oksidatif olarak hasar görmüş molekülleri ortadan kaldırabilir [262, 263]. GSH, karaciğer ve böbrekte bol miktarda bulunan glutamat, sistein ve glisinden oluşan tripeptit yapıda enzimatik olmayan güçlü antioksidanlardan biridir [264]. SOD, süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) anyon radikalini hidrojen peroksit (H_2O_2) katalize ederek temizleyen antioksidan bir enzimdir [265]. CAT, tüm hayvan dokularının peroksizomlarında veya

mikropeksizomlarında yaygın olarak bulunan hem içeren bir enzimdir. H_2O_2 'nin H_2O ve O_2 'ye ayrışmasını katalize eder [266].

Çalışmamızda Çizelge 7.1 de yer alan veriler incelendiğinde, STZ enjeksiyonu uygulanan ratların böbrek dokusunda kontrol grubuna göre SOD ve CAT aktivitelerinin yanı sıra GSH seviyelerinin de önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. Yine ratlarda pinealektomi (PX) işlemi uygulanmasını takiben kontrol grubuna göre SOD ve CAT aktiviteleri ile GSH düzeylerinde düşümlere sebep oldu. Pinealektomi sonrası STZ uygulaması sonucunda PX grubuna göre ciddi derecede bir düşüş gözlemlenmiştir. Pinealektomi uygulanmış ve STZ ile diyabet oluşturulmuş gruba krosin tedavisi uygulandığında ise PX+STZ grubuna göre SOD ve CAT ve GSH dahil olmak üzere antioksidan savunmayı iyileştirdiği görüldü.

Çalışmamız pinealektomi sonrası STZ ile oluşturulan diyabet modelinde antioksidan savunma sisteminin zayıflaması sonucu böbrek dokusunda oksidan-antioksidan dengesinin oksidan lehine bozulduğunu göstermiştir. Pinealektomi işlemi sonrası melatonin yoksunluğu da oksidatif stresin daha da artmasına neden olarak böbrek dokusundaki hasar sonucu nefropatiyi geliştirmiştir. Hwang vd. nin yaptığı çalışmada da, CAT eksikliğinin diyabette peroksizomal disfonksiyon yoluyla böbrek hasarını hızlandırdığını ortaya koymuşlardır [267].

Krosin, antioksidan, hipolipidemik, anti-inflamatuar, antikanserojenik ve antidiyabetik etkilere sahiptir [268]. Biz de tedavi gruplarına krosin tedavisi uyguladığımızda antioksidan seviyelerindeki artışla birlikte nefropatinin önemli ölçüde düştüğünü gözlemledik. Sonuç olarak pinealektomi sonrası STZ uygulaması oksidatif stresi artırırken krosin bu oksidatif stresi önemli derecede azaltarak böbrek dokusundaki hasarı en aza indirdi. Ayrıca DM kaynaklı metabolik değişikliklerin oksidatif stresi arttırdığı ve GSH düzeyi, SOD ve CAT aktiviteleri dahil olmak üzere doğal antioksidanları tükettiğine dair çalışmalar da mevcuttur [15, 269, 270]. Ayrıca Wu vd. oksidatif stres ve SOD, CAT ve GPx gibi renal korteks antioksidan enzimlerinin glukozile edildiğini, azalan aktivite ve içeriğe yol açacak şekilde oksidasyona uğradığını göstermiştir [271]. Elsherbiny vd., Dehghan vd. ve Manda

vd.'nin yaptığı çalışmalar da GSH düzeyi, SOD ve CAT aktiviteleri vb yönden çalışmamızı destekler nitelikte olup benzer bulgularla karşılaşmıştır [13, 268, 272].

Çalışmamız ile ilgili Çizelge 7.2 de yer alan veriler incelendiğinde, STZ enjeksiyonu uygulanan ratların böbrek dokusunda kontrol grubuna göre total antioksidan (TAS) seviyesinin azaldığı buna karşın total oksidan seviyesi (TOS) ve oksidatif stres indeksinin (OSI) arttığı görülmüştür. Yine ratlarda pinealektomi işlemi uygulanmasını takiben kontrol grubuna göre TAS'ın azaldığı buna karşın TOS ve OSI'nin arttığı gözlemlenmiştir. Pinealektomi uygulanmış ve STZ ile diyabet oluşturulmuş grupta PX grubuna göre TAS da ciddi derecede bir düşüş gözlemlenirken; TOS'da ve OSI'de belirgin bir artış görülmüştür. Pinealektomi uygulanmış ve STZ ile diyabet oluşturulmuş grupta krosin tedavisi yapıldığında ise PX+STZ grubuna göre TAS'da önemli düzeyde artma, TOS ve OSI'de ise önemli düzeyde azalma görülmektedir. Bu sonuçlar bize pinealektomi sonrası STZ uygulamasının diyabetik hastaların vücutlarındaki oksidatif stresi önemli derece de arttırdığını, krosin uygulaması ile artan bu oksidatif stresi önemli ölçüde azaltarak antioksidan enzim genlerini yukarı yönlü düzenleyerek nefropati sonucu gelişen komplikasyonları minimuma indirdiğini göstermektedir. Naghizadeh vd. 2008 ve 2010 yıllarında yaptıkları çalışmalar ile, Abou-Hany vd. 2018 yılında yaptığı da çalışma bizim çalışmamızın sonuçlarını desteklemektedir [15, 273, 274].

Böbrek dokusuna ait histopatolojik hasar skorları incelendiğinde ise pinealektomi uygulanmış ve STZ ile diyabet oluşturulmuş gruptaki böbrek hasarının kontrol ve STZ grubuna göre önemli derecede arttığı, krosinin ise pinealektomi uygulanmış ve STZ ile diyabet oluşturulmuş gruba verilmesiyle birlikte bu hasarı belirgin olarak azalttığı görülmüştür. Böylelikle krosinin nefropatiye karşı güçlü bir radikal süpürücü özellik göstererek koruyucu etkisini gördük.

Serum kreatinin, kan üre azotu (BUN) ve idrar albümini böbrek fonksiyonunun önemli göstergeleridir [275]. Diyabetik nefropatili hastalarda bozulmuş glomerüler filtrasyon membran bariyer fonksiyonu sıklıkla idrarda albümin atılımının artmasına, serum kreatinin ve BUN artışına yol açar [276]. Bu nedenle diyabetik hastalarda bu seviyelerin önemli ölçüde artması böbrek fonksiyon bozukluğunu gösterir.

Çalışmamızda pinealektomi uygulanmış ve STZ ile diyabet oluşturulmuş ratların serum böbrek fonksiyonları BUN ve kreatinin ölçümleri ile değerlendirildi. Çizelge 7.3 de yer alan veriler incelendiğinde, STZ enjeksiyonu uygulanan ratların serum böbrek fonksiyon değerlerinden kreatinin ve BUN değerlerinin kontrol grubuna göre ciddi bir artış gösterdiği görülmüştür. Pinealektomi uygulanmış ve STZ ile diyabet oluşturulmuş grupta pinealektomi grubuna göre kreatinin ve BUN değerlerinin yüksek olduğu görülmüştür. Pinealektomi uygulanmış ve STZ ile diyabet oluşturulmuş grupta krosin tedavisi uygulandığında ise PX+STZ grubuna göre ciddi iyileşmeler görülmektedir. Sonuçlarımızı incelediğimizde, pinealektomi uygulanmış ve STZ ile diyabet oluşturulmuş ratlara krosin uygulanması sonucunda, STZ'nin incelenen parametreler üzerindeki etkilerini önemli ölçüde tersine çevirdiğini gözlemledik Zhang vd. yaptığı çalışmanın sonuçları da bizim sonuçlarımızı desteklemektedir [277]. Ayrıca krosinin güçlü antioksidan özelliğinden dolayı oksidatif stresi azaltarak böbrek fonksiyonu üzerine koruyucu etkilerini gösteren birçok çalışma da mevcuttur [278-280].

TGF- β 1, tübüler epitelyal-mezenkimal geçişi (EMT) uyarabilen ve daha sonra renal interstisyel fibroz oluşumunu destekleyen olası bir fibrojenik sitokin olarak iyi bilinmektedir [281]. Önceki çalışmalar, TGF- β 1'in deney hayvanları ve insanlarda DN oluşumu ve ilerlemesi ile ilişkili olduğunu bildirmiştir [282, 283]. Ayrıca, önceki çalışmalar, TGF- β 1'in diyabette glomerüloskleroz, interstisyel fibroz ve glomerüler filtrasyon hızındaki azalmanın yanı sıra artmış idrar albümin, su, elektrolit ve glukoz atılımına aracılık etmede patofizyolojik bir rolü olduğunu kanıtlamıştır [284, 285].

Çok sayıda fibrojenik faktör böbrek fonksiyonunu etkilese de TGF- β 1, Smad yolu, mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) ve fosfatidilinositol 3 kinaz/AKT (PI3K/AKT) gibi çoklu sinyal yolları aracılığıyla EMT ve tübüler interstisyel fibrozda ana aracıdır [92, 93]. TGF- β 1, reseptörüne bağlandıktan sonra Smads proteinleri yoluyla hücrelere sinyaller iletebilir, glomerüler ve tübüler hücrelerin hipertrofisini indükler, ekstra selüler matriks birikimini teşvik eder ve EMT oluşumuna ve interstisyel fibrozise neden olur [94]. Öte yandan, TGF- β 1'in tübüler hasara neden olarak proteinüri ve glomerüler skleroza katkıda bulunduğu dair kanıtlar vardır [95]. İlginç bir şekilde, literatürle uyumlu olarak, tübüller çevresinde en yüksek TGF- β 1

immüno-boyama PX+STZ grubunda saptanırken, krosin, TGF- β 1'in immüno-lekeleme artışını başarılı bir şekilde azalttığı görülmüştür. TGF- β 1 immün boyama ile ilgili gözlemimiz, diyabetik ratlarda renal hidroksiprolin ve kollajen içeriğinin azalmasıyla renal fibrozun ilerlemesinin krosin tarafından azaldığını bildiren Abou-Hany vd yaptığı çalışma ile uyumludur [15]. Ayrıca, Algandaby vd. yaptığı çalışmada, TGF β 1 ve kollajen-1 gen ekspresyonunu düzenleyerek karaciğer fibrozuna karşı krosinin antifibrotik aktivitesini gösterdiğini bildirmişlerdir [286].

Sonuç olarak, krosin diyabetik ratlarda gece melatonin salınımı olmadan DN ilerlemesini önlemek için değerli bir etkiye sahiptir. Krosin, anti-hiperglisemik özelliği ile kan şekerini düşürmüştür. Ayrıca, krosin, böbreğin intrinsik antioksidan durumunu, ROS oluşumunu ve TGF- β 1 ekspresyonunu modüle ederek renal oksidatif stresi ve inflamatuvar yolları bastırmıştır. Ayrıca böbrek yapısını, böbrek fibrozunun ilerlemesine karşı korumuştur.

Tüm çalışma verileri dikkate alındığında bu çalışmanın sonucu olarak daha ileri çalışmalarla krosinin terapötik etkisinin DM hastalarında görülen nefropatinin olumsuz etkilerini en aza indirebileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Rangel, E. B., Rodrigues, C. O., and De Sa, J. R., “Micro-and macrovascular complications in diabetes mellitus: preclinical and clinical studies”, *Journal of Diabetes Research*, 1-5 (2019).
2. Abdul-Hamid, M., and Moustafa, N., “Protective effect of curcumin on histopathology and ultrastructure of pancreas in the alloxan treated rats for induction of diabetes”, *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 66 (4): 169-179 (2013).
3. Valencia, W. M., and Florez, H. “How to prevent the microvascular complications of type 2 diabetes beyond glucose control”, *The British Medical Journal*, 356 (2017).
4. Luk, A. O., Hui, E. M., Sin, M. C., Yeung, C. Y., Chow, W. S., Ho, A. Y., and Lau, I. T., “Declining trends of cardiovascular-renal complications and mortality in type 2 diabetes: the Hong Kong Diabetes Database”, *Diabetes Care*, 40 (7): 928-935 (2017).
5. Bikbov, B., Purcell, C. A., Levey, A. S., Smith, M., Abdoli, A., Abebe, M., and Owolabi, M. O. “Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017”, *The Lancet*, 395 (10225): 709-733 (2020).
6. Fineberg, D., Jandeleit-Dahm, K. A., and Cooper, M. E., “Diabetic nephropathy: diagnosis and treatment”. *Nature Reviews Endocrinology*, 9 (12): 713-723 (2013).
7. Forbes, J. M., & Cooper, M. E., “Mechanisms of diabetic complications”, *Physiological Reviews*, 93 (1): 137-188 (2013).
8. Furukawa, M., Gohda, T., Tanimoto, M., and Tomino, Y., “Pathogenesis and novel treatment from the mouse model of type 2 diabetic nephropathy”, *The Scientific World Journal*, (2013).
9. Luchsinger, J. A., and Gustafson, D. R., “Adiposity, type 2 diabetes, and Alzheimer's disease”, *Journal of Alzheimer's Disease*, 16 (4):693-704 (2009).
10. Elmas, O., Erbas, O., and Yigitturk, G., “The efficacy of Aesculus hippocastanum seeds on diabetic nephropathy in a streptozotocin-induced diabetic rat model”, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 83: 392-396 (2016).

11. Forbes, J. M., Coughlan, M. T., and Cooper, M. E., "Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in Diabetes", *Diabetes*, 57 (6): 1446-1454 (2008).
12. Vallon, V., and Thomson, S. C., "Renal function in diabetic disease models: the tubular system in the pathophysiology of the diabetic kidney", *Annual Review of Physiology*, 74: 351-375 (2012).
13. Elsherbiny, N. M., Salama, M. F., Said, E., El-Sherbiny, M., and Al-Gayyar, M. M., "Crocic protects against doxorubicin-induced myocardial toxicity in rats through down-regulation of inflammatory and apoptic pathways", *Chemico-biological Interactions*, 247: 39-48 (2016).
14. Kapucu, A., "Crocic ameliorates oxidative stress and suppresses renal damage in streptozotocin induced diabetic male rats" *Biotechnic & Histochemistry*, 96 (2):153-160 (2021).
15. Abou-Hany, H. O., Atef, H., Said, E., Elkashef, H. A., and Salem, H. A., "Crocic mediated amelioration of oxidative burden and inflammatory cascade suppresses diabetic nephropathy progression in diabetic rats", *Chemico-biological Interactions*, 284: 90-100 (2018).
16. Rahier, J., Goebbels, R. M., and Henquin, J. C., "Cellular composition of the human diabetic pancreas", *Diabetologia*, 24 (5): 366-371 (1983).
17. Ogilvie, R. F., "A quantitative estimation of the pancreatic islet tissue", *An International Journal of Medicine*, 6 (3): 287-300 (1937).
18. Slack, J. M., "Developmental biology of the pancreas", *Development*, 121 (6): 1569-1580 (1995).
19. Lane, M. A., "The cytological characters of the areas of Langerhans", *American Journal of Anatomy*, 7 (3): 409-422 (1907).
20. Bosco, D., Armanet, M., Morel, P., Niclauss, N., Sgroi, A., Muller, Y. D., and Berney, T., "Unique arrangement of α -and β -cells in human islets of Langerhans", *Diabetes*, 59:(5), 1202-1210 (2010).
21. Cabrera, O., Berman, D. M., Kenyon, N. S., Ricordi, C., Berggren, P. O., and Caicedo, A., "The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function", *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 103 (7), 2334-2339. (2006).
22. Mering, J. V., and Minkowski, O., "Diabetes mellitus nach Pankreasexstirpation", *Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 26 (5), 371-387 (1890).
23. Blundell, T., Dodson, G., Hodgkin, D., and Mercola, D., "Insulin: The Structure in the Crystal and its Reflection in Chemistry and Biology", *Advances in Protein Chemistry*, 26, 279-402 (1972).

24. Baker, E. N., Blundell, T. L., Cutfield, J. F., Dodson, E. J., Dodson, G. G., Hodgkin, D. M. C., and Vijayan, N. M., "The structure of 2Zn pig insulin crystals at 1.5 Å resolution", *Philosophical Transactions of The Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 319 (1195): 369-456 (1988).
25. Rhodes, C. J., "Processing of the insulin molecule", *Diabetes Mellitus: A Fundamental and Clinical Text*, 27-50 (2000).
26. Uchizono, Y., Alarcón, C., Wicksteed, B. L., Marsh, B. J., and Rhodes, C. J. "The balance between proinsulin biosynthesis and insulin secretion: where can imbalance lead? ", *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 9: 56-66 (2007).
27. Marsh, B. J., Volkman, N., McIntosh, J. R., and Howell, K. E., "Direct continuities between cisternae at different levels of the Golgi complex in glucose-stimulated mouse islet beta cells" *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 101 (15): 5565-5570 (2004).
28. Steiner, D. F., Rhodes, C. J., Philipson, L. H., Bell, G. I., and Chan, S. J., "Biosynthesis, processing, and secretion of the islet hormones: insulin, islet amyloid polypeptide (Amylin), glucagon, somatostatin, and pancreatic polypeptide", *Endocrinology*, 603-623 (2010).
29. Winkelman, C., "Medical-surgical nursing: Patient-centered collaborative care", *Evolve*, 100-140 (2016).
30. Alberti, K. G. M. M., and Zimmet, P. Z. "Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation", *Diabetic Medicine*, 15 (7): 539-553 (1998).
31. Federation, I. D., "IDF diabetes atlas ninth", *International Diabetes Federation*, Dunia, 50-60 (2019).
32. DeFronzo, R. A., Ferrannini, E., Zimmet, P. and Alberti, G., "International textbook of diabetes mellitus", *Wiley*, USA, 255-260, 300-315 (2015).
33. Zimmet, P., Alberti, K. G. M. M., and Shaw, J., "Global and societal implications of the diabetes epidemic", *Nature*, 414 (6865): 782-787 (2001).
34. World Health Organization. "WHO global report on traditional and complementary medicine" *Luxemburg*, 44-80 (2019).
35. WHO Expert Committee on Nutrition and World Health Organization, "Nutrition and infection: report of a WHO expert committee", *WHO Report*, Geneva, 5-35 (1965).

36. World Health Organization, "Diabetes Mellitus: Report of a WHO Study Group" *WHO Report*, Geneva, 5-15 (1985).
37. Weco, M., "WHO expert committee on diabetes mellitus: second report", *WHO Report*, Geneva, 646: 1-80 (1980).
38. World Health Organization. "WHO global report on traditional and complementary medicine" 2019.
39. Search Study Group, "Search for Diabetes in Youth: a multicenter study of the prevalence, incidence and classification of diabetes mellitus in youth", *Controlled ClinicalTrials*, 25 (5): 458-471 (2004).
40. Gepts, W., "Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus", *Diabetes*, 14 (10): 619-633 (1965).
41. Eisenbarth, G. S., "Type I diabetes mellitus", *New England Journal of Medicine*, 14 (21): 1360-1368 (1986).
42. You, W. P., and Henneberg, M., "Type 1 diabetes prevalence increasing globally and regionally: the role of natural selection and life expectancy at birth", *BMJ Open Diabetes Research and Care*, 4 (1): 161 (2016).
43. Palisaitis, E., "Basal Rate and Carbohydrate Ratio Learning Algorithm for Closed-Loop Insulin Delivery Systems (Artificial Pancreas): A Randomized Controlled Clinical Trial". *McGill Hill*, Canada, 155-170 (2019).
44. Maahs, D. M., West, N. A., Lawrence, J. M., and Mayer-Davis, E. J., "Epidemiology of type 1 diabetes", *Endocrinology and Metabolism Clinics*, 39 (3): 481-497 (2010).
45. Evans, J. M., Newton, R. W., Ruta, D. A., MacDonald, T. M., and Morris, A. D., "Socio-economic status, obesity and prevalence of Type 1 and Type 2 diabetes mellitus", *Diabetic Medicine*, 17 (6): 478-480 (2000).
46. Bruno, G., Runzo, C., Cavallo-Perin, P., Merletti, F., Rivetti, M., Pinach, S., and Pagano, G., "Incidence of type 1 and type 2 diabetes in adults aged 30–49 years: the population-based registry in the province of Turin, Italy", *Diabetes Care*, 28 (11): 2613-2619 (2005).
47. Holman, N., Young, B., and Gadsby, R., "Current prevalence of Type 1 and Type 2 diabetes in adults and children in the UK", *Diabetic Medicine: A Journal of The British Diabetic Association*, 32 (9):1119-1120 (2015).
48. Olgun, N., Aslan, F. E., Coşansu, G., ve Çelik, S. "Diyabetes Mellitus. İçinde: Dahili ve Cerrahi Hastalıklarda Bakım", *Nobel Kitabevi*, Adana, 829-864 (2010).

49. Ulusal Diyabet Konsensus Grubu,” Diyabet Tanı ve Tedavi Rehberi, 2019 9. baskı” *Armoni Nüans Baskı*, Türkiye, 27-52 (2019).
50. Howells, L., Musaddaq, B., McKay, A. J., and Majeed, A., “Clinical impact of lifestyle interventions for the prevention of diabetes: an overview of systematic reviews”. *The British Medical Journal* ,6 (12): 13806 (2016).
51. Hod, M., Kapur, A., Sacks, D. A., Hadar, E., Agarwal, M., Di Renzo, G. C., and Divakar, H., “The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) Initiative on gestational diabetes mellitus: A pragmatic guide for diagnosis, management, and care”, *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 131: 173-211 (2015).
52. Colagiuri, S., Falavigna, M., Agarwal, M. M., Boulvain, M., Coetzee, E., Hod, M., and Yang, H. X., “Strategies for implementing the WHO diagnostic criteria and classification of hyperglycaemia first detected in pregnancy. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 103 (3), 364-372 (2014).
53. Immanuel, J., & Simmons, D., “Screening and treatment for early-onset gestational diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis”. *Current Diabetes Reports*, 17 (11): 1-11 (2017).
54. Guariguata, L., Linnenkamp, U., Beagley, J., Whiting, D. R., and Cho, N. H., “Global estimates of the prevalence of hyperglycaemia in pregnancy”, *Diabetes Research and Clinical Practice*, 103 (2), 176-185 (2014).
55. López Stewart, G., “Diagnostic criteria and classification of hyperglycaemia first detected in pregnancy: a World Health Organization Guideline”, *Diabetes Research and Clinical Practice*, 103: 341-363 (2014).
56. Fetita, L. S., Sobngwi, E., Serradas, P., Calvo, F., and Gautier, J. F., “Consequences of fetal exposure to maternal diabetes in offspring”, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91 (10): 3718-3724 (2006).
57. Bellamy, L., Casas, J. P., Hingorani, A. D., and Williams, D., “Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis”, *The Lancet*, 373 (9677): 1773-1779 (2009).
58. Anna, V., Van Der Ploeg, H. P., Cheung, N. W., Huxley, R. R., and Bauman, A. E. “Sociodemographic correlates of the increasing trend in prevalence of gestational diabetes mellitus in a large population of women between 1995 and 2005”, *Diabetes Care*, 31 (12): 2288-2293 (2008).
59. Federation, I. D.,” IDF diabetes atlas 8th edition” *International Diabetes Federation*, Dunia, 905-911 (2017).
60. Immanuel, J., & Simmons, D., “Screening and treatment for early-onset gestational diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis”. *Current Diabetes Reports*, 17 (11): 1-11 (2017).

61. Busolo, D., and Woodgate, R., "Palliative care experiences of adult cancer patients from ethnocultural groups: a qualitative systematic review protocol", *JBI Evidence Synthesis*, 13 (1): 99-111 (2015).
62. American Diabetes Association, "Diagnosis and classification of diabetes mellitus", *Diabetes care*, 7 (Supplement 1): 81-90 (2014).
63. Kurt, E. İ., "Glikozile hemoglobin (HbA1c) ölçümü ve diabetes mellitusun uzun dönem glisemik kontrolünde kullanılması" *Gülhane Tıp Dergisi*, 387-395 (2003).
64. Peterson, K. P., Pavlovich, J. G., Goldstein, D., Little, R., England, J., and Peterson, C. M., "What is hemoglobin A1c? An analysis of glycosylated hemoglobins by electrospray ionization mass spectrometry" *Clinical Chemistry*, 44 (9): 1951-1958 (1998).
65. Sacks, D. B., "HbA1C versus glucose testing: a comparison" *Diabetes Care*, 34 (2): 518-523 (2011).
66. World Health Organization, "Use of glycosylated haemoglobin (HbA1c) in diagnosis of diabetes mellitus: abbreviated report of a WHO consultation", *WHO Report*, Switzerland ,4-25 (2011).
67. Collins, A. J., Foley, R. N., Gilbertson, D. T., and Chen, S. C., "United States Renal Data System public health surveillance of chronic kidney disease and end-stage renal disease", *Kidney International Supplements*, 5 (1): 2-7 (2015).
68. Moxey, P., Gogalniceanu, P., Hinchliffe, R. J., Loftus, I. M., Jones, K. J., Thompson, M. M., and Holt, P. J., "Lower extremity amputations a review of global variability in incidence", *Diabetic Medicine*, 28 (10): 1144-1153 (2011).
69. Olgun, N., Özkan, S., Satman, İ., Yetkin, İ., Çalışkan, D., Özcan, Ş., ve Özer, E., "Erişkin Diyabetli Bireyler İçin Eğitim Rehberi", *Koza basım yayın, Ltd. Şti.*, Ankara, 95-110 (2014).
70. Cavan, D., Makaroff, L. E., da Rocha Fernandes, J., Karuranga, S., Sylvanowicz, M., Conlon, J., and Barratt, J., "Global perspectives on the provision of diabetic retinopathy screening and treatment: survey of health care professionals in 41 countries", *Diabetes Research and Clinical Practice*, 143: 170-178 (2018).
71. Cavan, D., Makaroff, L., da Rocha Fernandes, J., Sylvanowicz, M., Ackland, P., Conlon, J., and Barratt, J., "The diabetic retinopathy barometer study: global perspectives on access to and experiences of diabetic retinopathy screening and treatment", *Diabetes Research and Clinical Practice*, 129: 16-24 (2017).

72. Lima, V. C., Cavalieri, G. C., Lima, M. C., Nazario, N. O., and Lima, G. C., “Risk factors for diabetic retinopathy: a case–control study”, *International Journal of Retina and Vitreous*, 2 (1): 1-7 (2016).
73. Aring, A. M., Jones, D. E., and Falko, J. M., “Evaluation and prevention of diabetic neuropathy”, *American Family Physician*, 71 (11): 2123-2128 (2005).
74. Tesfaye, S., Boulton, A. J., and Dickenson, A. H., “Mechanisms and management of diabetic painful distal symmetrical polyneuropathy”, *Diabetes care*, 36 (9): 2456-2465 (2013).
75. Hovind, P., Rossing, P., Tarnow, L., Smidt, U. M., and Parving, H. H., “Progression of diabetic nephropathy”, *Kidney International*, 59 (2): 702-709 (2001).
76. Sagoo, M. K., and Gnudi, L. “Diabetic nephropathy: Is there a role for oxidative stress?”, *Free Radical Biology and Medicine*, 116: 50-63 (2018).
77. Gnudi, L., Gentile, G., and Ruggenenti, P., “The patient with diabetes mellitus”, *Oxford Textbook of Clinical Nephrology*, 2: 1199-247 (2016).
78. Caramori, M. L., Parks, A., & Mauer, M., “Renal lesions predict progression of diabetic nephropathy in type 1 diabetes” *Journal of The American Society of Nephrology*, 24 (7): 1175-1181 (2013).
79. Fioretto, P., and Mauer, M., “Histopathology of diabetic nephropathy”, *Saunders*, 27 (2): 195-207 (2007).
80. Tyagi, I., Agrawal, U., Amitabh, V., Jain, A. K., and Saxena, S., “Thickness of glomerular and tubular basement membranes in preclinical and clinical stages of diabetic nephropathy”, *Indian Journal of Nephrology*, 18 (2): 64 (2008).
81. Drummond, K., and Mauer, M., “The early natural history of nephropathy in type 1 diabetes: II. Early renal structural changes in type 1 diabetes”. *Diabetes*, 51 (5): 1580-1587 (2002).
82. Kowluru, R. A., and Chan, P. S., “Oxidative stress and diabetic retinopathy” *Experimental Diabetes Research*, 16 (3): 155–159 (2007).
83. Alicic, R. Z., Rooney, M. T., and Tuttle, K. R. “Diabetic kidney disease: challenges, progress, and possibilities”, *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 12 (12): 2032-204 (2017).
84. Gnudi, L., Thomas, S. M., and Viberti, G., “Mechanical forces in diabetic kidney disease: a trigger for impaired glucose metabolism”, *Journal of The American Society of Nephrology*, 18 (8): 2226-2232 (2007).

85. Inoguchi, T., Li, P., Umeda, F., Yu, H. Y., Kakimoto, M., Imamura, M., and Nawata, H., "High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells", *Diabetes*, 49 (11): 1939-1945 (2000).
86. De Vriese, A. S., Stoenoiu, M. S., Elger, M., Devuyst, O., Vanholder, R., Kriz, W., and Lameire, N. H., "Diabetes-induced microvascular dysfunction in the hydronephrotic kidney: role of nitric oxide", *Kidney International*, 60 (1): 202-210 (2001).
87. Kagami, S., "Involvement of glomerular renin-angiotensin system (RAS) activation in the development and progression of glomerular injury" *Clinical and Experimental Nephrology*, 16 (2): 214-220 (2012).
88. Raij, L., "The pathophysiologic basis for blocking the renin-angiotensin system in hypertensive patients with renal disease", *American Journal of Hypertension*, 18 (S3): 95-99 (2005).
89. Sharma, K., Cook, A., Smith, M., Valancius, C., and Inscho, E. W., "TGF- β impairs renal autoregulation via generation of ROS", *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 288 (5): 1069-1077 (2005).
90. Mogensen, C. E., "Microalbuminuria, blood pressure and diabetic renal disease: origin and development of ideas", *The Kidney and Hypertension in Diabetes Mellitus*, 655-706 (2000).
91. Maddox, D. A., "Glomerular ultrafiltration" *The Kidney*., 57 (1): 17-25 (1993)
92. Santibañez, J. F., Quintanilla, M., and Bernabeu, C., "TGF- β /TGF- β receptor system and its role in physiological and pathological conditions", *Clinical science*, 121 (6): 233-251 (2011).
93. Andrés, I. E., and Toborek, M., "HIV-1 stimulates nuclear entry of amyloid beta via dynamin dependent EEA1 and TGF- β /Smad signaling", *Experimental cell research*, 323 (1): 66-76 (2014).
94. Zhao, T. T., Zhang, H. J., Lu, X. G., Huang, X. R., Zhang, W. K., Wang, H., and Li, P., "Chaihuang-Yishen granule inhibits diabetic kidney disease in rats through blocking TGF- β /Smad3 signaling", *Plos One*, 9 (3): 90807 (2014).
95. Chen, H. Y., Huang, X. R., Wang, W., Li, J. H., Heuchel, R. L., Chung, A. C., and Lan, H. Y., "The protective role of Smad7 in diabetic kidney disease: mechanism and therapeutic potential", *Diabetes*, 60 (2): 590-601 (2011).
96. Tan, D. X., Manchester, L. C., and Reiter, R. J., "CSF generation by pineal gland results in a robust melatonin circadian rhythm in the third ventricle as an unique light/dark signal", *Medical Hypotheses*, 86: 3-9 (2016).

97. Palm, L., Blennow, G., and Wetterberg, L., "Correction of non-24-hour sleep/wake cycle by melatonin in a blind retarded boy", *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 29 (3): 336-339 (1991).
98. Kehr, P., Anne M. G., Brian R. M., Lawrence M. R., Markus V. and Karl W. "Atlas of Anatomy", *Thieme Verlag*, France, 250 (2010).
99. Coste, O., Beaumont, M., Batéjat, D., Van Beers, P., and Touitou, Y., "Prolonged mild hypoxia modifies human circadian core body temperature and may be associated with sleep disturbances" *Chronobiology International*, 21 (3): 419-433 (2004).
100. Tessonneaud, A., Locatelli, A., Caldani, M., and Viguier-Martinez, M. C., "Bilateral lesions of the suprachiasmatic nuclei alter the nocturnal melatonin secretion in sheep", *Journal of Neuroendocrinology*, 7 (2): 145-152 (1995).
101. Scott, C. J., Jansen, H. T., Kao, C. C., Kuehl, D. E., and Jackson, G. L., "Disruption of reproductive rhythms and patterns of melatonin and prolactin secretion following bilateral lesions of the suprachiasmatic nuclei in the ewe", *Journal of Neuroendocrinology*, 7 (6): 429-443 (1995).
102. Bittman, E. L., Crandell, R. G., and Lehman, M. N., "Influences of the paraventricular and suprachiasmatic nuclei and olfactory bulbs on melatonin responses in the golden hamster" *Biology of Reproduction*, 40 (1): 118-126 (1989).
103. Tan, D. X., Xu, B., Zhou, X., and Reiter, R. J., "Pineal calcification, melatonin production, aging, associated health consequences and rejuvenation of the pineal gland", *Molecules*, 23 (2): 301 (2018).
104. Reiter, R. J., Rudeen, P. K., Banks, A. F., and Rollag, M. D., "Acute effects of unilateral or bilateral superior cervical ganglionectomy on rat pineal N-acetyltransferase activity and melatonin content", *Experientia*, 35 (5): 691-692 (1979).
105. Saboureau, M., Vivien-Roels, B., and Pevet, P., "Pineal melatonin concentrations during day and night in the adult hedgehog: effect of a light pulse at night and superior cervical ganglionectomy" *Journal of Pineal Research*, 11 (2), 92-98 (1991).
106. Pang, S. F., and Ralph, C. L., "Pineal and serum melatonin at midday and midnight following pinealectomy or castration in male rats", *Journal of Experimental Zoology*, 193 (3), 275-280 (1975).
107. Pelham, R. W. "A serum melatonin rhythm in chickens and its abolition by pinealectomy", *Endocrinology*, 96 (2): 543-546 (1975).

108. Reiter, R. J., "Melatonin suppression by static and extremely low frequency electromagnetic fields: relationship to the reported increased incidence of cancer", *Reviews on Environmental Health*, 10 (3-4): 171-186 (1994).
109. Szczepanik, M., "Melatonin and its influence on immune system" *Journal of Physiology and Pharmacology*, 58 (6): 115-124 (2007).
110. Lerner, A. B., Case, J. D., Takahashi, Y., Lee, T. H., and Mori, W., "Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocyteS1", *Journal of The American Chemical Society*, 80 (10): 2587-2587 (1958).
111. Bubenik, G. A., "Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance" *Digestive Diseases and Sciences*, 47 (10): 2336-2348 (2002).
112. Carrillo-Vico, A., Calvo, J. R., Abreu, P., Lardone, P. J., García-Mauriño, S., Reiter, R. J., and Guerrero, J. M., "Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance", *The FASEB Journal*, 18 (3): 537-539 (2004).
113. Champier, J., Claustrat, B., Besançon, R., Eymin, C., Killer, C., Jouvret, A., and Fèvre-Montange, M., "Evidence for tryptophan hydroxylase and hydroxy-indol-O-methyl-transferase mRNAs in human blood platelets", *Life Sciences*, 60 (24): 2191-2197 (1997).
114. Conti, A., Conconi, S., Hertens, E., Skwarlo-Sonta, K., Markowska, M., and Maestroni, G. J., "Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells", *Journal of Pineal Research*, 28 (4), 193-202 (2000).
115. Martin, M. T., Azpiroz, F., and Malagelada, J. R., "Melatonin and the gastrointestinal tract", *Therapie*, 53 (5), 453-458 (1998).
116. Slominski, A., Fischer, T. W., Zmijewski, M. A., Wortsman, J., Semak, I., Zbytek, B., and Tobin, D. J., "On the role of melatonin in skin physiology and pathology", *Endocrine*, 27 (2): 137-147 (2005).
117. Slominski, A., Wortsman, J., and Tobin, D. J., "The cutaneous serotonergic/melatonergic system: securing a place under the sun", *The FASEB Journal*, 19 (2), 176-194 (2005).
118. Pardridge, W. M., and Mietus, L. J., "Transport of albumin-bound melatonin through the blood-brain barrier", *Journal Neurochem*, 34 (6): 1761-3 (1980).
119. Kennaway, D. J., and Voultzios, A., "Circadian rhythm of free melatonin in human plasma", *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83 (3):1013-1015 (1998).

120. Reiter, R. J., "Normal patterns of melatonin levels in the pineal gland and body fluids of humans and experimental animals", *Journal of Neural Transmission. Supplementum*, 21: 35-54 (1986).
121. Hedlund, L., Lischko, M. M., Rollag, M. D., and Niswender, G. D., "Melatonin: daily cycle in plasma and cerebrospinal fluid of calves", *Science*, 195 (4279): 686-687 (1977).
122. Vakkuri, O., "Diurnal rhythm of melatonin in human saliva", *Acta Physiologica Scandinavica*, 124 (3): 409-412 (1985).
123. Brzezinski, A., Seibel, M. M., Lynch, H. J., Deng, M. H., and Wurtman, R. J., "Melatonin in human preovulatory follicular fluid, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 64 (4), 865-867 (1987).
124. Bornman, M. S., Oosthuizen, J. M. C., Barnard, H. C., Schulenburg, G. W., Boomker, D., and Reif, S., "Melatonin and sperm motility/melatonin und spermatozoenmotilität". *Andrologia*, 21(5): 483-485 (1989).
125. Kivelä, A., Kauppila, A., Leppäluoto, J., and Vakkuri, O., "Serum and amniotic fluid melatonin during human labor", *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 69 (5): 1065-1068 (1989).
126. Axelrod, J., and Weissbach, H., "Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin", *Science*, 131 (3409): 1312-1312 (1960).
127. Coon, S. L., Roseboom, P. H., Baler, R., Weller, J. L., Namboodiri, M. A. A., Koonin, E. V., and Klein, D. C., "Pineal serotonin N-acetyltransferase: expression cloning and molecular analysis", *Science*, 270 (5242): 1681-1683 (1995).
128. Redfield, B.G., "Biosynthesis of melatonin: enzymic conversion of serotonin to N-acetylserotonin", *Biochimica et Biophysica Acta*, 43: 352-353 (1960).
129. Hamilton, M. L., Van Remmen, H., Drake, J. A., Yang, H., Guo, Z. M., Kewitt, K., and Richardson, A., "Does oxidative damage to DNA increase with age?" *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98 (18): 10469-10474 (2001).
130. Harman, D., "Free-radical theory of aging: increasing the functional life span", *Annals of the New York Academy of Sciences*, 717 (1): 1-15 (1994).
131. Kawanishi, S., Hiraku, Y., and Oikawa, S., "Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging", *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 488 (1): 65-76 (2001).
132. Skulachev, V. P., "The programmed death phenomena, aging, and the Samurai law of biology", *Experimental Gerontology*, 36 (7): 995-1024 (2001).

133. Reiter, R., Tang, L., Garcia, J. J., and Muñoz-Hoyos, A., "Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology", *Life Sciences*, 60 (25): 2255-2271 (1997).
134. Livrea, M. A., Tesoriere, L., Tan, D. X., and Reiter, R. J., "Radical and Reactive Intermediate-Scavenging Properties of Melatonin in Pure Chemical Systems", *Handbook of Antioxidants*, 634-651 (2001).
135. Allegra, M., Reiter, R. J., Tan, D. X., Gentile, C., Tesoriere, L., and Livrea, M. A., "The chemistry of melatonin's interaction with reactive species", *Journal of pineal Research*, 34 (1): 1-10 (2003).
136. Tan, D. X., "Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger", *Journal of Pineal Research*, 1: 57-60 (1993).
137. Matuszak, Z., Reszka, K. J., and Chignell, C. F., "Reaction of melatonin and related indoles with hydroxyl radicals: EPR and spin trapping investigations", *Free Radical Biology and Medicine*, 23 (3): 367-372 (1997).
138. Sewerynek, E., Melchiorri, D., Ortiz, G. G., Poeggeler, B., and Reiter, R. J., "Melatonin reduces H₂O₂-induced lipid peroxidation in homogenates of different rat brain regions", *Journal of Pineal Research*, 19 (1): 51-56 (1995).
139. Reiter, R. J., Tan, D. X., Manchester, L. C., and Qi, W., "Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species", *Cell Biochemistry and Biophysics*, 34 (2): 237-256 (2001).
140. Karbownik, M., Garcia, J. J., Lewiński, A., and Reiter, R. J., "Carcinogen-induced, free radical-mediated reduction in microsomal membrane fluidity: reversal by indole-3-propionic acid.", *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 33 (1): 73-78 (2001).
141. Kotler, M., Rodríguez, C., Sáinz, R. M., Antolin, I., and Menéndez-Peláez, A., "Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex", *Journal of Pineal Research*, 24 (2): 83-89 (1998).
142. Pablos, M. I., Reiter, R. J., Ortiz, G. G., Guerrero, J. M., Agapito, M. T., Chuang, J. I., and Sewerynek, E., "Rhythms of glutathione peroxidase and glutathione reductase in brain of chick and their inhibition by light", *Neurochemistry international*, 32 (1): 69-75. (1998).
143. Konturek, S. J., Konturek, P. C., Brzozowska, I., Pawlik, M., Sliwowski, Z., Cześnikiewicz-Guzik, M., and Pawlik, W. W., "Localization and biological activities of melatonin", *Journal Physiol Pharmacol*, 58 (3): 381-405 (2007).
144. Lima, F. B., Machado, U. F., Bartol, I., Seraphim, P. M., Sumida, D. H., Moraes, S. M., and Cipolla-Neto, J., "Pinelectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats", *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, (1998).

145. Nogueira, T. C., Lellis-Santos, C., Jesus, D. S., Taneda, M., Rodrigues, S. C., Amaral, F. G., and Anhê, G. F., "Absence of melatonin induces night-time hepatic insulin resistance and increased gluconeogenesis due to stimulation of nocturnal unfolded protein response", *Endocrinology*, 152 (4): 1253-1263 (2011).
146. Storlien, L. H., Jenkins, A. B., Chisholm, D. J., Pascoe, W. S., Khouri, S., & Kraegen, E. W. "Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats: relationship to muscle triglyceride and ω -3 fatty acids in muscle phospholipid.", *Diabetes*, 40 (2): 280-289 (1991).
147. Sharma, S., Singh, H., Ahmad, N., Mishra, P., and Tiwari, A., "The role of melatonin in diabetes: therapeutic implications", *Archives of Endocrinology and Metabolism*, 59: 391-399 (2015).
148. Dantas-Ferreira, R. F., Raingard, H., Dumont, S., Schuster-Klein, C., Guardiola-Lemaitre, B., Pevet, P., and Challet, E., "Melatonin potentiates the effects of metformin on glucose metabolism and food intake in high-fat-fed rats", *Endocrinology, Diabetes & Metabolism*, 1 (4): 39 (2018).
149. Raygan, F., Ostadmohammadi, V., Bahmani, F., Reiter, R. J., and Asemi, Z. "Melatonin administration lowers biomarkers of oxidative stress and cardio-metabolic risk in type 2 diabetic patients with coronary heart disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial", *Clinical Nutrition*, 38 (1): 191-196 (2019).
150. Rao, V. S. N., Santos, F. A., Silva, R. M., and Teixeira, M. G., "Effects of nitric oxide synthase inhibitors and melatonin on the hyperglycemic response to streptozotocin in rats", *Vascular Pharmacology*, 38 (3): 127-130 (2002).
151. Bodeker, G., and Ong, C. K., "WHO global atlas of traditional, complementary and alternative medicine", *World Health Organization*, USA, 250-280 (2005).
152. Kothari, D., Thakur, R., and Kumar, R., "Saffron (*Crocus sativus* L.): gold of the spices—a comprehensive review", *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 1-17 (2021).
153. Srivastava, R., Ahmed, H., and Dixit, R. K., "Crocus sativus L.: a comprehensive review", *Pharmacognosy Reviews*, 4 (8): 200 (2010).
154. Leone, S., Recinella, L., Chiavaroli, A., Orlando, G., Ferrante, C., Leporini, L., and Menghini, L., "Phytotherapeutic use of the *Crocus sativus* L. (Saffron) and its potential applications: A brief overview" *Phytotherapy Research*, 32 (12): 2364-2375 (2018).
155. Khan, M. A., Naseer, S., Nagoo, S., & Nehvi, F. A., "Behaviour of saffron (*Crocus sativus* L.) corms for daughter corm production", *Journal of Phytology*, 3 (7) (2011).

156. Yasmin, S., & Nehvi, F. A., "Saffron as a valuable spice: A comprehensive review", *African Journal of Agricultural Research*, 8 (3): 234-242 (2013).
157. Serrano-Díaz, J., Sánchez, A. M., Martínez-Tomé, M., Winterhalter, P., and Alonso, G. L., "A contribution to nutritional studies on *Crocus sativus* flowers and their value as food", *Journal of Food Composition and Analysis*, 31 (1): 101-108 (2013).
158. Dastranj, M., and Sepaskhah, A. R., "Saffron response to irrigation regime, salinity and planting method", *Scientia Horticulturae*, 251: 215-224 (2019).
159. Gracia, L., Perez-Vidal, C., and Gracia-López, C., "Automated cutting system to obtain the stigmas of the saffron flower", *Biosystems Engineering*, 104 (1): 8-17 (2009).
160. Husaini, A. M., Wani, S. A., Sofi, P., Rather, A. G., Parray, G. A., Shikari, A. B., and Mir, J. I., "Bioinformatics for saffron (*Crocus sativus* L.) improvement" *Communications in Biometry & Crop Science*, 4 (1): 35-45 (2009).
161. Amin, B., and Hosseinzadeh, H., "Analgesic and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L.(saffron)", *Bioactive Nutraceuticals and Dietary Supplements in Neurological and Brain Disease*, 319-324 (2015).
162. Milajerdi, A., Jazayeri, S., Bitarafan, V., Hashemzadeh, N., Shirzadi, E., Derakhshan, Z., and Akhondzadeh, S., "The effect of saffron (*Crocus sativus* L.) hydro-alcoholic extract on liver and renal functions in type 2 diabetic patients: A double-blinded randomized and placebo control trial", *Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism*, 9: 6-11. (2017).
163. Parizad, S., Dizadji, A., Habibi, M. K., Winter, S., Kalantari, S., Movi, S., and Moratalla-Lopez, N., "The effects of geographical origin and virus infection on the saffron (*Crocus sativus* L.) quality", *Food Chemistry*, 295: 387-394 (2019).
164. Zhang, A., Shen, Y., Cen, M., Hong, X., Shao, Q., Chen, Y., and Zheng, B., "Polysaccharide and crocin contents, and antioxidant activity of saffron from different origins", *Industrial Crops and Products*, 133: 111-117 (2019).
165. Samarghandian, S., Borji, A., Farahmand, S. K., Afshari, R., and Davoodi, S., "Crocus sativus L.(saffron) stigma aqueous extract induces apoptosis in alveolar human lung cancer cells through caspase-dependent pathways activation", *BioMed Research International*, 2013 (2013).
166. Samarghandian, S., and Borji, A., "Anticarcinogenic effect of saffron (*Crocus sativus* L.) and its ingredients", *Pharmacognosy Research*, 6 (2): 99 (2014).
167. Wang, Y., Sun, J., Liu, C., and Fang, C., "Protective effects of crocetin pretreatment on myocardial injury in an ischemia/reperfusion rat model", *European Journal of Pharmacology*, 741: 290-296 (2014).

168. Bhandari, P. R., "Crocus sativus L.(saffron) for cancer chemoprevention: a mini review", *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 5 (2): 81-87 (2015).
169. Ohba, T., Ishisaka, M., Tsujii, S., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Kubo, K., and Hara, H., "Crocetin protects ultraviolet A-induced oxidative stress and cell death in skin in vitro and in vivo", *European Journal of Pharmacology*, 789: 244-253 (2016).
170. Alonso, G. L., Salinas, M. R., Garajo, J., and Sánchez-Fernández, M. A., "Composition of crocins and picrocrocin from Spanish saffron (*Crocus sativus* L.)", *Journal of Food Quality*, 24 (3): 219-233 (2001).
171. Kabiri, M., Rezaeost, H., and Ghassempour, A., "A comparative quality study of saffron constituents through HPLC and HPTLC methods followed by isolation of crocins and picrocrocin", *LWT-Food Science and Technology*, 84: 1-9 (2017).
172. Shahi, T., Assadpour, E., and Jafari, S. M., "Main chemical compounds and pharmacological activities of stigmas and tepals of 'red gold'; saffron", *Trends in Food Science & Technology*, 58: 69-78 (2016).
173. Pitsikas, N., "Constituents of saffron (*Crocus sativus* L.) as potential candidates for the treatment of anxiety disorders and schizophrenia", *Molecules*, 21 (3): 303 (2016).
174. Maggi, L., Carmona, M., Zalacain, A., Kanakis, C. D., Anastasaki, E., Tarantilis, P. A., and Alonso, G. L., "Changes in saffron volatile profile according to its storage time", *Food Research International*, 43 (5): 1329-1334 (2010).
175. Carmona, M., Zalacain, A., Sánchez, A. M., Novella, J. L., and Alonso, G. L., "Crocetin esters, picrocrocin and its related compounds present in *Crocus sativus* stigmas and *Gardenia jasminoides* fruits. Tentative identification of seven new compounds by LC-ESI-MS", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (3): 973-979 (2006).
176. Bolhasani, A., Bathaie, S. Z., Yavari, I., Moosavi-Movahedi, A. A., and Ghaffari, M., "Separation and purification of some components", *Asian Journal of Chemistry*, 17 (2): 725-729 (2005).
177. Singla, R. K., and Bhat, G. V., "Crocetin: an overview", *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1 (4): 281-286 (2011).
178. Jahanbakhsh, Z., Rasoulia, B., Jafari, M., Shekarforoush, S., Esmailidehaj, M., taghi Mohammadi, M., and Khoshbaten, A., "Protective effect of crocetin against reperfusion-induced cardiac arrhythmias in anaesthetized rats", *EXCLI Journal*, 11: 20 (2012).

179. Abdullaev, F. I. and Espinosa-Aguirre J. J., "Biomedical properties of saffron and its potential use in cancer therapy and chemoprevention trials", *Cancer Detection and Prevention*, 28 (6): 426-432 (2004).
180. Chiu, J., and Dawes, I. W., "Redox control of cell proliferation", *Trends In Cell Biology*, 22 (11):592-601. (2012).
181. Yaribeygi, H., Mohammadi, M. T., and Sahebkar, A., "Crocic acid potentiates antioxidant defense system and improves oxidative damage in liver tissue in diabetic rats" *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 98: 333-337 (2018).
182. Yang, Y. C., Hwang, J. H., Hong, S. J., and Hsu, H. K., "Enhancement of glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes by *Toona sinensis* leaf extract", *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 19 (7): 327-332. (2003).
183. Youn, J. Y., Park, H. Y., and Cho, K. H., "Anti-hyperglycemic activity of *Commelina communis* L.: inhibition of α -glucosidase", *Diabetes Research and Clinical Practice*, 66: 149-155 (2004).
184. Eddouks, M., Maghrani, M., Lemhadri, A., Ouahidi, M. L., and Jouad, H., "Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the south-east region of Morocco (Tafilalet)", *Journal of Ethnopharmacology*, 82 (2-3): 97-103 (2002).
185. Maghrani, M., Michel, J. B., and Eddouks, M., "Hypoglycaemic activity of *Retama raetam* in rats", *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 19 (2): 125-128 (2005).
186. Nassar, S. A., Hashim, A. M., Al-Shaer, N. H., El-Salam, A., and Sahar, M., "The Ameliorative Potential of Saffron Against the Histological and Immunohistochemical Changes in Kidney of Albino Mice Due to Streptozotocin-Induced Diabetes Mellitus", *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*, 77 (5): 5733-5741 (2019).
187. Elgazar, A. F., Rezaq, A. A., and Bukhari, H. M., "Anti-hyperglycemic effect of saffron extract in alloxan-induced diabetic rats", *European Journal of Biological Sciences*, 5 (1): 14-22 (2013).
188. Xi, L., Qian, Z., Xu, G., Zheng, S., Sun, S., Wen, N., and Zhang, Y., "Beneficial impact of crocetin, a carotenoid from saffron, on insulin sensitivity in fructose-fed rats", *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 18 (1): 64-72 (2007).
189. Rajaei, Z., Hadjzadeh, M. A. R., Nemati, H., Hosseini, M., Ahmadi, M., and Shafiee, S., "Antihyperglycemic and antioxidant activity of crocin in streptozotocin-induced diabetic rats", *Journal of Medicinal Food*, 16 (3): 206-210 (2013).

190. Shirali, S., Zahra Bathaie, S., and Nakhjavani, M., "Effect of crocin on the insulin resistance and lipid profile of streptozotocin-induced diabetic rats", *Phytotherapy Research*, 27 (7): 1042-1047 (2013).
191. Saeed, S., Mosa-Al-Reza, H., Fatemeh, A. N., and Saeideh, D., "Antihyperglycemic and antihyperlipidemic effects of guar gum on streptozotocin-induced diabetes in male rats", *Pharmacognosy Magazine*, 8 (29): 65 (2012).
192. Samarghandian, S., and Shabestari, M. M., "DNA fragmentation and apoptosis induced by safranal in human prostate cancer cell line", *Indian Journal of Urology: Journal of The Urological Society of India*, 29 (3): 177 (2013).
193. Kianbakht, S., and Hajiaghaee, R., "Anti-hyperglycemic effects of saffron and its active constituents, crocin and safranal, in alloxan-induced diabetic rats", *Journal of Medicinal Plants*, 10 (39): 82-89 (2011).
194. Jörns, A., Tiedge, M., Lenzen, S., and Munday, R., "Effect of superoxide dismutase, catalase, chelating agents, and free radical scavengers on the toxicity of alloxan to isolated pancreatic islets in vitro", *Free Radical Biology and Medicine*, 26 (9-10): 1300-1304 (1999).
195. Assimopoulou, A. N., Sinakos, Z., and Papageorgiou, V., "Radical scavenging activity of *Crocus sativus* L. extract and its bioactive constituents", *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 19 (11): 997-1000 (2005).
196. Xi, L., Qian, Z., Shen, X., Wen, N., and Zhang, Y., "Crocetin prevents dexamethasone-induced insulin resistance in rats", *Planta Medica*, 71 (10): 917-922 (2005).
197. Mohajeri, D., Mousavi, G., and Doustar, Y., "Antihyperglycemic and pancreas-protective effects of *Crocus sativus* L. (Saffron) stigma ethanolic extract on rats with alloxan-induced diabetes", *Journal of Biological Sciences*, 9 (4): 302-310 (2009).
198. Emerit, J., Edeas, M., and Bricaire, F., "Neurodegenerative diseases and oxidative stress", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 58 (1): 39-46 (2004).
199. Cadenas, E., and Davies, K. J., "Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging", *Free Radical Biology and Medicine*, 29 (3-4): 222-230 (2000).
200. Zheng, M., and Storz, G., "Redox sensing by prokaryotic transcription factors", *Biochemical Pharmacology*, 59 (1): 1-6 (2000).
201. Halliwell, B., "Biochemistry of oxidative stress", *Biochemical Society Transactions*, 35 (5): 1147-1150 (2007).

202. Gupta, V. K., and Sharma, S. K., "Plants as natural antioxidants", *Indian Journal of Natural Product Radiance*, 5 (4):326-334 (2006).
203. Pillai, C. K., and Pillai, K. S., "Antioxidants in health", *Indian Journal. Physiol Pharmacology*, 46 (1):1-5 (2002)
204. Maxwell, S. R., "Anti-oxidant therapy: does it have a role in the treatment of human disease?", *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 6 (3): 211-236 (1997).
205. Joshi, R., Kamat, J. P., and Mukherjee, T., "Free radical scavenging reactions and antioxidant activity of embelin: biochemical and pulse radiolytic studies", *Chemico-Biological Interactions*, 167 (2): 125-134 (2007).
206. Scandalios, J. G., "Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses", *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, USA, 300-350, (1997).
207. Yagi, K., "Lipid peroxides and human diseases", *Chemistry and Physics of Lipids*, 45 (2-4): 337-351 (1987).
208. Jose, N., and Janardhanan, K. K., "Antioxidant and antitumour activity of *Pleurotus florida*", *Current Science*, 79 (7): 941-943 (2000).
209. Marrocco, I., Altieri, F., and Peluso, I., "Measurement and clinical significance of biomarkers of oxidative stress in humans", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-33 (2017).
210. Fujii, J., Iuchi, Y., and Okada, F., "Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system", *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3 (1): 1-10. (2005).
211. Droge, W., "Free radicals in the physiological control of cell function", *Physiological Reviews*, 82 (1): 47-95 (2002).
212. Ruder, E. H., Hartman, T. J., & Goldman, M. B., "Impact of oxidative stress on female fertility", *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*, 21 (3): 219 (2009).
213. Perkins, A. V., "Endogenous anti-oxidants in pregnancy and preeclampsia", *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 46 (2): 77-83 (2006).
214. Matés, J. M., and Sánchez-Jiménez, F., "Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes", *Frontiers Bioscience*, 4 (4): 339-345 (1999).
215. Usui, S., Komeima, K., Lee, S. Y., Jo, Y. J., Ueno, S., Rogers, B. S. and Campochiaro, P. A., "Increased expression of catalase and superoxide dismutase 2 reduces cone cell death in retinitis pigmentosa", *Molecular Therapy*, 17 (5): 778-786 (2009).

216. Mello, L. D., and Kubota, L. T., "Biosensors as a tool for the antioxidant status evaluation", *Talanta*, 72 (2): 335-348 (2007).
217. Sharma, R. K., and Agarwal, "A. Role of reactive oxygen species in gynecologic diseases", *Reproductive Medicine and Biology*, 3 (4): 177-199 (2004).
218. Valko, M., Rhodes, C. J. B., Moncol, J., Izakovic, M. M., and Mazur, M., "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer", *Chemico-Biological Interactions*, 160 (1): 1-40 (2006).
219. Tang, V. J., Konigsfeld, K. M., Aguilera, J. A., and Milligan, J. R., "DNA binding hydroxyl radical probes", *Radiation Physics and Chemistry*, 81 (1): 46-51 (2012).
220. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., and Telser, J. "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease", *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39 (1): 44-84 (2007).
221. Comhair, S. A., and Erzurum, S. C., "Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases", *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 283 (3): 246-255 (2002).
222. Barreiros, A. L., David, J. M., and David, J. P., "Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo", *Química nova*, 29: 113-123 (2006).
223. Niki, E., "Antioxidants in relation to lipid peroxidation", *Chemistry and Physics of Lipids*, 44 (2-4): 227-253 (1987).
224. Limón-Pacheco, J., and Gonsébat, M. E., "The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress", *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 674 (1-2): 137-147 (2009).
225. Ellerby, L. M., Cabelli, D. E., Graden, J. A., and Valentine, J. S., "Copper-zinc superoxide dismutase: why not pH-dependent?", *Journal of The American Chemical Society*, 118 (28): 6556-6561 (1996).
226. Wassmann, S., Wassmann, K., and Nickenig, G., "Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells", *Hypertension*, 44 (4): 381-386. (2004).
227. Rahman, I., Biswas, S. K., and Kode, A., "Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases", *European Journal of Pharmacology*, 533 (1-3): 222-239. (2006).

228. Altinoz, E., Oner, Z., Elbe, H., Cigremis, Y., and Turkoz, Y., "Protective effects of saffron (its active constituent, crocin) on nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats", *Human & Experimental Toxicology*, 34 (2): 127-134 (2015).
229. Gedik, S., Erdemli, M. E., Gul, M., Yigitcan, B., Bag, H. G., Aksungur, Z., and Altinoz, E., "Hepatoprotective effects of crocin on biochemical and histopathological alterations following acrylamide-induced liver injury in Wistar rats", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 95: 764-770 (2017).
230. Demir, M., Yilmaz, U., Colak, C., Cigremis, Y., Ozyalin, F., Tekedereli, I., and Sandal, S., "The effects of lack of melatonin in experimental rat model of Alzheimer's Disease: relationship with FEZ1 gene expression", *Medicine*, 6 (2): 217-23 (2017).
231. Masana, M. I., and Dubocovich, M. L., "Melatonin receptor signaling: finding the path through the dark", *Science Signaling*, 107: 39 (2001).
232. Chamorro, V., Pandolfi, R., Moreno, L., Barreira, B., Martínez-Ramas, A., Morales-Cano, D., and Perez-Vizcaino, F., "Effects of quercetin in a rat model of hemorrhagic traumatic shock and reperfusion", *Molecules*, 21 (12): 1739 (2016).
233. Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K., "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction", *Analytical Biochemistry*, 95 (2): 351-358 (1979).
234. Ellman, G. L., "Tissue sulfhydryl groups", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82 (1): 70-77 (1959).
235. Sun, Y. I., Oberley, L. W., and Li, Y., "A simple method for clinical assay of superoxide dismutase", *Clinical Chemistry*, 34 (3): 497-500 (1988).
236. Burnie, J. P., Coke, A., and Matthews, R. C., "Restriction endonuclease analysis of *Aspergillus fumigatus* DNA", *Journal of Clinical Pathology*, 45 (4): 324-327. (1992)
237. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J., "Protein measurement with the Folin phenol reagent", *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275 (1951).
238. Erel, O., "A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status", *Clinical Biochemistry*, 38 (12): 1103-1111 (2005).
239. Erel, O., "A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation", *Clinical Biochemistry*, 37 (4): 277-285 (2004).

240. Holt, R. I., Cockram, C., Flyvbjerg, A., and Goldstein, B. J., "Textbook of Diabetes", *Wiley Blackwell*, UK, 333-433 (2017).
241. Liptakova, A., Carsky, J., Ulicna, O., Vancova, O., Bozek, P., and Durackova, Z., "Influence of beta-resorcylic acid aminoguanidine on selected metabolic parameters and antioxidant status of rats with diabetes mellitus", *Physiological research*, 51 (3): 277-284 (2002).
242. Lenzen, S., "The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes", *Diabetologia*, 51(2): 216-226 (2008).
243. Wu, Y., Xia, Z. Y., Dou, J., Zhang, L., Xu, J. J., Zhao, B., and Liu, H. M. "Protective effect of ginsenoside Rb1 against myocardial ischemia/reperfusion injury in streptozotocin-induced diabetic rats", *Molecular Biology Reports*, 38 (7): 4327-4335 (2011).
244. Al-Awar, A., Kupai, K., Veszelka, M., Szűcs, G., Attieh, Z., Murlasits, Z., and Varga, C., "Experimental diabetes mellitus in different animal models", *Journal of Diabetes Research*, 6 (1): 250-230 (2016).
245. Su, L. Q., and Chi, H. Y., "Effect of curcumin on glucose and lipid metabolism, FFAs and TNF- α in serum of type 2 diabetes mellitus rat models", *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24 (8): 1776-1780 (2017).
246. Delaney, C. A., Dunger, A., Di Matteo, M., Cunningham, J. M., Green, M. H., and Green, I. C., "Comparison of inhibition of glucose-stimulated insulin secretion in rat islets of Langerhans by streptozotocin and methyl and ethyl nitrosoureas and methanesulphonates: lack of correlation with nitric oxide-releasing or O 6-alkylating ability", *Biochemical Pharmacology*, 50 (12): 2015-2020 (1995).
247. Elsner, M., Guldbakke, B., Tiedge, M., Munday, R., and Lenzen, S., "Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin", *Diabetologia*, 43 (12): 1528-1533 (2000).
248. Szkudelski, T., Kandulska, K., and Oandulicz, M., "Alloxan in vivo does not only exert deleterious effects", *Physiological research*, 47: 343-346 (1998).
249. Szkudelski, T., "The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas", *Physiological Research*, 50 (6): 537-546 (2001).
250. Friesen, N. T. E., Büchau, A. S., Schott-Ohly, P., Lgssiar, A., and Gleichmann, H., "Generation of hydrogen peroxide and failure of antioxidative responses in pancreatic islets of male C57BL/6 mice are associated with diabetes induced by multiple low doses of streptozotocin", *Diabetologia*, 47 (4): 676-685 (2004).
251. Tiedge, M., Lortz, S., Drinkgern, J., and Lenzen, S., "Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells", *Diabetes*, 46 (11): 1733-1742 (1997).

252. Zanquetta, M. M., Seraphim, P. M., Sumida, D. H., Cipolla-Neto, J., and Machado, U. F., "Calorie restriction reduces pinealectomy-induced insulin resistance by improving GLUT4 gene expression and its translocation to the plasma membrane", *Journal of Pineal Research*, 35 (3): 141-148. (2003).
253. Peschke, E., Frese, T., Chankiewitz, E., Peschke, D., Preiss, U., Schneyer, U., and Mühlbauer, E., "Diabetic Goto Kakizaki rats as well as type 2 diabetic patients show a decreased diurnal serum melatonin level and an increased pancreatic melatonin-receptor status", *Journal of Pineal Research*, 40 (2): 135-143 (2006).
254. Peschke, E., and Mühlbauer, E., "New evidence for a role of melatonin in glucose regulation", *Best Practice & Research: Clinical Endocrinology & Metabolism*, 24 (5): 829-841 (2010).
255. Kor, Y., Geyikli, I., Keskin, M., and Akan, M., "Preliminary study: Evaluation of melatonin secretion in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus", *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 18 (4): 565 (2014).
256. Hosseinzadeh, H., Sadeghnia, H. R., Ziaee, T., and Danaee, A., "Protective effect of aqueous saffron extract (*Crocus sativus* L.) and crocin, its active constituent, on renal ischemia-reperfusion-induced oxidative damage in rats", *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8 (3): 387-93 (2005).
257. Mohajeri, D., Tabrizi, B. A., Mousavi, G. H., and Mesgari, M., "Antidiabetic activity of crocus sativus l.(saffron) stigma ethanolic extract in alloxan-induced diabetic rats", *Research Journal of Biological Sciences*, 3 (9): 1102-1108 (2008).
258. Sundaram, R. K., Bhaskar, A., Vijayalingam, S., Viswanathan, M., Mohan, R., and Shanmugasundaram, K. R., "Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus with and without complications", *Clinical Science*, 90 (4), 255-260 (1996).
259. Bhatia, S., Shukla, R., Madhu, S. V., Gambhir, J. K., and Prabhu, K. M., "Antioxidant status, lipid peroxidation and nitric oxide end products in patients of type 2 diabetes mellitus with nephropathy", *Clinical Biochemistry*, 36 (7): 557-562 (2003).
260. Kedziora-Kornatowska, K. Z., Luciak, M., Blaszczyk, J., and Pawlak, W., "Lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in erythrocytes of patients with non-insulin dependent diabetes with or without diabetic nephropathy", *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association-European Renal Association*, 13 (11): 2829-2832 (1998).

261. Pan, H. Z., Zhang, H., Chang, D., Li, H., & Sui, H., “The change of oxidative stress products in diabetes mellitus and diabetic retinopathy”, *British Journal of Ophthalmology*, 92(4), 548-551 (2008).
262. Zhu, Y. Z., Huang, S. H., Tan, B. K. H., Sun, J., Whiteman, M., and Zhu, Y. C., “Antioxidants in Chinese herbal medicines: a biochemical perspective”, *Natural Product Reports*, 21 (4): 478-489 (2004).
263. Núñez-Sellés, A. J., “Antioxidant therapy: myth or reality?”, *Journal of The Brazilian Chemical Society*, 16: 699-710 (2005).
264. Preet, A., Gupta, B. L., Siddiqui, M. R., Yadava, P. K., and Baquer, N. Z., “Restoration of ultrastructural and biochemical changes in alloxan-induced diabetic rat sciatic nerve on treatment with Na₃VO₄ and Trigonella—a promising antidiabetic agent”, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 278 (1): 21-31. (2005).
265. Bree, A. J., Puente, E. C., Daphna-Iken, D., and Fisher, S. J., “Diabetes increases brain damage caused by severe hypoglycemia”, *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 297 (1): 194-201 (2009).
266. Venukumar, M. R., and Latha, M. S., “Antioxidant activity of curcumin in carbon tetrachloride—induced hepatopathy in rats”, *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 17 (2): 80-87 (2002).
267. Hwang, I., Lee, J., Huh, J. Y., Park, J., Lee, H. B., Ho, Y. S., and Ha, H., “Catalase deficiency accelerates diabetic renal injury through peroxisomal dysfunction”, *Diabetes*, 61 (3): 728-738 (2012).
268. Dehghan, F., Hajiaghaalipour, F., Yusof, A., Muniandy, S., Hosseini, S. A., Heydari, S., and Azarbayjani, M. A., “Saffron with resistance exercise improves diabetic parameters through the GLUT4/AMPK pathway in-vitro and in-vivo”, *Scientific Reports*, 6 (1): 1-12 (2016).
269. Manda, G., Checherita, A. I., Comanescu, M. V., and Hinescu, M. E., “Redox signaling in diabetic nephropathy: hypertrophy versus death choices in mesangial cells and podocytes”, *Mediators of Inflammation*, 2015 (2015).
270. Samaha, M. M., Said, E., and Salem, H. A., “A comparative study of the role of crocin and sitagliptin in attenuation of STZ-induced diabetes mellitus and the associated inflammatory and apoptotic changes in pancreatic β -islets”, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 72: 103238 (2019).
271. Wu, L., Zhang, Y., Ma, X., Zhang, N., and Qin, G., “The effect of resveratrol on FoxO1 expression in kidneys of diabetic nephropathy rats”, *Molecular Biology Reports*, 39 (9): 9085-9093 (2012).

272. Hazman, Ö., Aksoy, L., & Büyükben, A., “Effects of crocin on experimental obesity and type-2 diabetes”, *Turkish Journal of Medical Sciences*, 46 (5): 1593-1602 (2016).
273. Naghizadeh, B., Boroushaki, M. T., Vahdati, M. N., and Mansouri, M. T., “Protective effects of crocin against cisplatin-induced acute renal failure and oxidative stress in rats”, *Iranian Biomedical Journal*, 12 (2): 93-100 (2008).
274. Naghizadeh, B., Mansouri, S. M. T., and Mashhadian, N. V., “Crocine attenuates cisplatin-induced renal oxidative stress in rats”, *Food and Chemical Toxicology*, 48 (10): 2650-2655. (2010).
275. Cohen, M. P., Clements, R. S., Cohen, J. A., and Shearman, C. W., “Prevention of decline in renal function in the diabetic db/db Mouse”, *Diabetologia*, 39 (3): 270-274 (1996).
276. Tashiro, K., Koyanagi, I., Saitoh, A., Shimizu, A., Shike, T., Ishiguro, C., and Tomino, Y., “Urinary levels of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and interleukin-8 (IL-8), and renal injuries in patients with type 2 diabetic nephropathy”, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 16 (1): 1-4 (2002).
277. Zhang, S., Xu, H., Yu, X., Wu, Y. I., and Sui, D., “Metformin ameliorates diabetic nephropathy in a rat model of low-dose streptozotocin-induced diabetes”, *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14 (1): 383-390 (2017).
278. Bahmani, M., Rafieian, M., Baradaran, A., Rafieian, S., and Rafieian-Kopaei, M., “Nephrotoxicity and hepatotoxicity evaluation of Crocus sativus stigmas in neonates of nursing mice”, *Journal of Nephrology*, 3 (2): 81 (2014).
279. Milajerdi, A. R., Djazayeri, A., Jazayeri, S., Hashemzadeh, N., Shirzadi, E., Derakhshan, Z., and Akhondzadeh, S., “The effect of hydro-alcoholic extract of saffron stigma (*Crocus sativus* L.) on metabolic control parameters, liver enzymes, and renal function parameters in type 2 diabetic patients”, *Journal of Medical Plants*, 15 (60):142-151 (2016).
280. Modaghegh, M. H., Shahabian, M., Esmaili, H. A., Rajbai, O., and Hosseinzadeh, H., “Safety evaluation of saffron (*Crocus sativus*) tablets in healthy volunteers”, *Phytomedicine*, 15 (12): 1032-1037 (2008).
281. Qi, M. Y., Liu, H. R., Su, Y. H., and Yu, S. Q., “Protective effect of Icaritin on the early stage of experimental diabetic nephropathy induced by streptozotocin via modulating transforming growth factor β 1 and type IV collagen expression in rats”, *Journal of Ethnopharmacology*, 138 (3): 731-736 (2011).
282. Sharma, K., and Ziyadeh, F. N., “Biochemical events and cytokine interactions linking glucose metabolism to the development of diabetic nephropathy”, *Seminars in Nephrology*, 17 (2): 80-92 (1997).

283. McGowan, T. A., Zhu, Y., and Sharma, K., “Transforming growth factor-beta: a clinical target for the treatment of diabetic nephropathy”, *Current Diabetes Reports*, 4 (6): 447-454 (2004).
284. Hathaway, C. K., Gasim, A. M., Grant, R., Chang, A. S., Kim, H. S., Madden, V. J., and Kakoki, M., “Low TGF β 1 expression prevents and high expression exacerbates diabetic nephropathy in mice”, *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 112 (18): 5815-5820 (2015).
285. Vallon, V., Richter, K., Blantz, R. C., Thomson, S., and Osswald, H., “Glomerular hyperfiltration in experimental diabetes mellitus: potential role of tubular reabsorption”, *Journal of The American Society of Nephrology*, 10 (12): 2569-2576 (1999).
286. Algandaby, M. M., “Antifibrotic effects of crocin on thioacetamide-induced liver fibrosis in mice”, *Saudi journal of biological sciences*, 25 (4):747-754 (2018).

EK AÇIKLAMALAR A.

ETİK KURUL İZİNİ



T.C.
ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu



TOPLANTI TARİHİ : 03/09/2020
TOPLANTI NO : 2020/07

- 1- Karabük Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanlığı'nın 2020-21-03/09 Protokol no'lu "Pinealektomi Edilmiş ve Streptozotosin ile Diyabet Oluşturulmuş Ratlarda Nefropati Üzerine Krosinin Koruyucu Etkilerinin Araştırılması" konulu çalışmasının Etik Kurul İlkelerine uygun olduğuna,

Oy birliği ile karar verildi.

ASLI GİBİDİR

Prof. Dr. Emine YILMAZ CAN
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

Rihab Mudhafar Ali HAMMOOD KEELO 1985 yılında Irak'ta doğdu; ilk ve orta öğrenimini aynı ülkede tamamladı. Bağdat Palestine Kız Lisesinden mezun oldu. 2010 yılında Al-Ma'mon University Collage Tıbbi Medikal Teknoloji bölümünden mezun oldu. 2019 yılında Karabük Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim dalında yüksek lisans programını tamamladı.