



**PİNEALEKTOMİ YAPILMIŞ VE  
STREPTOZOTOSİN İLE DİYABET  
OLUŞTURULMUŞ RATLARDA KROSİNİN  
KARACİĞER DOKUSU ÜZERİNE ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Melike KARAYAKALI**

**2022  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
TIBBİ BİYOKİMYA**

**Tez Danışmanı  
Dr. Öğr.Ü.Mehmet DEMİR**

**PİNEALEKTOMİ YAPILMIŞ VE STREPTOZOTOSİN İLE DİYABET  
OLUŞTURULMUŞ RATLARDA KROSİNİN KARACİĞER DOKUSU  
ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Melike KARAYAKALI**

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

**Tez Danışmanı  
Dr. Öğr. Ü. Mehmet DEMİR**

**KARABÜK  
Haziran 2022**

Melike KARAYAKALI tarafından hazırlanan “PİNEAKLEKTOMİ YAPILMIŞ VE STREPTOZOTOSİN İLE DİYABET OLUŞTURULMUŞ RATLARDA KROSİNİN KARACİĞER DOKUSU ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı bu tezin Yüksek Lisans Tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Dr. Öğr. Ü. Mehmet DEMİR

.....

Tez Danışmanı, Fizyoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından Oy Birliği ile Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 10/06/2022

Ünvanı, Adı SOYADI (Kurumu)

İmzası

Başkan : Prof. Dr. Hafize UZUN ( İAÜ)

.....

Üye : Prof. Dr. Eyüp ALTINÖZ (KBÜ)

.....

Üye : Dr. Öğr. Ü. Mehmet DEMİR (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.”*

Melike KARAYAKALI

## **ÖZET**

**Yüksek Lisans Tezi**

### **PİNEALEKTOMİ YAPILMIŞ VE STREPTOZOTOSİN İLE DİYABET OLUŞTURULMUŞ RATLARDA KROSİNİN KARACİĞER DOKUSU ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Melike KARAYAKALI**

**Karabük Üniversitesi**

**Lisansüstü Eğitim Enstitüsü**

**Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı:**

**Dr. Öğr. Ü. Mehmet DEMİR**

**Haziran 2022, 89 sayfa**

Dünya çapında yaklaşık 425 milyon kişiyi etkileyen diyabetes mellitus (DM), önemli morbidite ve mortalite nedenidir. Diyabetten etkilenen insanların % 80'i düşük ve orta gelirli ülkelerde yaşadığı bilinmektedir. Etkin tedavisi yapılamayan DM, böbrek yetmezliği, körlük, amputasyon ve kardiyovasküler hastalık dahil olmak üzere mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlara yol açabilir. Bu komplikasyonlar ise vücuttaki çoğu dokuyu etkileyebilmektedir.

Hiperglisemi ile karakterize olan diyabet, artan oksidatif stres ve sitokin seviyeleri, glukoz ve lipid metabolizmasının düzensizliği gibi çeşitli mekanizmalarla karaciğer hasarına neden olabilir. Bu yüzden tip 1 diyabetes mellitus (DMT1) ve tip 2 diyabetes mellitus (DMT2)'de hepatik süreçler düzensizleşmektedir.

Güçlü bir endojen radikal süpürücü olarak melatonin, sadece oksidatif seviyeleri azaltmakla kalmayıp, aynı zamanda inflamasyona karşı etkili bir savunma oluşturmaktadır. Ayrıca melatonin kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve obezite gibi kronik hastalıkların kontrolünü de kolaylaştırmaktadır. Çalışmalarda melatoninin anti-diyabetik özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir. Hayvanlar üzerinde yapılan pinealektomi çalışmalarında düşük melatonin seviyelerinin diyabet hastalığına yatkınlığı artırabileceği kanıtlanmıştır.

Krosin, antioksidan aktiviteye sahip safranın ana bileşenidir. Oksidatif stresle oluşan reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu baskılayabilmektedir. Çalışmalarda krosinin glutasyon sentezini ve oksidatif strese karşı endojen savunmayı arttırdığı gösterilmiştir. Krosinin diğer farmakolojik özellikleri ise antihiperlipidemik, anti-inflamatuvar, antikanser, antiartritik, hepatoprotektif ve kardiyoprotektif olmasıdır. Ayrıca krosinin tip 2 diyabet komplikasyonlarını da azalttığı bilinmektedir ve deneysel olarak oluşturulan diyabet modelinde krosinin hiperglisemiye karşı yararlı etkileri olduğu açıklanmıştır.

Bu çalışmada, melatonin varlığında ve yoksunluğunda streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş ratlarda krosinin oksidatif stres üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmanın ilk günü pinealektomi işlemi uygulanmıştır, çalışmanın son günü ise (30. Gün) intraperitoneal (i.p) olarak streptozotosin (STZ) (50 mg/kg) ile diyabet modeli oluşturulmuştur.

Çalışmada 250-300 gram 60 adet erkek Wistar albino türü rat kullanıldı. Ratlar, her grupta 10 adet olacak şekilde 6 gruba ayrılmıştır (Kontrol, Sham + STZ, PİNX, PİNX+STZ, PİNX+Krosin, PİNX+STZ+Krosin).

Çalışmamızda pinealektomi yapılan hayvanlarda diyabet oluşturulması, serum karaciğer enzimlerinde (alanin aminotransferaz, aspartat aminotransferaz, alkalin fosfataz) ciddi artışlara neden olmuştur. Aynı zamanda krosin tedavisinin uygulanması pinealektomi uygulanmış diyabetik ratlarda karaciğer enzimlerinde düşüş sağlamıştır.

Ayrıca STZ enjeksiyonunun yapılması karaciğer dokusunda malondialdehit (MDA), total oksidan seviyesi (TOS) ve oksidatif stres indeksi (OSİ) düzeylerinde ciddi artışa neden olurken, redükte glutatyon (GSH), total antioksidan seviyesi (TAS), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) düzeylerinde ise ciddi azalmalara neden olmuştur. Ancak pinealektomi uygulanmış diyabetik sıçanların krosin ile tedavi edilmesi, karaciğer dokusu MDA ve GSH düzeylerinde, oksidan/antioksidan dengesinde ve antioksidan enzim aktivitelerinde (SOD ve CAT) ciddi iyileşmeler gözlenmesine neden olmuştur. Çalışmada histopatolojik ve immünohistokimyasal sonuçlar değerlendirildiğinde pinealektomi uygulanmış diyabetik sıçanlarda karaciğer hasarı tespit edilmiştir. Sonuç olarak krosin hiperglisemi ve oksidatif stres kaynaklı oluşan karaciğer hasarını hafifletmiştir. Çalışma bulgularımız göz önünde bulundurulduğunda krosinin diyabet ve oksidatif stresin neden olduğu karaciğer doku hasarında tedavi edici ajan olabileceğini düşünmekteyiz. Fakat bu düşüncenin desteklenmesi için daha çok çalışma yapılmalıdır.

**Anahtar Sözcükler :** Pinealektomi, Krosin, Karaciğer, Hiperglisemi, Streptozotosin, Melatonin, Diyabetes Mellitus

**Bilim Kodu** : 1090

## **ABSTRACT**

**M. Sc. Thesis**

### **INVESTIGATION OF THE EFFECT OF CROCIN ON LIVER TISSUE OF PINEALECTOMIZED AND STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETIC RATS**

**Melike KARAYAKALI**

**Karabük University  
Institute of Graduate Programs  
Department of Medical Biochemistry**

**Thesis Advisor:**

**Asst. Prof. Mehmet DEMİR**

**June 2022, 89 pages**

Diabetes mellitus (DM), which affects approximately 425 million people worldwide, is an important cause of morbidity and mortality. It is known that 80% of people affected by diabetes live in low- and middle-income countries. Untreated DM can lead to microvascular and macrovascular complications, including renal failure, blindness, amputation, and cardiovascular disease. These complications can affect most tissues in the body.

Diabetes mellitus, which is characterized by hyperglycemia, can cause liver damage by various mechanisms such as increased oxidative stress and cytokine levels, and dysregulation of glucose and lipid metabolism. Therefore, hepatic processes are



dysregulated in type 1 diabetes mellitus (DMT1) and type 2 diabetes mellitus (DMT2).

As a potent endogenous radical scavenger, melatonin not only reduces oxidative levels but also provides an effective defense against inflammation. In addition, melatonin facilitates the control of chronic diseases such as cardiovascular diseases, diabetes and obesity. Studies have shown that melatonin has anti-diabetic properties. It has been proven in animal pinealectomy studies that low melatonin levels may increase susceptibility to diabetes.

Crocin is the main component of saffron with antioxidant activity. It can suppress the formation of reactive oxygen species (ROS) formed by oxidative stress. Studies have shown that crocin increases glutathione synthesis and endogenous defense against oxidative stress. Other pharmacological properties of crocin are antihyperlipidemic, anti-inflammatory, anticancer, antiarthritic, hepatoprotective and cardioprotective. It is also known that crocin reduces complications of type 2 diabetes, and it has been reported that crocin has beneficial effects against hyperglycemia in an experimental diabetes model.

In this study, it was aimed to investigate the effect of crocin on oxidative stress in rats in whom diabetes was induced by streptozotocin in the presence and absence of melatonin. Pinealectomy was performed on the first day of the study, and on the last day (day 30) of the study, a diabetes model was created with intraperitoneal (i.p) streptozotocin (STZ) (50 mg/kg).

In the study, 60 male Wistar albino rats of 250-300 grams were used. Rats were divided into 6 groups, 10 in each group (Control, Sham + STZ, PINX, PINX+STZ, PINX+Krosin, PINX+STZ+Krosin).

In our study, the establishment of diabetes in animals that underwent pinealectomy caused serious increases in serum liver enzymes (alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase). At the same time, administration of crocin treatment resulted in a decrease in liver enzymes in pinealectomized diabetic rats. In addition, STZ injection causes a serious increase in malondialdehyde [1], total oxidant

level (TOS) and oxidative stress index (OSI) levels in liver tissue, while reduced glutathione (GSH), total antioxidant level (TAS), superoxide dismutase (SOD) and catalase levels. (CAT) levels, on the other hand, caused serious decreases. However, treatment of pinealectomized diabetic rats with crocin resulted in significant improvements in liver tissue MDA and GSH levels, oxidant/antioxidant balance and antioxidant enzyme activities (SOD and CAT). When the histopathological and immunohistochemical results were evaluated in the study, liver damage was detected in diabetic rats who had undergone pinealectomy. As a result, crocin alleviated the liver damage caused by hyperglycemia and oxidative stress. Considering our study findings, we think that crocin may be a therapeutic agent in liver tissue damage caused by diabetes and oxidative stress. However, more work needs to be done to support this idea.

**Key Word** : Pinealectomy, Crocin, Liver, Hyperglycemia, Streptozotocin, Melatonin, Diabetes Mellitus.

**Science Code** : 1090

## TEŞEKKÜR

Bu tez alıőmasının planlanmasında, araőtırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalıőmamı bilimsel temeller ışığında őekillendiren sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Mehmet DEMİR'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Deneyimiz sonucunda biyokimyasal analizlerin yapılması ve yorumlanmasında Karabük Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Prof. Dr. Eyüp ALTINÖZ, 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 Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje No: KBÜBAP-21-YL-044) teşekkür ederim.

Sevgili aileme manevi hiçbir yardımı esirgmeden yanımda oldukları için tüm kalbimle teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa</u></b>
KABUL.....	ii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vii
TEŞEKKÜR.....	x
İÇİNDEKİLER .....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xvi
BÖLÜM 1 .....	1.
GİRİŞ .....	1.
BÖLÜM 2 .....	4
DİYABETES MELLİTUS(DM).....	4
2.1. DİYABETES MELLİTUSUN PATOFİZYOLOJİSİ.....	5
2.2. DİYABETES MELLİTUS'UN SINIFLANDIRILMASI.....	7
2.2.1. Diyabetes Mellitus Tip 1(DMT1) .....	8
2.2.2. Diyabetes Mellitus Tip 2 (DMT2) .....	10
2.2.3. Gestasyonel Diyabetes Mellitus (GDM).....	10
2.2.4. Diğer Nedenlere Bağlı Spesifik Diyabet Türleri .....	11
2.2.4.1. Monogenik Diyabet Sendromları.....	11

	<b><u>Sayfa</u></b>
2.2.4.2. Ekzokrin Pankreas Diyabeti (DEP).....	11
2.2.4.3. İlaç ve Kimyasal Kaynaklı Diyabet .....	12
2.2.4.4. Organ Nakli Kaynaklı Diyabet .....	12
2.3. DİYABETES MELLİTUS'UN KOMPLİKASYONLARI .....	13
BÖLÜM 3 .....	15
OKSİDATİF STRES VE DİYABETES MELLİTUS .....	15
3.1. ANTİOKSİDAN SAVUNMA MEKANİZMASI .....	16
BÖLÜM 4 .....	19
MELATONİN VE DİYABETES MELLİTUS.....	19
BÖLÜM 5 .....	21
SAFRAN VE DİYABETES MELLİTUS.....	21
BÖLÜM 6 .....	26
DİYABETES MELLİTUS VE BESLENME .....	26
BÖLÜM 7 .....	27
GEREÇ VE YÖNTEM .....	27
7.1. GEREÇ.....	27
7.1.1. Kullanılan Malzemeler.....	27
7.2. YÖNTEM.....	27
7.2.1. STZ ve Krosin Hazırlanması .....	27
7.2.2. Ratların Bakımı .....	27
7.2.3. Rat Deney Protokolü.....	28
7.2.3.1. Pinealektomi Uygulaması .....	29
7.2.3.2. Diyabet Modelinin Oluşumu.....	29
7.2.4. Numune Alınması .....	29
7.2.5. Biyokimyasal Analizler .....	30
7.2.5.1. Numunelerin Hazırlanma Aşamaları.....	30
7.2.5.2. Oksidatif Stres Belirteçleri.....	30

7.2.5.3. Karaciğer Fonksiyon Testleri.....	33
7.2.5.4. Karaciğer İnterlökin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) Seviyesinin Belirlenmesi.....	33
7.2.6. Histopatolojik Analiz.....	33
7.2.7. İmmünohistokimyasal Analiz.....	34
7.2.8. İstatistiksel Analiz.....	37
BÖLÜM 8.....	38
DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA.....	38
8.1. BİYOKİMYASAL BULGULAR.....	38
8.1.1. Karaciğer Oksidatif Stres İndekslerinin Düzeyi.....	38
8.1.1.1. Karaciğer Dokusu MDA ve GSH Düzeyleri.....	39
8.1.1.2. Karaciğer Dokusu Antioksidan Enzim Aktivite Düzeyleri.....	40
8.1.1.3. Karaciğer Dokusu Oksidan/Antioksidan Düzeyleri.....	42
8.1.1.4. Serum Karaciğer Fonksiyon Testlerinin Düzeyleri.....	44
8.1.1.5. Serum Glikoz Düzeyleri.....	46
8.1.1.6. Karaciğer Dokusu İnflamasyon Belirteç Düzeyi.....	47
8.2. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR.....	49
8.3. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR.....	51
8.4. TARTIŞMA.....	53
KAYNAKLAR.....	62
EK AÇIKLAMALAR ETİK KURUL İZİNİ.....	88
EK AÇIKLAMALAR ÖZGEÇMİŞ.....	89

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 2.1. Toklukta sağlıklı ve insüline dirençli durumda hepatik substrat akışı.....	6
Şekil 2.2. Tip 2 diyabet gelişimine neden olan patofizyolojik yollar.....	7
Şekil 2.3. Nakil sonrası diyabete neden olan etmenler.....	13
Şekil 3.1. Oksidatif stresin beş ana moleküler yolağı ile insülin direnci .....	16
Şekil 3.2. Biyolojik sistemde ROS üretim ve tüketim yolları .....	18
Şekil 4.1. Melatonin biyosentezi .....	19
Şekil 4.2. Melatonin sentezi ve ışığın algılanması. ....	20
Şekil 5.1. Safran .....	22
Şekil 5.2. Safranın aktif maddelerinin kimyasal formülleri .....	23
Şekil 5.3. Safran yaprağının farmakolojik etkileri .....	24
Şekil 5.4. Krosinin kimyasal yapısı.....	24
Şekil 8.1. Ortalama karaciğer dokusu MDA değerleri.....	39
Şekil 8.2. Ortalama karaciğer dokusu GSH değerleri .....	39
Şekil 8.3. Ortalama karaciğer doku CAT değerleri.....	40
Şekil 8.4. Ortalama karaciğer dokusu SOD değerleri .....	41
Şekil 8.5. Ortalama karaciğer TAS değerleri .....	42
Şekil 8.6. Ortalama karaciğer TOS değerleri .....	43
Şekil 8.7. Ortalama karaciğer OSI değerleri .....	43
Şekil 8.8. Ortalama serum ALT düzeyleri .....	45
Şekil 8.9. Ortalama serum AST düzeyleri.....	45
Şekil 8.10. Ortalama serum ALP düzeyleri.....	46
Şekil 8.11. Ortalama açlık kan glikoz düzeyleri .....	47
Şekil 8.12. Ortalama serum IL-1 $\beta$ düzeyleri .....	48
Şekil 8.13. Karaciğer histolojik yapısı Hemptoksilen-Eozin (H-E) boyama yöntemi .	50
Şekil 8.14. Dokuların anti-GLUT-1 antikoru ile immünohistokimyasal yöntemle boyanması .....	52

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b><u>Sayfa</u></b>
Çizelge 2.1. Diyabetes Mellitus'un Etiyolojik Sınıflandırmaları .....	8
Çizelge 2.2. Diyabetin Tanı Kriterleri.....	9
Çizelge 2.3. Bozulmuş Glukoz Toleransı .....	9
Çizelge 7.1. Hematoksilen & Eozin boyama protokolü.....	34
Çizelge 7.2. IHC boyama protokolü .....	35
Çizelge 8.1. Ortalama karaciğer dokusu MDA ve GSH düzeyleri. ....	37
Çizelge 8.2. Ortalama karaciğer dokusu SOD ve CAT aktiviteleri. ....	38
Çizelge 8.3. Karaciğer TAS, TOS ve OSI ortalama düzeyleri.....	42
Çizelge 8.4. Ortalama serum ALT, AST ve ALP düzeyleri .....	44
Çizelge 8.5. Ortalama serum glikoz düzeyleri .....	47
Çizelge 8.6. Ortalama Karaciğer IL-1 $\beta$ düzeyleri.....	48
Çizelge 8.7. Histopatolojik hasar skoru .....	49
Çizelge 8.8. GLUT-1immün reaktivitesi için ortalama H-Skoru.....	51



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### SİMGELER

$H_2O_2$	: hidrojen peroksit
$H_3PO_4$	: fosforik asit
$O_2$	: oksijen
$O_2^-$	: süperoksit radikali
$C_{44}H_{64}O_{24}$	: krosin
$C_{16}H_{26}O_7$	: pikrokrosin
$C_{10}H_{14}O$	: safranal
-OH	: hidroksil radikali
NO	: nitrik oksit

## KISALTMALAR

DM	: Diyabetes Mellitus
STZ	: Streptozotosin
DMT1	: Tip 1 Diyabetes Mellitus
DMT2	: Tip 2 Diyabetes Mellitus
MDA	: Malondialdehit
TAS	: Total Antioksidan Seviyesi
TOS	: Total Oksidan Seviyesi
OSI	: Oksidatif Stres İndeksi
GSH	: Redükte Glutasyon
SOD	: Süperoksit Dismutaz
CAT	: Katalaz
ALT	: Alanin Aminotransferaz
AST	: Aspartat Aminotransferaz
ALP	: Alkalin Fosfataz
IL-1 $\beta$	: İnterlökin-1 $\beta$
HbA1c	: Glukozillenmiş Hemoglobin A1c
ADA	: Amerikan Diyabet Derneği
IDF	: Uluslararası Diyabet Federasyonu
GDM	: Gestasyonel Diyabetes Mellitus
DEP	: Ekzokrin Pankreas Diyabeti
OGTT	: Oral Glukoz Tolerans Testi
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
i.p.	: İntroperitonal
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
NO	: Nitrik Oksit
IDF	: Uluslararası Diyabet Federasyonu
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
LDL	: Lipoprotein
GLUT	: Kolaylaştırılmış Glukoz Taşıyıcısı
ATP	: Adenozin Trifosfat
NTF	: Nötral Tamponlanmış Formalin

## BÖLÜM 1

### GİRİŞ

Diyabetes mellitus (DM) dünya çapında yaygınlığı giderek artan [2], önemli ölçüde morbidite ve mortaliteye neden olan [3] kronik metabolik bir bozukluktur [4]. Hastalık, pankreatik beta hücre fonksiyonunu bozabilen, metabolik durumu kötüleştirebilen, insülin direncini artıran kronik bir hiperglisemi tablosu şeklinde kendini göstermektedir [5]. İnsülin bağımlı Tip 1 DM (DMT1) ve İnsüline bağımlı olmayan Tip 2 DM (DMT2) en sık görülen DM çeşitleridir [6].

DM ile ilişkili makro ve mikrovasküler komplikasyonların kilit noktası kronik hiperglisemidir [7]. Hipergliseminin ana mekanizmalarından birisi DMT1’de otoimmüitenin neden olduğu pankreatik beta hücre harabiyeti, DMT2’de ise insülin direnci ile aşırı insülin sentezinin uyarılmasıdır [8]. Hiperglisemi, kronik inflamasyon belirteçlerini artırabilir ve reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olabilir [9]. Aynı zamanda oksidatif stres ve inflamasyon da insülin direncine, bozulmuş insülin sekresyonuna [10] ve diyabetin komplikasyonlarına sebep olabilmektedir [11, 12]. Oksidatif stres patofizyolojik mekanizmaları indüklemekte ve diyabete yol açabilen patolojik yollar başlatabilmektedir [13, 14]. Aynı zamanda serbest radikal üretimi ile periferik insülin duyarlılığında azalmaya yol açarak çeşitli mekanizmalar yoluyla DMT2’ye de sebep olabilir [15].

Streptozotosin (STZ) alkilasyon maddesi, reaktif oksijen türlerini (ROS) artırmaktadır ve pankreas adacık hücrelerindeki antioksidan sisteme zarar vermektedir [16]. Zarar gören antioksidan sistem DNA zinciri kopmasına ve beta hücre nekrozuna neden olmaktadır [17, 18].

Glukoz homeostazının kontrolünde karaciğer önemli bir rol oynamaktadır. Karaciğer, DM'den en çok etkilenen dokulardan birisidir [19] ve DM, karaciğer fonksiyon bozukluğuna neden olmaktadır [20]. Karaciğer fonksiyon bozukluğu diyabetin oldukça yaygın bir komplikasyonudur. Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı ve hepatik steatoz gibi hepatik-lipide bağlı bozukluklar, diyabetik hastalarda en sık görülen karaciğer hastalıklarıdır [21]. Çalışmalar, diyabetik bireylerin % 70-90'ının karaciğere bağlı bozukluklar yaşadığını ortaya koymuştur [22].

Pineal bezin temel işlevlerinden birisi melatonin hormonunu salgılamaktır [23]. Melatonin geceleri sentezlenir ve dolaşıma salınır, ayrıca vücudun sirkadiyen döngüsünde rol oynar. Anti-aging, antioksidan, anti-inflamatuvar ve antionkotik etkilere sahip olduğu da bilinmektedir [24]. Melatoninin serbest radikalleri nötralize ederek hasar oluşumunu önlemenin yanında [25] organ ve dokularda glukotoksisiteyi azaltarak komplikasyonları önleyebildiği bilinmektedir [26]. Ayrıca melatonin,  $\beta$ -hücre apoptozunu azaltarak, DM2'de  $\beta$ -hücre kaybı ve işlev bozukluğunun neden olduğu pankreas adacık yetmezliğini önleyebilmektedir [27].

Yaşlanma, diyabet ve diğer yaşa bağlı hastalıklar için risk faktörüdür [28]. Yaşlılarda geceleri melatonin seviyesi azalmaktadır [29]. Melatonin yoksunluğunda (pinealektomi) hayvanlarda kolaylaştırılmış glukoz taşıyıcısı (GLUT) 4 geninin ekspresyon seviyesinin azaldığı, glikoz intoleransının ve insülin direncinin olduğu görülmüştür [30]. Çalışmamızı planlarken melatonin yoksunluğuna yol açan pinealektominin diyabetle ilişkilendirilmesinde bu durum göz önüne alınmıştır.

Esas olarak Yunanistan, İnan ve Hindistan'da üretilen safran (*Crocus sativus* L.) bir baharat olarak kullanılmasının yanı sıra geleneksel tıpta yoğun ilgi görmektedir [31]. Safran, krosin (dikarboksilik asitlerin mono- ve diglikosilik esterleri, krosetin), pikrokrosin ve safranal gibi aktif bileşenleri içermektedir [32]. Çalışmalarda krosinin antidiyabetik, anti-inflamatuvar ve antioksidan özellikler gösterdiği bulunmuştur. Açlık kan şekerinin, serum insülin düzeylerinin, glukozillenmiş hemoglobin A1c (HbA1c) düzeylerinin iyileşmesinde ve hiperglisemi üzerinde olumlu etkiye sahip olduğu çalışmalarda gösterilmiştir [33-35].

Bu çalışmada krosinin, diyabet kaynaklı hiperglisemi ile melatonin yoksunluğunda (pinealektomi) oluşan oksidatif stres üzerine olumlu etkisinin olabileceğini düşündük. Amacımız doğrultusunda karaciğerde oksidatif stres düzeyini belirlemek için lipid peroksidasyonunun toksik sekonder ürünlerinden birisi olan malondialdehit (MDA), redükte glutatyon (GSH), total antioksidan (TAS) ve total oksidan (TOS) değerlerini, hücrel savunma sisteminin temel parçaları olan süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) enzimlerinin seviyelerini ölçtük. Karaciğer fonksiyon bozukluğunu tespit etmek amacıyla da serum alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST) ve alkalin fosfataz (ALP) değerlerine baktık. Son olarak da inflamatuvar karaciğer hasarını gözlemlemek için IL-1 $\beta$  değerine bakıldı ve karaciğer dokusunda histopatolojik değişiklikler incelenmiştir.

## BÖLÜM 2

### DIYABETES MELLİTUS

DM, yirmi birinci yüzyılın en önemli halk sağlığı sorunlarından birisidir [36]. DM vücutta yetersiz insülin sonucunda yüksek kan şekeri seviyeleri ile karakterize bir heterojen bozukluktur [37, 38]. Diyabetin en yaygın biçimleri, pankreas beta hücresi yıkımına bağlı olarak mutlak insülin eksikliğinin ortaya çıktığı DMT1 ve insülin direncinin hiperglisemiye yol açabileceği DMT2'dir [39]. Diyabet hastalarının yaklaşık %5-10'undan sorumlu olan DMT1, pankreas  $\beta$ -hücrelerini yok eden otoimmün bir süreç nedeniyle mutlak insülin eksikliğinden kaynaklanmaktadır [40]. Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF) 425 milyon insanın dünya çapında diyabetten etkilendiğini bildirmektedir. Son yıllarda diyabetten etkilenen birey sayısı gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde giderek artmaktadır [41]. Diyabetten etkilenen insanların % 80'i düşük ve orta gelirli ülkelerde yaşadığı ve bunun büyük kısmı ise Asya-Pasifik bölgesinde olduğu bilinmektedir [42].

DMT2 artan prevalansı ve insidansı nedeniyle bir salgın haline gelmiştir [43]. Bu diyabet tipi yüksek kalorili diyet, artan sedanter davranış ile genetik, fizyolojik ve yaşam tarzı gibi çok faktörlü etiyolojiye sahiptir [44]. DMT2'li kişilerde beta hücre fonksiyonunda azaldığı da bilinmektedir [45].

## 2.1. DİYABETES MELLİTUS'UN PATOFİZYOLOJİSİ

DM, karbonhidrat ve lipid metabolizmalarını etkilediği için karaciğerde hasara ve uzun vadeli komplikasyonlara yol açabilmektedir [46-48]. Karaciğer normal glikoz homeostazının korunması için çok önemlidir. Açlık durumunda, karaciğer glisemiye kontrol altında tutmak için glikoz sağlamaktadır. Böylece karaciğer, nöronlar, kırmızı kan hücreleri ve renal medüller hücreler gibi zorunlu glikozla beslenen hücre tiplerinin ihtiyacını gidermektedir [49]. Karaciğer postprandiyal normal glukoz toleransına da katkıda bulunmaktadır [50]. Glikojen sentez hızını artırıp hepatik glukoz çıkışını baskılamaktadır [51]. Hepatik glukoz çıkışının baskılanması, hepatik glikojenolizin ve glukoneogenezin baskılanması ile olmaktadır [52].

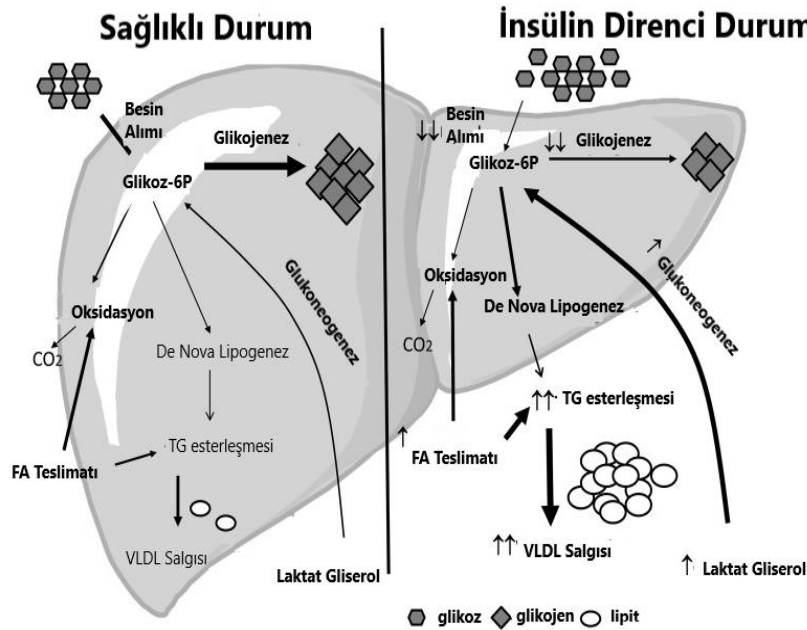
Hiperglisemi, artan oksidatif stres ve sitokin seviyeleri ile glukoz ve lipid metabolizmasında düzensizliğine neden olmaktadır. Bu yüzden DMT1 ve DMT2'de hepatik süreçler düzensizleşmektedir. [53]. Bozulmuş glukoz homeostazi, hiperinsülinemi ve hipertrigliseridemi ile karakterizedir. Açlık durumunda gerçekleşen hiperglisemi ve hiperinsülinemi, insülinin kas glukoz alımındaki ve hepatik glukoz üretimindeki başarısızlığından kaynaklanmaktadır. Hiperinsülineminin karaciğer, kas dokusu, yağ dokusu, damar sistemi ve beyin dahil olmak üzere çoklu dokularda gerçekleşen insülin direncine neden olduğu bilinmektedir. Tokluk durumunda insülin direnci, karaciğerin glukoz üretiminden sonra glukoz atımındaki başarısızlıktan kaynaklanmaktadır. Bu durum hiperglisemiye neden olmaktadır [54]. Şekil 2.1 de toklukta sağlıklı ve insüline dirençli durumda hepatik substrat akışı sunulmuştur.

Metabolik hastalıklarda 24 saatlik beslenme-açlık döngüsünde karaciğerin işlediği besinlerin hem düzeni hem de akışı değişmektedir. Aynı zamanda hepatik glukoz alımı ve glikojen birikimi bozulmuştur. Normalde inhibe olması gereken glukoneogenez ve de nova lipogenez yolları aktiftir. Yağ asitleri iletimi, trigliserit esterleşmesi ve sekresyonu hızlanmıştır [55]. Obezite ve insülin direnci varlığında hiperinsülinemi olmasına rağmen gece açlıktan sonra hepatik glukoz üretimi normal veya yüksek olmaktadır. Bunun nedeni, insülinin hepatik glukoz alımı ve üretimini düzenleme

yeteneğinin bozulmasıdır [56]. İnsülin direnci genellikle DMT2 ile ilişkili olsa da son çalışmalar DMT1’de de insülin direncini bildirmiştir [57].

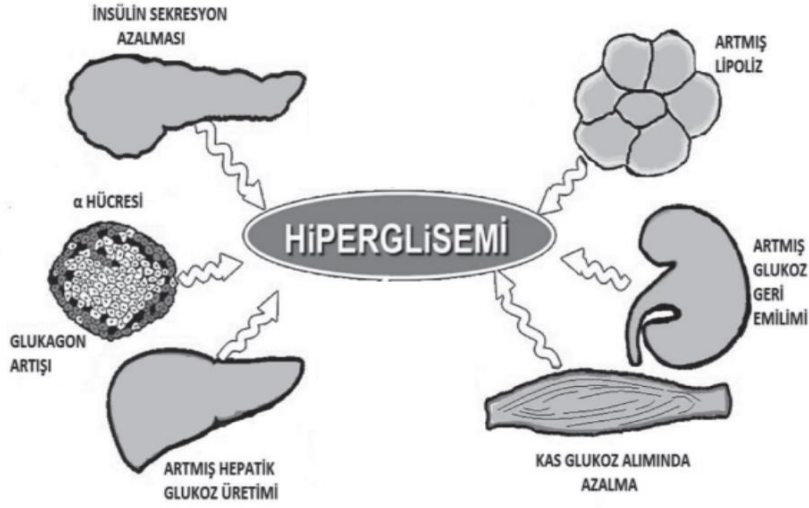
İnsülin direnci varlığında insülin, pankreas adacık hücrelerinden salgılanır fakat metabolik dokularda glikoz alımını tetikleyemez. Bu durum kan şekerinin ve insülin seviyelerinin yükselmesine neden olmaktadır. DMT2’de, insülin etkisinde ilerleyici bir azalma olmaktadır. Sonuçta glikozun dokulara taşınmasında insülin verimli bir şekilde kullanılamaz ve insülin reseptörlerinin de duyarısızlaşmasına neden olmaktadır. Bu durumda vücut glikoz homeostazını kolaylaştırmak için ek insülin üretmektedir. İnsülin direncindeki yüksek kan insülini, dislipidemi, yüksek tansiyon ve glukoz metabolizması değişikliğine neden olmaktadır [58]. Şekil 2.2 de DMT2 gelişimine neden olan patofizyolojik yollar gösterilmiştir [59].

Ekstra hepatic faktörler, hepatic glukoz üretimi ile başarısız insülin baskılanmasına neden olabilmektedir. İnsülin tarafından gerçekleştirilen pankreastan glukagon sekresyonunun baskılanma ve yine insülin tarafından gerçekleştirilen yağ dokusu lipolizinin inhibisyonunda aksaklıklar oluşabilmektedir. Bu durum metabolik hastalığı olan bireylerde karaciğer glukoz alımındaki bozulmayı şiddetlendirmektedir [60, 61].



Şekil 2.1. Toklukta sağlıklı ve insüline dirençli durumda hepatic substrat akışı [56].





Şekil 2.2. Tip 2 diyabet gelişimine neden olan patofizyolojik yollar [59].

Hiperinsülinemi varlığı, yüksek hepatic glukoz üretimi, glukoneogenez ve glikojenolizdeki artış ile ilgilidir. Diyet karbonhidratın önemli bir kısmı karaciğer tarafından glikojen olarak depolanmaktadır. Hepatic glikojen, glukozdan doğrudan veya dolaylı olarak sentezlenebilmektedir [62]. Daha sonra glikojenolizin aktivasyonu ile emilim sonrasında glikoz serbest bırakılmaktadır [63].

Glukoneogenez ise bir gecelik açlıktan sonra insanlarda toplam hepatic glikoz üretiminin yarısından sorumludur ve DM2'li bireylerde açlık hepatic glikoz üretimindeki artıştan sorumludur [64-66]. DM'de glukoneogenezin glikoz üretimine daha fazla katkısı olmaktadır [67, 68].

## 2.2. DİYABETES MELLİTUS'UN SINIFLANDIRILMASI

Amerikan Diyabet Derneği'nin (ADA) sınıflandırmasına göre diyabet hastalığı temelde dört gruba ayrılmaktadır [69, 70].

Çizelge 2.1. Diyabetes Mellitus'un etiyolojik sınıflandırmaları [71].

1. <b>Tip 1 Diyabetes Mellitus</b> (mutlak insülin eksikliğine yol açan otoimmün $\beta$ -hücre yıkımı)
2. <b>Tip 2 Diyabetes Mellitus</b> (çoğunlukla insülin direncinin olduğu, $\beta$ -hücresinde insülin sekresyonunun ilerleyici kaybı)
3. <b>Gestasyonel Diyabetes Mellitus</b> (gebeliğin ikinci veya üçüncü trimesterinde teşhis edilen ve aşkar olmayan diyabet)
4. <b>Diğer Nedenlere Bağlı Spesifik Diyabet Türleri</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Beta hücre fonksiyonunun genetik kusurları</li><li>• İnsülin etkisindeki genetik kusurlar</li><li>• Ekzokrin pankreas hastalıkları (pankreatit, travma/pankreatektomi, neoplazi, kistik fibroz, hemokromatoz)</li><li>• Endokrinopatiler (akromegali, cushing sendromu, glukagonom, feokromositoma, hipertiroidizm, somatostatinoma, aldosteronom )</li><li>• İlaç veya kimyasal kaynaklı (vacor, pentamidin, nikotinic asit, glukokortikoidler, tiroid hormonu, diazoksit, beta-adrenerjik agonistler, tiyazidler, fenitoin, alfa-interferon)</li><li>• Enfeksiyonlar (doğuştan kızamıkçık, sitomegalovirüs vb.)</li><li>• İmmun aracılı diyabetin yaygın olmayan formları</li><li>• Diyabetle ilişkili diğer genetik sendromlar (down Sendromu, klinefelter sendromu, turner sendromu, wolfram sendromu, friedreich ataksisi, huntington koresi, lawrence-moon beidel sendromu, miyotonik distrofi, porfiri, prader-willi sendromu)</li></ul>

### 2.2.1. Diyabetes Mellitus Tip 1 (DMT1)

DMT1, otoimmün veya idiyopatik beta hücre yıkımı neticesinde şiddetli insülin eksikliğinin oluşmasıdır [72]. Beta hücre yıkımında T hücrelerinin yanında makrofajlar da etkili olmaktadır. Sonuçta pankres  $\beta$ -hücre ölümü, insülin üretiminin eksikliği ve glikoz hassasiyeti oluşmaktadır [73]. DMT1'li hastalarda yaşam boyu insülin replasman tedavisi gerekli olmaktadır [74].

DMT1, açlık kan şekerinin yüksek olması, hiperglisemi semptomları ile herhangi bir zamanda ölçülen kan şekerinin yüksek olması ve HbA1c'nin % 6,5 veya daha yüksek olması ile teşhis edilmektedir [75]. Çizelge 2.2 de diyabetin tanı kriterlerinden bahsedilmiştir [71]. DM'nin gelişim sürecinde, diyabet tanı kriterlerini gözlenmeden açlık kan glukoz toleransında ve/veya tokluk kan glukoz toleransında bozulma

meydana gelebilir [76]. Çizelge 2.3 de bozulmuş açlık ve tokluk kan glukoz toleransları sunulmuştur [71].

DMT1 her yaşta teşhis edilebilmesine rağmen en sık çocukluk çağında görülmektedir.Yapılan çalışmalara göre çocuklarda DMT1 insidansı dünya çapında her yıl % 2-5 oranında artmaktadır [77] ve coğrafi bölgelere göre değişiklik göstermektedir; Asya ülkelerinde insidansı genellikle çok düşükken [78], bazı Avrupa ülkelerinde ise örneğin Finlandiya'da oranlar oldukça yüksektir [79].

Yetişkin bireyler arasında DMT1 ile DMT2 ayrımı zor olmaktadır. Yetişkin DMT1 hastalarını DMT2 hastalığı olanlardan ayırma girişimleri, yetişkinlerin gizli otoimmün hastalığı ve ketoza eğilimli diyabet olmak üzere yeni hastalık sınıflarının önerilmesiyle sonuçlanmıştır [80, 81].

Çizelge 2.2. Diyabetin tanı kriterleri [71].

Açlık Plazma Glukozu	≥ 126 mg/dl (7.0 mmol/L)
Plazma Glukoz konsantrasyonu (Son yemek tüketildikten sonra geçen zamana bakılmaksızın günün herhangi bir saatinde ölçülen plazma glukozu ve aynı zamanda poliüri, polidipsi veya açıklanamayan kilo kaybı gibi DM semptomlarının olması)	≥ 200 mg/dl (11.1 mmol/L)
Oral Glukoz Tolerans Testi Sonrası (75 g glikoz yüklemesinden 2 saat sonra ölçülen plazma glukozu)	≥ 200 mg/dl (11.1 mmol/L)
HbA1c	≥ % 6,5

Çizelge 2.3. Bozulmuş glukoz toleransı [71].

Bozulmuş Açlık Glukozu	110 - <126 arasında (6,1-7,0 mmol/L)
Bozulmuş Tokluk Glukozu (iki saatlik tokluk glukozu)	140 -<200 arasında (7,75-<11,1 mmol/L)

### 2.2.2. Diyabetes Mellitus Tip 2 (DMT2)

DMT2, çevresel ve genetik duyarlılıkların etkili olduğu karmaşık metabolik bir hastalıktır [82]. DMT2' nin dünya çapında 400 milyondan fazla insanı etkilediği tahmin edilmektedir ve prevalansı salgın boyutlarına ulaşmıştır [83]. DMT2'nin komplikasyon ve komorbiditesinde açlık ve tokluk hipergliseminin gelişmesi primer etken olarak gösterilmiştir [84]. DMT2, insülin direnci [85] ve adacıklardaki  $\beta$  hücre disfonksiyonu ile ilişkilidir ancak etiyojisi ve gelişim mekanizmaları hala tam olarak anlaşılammıştır. Açlık kan şekeri, iki saatlik tokluk kan şekeri, glikozillenmiş hemoglobin ve insülin direnci gibi klinik göstergeler DMT2'nin tanı ve sınıflandırmasında yaygın olarak kullanılmaktadır [86]. Çizelge 2.2 de diyabetin tanı kriterlerinden bahsedilmiştir [71]. Son yıllarda yapılan birçok çalışma çocuklarda ve ergenlerde DMT2'nin çarpıcı şekilde arttığını göstermiştir [87]. ADA, DMT2 için risk faktörüne sahip aşırı kilolu bireylerde 45 yaşından önce açlık veya rastgele kan glikozu ölçümü, oral glukoz tolerans testi veya HbA1c testinin dikkate alınmasını tavsiye etmektedir [88].

Diyabet tanısı olmayan 65 yaş ve üzerindeki bireylerde diyabet veya prediyabet riski için açlık plazma glukozu ve/veya HbA1c taramasının yapılması önerilmektedir [89].

### 2.2.3. Gestasyonel Diyabetes Mellitus (GDM)

GDM, gebelik sırasında gelişen ve hiperglisemi sonucunda insülin direncinin oluşması ile karakterize bir komplikasyondur. Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF) 2017 verilerine göre GDM, dünya çapındaki gebeliklerin yaklaşık % 14'ünü etkilemektedir [90]. GDM görülme sıklığı bir popülasyonda veya etnik grupta DMT2 prevalansı ile orantılı olarak değişmektedir. Afrikalı, Hispanik, Hintli ve Asyalı kadınlarda GDM prevalansı beyaz kökenli kadınlara göre daha yüksek olmaktadır [91].

Obezite, mikro besin eksiklikleri, gebelik yaşının büyük olması ve ailede insülin direnci veya diyabet öyküsünün bulunması GDM için risk faktörüdür. GDM sonrası kadınlarda DMT2 ve kardiyovasküler hastalık oluşma riski artmaktadır. Çocuklarda da ileri dönemlerde obezite, kardiyovasküler hastalık, DMT2 ve GDM gibi sağlık sorunları riski artmaktadır [92, 93].

İnsülin gereksinimleri hamilelik sırasında fizyolojik olarak artmaktadır [94]. Gebelik döneminde ilerleyici insülin direnci, hamileliğin ortalarından başlayarak gelişmektedir ve üçüncü trimestera kadar ilerlemektedir [95]. Tümör nekroz faktör-alfa (TNF)- $\alpha$ , plasental laktojen ve plasental büyüme hormonu dahil olmak üzere plasentadan salgılanan hormonlar ve adipokinler, gebelikte insülin direncinin olası nedenleridir [96].

Normal kiloda olan kadınlarda gebelik döneminde fizyolojik olarak artan insülin direnci riski ve genetik özellikler nedeniyle GDM'ye karşı duyarlılık gözlenmektedir [97]. Ancak çoğunlukla aşırı kilolu/obez kadınlar GDM'den etkilenmektedir [98].

#### **2.2.4. Diğer Nedenlere Bağlı Spesifik Diyabet Türleri**

##### **2.2.4.1. Monogenik Diyabet Sendromları**

Diyabetin monogenik formları orta veya şiddetli hiperglisemi ile sonuçlanan, pankreas beta hücrelerinin fonksiyonel kusurları ile karakterize edilen bir durumdur. Tek gen bozukluklarının nadir görülen heterojen bir grubunu temsil etmektedir [85, 99]. Pediatrik popülasyonda monogenik diyabetin sistematik olarak tarandığı birkaç çalışmada monogenik diyabetin tahmini prevalansının %1.1-4,2 olduğu bulunmuştur [100].

##### **2.2.4.2. Ekzokrin Pankreas Diyabeti (DEP)**

DEP, pankreas hasar gördüğünde ortaya çıkan bir diyabet şeklidir. DEP hem ekzokrin hem de endokrin işlev bozukluğu ile karakterizedir [101]. Hem akut hem de kronik pankreatit, DEP'nin en yaygın nedenidir. Diğer nedenleri ise cerrahi pankreas rezeksiyonu, pankreas kanseri, hemokromatozis ve pankreasın konjenital agenezisini içermektedir [102]. Çalışmalar DEP'in genellikle DMT2 ile karıştırıldığını söylemektedir [103].

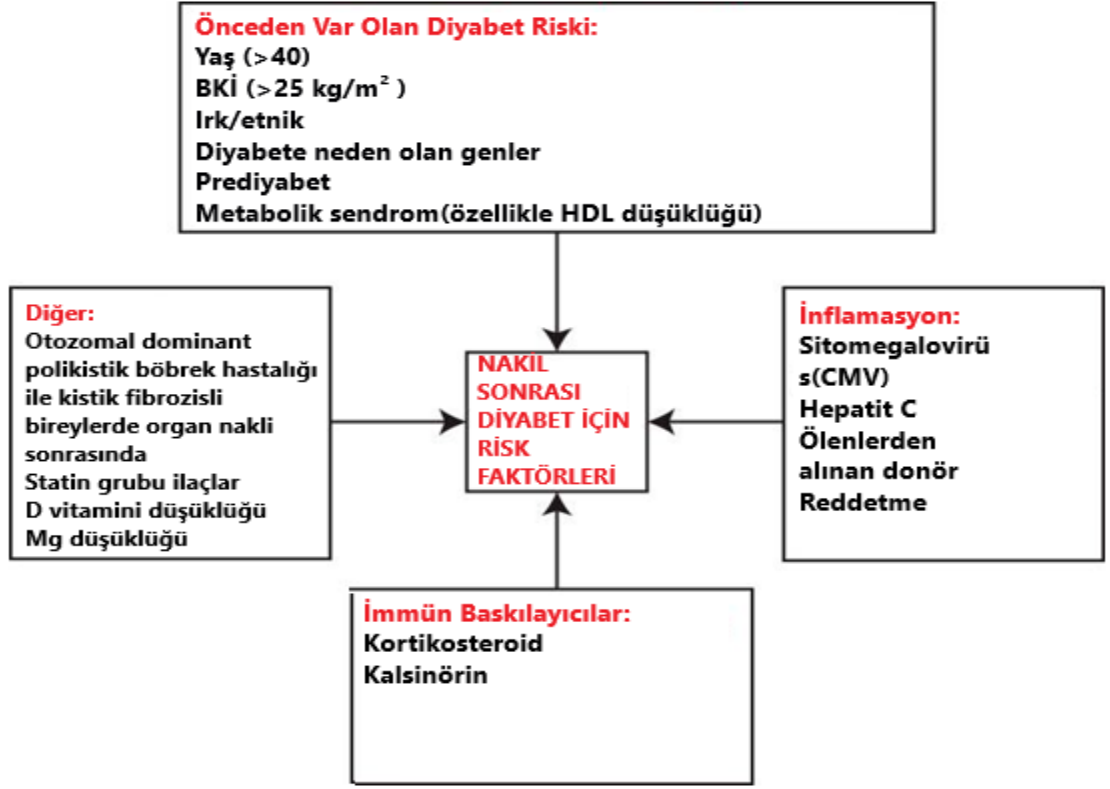
#### **2.2.4.3. İlaç veya Kimyasal Kaynaklı Diyabet**

Glukokortikosteroid, statin, diüretik ve beta bloker gibi ilaçlar hepatik glikoz üretimi, pankreatik insülin sekresyonu ve periferik dokulardaki insülin duyarlılığı üzerindeki etkilerinden dolayı diğer ilaçlara göre DMT2'yi daha çok indükleyebilmektedir [104].

#### **2.2.4.4. Organ Nakli Kaynaklı Diyabet**

DM, katı organ transplantasyonunun sık görülen bir sonucudur [105]. Yakın tarihli Uluslararası Konsensüs Kılavuzlarına göre, transplant olan kişi hastaneden taburcu edildikten sonra, organ nakli kaynaklı diyabet tanısı için ADA ve Dünya Sağlık Örgütü kriterlerinden herhangi biri kullanılabilir. Tanı için Açlık kan glukozunu >126 mg/dL (7 mmol/L) olması, diyabet semptomları ile birlikte rastgele ölçülen kan glukozunun >200 mg/dL (11.1 mmol/L) olması, 75 gram OGTT'den 2 saat sonra glukoz seviyesinin  $\geq$  200 mg/dl (11.1 mmol/l) olması ve HbA1c'nin > %6.5 olması kullanılabilir. Fakat HbA1c, nakilden sonraki ilk yıl içinde organ nakli kaynaklı diyabet tanısı için tek başına kullanılmamalıdır [106].

Organ nakli kaynaklı diyabet gelişiminde rol oynayan risk faktörleri, DMT2'ye sebep olan risk faktörleri ile ortaktır. Ancak DMT2 risk faktörlerine ek olarak bazı nakille ilgili risk faktörleri de mevcuttur. Bunlara immün baskılayıcılar ve enfeksiyon (hepatit C virüsü veya sitomegalovirüs gibi) örnek verilebilir. Nakilden hemen sonra kilo alımı yaygındır ve organ nakli kaynaklı diyabet gelişimi için bir başka önemli risk faktörüdür. Kilo alımı glukokortikoidlerin etkisinden kaynaklanabileceği gibi, hastanın nakil öncesine daha yüksek kalorili beslenmesinden de kaynaklanabilir [107]. Şekil 2.3 de nakil sonrası diyabete neden olan etmenler sunulmuştur [108].



Şekil 2.3. Nakil sonrası diyabete neden olan etmenler [108].

### 2.3. DİYABETES MELLİTUS'UN KOMPLİKASYONLARI

Diyabetik komplikasyonların altında yatan mekanizmalar arasında genetik ve epigenetik modifikasyonlar, beslenme faktörleri ve hareketsiz yaşam tarzı yer almaktadır [109]. Bunun yanında ROS'un aşırı üretimi ile oluşan oksidatif stresin de önemli rol oynadığına dair artan kanıtlar vardır [110]. Hem DMT1 hem de DMT2 hastalığının ortak özelliği olan hiperglisemi, ciddi komplikasyonlara neden olma potansiyeline sahiptir [111]. Diyabette ortaya çıkan komplikasyonlar, "mikrovasküler" (küçük kan damarlarının hasar görmesi) ve "makrovasküler" (atar damarlarının hasar görmesi) olarak gruplandırılmaktadır [112]. DM, makrovasküler komplikasyonların oluşumunu arttırmaktadır. Makrovasküler komplikasyonların başlıca klinik belirtileri koroner arter hastalığı, periferik arter hastalığı [113] ve felçtir. Özellikle, DM'li hastalarda ölümcül miyokard infarktüs ve inme riski 2-4 kat artmaktadır [114]. Ateroskleroz, endotel hücrelerindeki makrofajların ve T hücrelerinin damar duvarına bağlanmasına yol açtığı kronik bir durum olarak tanımlanmaktadır. Endotel hücreleri, oksitlenen düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) parçacıklarını kan dolaşımından

yakalamaya yatkındır [112]. Makrofajlar oksitlenmiş LDL'yi aldıklarında köpük hücrelerine dönüşür ve bunlar hasarlı endotel bölgesinde birirmektedir. Köpük hücrelerinin ve monositlerin kalsifiye düz kas hücreleriyle birleştiği kümeler, aterosklerotik plaklar olarak bilinmektedir. Köpük hücreleri kararsızdır ve sonunda parçalanarak kolesterol ve diğer bileşenlerini kana bırakır. Bu maddeler kalbe veya beyne giden kan akışını engelliyorsa sırasıyla miyokard infarktüsü veya felç olayı meydana gelmektedir [115].

Diyabete bağlı başlıca mikrovasküler komplikasyonlar ise nefropati, nöropati ve retinopatidir. Bu patolojik durumlar, proinflamatuvar belirteçlerin ve oksidatif stresin oluşumuna yol açan kronik hiperglisemi ile bağlantılıdır [116]. Ayrıca bu komplikasyonlar, diyabetle ilişkili önemli morbidite oranlarına sahiptir.

Diyabetik nefropati genellikle yüksek tansiyonun eşlik ettiği ve glomerüler filtrasyon hızında ilerleyici azalma ile karakterize bir hastalıktır. İdrar albumin atılımında da artış olmaktadır [117]. Diyabetik nefropati görülen bireylerde normal böbrek fonksiyonuna sahip bireylere göre 8 ila 10 kat kadar daha yüksek kardiyovasküler mortalite oranı görülmektedir [118].

Diyabetin en yaygın komplikasyonu olan diyabetik nöropati ise vücudun herhangi bir bölgesindeki sinir liflerine (çoğunlukla periferik duyu sinirleri) verilen hasarla karakterizedir. Diyabetik nöropatinin tespit edilen semptomları arasında uyuşma, yanma, görme bozukluğu, denge kaybı, atrofi ve kalp hastalıkları yer almaktadır [119]. Diyabetik nöropatinin patofizyolojisi, hem nöronları besleyen kan damarlarındaki işlev bozukluğunu hem de sinir hücrelerinin hiperglisemiye bağlı hasar görmesini içermektedir [112].

Retina lezyonları ve görme bozukluğu ile sonuçlanan diyabetik retinopati, dünya çapında yetişkinler arasında görülen ve önde gelen bir körlük nedenidir. Retinopati, kan-retina bariyerinin zayıflaması, vasküler bazal membranın kalınlaşması ve retina endotel hücrelerini çevreleyen kontraktıl hücrelerin (perisitler) ölümü ile karakterizedir [112]. Nöropati gibi, retinopatiye neden olan biyokimyasal mekanizmaların çoğu kronik hiperglisemi ile ilişkilidir [117].



## BÖLÜM 3

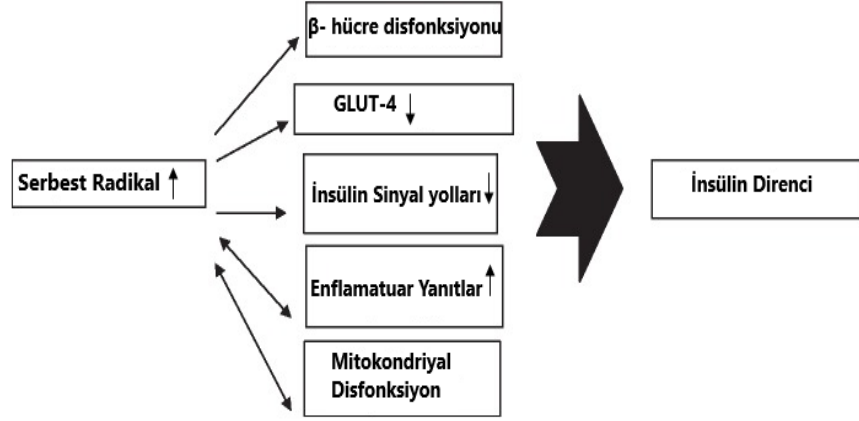
### OKSİDATİF STRES VE DİYABETES MELLİTUS

Oksidatif stres, DM insidansı ile yakından ilişkilidir. Oksidatif stress, hücrenin redoks dengesinde bir bozulma olduğunda meydana gelmektedir. Hücre zarı, DNA, protein ve lipid gibi hayati biyomoleküllere zarar vermektedir [120]. Süreç hem diyabetin başlamasını teşvik etmekte hem de hastalık durumunu ve buna bağlı komplikasyonları şiddetlendirmektedir. Ayrıca, oksidatif stres karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasının bozulması, mikro ve makrovasküler işlev bozuklukları gibi komplikasyonlara da neden olmaktadır [121].

Oksidatif stres hasarına karşı en hassas dokulardan biri pankreastır [122]. Diğer dokulara kıyasla zayıf anti-oksidatif sisteme sahip olduğundan diğer doku hücrelerine göre oksidatif hasara daha duyarlıdır. Çalışmalar, oksidatif stresin pankreas hücre fonksiyonunu azaltmada rol oynadığını göstermiştir. Oksidatif stres, gen ekspresyonunu etkilebilmenin yanında pankreas hücrelerinin apoptozunu indükleyebilmektedir [123].

Araştırmalar, DMT1'de otoimmün reaksiyonlar, sitokinler ve inflamatuvar proteinlerin neden olduğu bozulmuş beta hücre fonksiyonunda ROS'un rolünün olduğunu ileri sürmektedir [124]. Hipergliseminin de serbest radikal üretimi ve antioksidan savunma sistemlerinin baskılanması yoluyla oksidatif strese neden olduğu belirtilmiştir [125]. Kronik hiperglisemik koşullarda ROS üretilir, antioksidan enzimler ve enzimatik olmayan antioksidanlar çeşitli dokularda bu üretimi bastırmada rol almaktadır [126-128].

Oksidatif stres, insülin direnci patofizyolojisinde de kilit role sahiptir.  $\beta$ -hücre disfonksiyonu, inflamatuvar süreç, GLUT-4 regülasyonunun bozulması, mitokondriyal ve insülin sinyal yollarının disfonksiyonu ile periferik insülin duyarlılığı azalabilmektedir [15]. Şekil 3.1 de insülin direncine neden olan oksidatif stres ile ilişkili beş ana yolak gösterilmiştir [129].



Şekil 3.1. Oksidatif stresin beş ana moleküler yolağı ile insülin direnci [129].

### 3.1. ANTIÖKSİDAN SAVUNMA MEKANİZMASI

ROS, antioksidan mekanizmalar sayesinde yok edilebilmektedir [128]. Enzimatik antioksidanlar hücrede ROS yayılımına, oksidatif stres kaynaklı doku hasarına karşı savunma yapmaktadır [130]. Birincil enzimatik antioksidanlar, SOD, CAT ve glutatyon peroksidazdır (GSH-Px). Diğer antioksidan enzimler ise glutatyon-S-transferaz ve glukoz-6-fosfat dehidrojenazdır [131]. Eser elementler, antioksidan enzimlerin düzenlenmesinde kofaktör görevi görmektedir. Şekil 3.2 de ROS'un üretim ve tüketim yollarından bahsedilmiştir [132].

SOD, süperoksit ( $O_2^-$ ) radikalini yok eden, süperoksit tarafından verilen hasarı azaltmaya yardımcı olan ve hasarlı hücreleri onaran bir enzimdir. Bu antioksidan hem dermiste hem de epidermiste bulunmaktadır. Cilt oluşumuna yardımcı olan fibroblastların üretimini sağlamaktadır [133]. SOD, CAT veya GSH-Px tarafından da yok edilebilen  $O_2^-$ 'nin hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) indirgenmesini sağlamaktadır.

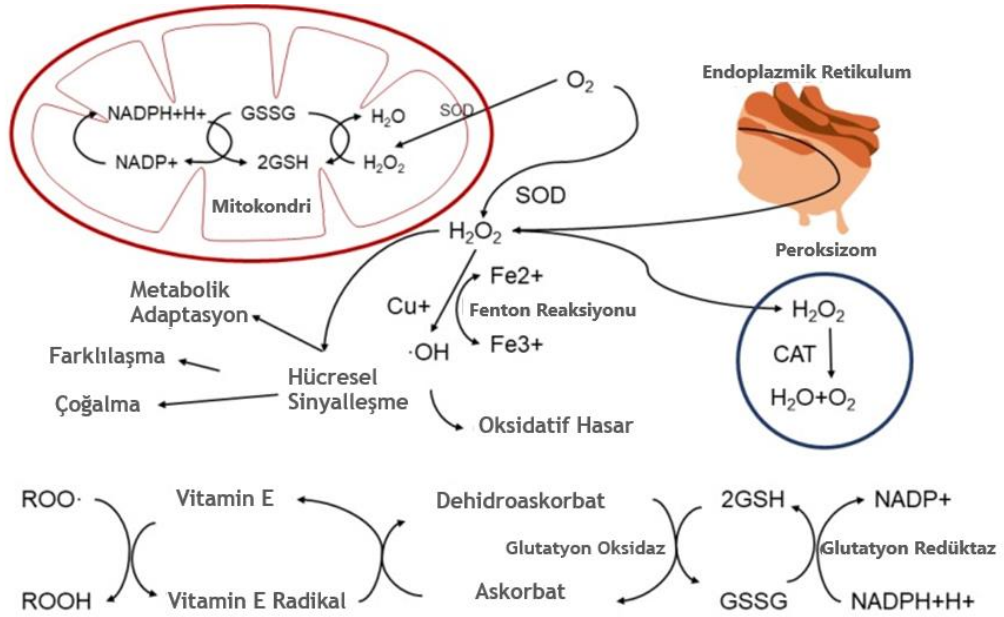
Bu enzim peroksinitrit oluşturmak için nitrik oksit (NO) ile rekabet etmektedir. Sonuç olarak SOD, NO'yu inaktive eden  $O_2^-$ 'yi temizleyerek, NO aktivitesini arttırmaktadır [134].

Antioksidan metabolizmasında önemli rolü olan GSH, sülfhidril içeren amino asitlerden sentezlenmektedir. Serbest radikalleri temizleyerek veya  $H_2O_2$ 'nin indirgenmesine katılarak oksidatif strese karşı birincil savunma mekanizmasını oluşturmaktadır [135]. GSH-Px, GSH'ın glutatyon disülfide oksidasyonunu sağlamaktadır ve daha sonra glutatyon redüktaz ile GSH'ye indirgenmesiyle peroksitleri ve hidroksil radikallerini toksik olmayan formlara dönüştürmektedir [131].

CAT önemli bir antioksidan enzimdir [136]. CAT'in merkezi rolü, aşırı  $H_2O_2$ 'yi ortadan kaldırmak ve hücrel redoks dengesini korumaktır. Serbest radikallere karşı ilk savunma hattı olan SOD,  $O_2^-$ 'nin  $H_2O_2$ 'ye dismutasyonunu katalize ederken, CAT ise  $H_2O_2$ 'yi moleküler oksijen ( $O_2$ ) ve suya ( $H_2O$ ) ayrıştırarak nötralize etmektedir [137].

Enzimatik olmayan antioksidanlar E, C ve A vitaminlerini içermektedir. ROS ve nitrojen türleri etkileşime girerek serbest radikal zincir reaksiyonlarını sonlandırmaktadırlar. Böylece ROS'u doğrudan nötralize ederek ROS'un yan etkilerine karşı önemli koruma sağlamaktadır [138]. Non enzimatik bu antioksidanlar kronik hastalık ve yaşlanma riskinin azaltılmasına da katkıda bulunmaktadırlar [139, 140]. Meyve ve sebzeler, vitamin C, vitamin E ve karotenoidler dahil olmak üzere diyet antioksidanlarının ana kaynaklarıdır. Polifenoller de doğal antioksidanlar olarak özellikle sebze ve meyvelerde bulunmaktadır [141].

Küçük moleküler ağırlıklı enzimatik olmayan antioksidanlar (tioredoksin, E ve C vitaminleri ve selenyum gibi eser metaller) doğrudan ROS temizleyicileri olarak işlev görmektedir [142]. Bilirubin,  $\alpha$ -tokoferol (E vitamini) ve  $\beta$ -karoten kanda bulunmaktadır. Albumin ve ürik asit plazmadaki antioksidan kapasitesinin % 85'ini oluşturmaktadır [143].

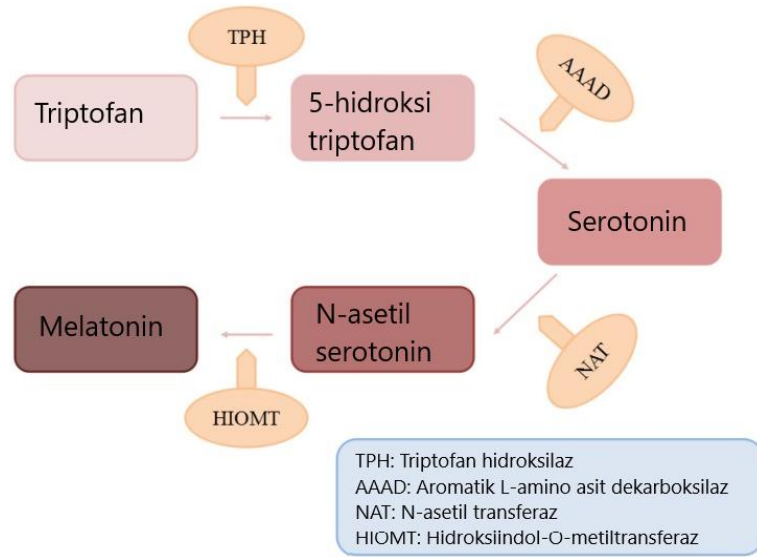


Şekil 3.2. Biyolojik sistemde ROS üretim ve tüketim yolları [132].

## BÖLÜM 4

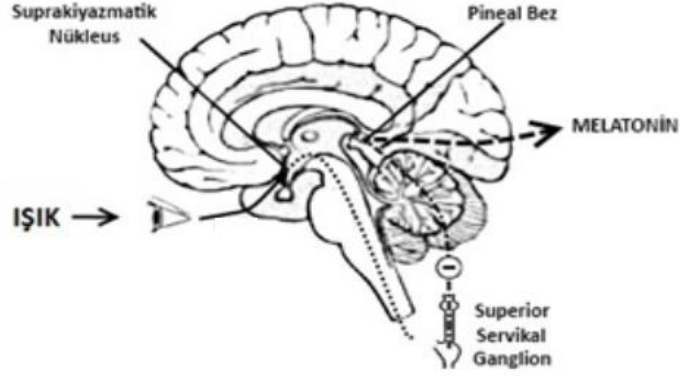
### MELATONİN VE DİYABETES MELLİTUS

Pineal bez, sirkadiyen ritmin düzenlenmesinde ve hormon sentezinde rol oynayan nöroendokrin organdır [144]. Pineal bezden salgılanan ana hormon melatonindir. Şekil 4.1 de melatonin biyosentezi gösterilmiştir. Melatonine ek olarak pineal bezde serotonin ve N,N-dimetil-triptamin sentezinin de olduğu bilinmektedir [145].



Şekil 4.1. Melatonin biyosentezi [26].

Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin) güçlü bir antioksidan aktiviteye sahiptir ve karanlık fazda sirkadiyen ritimde rol oynamaktadır [146, 147]. Melatonin üretimi gece artmakta ve gündüz vakti retinalar tarafından algılanan ışık tarafından baskılanmaktadır. Şekil 4.2. de melatonin sentezinin ışığın algılanması ile suprakiazmatik nükleus tarafından baskılanması gösterilmiştir [148]. Sirkadiyen ritimlerin düzenleyicisi olarak bilinen melatonin, vücudun çeşitli merkezi ve çevresel dokularında düzenleyici bir molekül olarak görev yapmaktadır [149].



Şekil 4.2. Melatonin sentezi ve ışığın algılanması [148].

Çalışmalarda melatoninin anti-diyabetik özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir. Hayvanlar üzerinde yapılan pinealektomi çalışmalarında düşük melatonin seviyelerinin diyabet hastalığına yatkınlığı artırabileceği kanıtlanmıştır [150]. Endojen glukoz üretiminde ve  $\beta$ -hücrelerinden insülin salgılanmasında [151] etkili olduğu bilinen melatoninin eksojen uygulanmasının insülin direncini ve bozulmuş glukoz toleransını azaltmada terapötik faydalar sağlayabileceği düşünülmektedir [152, 153]. Birçok çalışmada melatoninin insülin seviyelerini düşürmesinden dolayı  $\beta$ -hücresinin aktivitesi üzerinde baskılayıcı bir etkiye sahip olduğu sonucuna varılmıştır [154]. Artan insülin düzeyinin de epifiz bezi ve melatonin üzerinde inhibitör bir etki yarattığı anlaşılmıştır. Bu yüzden insülin ve melatonin arasında antagonist bir ilişki olduğu sonucuna varılmıştır. Bu durum, gün içinde melatonin konsantrasyonu düştüğünde insülin seviyelerinin yükselmesi, gece boyunca ise melatonin konsantrasyonu yükseldiğinde insülin seviyelerinin düşmesi sonucunda glikoz seviyelerinin yükselmesi ile açıklanabilmektedir [155].

## BÖLÜM 5

### SAFRAN VE DİYABETES MELLİTUS

Yaşam tarzı değişikliği ve özellikle beslenme yönetimi diyabet risk faktörlerinin kontrolünde faydalı olabilmektedir. Son zamanlarda antioksidan etkilere sahip bitkisel maddelere glisemi metabolizmasının düzenlenmesinde iyileştirici etkiye sahip olduklarından dolayı ilgi artmıştır [156].

Safran, Iridaceae familyasına ait sapsız bir bitki olan *Crocus sativus* L. çiçeğinin kurutulmuş stigmalarından elde edilmektedir. Renklendirici ve tatlandırıcı bir baharat olarak kullanılmaktadır [32, 157]. Tarihi 3000-4000 yıl öncesine dayanmaktadır ve birçok kıta ve medeniyetle ilişkilendirilmektedir. Şu anda, dünyanın ana safran üreticileri İran, Yunanistan, Fas, İspanya ve Hindistan'dır [158].

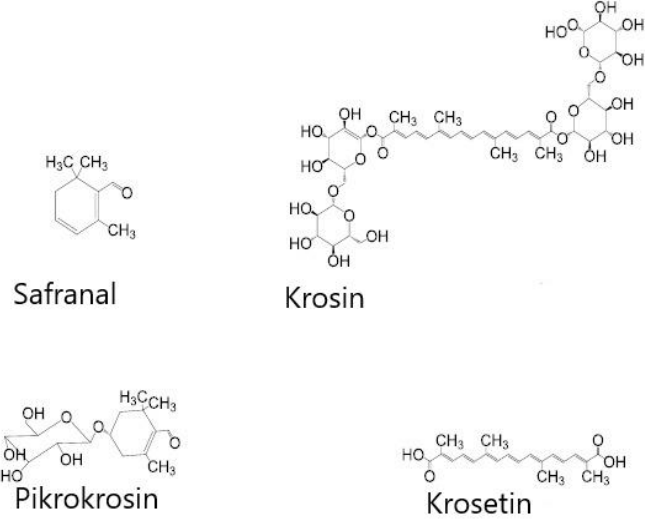
Safran, 10 ila 30 cm boyunda küçük ve çok yıllık bir bitkidir. Çiçek soğanının ortasından birkaç yaprak ve 2 ya da 3 çiçekle bitmektedir. Renk özelliği karotenoid ve likopen seviyesine bağlıdır (Şekil 5.1 ) [159].



Şekil 5.1. Safran [160].

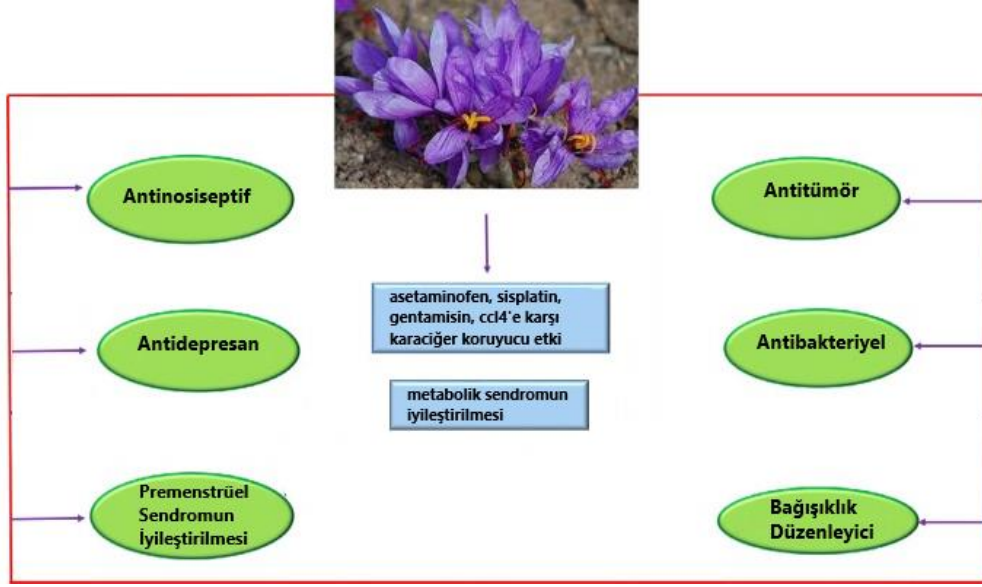
Safran, krosin, krosetin ve safranal gibi 100'den fazla aktif bileşen içermektedir. Safranın üç ana aktif maddesi vardır. Esas olarak safranı, stigmaların kırmızı pigmentasyonundan sorumlu olan krosin (8'-diapokaroten-8,8'-dioik asit) ( $C_{44}H_{64}O_{24}$ ), belirgin şekilde acı tadından sorumlu olan pikrokrosin ( $C_{16}H_{26}O_7$ ) ve safrana karakteristik koku veren aynı zamanda uçucu yağın ana bileşeni olan safranal (2 ,6,6-trimetilsikloheksan-1,3-dien-1-karboksaldehit) ( $C_{10}H_{14}O$ ) oluşturmaktadır [161]. Şekil 5.2 de safranın aktif maddelerinin kimyasal formülleri gösterilmiştir [162].





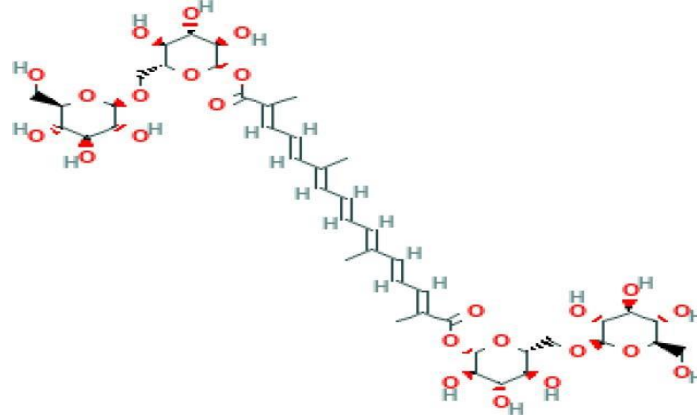
Şekil 5.2. Safranın aktif maddelerinin kimyasal formülleri [162].

Safranın antidepresan, nöroprotektif, antitümör, antikonvülzan, antihipertansif, anti-iskemik, hipolipidemik, antidiyabetik, antiaterosklerotik, antioksidan ve anti-inflamatuvar etkiye sahip olduğu çalışmalarda gösterilmiştir [163]. Şekil 5.3. de safran yaprağının farmakolojik özellikleri belirtilmiştir [164]. Safranın, krosin ve safranal biyoaktif bileşenleri oksidatif stresin yükünü azaltmaktadır [161]. Ayrıca antidiyabetik etkisi olan safran, insülin ile beraber kullanıldığında insülinin duyarlılığını arttırmaktadır [165]. STZ ile oluşturulan deneysel diyabet modelinde safran stigma özütü uygulanmasının, plazma lipid peroksidasyonunu iyileştirdiği gösterilmiştir [166].



Şekil 5.3. Safran yaprağının farmakolojik etkileri [164].

Krosin( $C_{44}H_{64}O_{24}$ ), *Crocus sativus* L'nin stigmalarının bir renk maddesi ve suda çözünür karotenoid pigmentidir (Şekil 5.4 ). Safran stigma kuru ağırlığının yaklaşık %10'unu oluştururlar [167].



Şekil 5.4. Krosinin kimyasal yapısı [164].

Krosin, yapısal proteinler, membran taşıyıcılar ve adenosin trifosfat (ATP) sentezi, redoks homeostazı ve sinyal iletiminde yer alan enzimler gibi çok çeşitli hücresel proteinlere bağlanmaktadır [168]. Krosinin, antioksidan, antihiperlipidemik, anti-inflamatuvar, antikanser, antiartritik, hepatoprotektif ve kardiyoprotektif etkiler dahil

olmak üzere birçok farmakolojik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir [169]. Krosin insülin direncini önemli ölçüde önlemektedir [170] ve hiperglisemiye karşı yararlı etkileri vardır [33]. Ayrıca obezite ve DMT2 komplikasyonlarını da azalttığı bilinmektedir [171]. Ek olarak diyabetik sıçanlarda krosin tedavisinin, pankreas  $\beta$ -adacıklarında apoptotik değişiklikleri inhibe ettiği bildirilmiştir [172]. Krosin, oksidatif stresle oluşan ROS oluşumunu baskılayabilmektedir. Çalışmalarda vücudun enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemini geliştirerek endojen savunmayı arttırdığı gösterilmiştir [173, 174]. Krosin aynı zamanda safradaki en güçlü antibakteriyel ajandır (gram-negatif bakterilere karşı). Krosinin yüksek antibakteriyel aktivitesi, yapısındaki alkolik gruplardan (-OH) kaynaklıdır [175].

## BÖLÜM 6

### DİYABETES MELLİTUS VE BESLENME

Beslenme tedavisinin diyabet yönetiminde bütünleyici bir rolü vardır [176]. Tıbbi beslenme tedavisi diyabetin önlenmesinde, diyabetin yönetilmesinde, diyabetin komplikasyonlarının oluşmasını önlemede ve oluşum hızını yavaşlatmada önemli rol oynamaktadır [177]. Beslenme tedavisi DMT1 ve DMT2’de glisemik kontrolün normal seviyelerde tutulması için gereklidir [178].

Tıbbi beslenme tedavisindeki klinik kılavuzlar, DMT1’li hastaların glisemik kontrolünü iyileştirmek için karbonhidrat sayımı öğrenmesini önermektedir. Karbonhidrat sayımı, temel ve ileri düzey olmak üzere iki farklı düzeyde tanımlanmıştır. Temel karbonhidrat sayımı, karbonhidrat içeren besinlerin tüketim zamana, türüne ve miktarına dikkat ederek beslenme, fiziksel aktivite ve plazma glikoz seviyeleri arasındaki ilişkinin anlaşılmasını içermektedir. İleri düzey karbonhidrat sayımı ise temel karbonhidrat sayımına hakim olan, yoğun insülin tedavisi gören ve karbonhidrat alımına göre insülinin nasıl ayarlanacağını öğrenmeye hazır olan hastaları kapsamaktadır [179].

DMT2’li hastalarda da diyet müdahalesi hedeflenen kilo ve glisemik kontrolün sağlanmasında etkilidir [180]. DMT2’li hastalar için kılavuzlara göre beslenme önerileri enerji alımını azaltarak başlangıçtaki vücut ağırlığında %5-10 kaybı teşvik etmek üzere tasarlanmıştır. Beslenme tedavisine göre makro besinlerin optimal dağılımı toplam enerjinin, % 45 ile % 60’nın karbonhidrat, %15 ile %20’inin protein ve %20 ile %35’inin yağ şeklinde olmasıdır [181].

## BÖLÜM 7

### GEREÇ VE YÖNTEM

#### 7.1.GEREÇ

##### 7.1.1. Kullanılan Malzemeler

Tez çalışmasında manyetik karıştırıcı, otomatik pipetler, hassas terazi, vortex, soğutma özelliği olan santrifüj cihazı (Nüve NF 1200R), mikrosantrifüj cihazı (Nüve NF 048), spektrofotometre cihazı (Thermo Fisher Multiskan Go 1510), UV/VIS Spektrofotometre, pH metre aleti, homejenizasyon cihazı (Hangzhou Bioprep-24) su banyosu (Nüve ST 30), mikropilaka yıkamada kullandığımız cihaz (Thermo Fisher Wellwash 888) çalışma esnasında kullanılan aletlerdir.

#### 7.2.YÖNTEM

##### 7.2.1. STZ ve Krosin Hazırlanması

pH 4.5'te 0.01 M sodium sitrat buffer içerisinde STZ çözüldü ve 50 mg/kg dozda ayarlanarak enjeksiyona hazırlanmıştır. Serum fizyolojik içerisinde çözdürülen krosin, 50 mg/ kg dozda ayarlanarak enjeksiyona hazırlandı ve hem STZ hem de krosin intraperitoneal (i.p.) enjekte edilmiştir [182, 183].

##### 7.2.2. Ratların Bakımı

Deneyde kullanılacak olan ve ağırlıkları 250-300 gram aralığındaki Wistar albino türünde 60 adet erkek sıçan Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi (ZBEÜN-DEHAM) biriminden

temin edilmiştir. Çalışmayı gerçekleştirmek için Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu onayı (Protokol No:2021-05-01/04) alınmıştır. Uygulamalar bu protokole uygun olarak yapılmıştır. Kafes temizliği gün aşırı yapılan sıçanların içme suları günlük olarak değiştirilmiştir. Sıçanların bulunduğu oda, ortam sıcaklığı 21°C, nem %55-60, ışık düzeyi ise 12 saat aydınlık/karanlık olacak şekilde dizayn edilmiştir. Sıçanlar, standart yem ile ad libitum olarak beslenmiştir.

### **7.2.3. Ratların Deney Protokolü**

60 adet sıçan her grupta 10 adet olacak şekilde rastgele aşağıdaki gibi 6 gruba ayrılmıştır:

**1. Grup: Kontrol grubu;** Bu gruptaki ratlara intraperitoneal (i.p.) olarak %0.9 serum fizyolojik uygulanmıştır.

**2. Grup: Sham+ STZ grubu;** Deneyin son günü (30. Gün) deneysel diyabet modeli oluşturmak için i.p. olarak 50 mg/kg dozda STZ enjeksiyonu yapılmıştır. Serum fizyolojik uygulamasına ise 15 gün boyunca i.p. olarak devam edilmiştir [182].

**3. Grup: Pinealektomi (PİN) grubu;** Deneyin ilk günü pinealektomi yapılan sıçanlara deneyin son gününden itibaren (30. Gün) i.p. serum fizyolojik 15 gün süre ile uygulanmıştır [184].

**4. Grup: PİN+STZ grubu;** Deneyin ilk günü pinealektomi yapılan sıçanlara deneyin son gününde (30. Gün) i.p. STZ enjeksiyonu yapılarak (50 mg/kg) deneysel diyabet modeli oluşturulmuştur. Serum fizyolojik uygulamasına ise 15 gün boyunca i.p. olarak devam edilmiştir [182, 184].

**5. Grup: PİN+Krosin grubu;** Deneyin ilk günü pinealektomi yapılan sıçanlara son gün (30. Gün) itibariyle i.p. olarak 15 gün süreyle krosin (50 mg/kg ) verilmiştir [183, 184].

**6. Grup: PİNΧ+STZ+Krosin grubu;** Deneyin ilk günü pinealektomi yapılan sıçanlara 30. günün sonunda i.p. olarak STZ enjeksiyonu (50 mg/kg doz) yapılarak diyabet oluşturulmuştur. Daha sonra i.p. krosin (50 mg/kg doz) 15 gün süreyle uygulanmıştır [182-184].

### **7.2.3.1. Pinealektomi Uygulaması**

İntraperitoneal 80 mg/kg dozda ketamin ve 8 mg/kg dozda xylazine uygulamasıyla ratlar anestezi altına alınmışlardır [185]. Stereotaksik çerçeveye sabitlenmiş sıçanın iki gözünün arasından geçecek şekilde burundan enseye doğru bir insizyon yapıldı. Periost sıyrılarak lambda bölgesi çalışmaya elverişli hale getirildi. Lambda bölgesinin sağ üst kısmından mikro freze matkap yardımıyla pensin rahatlıkla girebileceği bir alan oluşturuldu. Pens kullanılarak oluşturulan açıklıktan girilerek pineal bez özenle çıkarıldı [184].

### **7.2.3.2. Diyabet Modelinin Oluşumu**

Deneyin 30. gününde yapılan STZ enjeksiyonundan 72 saat sonra kuyruktan alınan kan glukometre (eBsensor, EMERGO EUROPE B.V., Prinsessegracht 20, 2514 AP, The Hague, Hollanda) yardımıyla ölçülmüştür. Kan glukoz seviyesi  $\geq 270$  mg/dl olan ratlar diyabetik kabul edilmiştir.

### **7.2.4. Numune Alınması**

Deney bittiğinde anesteziye alınan sıçanların abdominal veninden kan alınarak tüplere eklendi ve hayvanlar öldürüldü. Steril bir şekilde alınan karaciğer dokuları serum fizyolojik içerisinde yıkandı. İki eşit parçaya bölünen karaciğer dokusunun bir parçası histolojik değerlendirmeler için % 10'luk formol solusyonuna koyularak ayrılmıştır. Karaciğer dokusunun diğer parçası ise alüminyum folyo içerisinde sarıldı ve analiz yapılacak güne kadar derin dondurucuda  $-80$  C°'de saklanmıştır. Tüplerdeki kan numuneleri pıhtılaşma olmaması için oda koşullarında bir saat bekletildi ve 10 dakika 3500 rpm'de santrifüj edilerek serumlar elde edilmiştir. Bu serumlar ependorf tüplere

alındıktan sonra karaciğer fonksiyon testlerinin yapılması için analiz gününe kadar derin dondurucuda -80 C°'de muhafaza edilmiştir.

### **7.2.5. Biyokimyasal Analizler**

#### **7.2.5.1. Numunelerin Hazırlanma Aşamaları**

Karaciğer dokularının çalışılacağı gün bu dokular dondurucudan çıkarıldı. MDA, GSH, SOD, CAT analizi ile TAS, TOS, OSI ve protein düzeylerini belirlemek amacıyla tartılmıştır. % 10 homojenatlar fosfat tampon (pH:7.5) ilavesi elde edilmiştir. Numunelerin homojenizasyon işlemi 3 dakika 10.000 rpm'de homojenizatör (Hangzhou Bioprep-24) yardımıyla yapılmıştır. Homojenatlardan karaciğer dokusunun MDA seviyeleri belirlenmiştir. Süpernatant elde etmek için homojenatlar +4 °C'de 30 dakika boyunca 5000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar ise protein düzeyi, GSH, SOD ve CAT aktivitesi, TAS, TOS, ve OSI değerlerini tespit etmek için kullanılmıştır. Derin dondurucuda muhafaza edilen serumlar çalışma gününde dondurucudan çıkarıldıktan sonra oda ısısına getirilerek ve uygun kitler kullanılarak otoanalizörde ALT, AST, ALP ve glukoz seviyeleri belirlenmiştir.

#### **7.2.5.2. Oksidatif Stres Belirteçleri**

##### **Karaciğer Dokusunun Malondialdehit (MDA) Seviyesinin Belirlenmesi**

MDA düzeyi, karaciğer homojenatında Ohkawa vd. kullandığı yönteme göre yapılmıştır [186]. Kapaklı cam tüp içerisinde %0.6'lık tiyobarbitürik asit, %1'lik fosforik asit (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) ve karaciğer homojenatları karıştırıldı. Alüminyum folyo ile tüplerin kapakları 2-3 kat sarıldı ve kaynar su banyosunda 45 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra karışıma n-bütanol eklendi. Santrifüj edildikten sonra n-bütanol fazında oluşan pembe renk mikropelakaya kuyucuklarına deney grupları dikkate alınarak yerleştirildi. MDA seviyesini hesaplamak için 535 nm dalga boyunda ELİSA okuyucuda ölçüldü. Kör olarak n-bütanol kullanıldı ve standart olarak da



tetrametoksipropan kullanılmıştır. Ayrıca bulgular nanomol/g yaş doku şeklinde elde tespit edildi.

### **Karaciğer Dokusunun Redükte-Glutatyon (GSH) Seviyesinin Belirlenmesi**

Karaciğer doku süpernatantındaki GSH analizi Ellman'ın uyguladığı yöntem kullanılarak yapılmıştır [187]. Karaciğer süpernatantları deproteinize edildi. Daha sonra sarı-yeşil renk oluşabilmesi için ependorf tüp içersine deproteinize süpernatantlar ve 5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoik asit eklendi. GSH seviyesi, sarı-yeşil renk oluşumundan sonra deney gruplarına göre mikropalakalara yerleştirilerek 410 nm ELİSA okuyucuda ölçüldü. Distile su kör, 5mM/L'lik stok GSH çözeltisinden hazırlanan farklı dilüsyonlar standard olarak kullanılmıştır ve bulgular nanomol/g yaş doku şeklinde tespit edilmiştir.

### **Karaciğer Dokusunun Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Seviyesinin Belirlenmesi**

Karaciğer doku süpernatantındaki SOD aktiviteleri, Sun vd. yöntemi kullanılarak belirlenmiştir [188]. Deney ortamında oluşan süperoksit radikalleri, ortamdaki nitro blue tetrazolium'u indirger ve mavi renginde formazan oluşturur. Dokunun SOD aktiviteleri 560 nm'de ELİSA'da mavi renkli formazanın ölçülmesi ile belirlenmiştir ve bulgular U/g protein şeklinde tespit edilmiştir.

### **Karaciğer Dokusunun Katalaz (CAT) Enzim Seviyesinin Belirlenmesi**

Karaciğer doku süpernatantındaki CAT aktiviteleri Aebi vd. yöntemi kullanılarak yapılmıştır [189]. Süpernatant ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'li fosfat tamponu pH: 7.5 mM'de karıştırılmıştır. CAT aktivitesi, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi H<sub>2</sub>O ve O<sub>2</sub>'e parçalar ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin yıkımlanması absorbans azalması (240 nm'de) ile sonuçlanır. Absorbanstaki azalma 1 dakika süresince CAT aktivitesini hesaplamak için gözlenmiştir ve bulgular K/g protein olarak elde edilmiştir.

### **Karaciğer Dokusunun Protein Seviyesinin Belirlenmesi**

Karaciğer doku süpernatantındaki protein düzeyleri Lowry vd. yöntemine göre belirlendi [190]. Protein içeriğinin hesaplanması için Mavi renkli ürün 540 nm dalga boyunda ELİSA okuyucuda ölçüldü ve bulgular mg/ml şeklinde tespit edilmiştir.

### **Karaciğer Dokusunun Total Oksidan (TOS) Seviyesinin Belirlenmesi**

Karaciğer doku süpernatantında TOS düzeyleri Erel'in yöntemine göre ölçüldü [191]. Kit (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep Türkiye) prosedürüne göre çalışılmıştır. Oluşan renkli ürün ELİSA okuyucuda (660 nm'de) ölçüldü ve karaciğer TOS seviyesinin belirlenmesinde kullanılmıştır. 20 µmol/L'lik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solusyonu standart kullanıldı ve bulgular µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> equiv /L şeklinde tespit edilmiştir.

### **Karaciğer Dokusunun Total Antioksidan (TAS) Seviyesinin Belirlenmesi**

Karaciğer doku süpernatantında TAS düzeyleri Erel'in yöntemine göre yapılmıştır [192]. TAS ölçümünde kit (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, Türkiye) prosedürü uygulanmıştır. Prosedürde, 660 nm'de ilk okuma mikropalakalara eklenen süpernatant üzerine reaktif 1 eklenerek gerçekleştirildi ve daha sonra süpernatantlara reaktif 2 eklenerek ikinci okuma yapılmıştır. İki okumadaki absorbans farkı belirlendi. Sonuçta karaciğer TAS düzeyleri hesaplanmıştır. E vitamininin suda çözünür bir analogu olan Trolox kalibratör olarak kullanılmıştır. Bulgular mmol Trolox Equiv/L olarak elde edilmiştir.

### **Karaciğer Dokusunun Oksidatif Stres İndeksinin (OSI) Belirlenmesi**

OSİ düzeyi karaciğer doku süpernatantında Erel'in yöntemine göre hesaplanmıştır [192]. TOS'un TAS'a bölünmesi ile OSI değeri bulunur: OSI (Arbitrary Unit) = TOS (µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eqv/l)/[(TAS (mmol Trolox eqv/l)x10)]. Bulgular Arbitrary Unit (AU) şeklinde elde edilmiştir.

### **7.2.5.3. Karaciğer Fonksiyon Testleri**

Plazma AST seviyelerini (Architect/Aeroset Aspartate Aminotransferase Reagent Kit), ALT seviyelerini (Architect/Aeroset Alanine Aminotransferase Reagent Kit) ve ALP seviyelerini (Architect/Aeroset Alkaline Phosphatase Reagent Kit) belirlemek için kitler kullanıldı. Enzimatik-kolorimetrik yöntemle bir otoanalizörde (Architect C8000) belirlendi. Bulgular U/L şeklinde tespit edildi.

### **7.2.5.4. Karaciğer İnterlökin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) Seviyesinin Belirlenmesi**

Karaciğer dokusu IL-1 $\beta$  seviyesini belirlemek için BT LAB rat İnterlökin -1 $\beta$  ELİSA kiti kullanılmıştır (CAT NO:E0119Ra). Bulgular ng/ml şeklinde tespit edildi.

### **7.2.6. Histopatolojik Analiz**

Deney sonunda sıçanlar ketamin/ksilazin anestezisi altında sakrifiye edildi. Çıkarılan karaciğerler fikse olması için %10'luk nötral tamponlanmış formaline (NTF) (104003, Formaldehydesolution %37, Merck, ABD) konuldu. Karaciğerler daha sonra 3-4 mm'lik daha küçük parçalara ayrılıp, plastik doku takip kasetlerine konularak NTF'de 24 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  $\mu$ m'lik kesitler ışık mikroskopik ve immuno histokimyasal yöntemler için jelatin kaplı lamlara alındı. Hazırlanan lamalar dokunun lama adezyonunu artırmak için 37°C'lik etüvde 2 saat bekletildi. Kesitlere genel histolojik yapıyı gözlemlemek amacıyla Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama yöntemi uygulandı. Karaciğer hasarı, histopatolojik değişikliklerin derecesi ve yaygınlığına göre semikantitatif olarak belirlendi. Buna göre kesitler konjesyon, sinüzoidal dilatasyon ve inflamatuvar hücre infiltrasyonuyönünden 10 farklı alanda incelendi. Hasarın şiddetine

göre; 0 (değişiklik yok), 1 (hafif), 2 [193] ve 3 (ağır) olarak skorlandı. Maksimum hasar skoru 9 idi. Preparatlar Nikon Eclipse 80 ışık mikroskobu ve Nikon görüntü analiz sistemi ile incelenerek skorlandı ve fotoğrafları çekildi.

Çizelge 7.1. 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 (1.09253.2500, Papanicolaous Harris Hematoksilen, Merck, ABD)	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 (05-10003/L, Bio-optica, ITA)	1.5 dakika
% 80 Alkol yıkama	Daldır çıkar
% 96 Alkol yıkama	Daldır çıkar
% 96 Alkol yıkama	Daldır çıkar
Ksilol	30 dakika
Boyalı preparatlar entellan damlatılarak kapatıldı	

### 7.2.7. İmmünohistokimyasal Analiz

Kesitler deparafinizasyon aşaması için sırasıyla 60°C etüvde ve 60°C sıcaklıktaki ksilol içerisinde 1 saat bekletildi. Ardından anti-GLUT-1 antikoru ile IHC boyama protokolü uygulandı. Preparatlar entallen ile kapatılarak NikonEclipse80idigital kamera takılı ışık mikroskobu (Nikon, JAP) ile fotoğraflandı.

IHC değerlendirme: 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 skortlama yapıldı. Boyanma derecesi: 0 (boyanma yok), 1(zayıf boyanma), 2 (orta boyanma), 3 (güçlü boyanma) olarak değerlendirildi. Her kesit için immünohistokimyasal boyanma skortlaması, H-Skoru adı verilen ve (I x PC), (I: boyanmanın derecesi, PC: her derecede boyanan hücrelerin yüzdesi) formülüyle hesaplanan bir skortlama algoritması kullanılarak yapıldı.

Çizelge 7.2. IHC boyama protokolü

Sodyum sitrat solüsyonu 800 watt mikrodalga fırın (Profilo, TR)	10 dk
Soğuk su banyosu	20 dk
Distile su	5 dk
%3' lük H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (H1009, Sigma, ABD) solüsyonu	10 dk
PBS içerisinde	2x3 dk
Dokuları etrafı pappen (Z377821, Sigma, ABD) ile çizilir ve Serum bloklama solüsyonu (SHP 125, ScyTekLaboratories, ABD) damlatılır	10 dk
Serum bloklama solüsyonu dokudan uzaklaştırılır. Anti-GLUT-1 (0472R, Bioss, China) primer antikoru 1/100 oranında seyreltilerek damlatılır nemli ortamda +4°C' de inkübe edildi	Gece boyu
PBS tamponu içerisinde	2x3 dk
Primer ile uyumlu biyotinlenmişsekonder antikor (SHP 125, ScyTekLaboratories, ABD)	30 dk
PBS tamponu içerisinde	2x3 dk
Streptoavidin ile işaretli antikor (HRP) (SHP 125, ScyTekLaboratories, ABD)	30 dk
PBS tamponu içerisinde	2x3 dk
DAB (3,3-diaminobenzidine) (ACK 500, ScyTekLaboratories, ABD)	Gözle takip
Distile su ile yıkama	3 dk
MayersHematoksilen(M06002, Bio-optica, ITA)	1 dk
Çeşme suyu ile yıkama	5 dk
Distile su ile yıkama	2 dk

### 7.2.8. İstatistiksel Analiz

SPSS (SPSS for Windows version 14.0) istatistiksel yazılım programı kullanıldı. Sonuçlar aritmetik ortalama  $\pm$  standart hata (SE) şeklinde gösterildi. Shapiro Wilk normallik testi ile gruptaki değişkenlerde dağılımın normal olup olmadığı belirlendi ( $p>0.05$ ). Kruskal Wallis varyans analizi, değişkenlerin genel grup karşılaştırılmasında kullanılırken, Mann-Whitney  $U$  testi ikili grupların karşılaştırılmasında kullanılmıştır ve istatistiksel olarak  $p<0.05$  anlamlı kabul edilmiştir.

## BÖLÜM 8

### DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA

#### 8.1. BİYOKİMYASAL BULGULAR

##### 8.1.1. Karaciğer Oksidatif Stres İndekslerinin Düzeyi

Pinealektomi sonrası diyabet oluşturulmuş ve krosin tedavisi yapılmış deney hayvanlarının karaciğer dokusunda oksidatif hasarı ortaya koymak için MDA, GSH, TAS, TOS ve OSİ seviyeleri ile SOD ve CAT aktivite düzey düzeyleri ölçülmüştür. Karaciğer dokusuna ait MDA ve GSH değerleri Çizelge 8.1’de verilmiştir. Karaciğer dokusuna ait SOD ve CAT aktiviteleri ise Çizelge 8.2’de verilmiştir.

Çizelge 8.1. Ortalama karaciğer dokusu MDA ve GSH düzeyleri.

GRUPLAR	MDA (nmol/g yaş doku)	GSH (nmol/g yaş doku)
Grup 1: Kontrol	215.09±10.61	1253.60 ±80.86
Grup 2: Sham + STZ	701.92±16.56 <sup>a</sup>	486.45±38.42 <sup>a</sup>
Grup 3: PINX	342.05±12.66 <sup>a,c</sup>	782.27±38.32 <sup>a,c</sup>
Grup 4: PINX+ STZ	874.08±66.20 <sup>a,d,e</sup>	157.55±24.89 <sup>a,c,e</sup>
Grup 5: PINX + Crocin	173.93±6.17 <sup>b,c,e,f</sup>	1326.29±133.02 <sup>c,f,h</sup>
Grup 6: PINX + STZ + Crocin	506.60±16.97 <sup>a,c,e,f,g</sup>	658.21±36.23 <sup>a,c,f,g</sup>

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

<sup>a</sup> p< 0.001 vs grup 1    <sup>b</sup> p< 0.05 vs grup 1    <sup>c</sup> p< 0.001 vs grup 2    <sup>d</sup> p< 0.005 vs grup 2  
<sup>e</sup> p< 0.001 vs grup 3    <sup>f</sup> p< 0.001 vs grup 4    <sup>g</sup> p< 0.001 vs grup 5    <sup>h</sup> p< 0.005 vs grup 3



Çizelge 8.2. Ortalama karaciğer dokusu SOD ve CAT aktiviteleri

GRUPLAR	SOD (U/g protein)	CAT (K/g protein)
Grup 1: Kontrol	49.59±2.89	57.11±1.64
Grup 2: Sham + STZ	16.77±0.33 <sup>a</sup>	29.52±2.17 <sup>a</sup>
Grup 3: PINX	31.56±2.62 <sup>a,b</sup>	48.75±0.91 <sup>a,b</sup>
Grup 4: PINX+ STZ	9.70±1.89 <sup>a,b,c</sup>	17.41±0.62 <sup>a,b,c</sup>
Grup 5: PINX + Crocin	56.68±4.42 <sup>b,c,d</sup>	47.27±2.38 <sup>b,d,f</sup>
Grup 6: PINX + STZ + Crocin	32.22±2.18 <sup>a,b,d,e</sup>	39.96±1.82 <sup>a,c,d,g,h</sup>

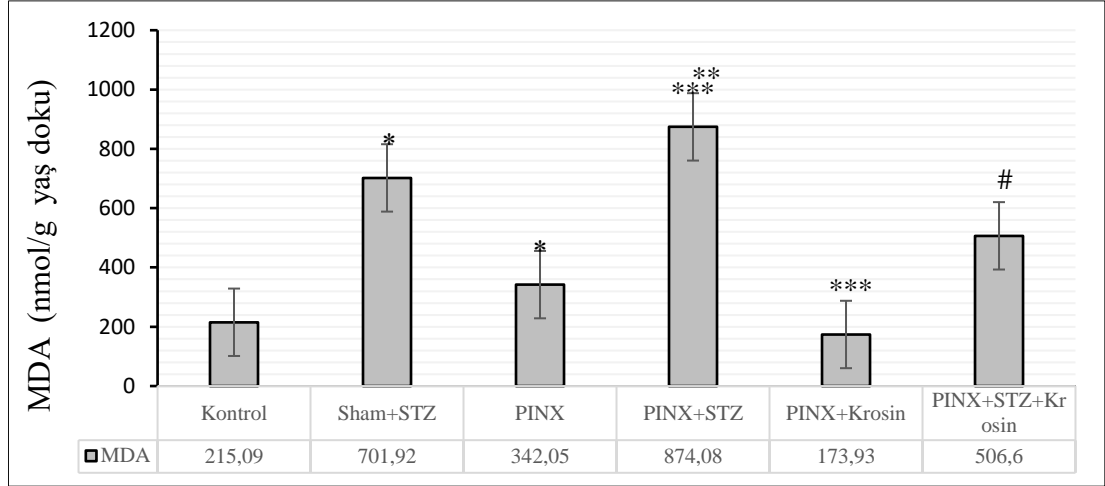
Veriler aritmetik ortalama±SE olarak ifade edildi (n=10).

<sup>a</sup>p< 0.001 vs grup 1 <sup>b</sup>p< 0.001 vs grup 2 <sup>c</sup>p< 0.001 vs grup 3 <sup>d</sup>p< 0.001 vs grup 4  
<sup>e</sup>p< 0.001 vs grup 5 <sup>f</sup>p< 0.005 vs grup 1 <sup>g</sup>p< 0.005 vs grup 2 <sup>h</sup>p< 0.05 vs grup 5

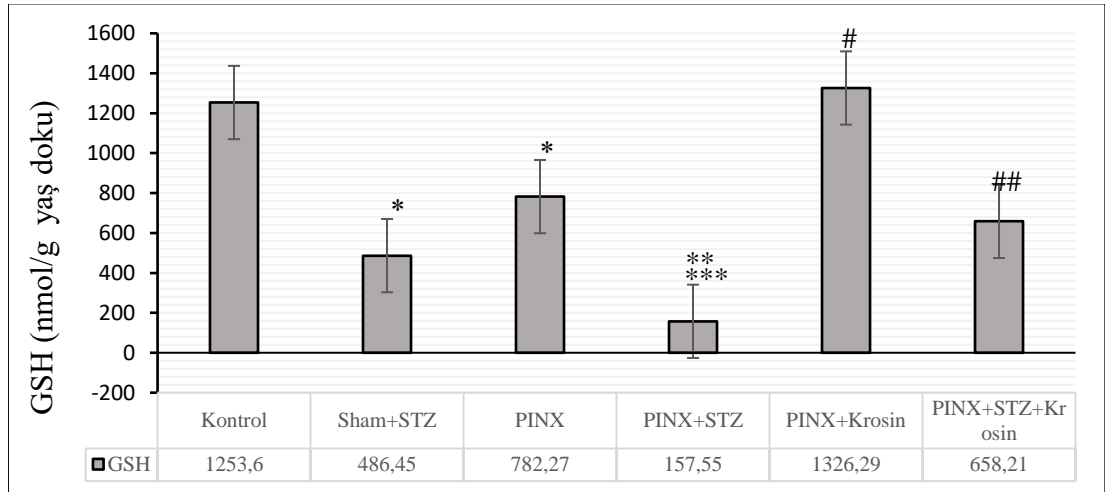
#### 8.1.1.1. Karaciğer Dokusu MDA ve GSH Düzeyleri

Sham için ayrılan sıçanlara STZ enjeksiyonu yapılması kontrol grubuna göre karaciğer MDA seviyelerinde ciddi artışa (p< 0.001) neden olurken, GSH seviyelerinde ise ciddi düşüşe (p< 0.001) neden olmuştur. Diğer yandan ratlara pinealektomi yapılması kontrol grubuna göre doku MDA seviyesinde artış (p< 0.001) olmasına, GSH seviyesinde ise ciddi düşüşe (p< 0.001) sebep olmuştur.

Ayrıca, hayvanların pinealektomi sonrası STZ indüksiyonu ile diyabet yapılması ise pinealektomi sonrası diyabet yapılmayan gruba göre (PINX) MDA seviyelerinde ciddi artışa (p< 0.001), GSH seviyelerinde ise artış oluşmasına neden olmuştur. Ancak pinealektomi ve diyabet oluşturulan hayvanların krosin ile tedavi edilmesi (PINX+STZ+Kr), tedavi yapılmayan gruba kıyasla (PINX+STZ) MDA ve GSH düzeylerinde ciddi iyileşmeler (p< 0.001) gözlenmesine neden olmuştur. MDA ve GSH değerleri Şekil 8.1 ve Şekil 8.2’de sunulmuştur.



Şekil 8.1. Ortalama karaciğer dokusu MDA değerleri (nmol/g yaş doku). Veriler aritmetik ortalama  $\pm$  SE olarak ifade edildi (n=10). \* p< 0.001 vs grup 1 \*\* p< 0.001 vs grup 2 \*\*\* p< 0.001 vs grup 3 # p< 0.001 vs grup 4

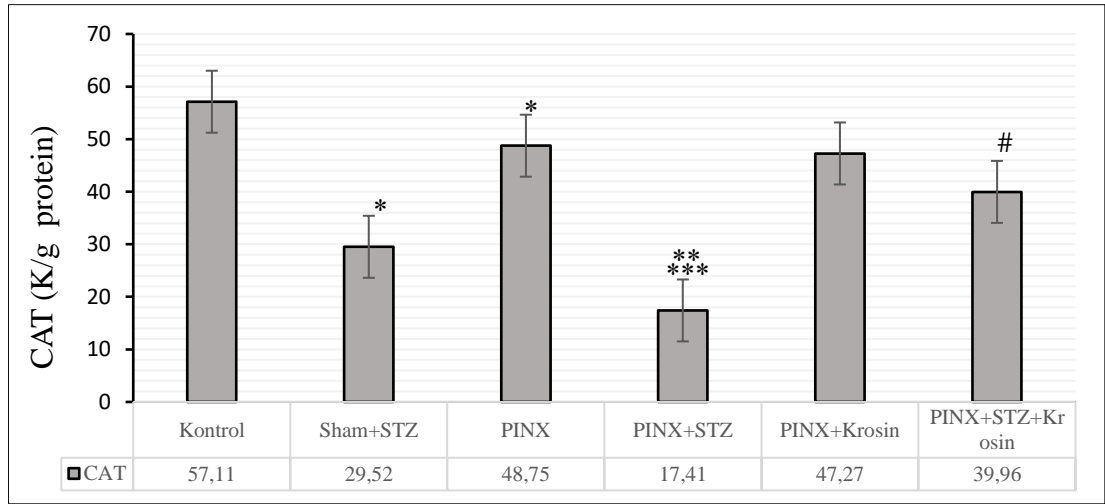


Şekil 8.2. Ortalama karaciğer dokusu GSH değerleri (nmol/g yaş doku). Veriler aritmetik ortalama  $\pm$  SE olarak ifade edildi (n=10). \* p< 0.001 vs grup 1 \*\* p< 0.001 vs grup 2 \*\*\* p< 0.001 vs grup 3 # p< 0.005 vs grup 3 ## p< 0.001 vs grup 4

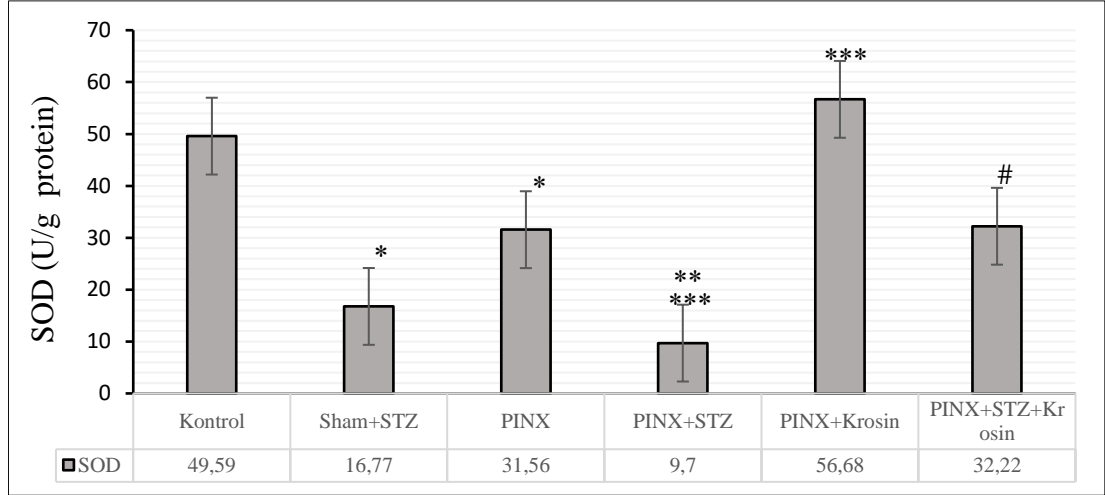
### 8.1.1.2. Karaciğer Dokusu Antioksidan Enzim Aktivite Düzeyleri

Sham sıçanlarının STZ ile diyabet yapılması kontrol grubuna kıyasla karaciğer dokusu antioksidan enzimlerinden SOD ve CAT aktivitelerinde ciddi aktivite kaybına (p< 0.001) neden olmuştur. İlave olarak sıçanlara pinealektomi operasyonu yapılması SOD ve CAT aktivitelerinde kontrol sıçanlarına göre önemli düşüşler (p< 0.001) görülmesine sebep olmuştur. Öte yandan, pinealektomi sonrası STZ enjeksiyonu ile

sıçanların diyabet yapılması karaciğer SOD ve CAT aktivitelerinde sadece pinealektomi yapılan gruba göre SOD ve CAT aktivitelerinde ciddi düşüşler ( $p < 0.001$ ) gözlenmesine neden olmuştur. Bununla birlikte pinealektomili ve diyabetli sıçanların krosin ile tedavi edilmesi (PINX+STZ+Kr), tedavi edilmeyen gruba (PINX+STZ) kıyasla antioksidan enzim aktivitelerinde ciddi iyileşmeler ( $p < 0.001$ ) oluşturmuştur. Karaciğer dokusu antioksidan enzim aktiviteleri Şekil 8.3 ve Şekil 8.4'de sunulmuştur.



Şekil 8.3.Ortalama karaciğer doku CAT değerleri (K/g protein).Veriler aritmetik ortalama  $\pm$  SE olarak ifade edildi (n=10). \*  $p < 0.001$  vs grup 1 \*\*  $p < 0.001$  vs grup 2 \*\*\*  $p < 0.001$  vs grup 3 #  $p < 0.001$  vs grup 4



Şekil 8.4.Ortalama karaciğer dokusu SOD değerleri (U/g protein). Veriler aritmetik ortalama±SE olarak ifade edildi (n=10). \*p< 0.001 vs grup 1 \*\* p< 0.001 vs grup 2 \*\*\* p< 0.001 vs grup 3 #p< 0.001 vs grup 4

### 8.1.1.3. Karaciğer dokusu Oksidan/Antioksidan Düzeyleri

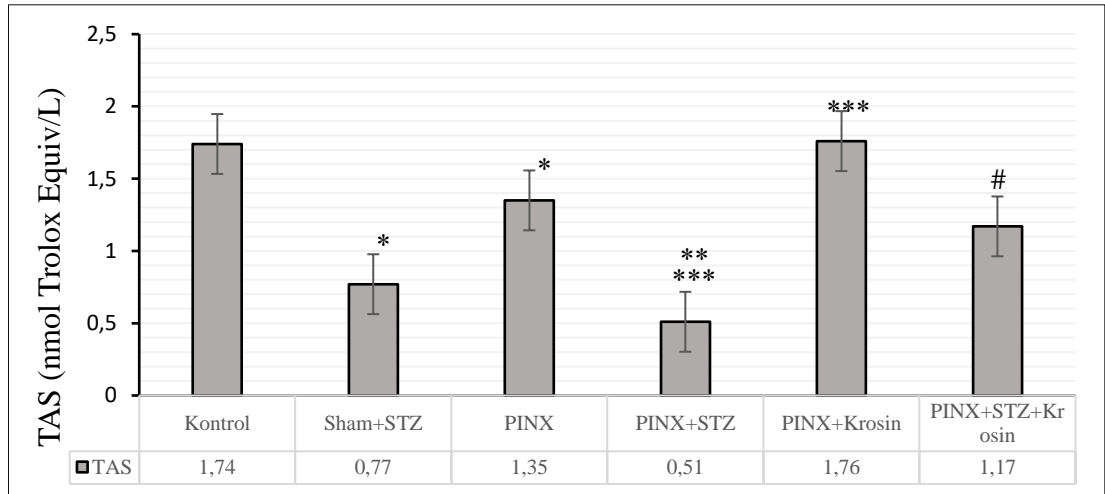
Sham grubu sıçanlarında STZ enjeksiyonu karaciğer dokusu TOS ve OSİ düzeylerinde kontrol sıçanlarına göre ciddi artışlar ( $p < 0.001$ ), TAS düzeylerinde ise ciddi düşümlere ( $p < 0.001$ ) neden olmuştur. Bununla birlikte sıçanların pinealektomi altına alınması karaciğerde oksidanlarda (TOS ve OSİ) artış ( $p < 0.001$ ), antioksidan düzeylerinde (TAS) ise ciddi düşümlere ( $p < 0.001$ ) sebep olmuştur. Ayrıca pinealektomi sonrası hayvanların diyabet yapılması (PINX+STZ), diyabet yapılmayan pinealektomili sıçanlara göre oksidanlarda daha da artışa ( $p < 0.001$ ), antioksidanlarda ise düşüme neden olmuştur. Ancak pinealektomili ve diyabetli hayvanlara krosin tedavisi (PINX+STZ+Kr), tedavi yapılmayan gruba göre (PINX+STZ) karaciğer dokusu oksidan/antioksidan dengede ciddi iyileşmeler ( $p < 0.001$ ) gözlemlenmesine sebep olmuştur. Karaciğer dokusu TAS, TOS ve OSİ seviyeleri Şekil 8.5, Şekil 8.6, Şekil 8.7 ve Çizelge 8.3’de verilmiştir.

Çizelge 8.3. Karaciğer TAS, TOS ve OSI ortalama düzeyleri.

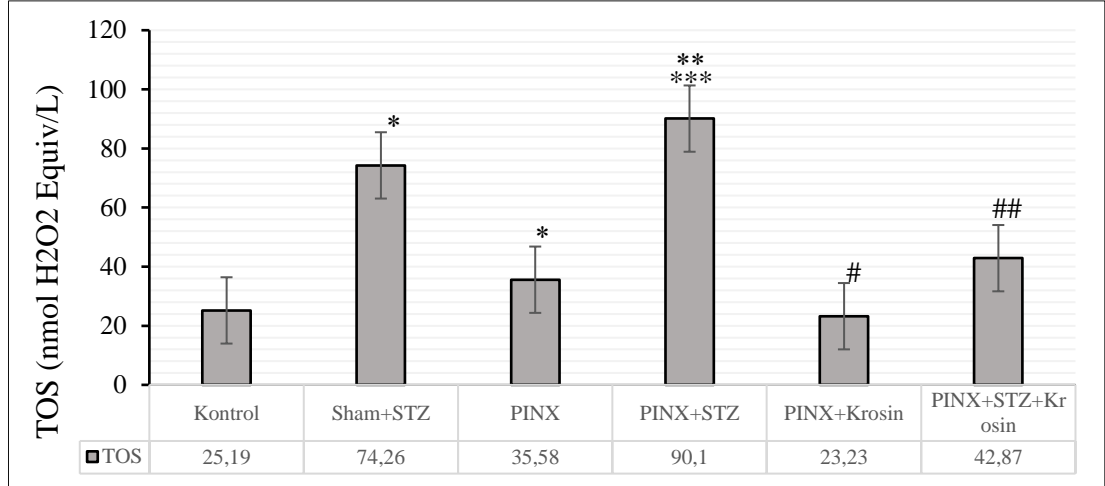
GRUPLAR	TAS (nmol Trolox Equiv/L)	TOS (µmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Equiv/L)	OSI (Arbitrary Unit)
Grup 1: Kontrol	1.74±0.03	25.19±1.39	1509.78±91.06
Grup 2: Sham + STZ	0.77±0.02 <sup>a</sup>	74.26±3.33 <sup>a</sup>	9377.81±421.84 <sup>a</sup>
Grup 3: PINX	1.35±0.01 <sup>a,b</sup>	35.58±1.72 <sup>a,b</sup>	2638.51±115.89 <sup>a,b</sup>
Grup 4: PINX+ STZ	0.51±0.01 <sup>a,b,c,d</sup>	90.10±5.30 <sup>a,f,c</sup>	15523.03±906.52 <sup>a,b,c</sup>
Grup 5: PINX + Crocin	1.76±0.04 <sup>b,c</sup>	23.23±1.48 <sup>b,c,d</sup>	1332.96±75.19 <sup>b,c,d</sup>
Grup 6: PINX + STZ + Crocin	1.17±0.02 <sup>a,b,c,d,e</sup>	42.87±1.84 <sup>a,b,d,e,g</sup>	3737.25±165.78 <sup>a,b,c,d,e</sup>

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

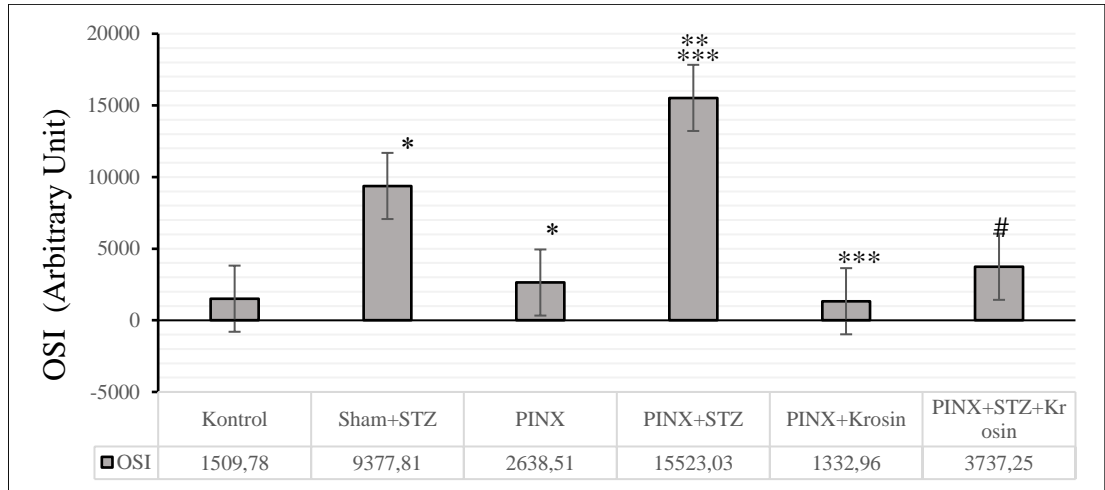
<sup>a</sup> p< 0.001 vs grup 1 <sup>b</sup> p< 0.001 vs grup 2 <sup>c</sup> p< 0.001 vs grup 3 <sup>d</sup> p< 0.001 vs grup 4  
<sup>e</sup> p< 0.001 vs grup 5 <sup>f</sup> p< 0.05 vs grup 2 <sup>g</sup> p< 0.05 vs grup 3



Şekil 8.5. Ortalama karaciğer TAS değerleri (nmol Trolox Equiv/L). Veriler aritmetik ortalama±SE olarak ifade edildi (n=10). \* p< 0.001 vs grup 1  
\*\* p< 0.001 vs grup 2 \*\*\* p< 0.001 vs grup 3 # p< 0.001 vs grup 4



Şekil 8.6. Ortalama karaciğer TOS değerleri (nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Equiv/L). Veriler aritmetik ortalama±SE olarak ifade edildi (n=10). \* p< 0.001 vs grup 1 \*\* p< 0.05 vs grup 2 \*\*\* p< 0.001 vs grup 2 #p< 0.001vs grup 3 ##p< 0.001vs grup 4



Şekil 8.7. Ortalama karaciğer OSI değerleri (Arbitrary Unit). Veriler aritmetik ortalama ± SE olarak ifade edildi (n=10). \* p< 0.001 vs grup 1 \*\* p< 0.001 vs grup 2 \*\*\* p< 0.001 vs grup 3 #p< 0.001vs grup4

#### 8.1.1.4. Serum Karaciğer Fonksiyon Testlerinin Düzeyleri

Hayvanlarda STZ ile diyabet yapılması serum karaciğer enzimleri olan AST, ALT ve ALP düzeylerinde kontrole kıyasla ciddi artış (p< 0.001) oluşturmuştur. Sıçanların pinealektomi altına alınması kontrole kıyasla ALT enziminde anlamlı değişikliğe sebep olmazken AST ve ALP seviyelerinde anlamlı artışlara (p< 0.05) sebep olmuştur. İlave olarak, pinealektomi ile birlikte hayvanların diyabet yapılması (PINX+STZ), pinealektomili sıçanlara kıyasla enzimlerde ciddi (p< 0.001) artışlara neden olmuştur.

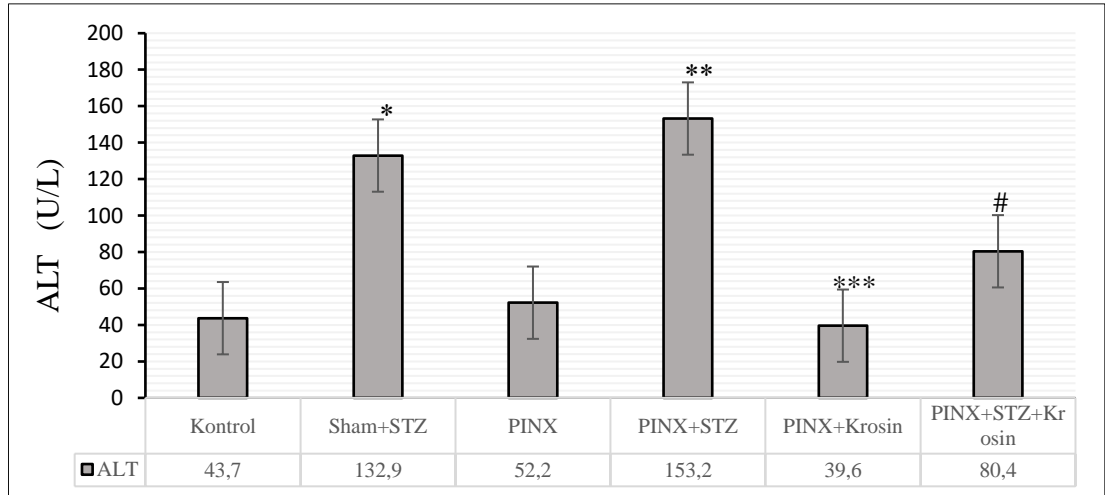
Diğer yandan pinealektomili ve diyabetli hayvanların krosin ile tedavisi (PINX+STZ+Kr) tedavi yapılmayan sıçanlara kıyasla (PINX+STZ) serum karaciğer enzimlerinde ciddi geri dönüş ( $p < 0.001$ ) oluşmasına neden olmuştur. Serum ALT, AST ve ALP düzeyleri Şekil 8.8, Şekil 8.9, Şekil 8.10 ve Çizelge 8.4’de sunulmuştur.

Çizelge 8.4. Ortalama serum ALT, AST ve ALP düzeyleri.

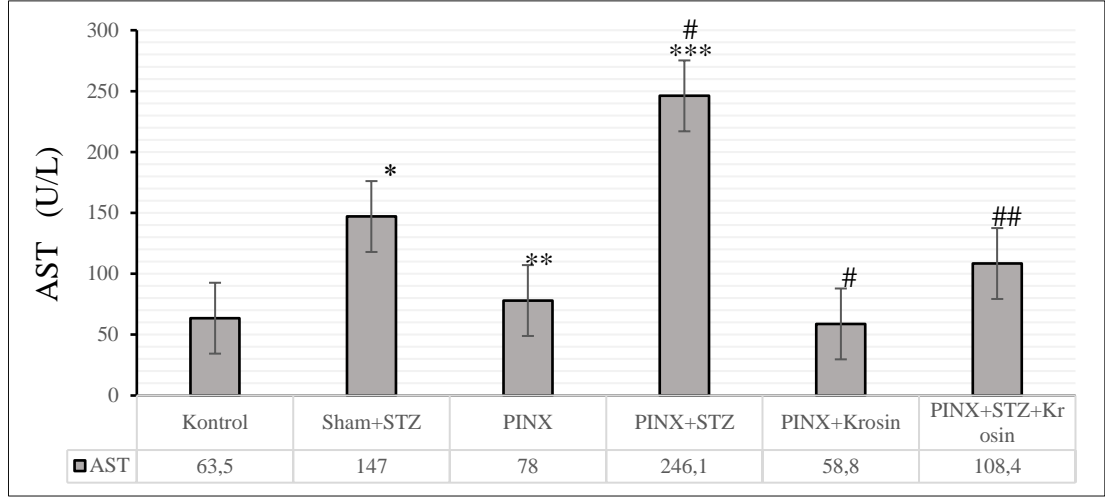
GRUPLAR	ALT	AST	ALP
Grup 1: Kontrol	43.70±2.35	63.50±3.76	74.50±2.39
Grup 2: Sham + STZ	132.90±19.30 <sup>a</sup>	147.00±14.39 <sup>a</sup>	268.30±29.67 <sup>a</sup>
Grup 3: PINX	52.20±3.45 <sup>b</sup>	78.00±3.41 <sup>b,k</sup>	82.70±2.55 <sup>k,b</sup>
Grup 4: PINX+ STZ	153.20±23.92 <sup>a,d</sup>	246.10±35.15 <sup>a,d,c</sup>	412.40±40.12 <sup>a,c,d</sup>
Grup 5: PINX + Crocin	39.60±2.07 <sup>b,e,f</sup>	58.80±2.50 <sup>b,d,h</sup>	77.10±3.56 <sup>b,h</sup>
Grup 6: PINX + STZ + Crocin	80.40±9.72 <sup>a,c,e,g,h</sup>	108.40±12.95 <sup>a,h,b,e,l</sup>	144.20±14.34 <sup>a,b,d,h,l</sup>

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

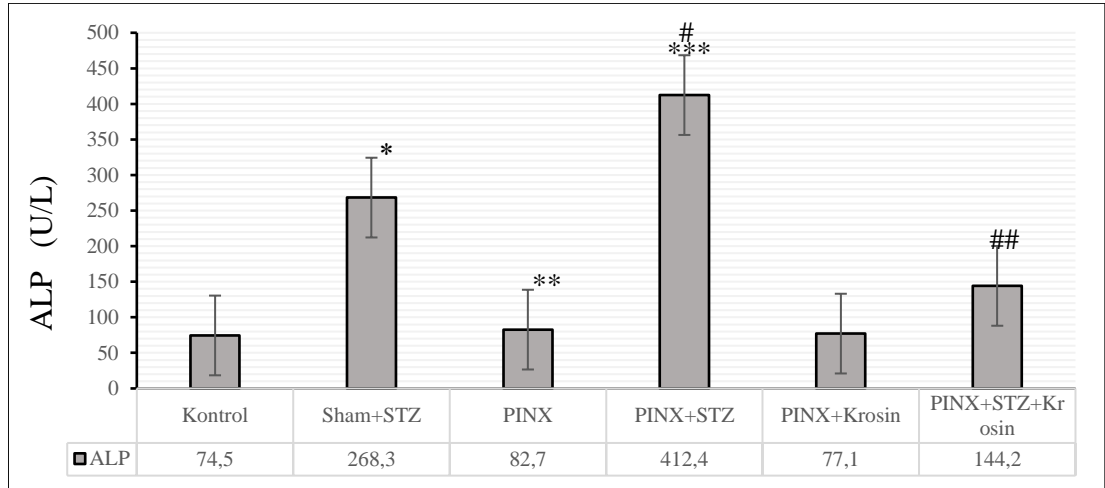
<sup>a</sup>  $p < 0.001$  vs grup 1   <sup>b</sup>  $p < 0.001$  vs grup 2   <sup>c</sup>  $p < 0.01$  vs grup 2   <sup>d</sup>  $p < 0.001$  vs grup 3  
<sup>e</sup>  $p < 0.005$  vs grup 3   <sup>f</sup>  $p < 0.001$  vs grup 4   <sup>g</sup>  $p < 0.005$  vs grup 4   <sup>h</sup>  $p < 0.001$  vs grup 4  
<sup>k</sup>  $p < 0.05$  vs grup 1   <sup>l</sup>  $p < 0.001$  vs grup 5



Şekil 8.8. Ortalama serum ALT düzeyleri. Veriler aritmetik ortalama ± SE olarak ifade edildi (n=10). \*  $p < 0.001$  vs grup 1   \*\*  $p < 0.001$  vs grup 3  
\*\*\*  $p < 0.005$  vs grup 3   #  $p < 0.005$  vs grup 4



Şekil 8.9. Ortalama serum AST düzeyleri. Veriler aritmetik ortalama  $\pm$  SE olarak ifade edildi (n=10). \* p< 0.001 vs grup 1 \*\* p< 0.05 vs grup 1 \*\*\* p< 0.01 vs grup 2 # p< 0.001vs grup 3 ##p< 0.001vs grup 4



Şekil 8.10. Ortalama serum ALP düzeyleri. Veriler aritmetik ortalama $\pm$ SE olarak ifade edildi (n=10). \* p< 0.001 vs grup 1\*\* p< 0.05 vs grup 1 \*\*\* p< 0.01 vs grup 2 #p< 0.001vs grup 3 ##p< 0.001vs grup 4

### 8.1.1.5. Serum Glukoz Düzeyleri

Hayvanların STZ ile diyabet yapılması (Sham+STZ ve PINX+STZ) kontrol sıçanlarına göre serum glukoz düzeylerinde ciddi artışlar (p< 0.001) oluşturmuştur. Diğer yandan pinealektomili ve diyabetli hayvanlara krosin tedavisi yapılması (PINX+STZ+Kr) diğer diyabetli gruplara kıyasla (Sham+STZ ve PINX+STZ) serum glukoz düzeylerinde ciddi iyileşmeler (p< 0.001) gözlemlenmesine sebep olmuştur.



Ortalama serum glikoz düzeyleri Çizelge 8.5’de, ortalama açlık kan glikoz düzeyleri Şekil 8.11’de sunulmuştur.

Çizelge 8.5. Ortalama serum glikoz düzeyleri.

GRUPLAR	Glikoz
Grup 1: Kontrol	83.90±2.34
Grup 2: Sham + STZ	403.20±31.35 <sup>a</sup>
Grup 3: PINX	87.20±2.01 <sup>b</sup>
Grup 4: PINX+ STZ	462.60±15.13 <sup>a,c</sup>
Grup 5: PINX + Crocin	81.90±3.22 <sup>b,d</sup>
Grup 6: PINX + STZ + Crocin	160.80±19.45 <sup>a,b,c,d,e</sup>

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

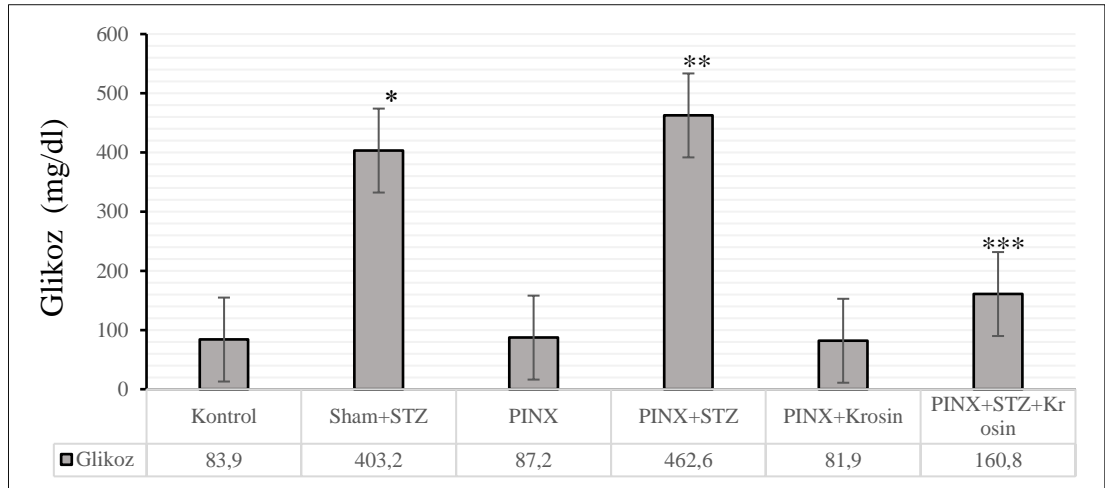
<sup>a</sup> p< 0.001 vs grup 1

<sup>b</sup> p< 0.001 vs grup 2

<sup>c</sup> p< 0.001 vs grup 3

<sup>d</sup> p< 0.001 vs grup 4

<sup>e</sup> p< 0.001 vs grup 5



Şekil 8.11. Ortalama açlık kan glikoz düzeyleri Veriler aritmetik ortalama±SE olarak ifade edildi (n=10). \* p< 0.001 vs grup 1 \*\* p< 0.001 vs grup 3 \*\*\* p< 0.001 vs grup 4

#### 8.1.1.6. Karaciğer Dokusu İnflamasyon Belirteç Düzeyi

Sham sıçanlarına STZ enjeksiyonu karaciğerde inflamasyona sebep olarak IL-1 $\beta$  düzeylerinde kontrole kıyasla ciddi artış (p< 0.001) yapmıştır. Diğer yandan sıçanların

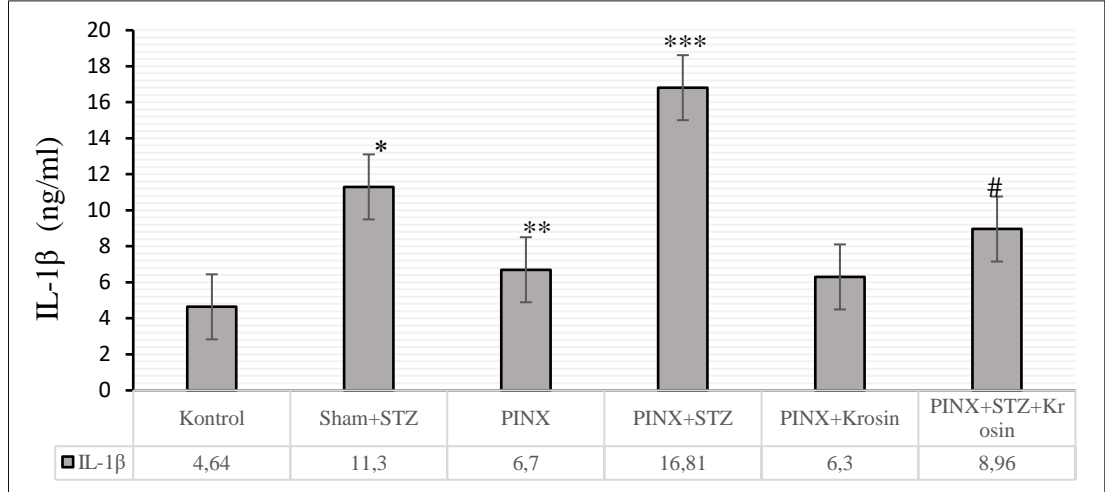
pinealektomi altına alınması IL-1 $\beta$  düzeylerinde kontrole kıyasla anlamlı artış ( $p < 0.01$ ) oluşmuştur. İlave olarak pinealektomi ile birlikte diyabetli sıçanların karaciğer dokusunda IL-1 $\beta$  seviyelerinin yalnız pinealektomili sıçanlara göre daha da artmasına ( $p < 0.001$ ) neden olmuştur. Diğer yandan pinealektomili ve diyabetli hayvanlara krosin tedavisi (PINX+STZ+Kr) tedavisiz gruba göre (PINX+STZ) inflamasyondaciddi baskılanma ( $p < 0.005$ ) oluşturmuştur. Ortalama Karaciğer IL-1 $\beta$  düzeyleri Çizelge 8.6’de, Ortalama serum IL-1 $\beta$  düzeyleri Şekil 8.12’de sunulmuştur.

Çizelge 8.6. Ortalama Karaciğer IL-1 $\beta$  düzeyleri.

GRUPLAR	IL-1 $\beta$
Grup 1: Kontrol	4.64 $\pm$ 0.24
Grup 2: Sham + STZ	11.30 $\pm$ 1.18 <sup>a</sup>
Grup 3: PINX	6.70 $\pm$ 0.75 <sup>b,c</sup>
Grup 4: PINX+ STZ	16.81 $\pm$ 1.97 <sup>a,e</sup>
Grup 5: PINX + Crocin	6.30 $\pm$ 0.46 <sup>b,d,g</sup>
Grup 6: PINX + STZ + Crocin	8.96 $\pm$ 0.84 <sup>f,h,k</sup>

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

<sup>a</sup>  $p < 0.001$  vs grup 1 <sup>b</sup>  $p < 0.01$  vs grup 1 <sup>c</sup>  $p < 0.005$  vs grup 2 <sup>d</sup>  $p < 0.01$  vs grup 2  
<sup>e</sup>  $p < 0.001$  vs grup 3 <sup>f</sup>  $p < 0.05$  vs grup 3 <sup>g</sup>  $p < 0.001$  vs grup 4 <sup>h</sup>  $p < 0.005$  vs grup 4  
<sup>k</sup>  $p < 0.005$  vs grup 5



Şekil 8.12. Ortalama karaciğer IL-1 $\beta$  düzeyleri. Veriler aritmetik ortalama $\pm$ SE olarak ifade edildi (n=10). \* p< 0.001 vs grup 1 \*\* p< 0.01 vs grup 1  
\*\*\* p< 0.001 vs grup 3 #p< 0.005 vs grup 4

## 8.2. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

Kontrol grubuna ait karaciğer kesitleri normal histolojik görünümdeydi (Şekil 8.13A). PINX grubunda da normale yakın bir görünüm mevcuttu (Şekil 8.13B). Bu gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (p>0.05). Sham+STZ ve PINX+STZ gruplarında konjesyon, portal alanlarda inflamatuvar hücre infiltrasyonu, sinüzoidal dilatasyon ve çok miktarda piknotik hepatosit tespit edildi (Şekil 8.13C-G). Sham+STZ grubunun ortalama histopatolojik hasar skoru 5.70 $\pm$ 0.30, PINX+STZ grubunun ortalama histopatolojik hasar skoru ise 6.60 $\pm$ 0.16 idi. PINX+STZ grubunda hasarın şiddeti daha fazlaydı. Sham+STZ grubu ile PINX+STZ grubu karşılaştırıldığında hasar skorunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardı (p=0.035). Krosin uygulanan gruplarda hasar skorunun azaldığı tespit edildi. PINX+STZ+Crocine grubunda histopatolojik değişikliklerin krosin uygulamasıyla belirgin olarak azaldığı görüldü (Şekil 8.13H, I). Bu grubun ortalama histopatolojik hasar skoru 3.10 $\pm$ 0.37 idi. Kontrol, PINX ve PINX+Crocine grupları ile Sham+STZ grubu karşılaştırıldığında hasar skorunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulundu (p<0.001, hepsi için). Kontrol, PINX ve PINX+Crocine grupları ile PINX+STZ grubu karşılaştırıldığında da hasar skorunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulundu (p<0.001, hepsi için). Her bir grup için ortalama histopatolojik hasar skoru Çizelge 8.7'de verildi.

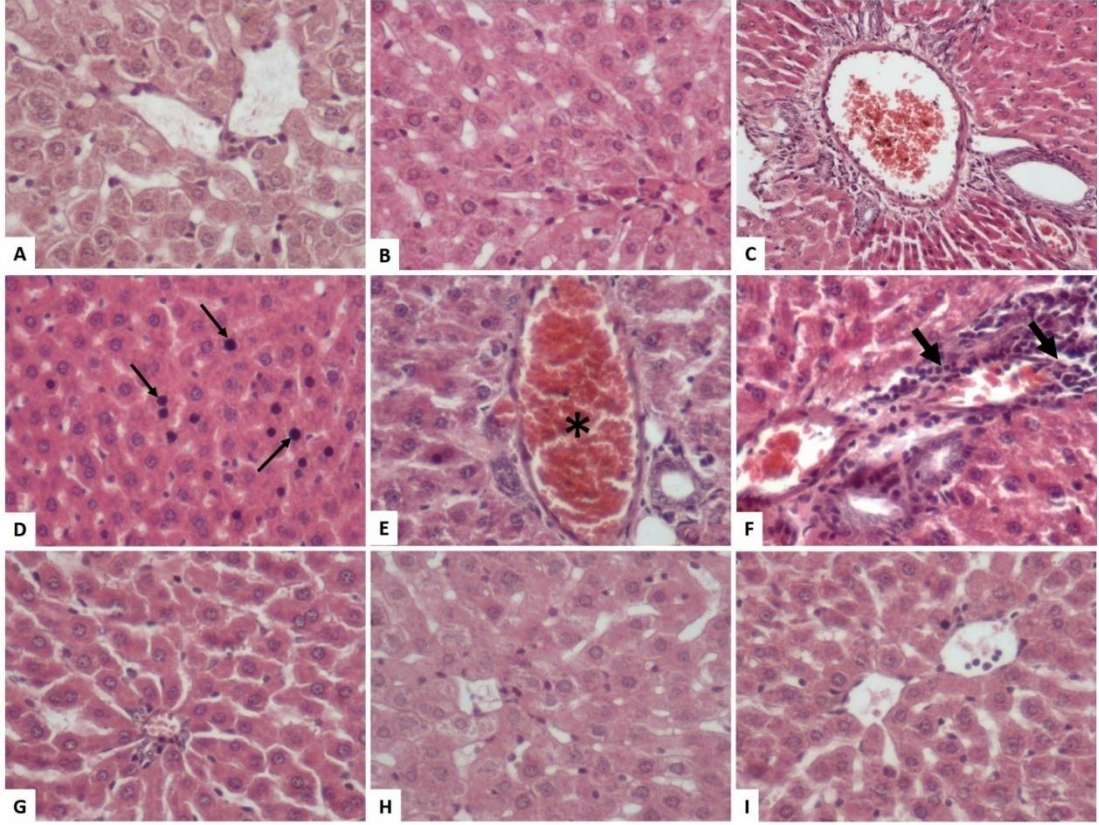
Çizelge 8.7. Histopatolojik hasar skoru.

<b>Gruplar</b>	<b>Hasar Skoru</b>
Grup 1: Kontrol	0.20±0.13
Grup 2: Sham + STZ	5.70±0.30 <sup>a</sup>
Grup 3: PINX	0.60±0.16 <sup>b</sup>
Grup 4: PINX + STZ	6.60±0.16 <sup>a,c,d</sup>
Grup 5: PINX + Crocin	0.30±0.15 <sup>b,e</sup>
Grup 6: PINX + STZ + Crocin	3.10±0.37 <sup>a,b,d,e,f</sup>

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

<sup>a</sup>p< 0.001 vs grup 1 <sup>b</sup>p< 0.001 vs grup 2 <sup>c</sup>p< 0.05 vs grup 2

<sup>d</sup>p< 0.001 vs grup 3 <sup>e</sup>p< 0.001 vs grup 4 <sup>f</sup>p< 0.001 vs grup 5



Şekil 8.13. Karaciğer histolojik yapısı Hemtoksilen-Eozin (H-E) boyama yöntemi. Kontrol grubuna ait karaciğer kesitleri normal histolojik görünümdeydi. PINX grubunda da normale yakın bir görünüm mevcuttu. Sham+STZ ve PINX+STZ gruplarında konjesyon (asteriks), portal alanlarda inflamatuvar hücre infiltrasyonu (kalın ok), sinüzoidal dilatasyon ve çok miktarda piknotikhepatosit (ince ok) tespit edildi. Crocin uygulanan gruplarda hasar skorunun azaldığı tespit edildi. **A.** Kontrol grubu; H-E X40, **B.** PINX grubu; H-E X40, **C.** Sham+STZ grubu; H-E X20, **D.** Sham+STZ grubu; H-E X40, **E-F-G.** PINX+STZ; H-E X40, **H.** PINX+Crocine grubu; H-E X40 **I.** PINX+STZ+Crocine grubu; H-E X40.

### 8.3. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

Kolaylaştırıcı glikoz taşıyıcısı GLUT-1, vücudun pek çok dokusunda eksprese edilir. GLUT-1, hem hepatositler hem de parankimal olmayan hücreler dahil olmak üzere karaciğer hücrelerinin metabolizmasında da rol oynar. GLUT-1'in artan ekspresyonu karaciğerdeki metabolik ve onkojenik hastalıklar için bir belirteç olarak kabul edilebilir. Hem açlık hem de diyabetik durumlarda hepatositlerde GLUT-1 ekspresyonu artar [194]. Kontrol grubu anti-GLUT-1 antikoruna ile zayıf boyanmıştı. Kontrol grubu ile diğer gruplar GLUT-1 ekspresyonu açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark vardı ( $p < 0.001$ ). STZ ve PINX gruplarına ait karaciğer dokularındaki GLUT-1 ekspresyonunun

artmış olduğu tespit edildi. Sham+STZ, PINX+Crocine ve PINX+STZ+Crocine gruplarında GLUT-1 ekspresyonu orta şiddetteyken, PINX ve PINX+STZ gruplarında ise yüksek şiddette olduğu görüldü. Krosin uygulamasının GLUT-1 ekspresyonunu azalttığı tespit edildi. (Şekil 8.14). GLUT-1 immün boyamasına ait H-Skoru Çizelge 8.8’ de verildi.

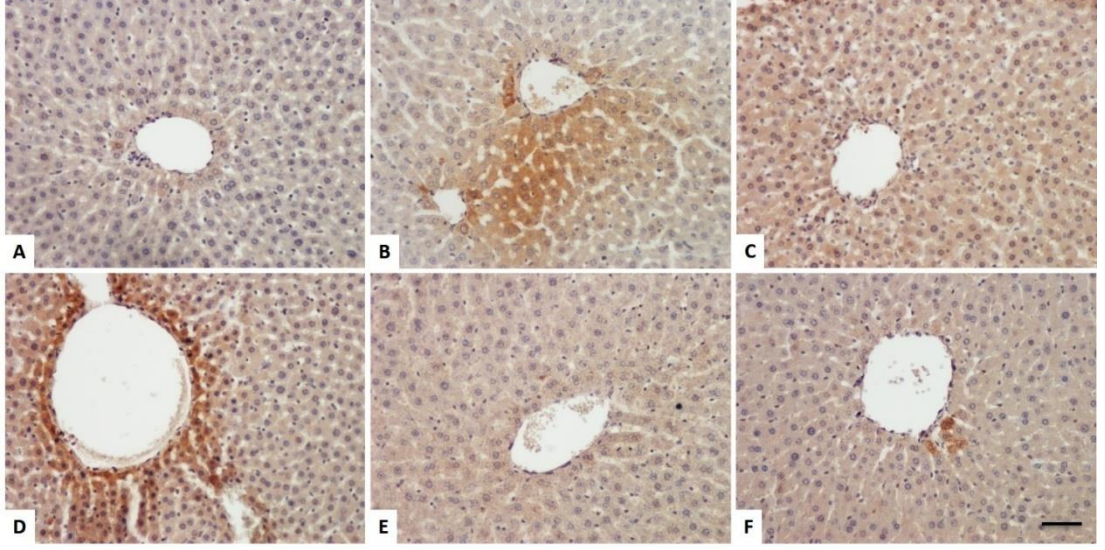
Çizelge 8.8. GLUT-1 immün reaktivitesi için ortalama H-Skoru.

Gruplar	H-Skoru
Grup 1: Kontrol	153.60±2.35
Grup 2: Sham + STZ	229.10±2.53 <sup>a</sup>
Grup 3: PINX	271.10±2.05 <sup>a,b</sup>
Grup 4: PINX + STZ	277.20±4.35 <sup>a,b</sup>
Grup 5: PINX + Crocin	231.50±2.22 <sup>a,d,e</sup>
Grup 6: PINX + STZ + Crocin	239.80±3.12 <sup>a,c,d,e</sup>

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

<sup>a</sup>p< 0.001 vs grup 1    <sup>b</sup>p< 0.001 vs grup 2    <sup>c</sup>p< 0.05 vs grup 2

<sup>d</sup>p< 0.001 vs grup 3    <sup>e</sup>p< 0.001 vs grup 4



Şekil 8.14. Dokuların anti-GLUT-1 antikoruna ile immünohistokimyasal yöntemle boyanması. Kontrol grubu zayıf boyanmıştı. STZ ve PINX gruplarına ait karaciğer dokularındaki GLUT-1 ekspresyonunun artmış olduğu tespit edildi. Sham+STZ, PINX+Crocine ve PINX+STZ+Crocine gruplarında GLUT-1 ekspresyonu orta şiddetteyken, PINX ve PINX+STZ gruplarında ise yüksek şiddette olduğu görüldü. **A.**Kontrol grubu,**B.**Sham+STZ grubu,**C.** PINX grubu,**D.**PINX+STZ grubu,**E.**PINX+Crocine grubu, **F.**PINX+STZ+Crocine grubu. Anti-GLUT-1; X20.Bar: 20 µm.

#### 8.4. TARTIŞMA

Birçok çalışmada oksidatif stresin, hiperglisemi ile ilişkili doku hasarının oluşumunda önemli rol oynadığı gösterilmiştir. DM’de antioksidan savunma sistemi tarafından ROS’un zararlı etkileri ortadan kaldırılamadığında sinir, damar ve retina yapılarında ayrıca böbrek ve diğer organlarda diyabetik lezyonlar oluşabilmektedir. Aynı şekilde son zamanlarda yapılan DM ile ilgili çalışmalarda karaciğerde oksidatif stres kaynaklı doku hasarı ve proinflamatuvar makrofaj birikiminden dolayı inflamasyon oluşabileceği gösterilmiştir [113, 195]. Kronik inflamatuvar bir durum olan diyabet hastalığında, IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$  dahil olmak üzere proinflamatuvar sitokinlerin salgılanmasının arttığı yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur [196].

Bu çalışmanın amacı pinealektomi (melatonin hormonunun yoksunluğu) yapılmış ve DM modeli oluşturulmuş sıçanlarda, oluşan karaciğer hasarını incelemek ve aynı

zamanda antioksidan olarak bilinen krosinin karaciğer üzerinde iyileştirici etkisinin olup olmadığını histolojik ve biyokimyasal olarak ortaya koymaktır.

STZ alkilasyon maddesi, reaktif oksijen türü seviyelerini arttıran, glukoz taşıyıcı 2 (GLUT 2) yoluyla pankreas beta hücrelerinde birikerek pankreas adacık hücrelerindeki antioksidan sisteme zarar veren güçlü diyabetojenik kimyasaldır [16]. Zarar gören antioksidan sistem, DNA zincirinde kopmalara ve hücre nekrozuna neden olmaktadır [18, 197]. Antibiyotik ve antikanser ajan olan STZ, bu özelliklerinden dolayı deneysel olarak DM modeli üretmek için yaygın olarak kullanılmaktadır [198]. Sıçanlarda düşük ve tek doz STZ (40-70 mg/kg ip veya iv) uygulaması 72 saat içinde hiperglisemiye neden olmaktadır [199-201]. STZ ile indüklenen diyabetik sıçanlarda yapılan bir çalışmada hiperglisemi STZ enjeksiyonundan sonraki bir hafta içinde doğrulanmıştır [202].

Çalışmamızda sıçanlara i.p. STZ enjeksiyonunun yapıldığı model gruplarında kontrol grubu ratlara göre serum glukoz seviyelerinde ciddi artışlar olmuştur. Diyabet oluşturduğumuz gruplarda belirgin serum glukoz artışının olması amaçladığımız deneysel modelin başarılı olduğunun göstergesidir.

Sıçanlara STZ (50 mg/kg) uygulanarak diyabet modeli oluşturulmuş bir çalışmada düşük dozda krosin uygulamasının (7.5 mg/kg) kan glukozunu düşürmede önemli bir etkiye sahip olmadığı ancak 15 ve 30 mg/kg dozlarda krosin uygulamalarının kan glukozunu önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada kan glukozunu azaltmada en etkili dozun 30 mg/kg krosin olduğu görülmüştür [203]. Başka bir çalışmada STZ (60 mg/kg tek doz i.p.) ile diyabet oluşturulmuş ve 4 hafta boyunca 40 ve 60 mg/kg/gün dozlarda krosin ile tedavi edilen diyabetik sıçanlarda kan glukozunun, çalışmanın 2., 3. ve 4. haftalarında tedavi edilmeyen diyabetik sıçanlara kıyasla önemli ölçüde azaldığı görülmüştür [204]. Sıçanlara tek doz 45 mg/kg intravenöz STZ'nin verildiği başka bir çalışmada ise tedavi gruplarına 8 hafta boyunca 40 mg/kg/gün krosin uygulanması sonucunda tedavi edilen diyabetik sıçanlardaki kan glukozunun, tedavi edilmeyen diyabetik sıçanlara kıyasla daha düşük seyrettiği bulunmuştur [122]. Bizim çalışmamızda diyabetli hayvanlara 50 mg/kg dozda verilen krosin tedavisinin diğer diyabetli gruplara kıyasla serum glukoz düzeylerinde ciddi



azalma sağladığı görülmüştür. Bu durum krosinin hiperglisemiye karşı yararlı etki gösterdiğinin kanıtıdır.

DM'de  $\beta$ -hücreleri, otoimmün kaynaklı veya adipozdan üretilen dolaşımdaki sitokinlerin ve adacık hücresinden üretilen sitokinlerin ( IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , interferon- $\gamma$  (INF  $\gamma$ )) üretimine maruz kalır [205-208]. Birçok çalışma, hipergliseminin inflamatuvar karaciğer hasarında metabolik fonksiyonu azaltma anlamında kritik bir rol oynadığını göstermiştir [209, 210].

Yapılan bir çalışmada 35 mg/kg dozda STZ ile indüklenmiş sıçanlarda diyabetik grubun diyabetik olmayan gruba göre karaciğer TNF-  $\alpha$ , IL-4 ve IL-6 seviyelerinin önemli ölçüde yüksek olduğu ancak IL-1  $\beta$  seviyelerinde önemli bir fark bulunmadığı tespit edilmiştir [211]. Sıçanlarda iki farklı STZ dozunun (60 mg/kg ve 50 mg/kg) kullanılmasıyla diyabet modeli oluşturulmuş iki ayrı çalışmada diyabetik sıçanların karaciğer dokularında inflamatuvar sitokinlerden IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$  ekspresyonun diyabetik olmayanlara kıyasla önemli ölçüde yükseldiği gözlenmiştir [212, 213]. Çalışmamızda karaciğer dokusunda diyabetojenik stres faktörlerinden IL-1 $\beta$  düzeylerini gözlemledik. Diyabet oluşturduğumuz gruplarda karaciğer IL-1 $\beta$  düzeyleri anlamlı derecede yüksek seyretmiştir.

Epifiz bezi tarafından doğal olarak sentezlenen ve salgılanan antioksidan hormon melatonin [214], farklı patolojik ve fizyolojik koşullarda proinflamatuvar sitokinlerin modülasyonundan sorumludur [215]. Sıçanlarda pineal bezin cerrahi olarak çıkarılması (pinealektomi) dolaşımdaki melatonin seviyelerinin azalmasına ve geceleri artış gösteren melatonin salımını önleyerek doku hasarının kötüleşmesine yol açmaktadır [1, 216]. Tikloretilen ile karaciğer toksisitesi oluşturulmuş hayvanlarda melatoninin etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada pinealektomi işleminden sonra hayvanların karaciğer dokularında IL-6, IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$  düzeylerinin artmış olduğu tespit edilmiştir [217]. Kardiyak oksidatif stres ile ilgili yapılan başka çalışmada ise pinealektomi uygulanan sıçanların kalp dokusunda TNF- $\alpha$  üretiminin arttığı bulunmuştur [218].

Çalışmamızda sıçanların pinealektomi işlemi sonucunda IL-1 $\beta$  düzeylerinde anlamlı artış tespit ettik. Pinealektomi ile birlikte diyabetli sıçanların karaciğer dokusunda IL-1 $\beta$  seviyelerinin yalnız pinealektomili sıçanlara göre daha da arttığını gözlemledik. Bu sonuçlar bize pinealektomi yaptığımız sıçanlarda melatonin yoksunluğunun STZ ile oluşturulan diyabette karaciğer hasarını daha da arttırdığını göstermektedir.

Hipergliseminin karaciğer dokularında oksidatif stresi tetikleyici faktör olduğu bilinmektedir ve azalmış hepatik antioksidan kapasitesi TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve IL-6 gibi inflamatuvar sitokinlerin üretiminin artmasına neden olmaktadır [219, 220].

Geleneksel tıpta sık kullanılan ve bitkisel kökenli olan krosin antioksidan ve hipoglisemik özelliğe sahiptir [221].

Yapılan birçok çalışmada krosinin kalp, böbrek, akciğer, pankreas gibi organların hasarlarında artmış sitokin seviyelerini azalttığı gösterilmiştir [222-225]. Sıçanlarda krosinin diyabetik nefropati üzerindeki koruyucu etkisinin araştırıldığı bir çalışmada krosin tedavisi yapılan grupta TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve IL-18'in üretiminin inhibe edildiği gözlenmiştir [226]. Lipopolisakkarid kaynaklı deneysel akut akciğer hasarında [227] ve izoproterenol ile indüklenen miyokardiyal fibrozisde IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$  seviyelerinin önemli ölçüde arttığı, krosin tedavisinin ise IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$  seviyelerini önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir [228]. Bizim çalışmamızda da diyabet oluşturulmuş sıçanlara krosin tedavisinin uygulanması inflamatuvar süreci ciddi olarak baskılamıştır.

Hücre zarının permeabilite değişikliğine, aminotransferazların artan sentezine veya azalan katabolizmasına bağlı olarak AST ve ALT'de meydana gelen değişiklikler, karaciğer hasarının önemli göstergeleridir. Bu modifikasyonlar diyabette görülen ketogenezi ve glukoneogenezi de arttırmaktadır. Ayrıca ALP aktivitesindeki değişikliklerin, diyabetin karaciğer fonksiyon bozukluğunu indükleyebileceği bilinmektedir [229]. Karaciğerdeki bir hasar veya metabolizmasındaki aksaklık karaciğer enzimlerinin çok kısa sürede tepki vermesine yol açar. Bilindiği gibi diyabette karaciğer hasarı veya metabolizmasındaki sıkıntı karaciğer enzimlerinin yükselmesine sebep olmaktadır.

Alloksan enjeksiyonu (intravenöz 75 mg/kg) ile diyabet oluşturulan farelerde ALP, AST ve ALT seviyelerinin önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir [230].

Fareler üzerinde iki farklı dozda STZ (60 mg/kg ve 150 mg/kg) ile diyabet modeli oluşturulmuş çalışmalarda yine serum ALT ve AST düzeyleri artış görülmüştür [231, 232]. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde diyabetik sıçanlarda AST, ALT ve ALP düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla ciddi artış gözlemlenmiştir.

Eksojen melatonin takviyesinin oksidatif stresi ve inflamatuvar yanıtları azaltarak karaciğer hasarını iyileştirdiği ve hepatoprotektif etkiye sahip olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir [233-235].

Melatoninin tiyoasetamid kaynaklı karaciğer hasarında koruyucu ve tedavi edici etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada karaciğer hasarı oluşturulan sıçanlarda melatonin tedavisinin yükselen ALT, AST ve ALP değerlerini önemli derecede düşürdüğü ortaya konulmuştur [236]. Sıçanlarda oluşturulmuş diyabetik karaciğer hasarında ise eksojen melatonin uygulamasının serum ALT, AST ve ALP düzeylerinde tedavi edilmeyen gruba kıyasla azaldığı gösterilmiştir [237]. Benzer şekilde kadmiyum kaynaklı karaciğer hasarında melatonin takviyesi AST, ALT ve ALP seviyelerinde önemli düşüş sağlamıştır [233].

Yapılan bu çalışmalar melatonin tedavisinin karaciğer enzimleri üzerindeki olumlu etkisini destekler niteliktedir fakat melatonin yoksunluğunda (pinealektomi) karaciğer enzim değişikliklerinin ortaya konduğu yeterli çalışmaya rastlanmıştır. Çalışmamızda pinealektomi işleminden sonra sıçanların serum ALT seviyesinde anlamlı bir değişiklik olmazken AST ve ALP seviyelerinde anlamlı artışlar meydana gelmiştir.

Mevcut araştırmalar güçlü bir antioksidan olan krosinin, karaciğer dokusundaki antioksidan kapasiteyi ciddi bir şekilde arttırdığını, karaciğer enzim seviyelerini iyileştirdiğini göstermiştir [238]. Krosinin ana kaynağı olan safranın karaciğer parametreleri üzerindeki iyileştirici etkisine bakıldığı bir çalışmada safran ile tedavi edilen diyabetik sıçanlarda serum ALP değerlerinin önemli derecede azaldığı görülmüştür [239]. Antioksidan olarak bilinen karnosin maddesinin karaciğer üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada diyabet modeli sıçanlarda serum ALT (%299) ve AST (%74,2) aktivitelerinin önemli ölçüde arttığı, karnosin tedavisinin ise bu ALT (%37,2) ve AST (%38,9) seviyelerini önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir [240].

Diyabetik karaciğer hasarında *Sargassum muticum*un koruyucu etkisinin araştırıldığı çalışmada tedavi edilen diyabetik sıçanlarda serum AST, ALT, ALP aktivitelerinin azaldığı saptanmıştır [241]. Çalışmamızda krosin ile tedavi edilen diyabetli sıçanların serum karaciğer enzimlerinde ciddi azalmalar olduğu görülmüştür.

Eksojen veya endojen olarak üretilen reaktif oksidan moleküllerinin tehlikeli etkilerinin olduğu bilinmektedir [242]. Diyabet kaynaklı karaciğer hasarlarının patogeneğinde oksidatif stres ve ROS oluşumları ana faktör olarak kabul edilmektedir [219]. Hücre içi serbest radikal üretimi hepatositlerin antioksidan kapasitesini aşarak lipid peroksidasyonuna ve sonuçta oksidatif nekroza yol açmaktadır [243]. Oksidatif streste lipid peroksidasyonunun ortaya çıkması, toksik sekonder ürünlerinden birisi olan MDA'nın [1] artışına neden olurken, reaktif oksidan moleküllerinin tehlikeli etkilerinin uzaklaştırılmasında GSH etkili bir rol almaktadır [244].

Etanol kaynaklı karaciğer hasarının araştırıldığı bir çalışmada karaciğer dokusunda MDA seviyesi önemli ölçüde artarken, GSH seviyesinin ise anlamlı ölçüde azaldığı tespit edilmiştir [245]. Ancak sıçanlarda yapılan bir çalışmada STZ (55 mg/kg) ile diyabet modeli oluşturulmuş hayvanların karaciğer dokularında GSH ve MDA düzeylerinin arttığı gözlenmiştir [246]. Başka bir çalışmada ise diyabetik sıçanların hepatik lipid peroksidasyon seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik göstermediği tespit edilmiştir [247]. Çalışmamızda diyabetik sıçanların karaciğer dokusunda MDA seviyelerinin arttığını, GSH seviyelerinin ise ciddi ölçüde azaldığını gözlemledik. MDA seviyelerinde yükselmenin olması lipid peroksidasyon derecesiyle anlamlı bir korelasyon göstermektedir.

Hücre sel savunma sisteminin temel bir parçası olan SOD ve CAT gibi enzimlerin, ROS üretiminin artması sonucu önemli düzeylerde azaldığı bilinmektedir. Bu antioksidan enzimlerin aktivitelerinin zarar görmesi ise diyabetin patojenitesinde büyük rol oynamaktadır [248]. Sıçanlar üzerine yapılan farklı iki çalışmada STZ (60 mg/kg ve 65 mg/kg) ile indüklenen sıçanların hepatik SOD ve CAT aktivitelerinin önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir [249, 250]. Başka bir çalışmada beklenen aksine diyabet modeli oluşturulan sıçanlarda karaciğer dokusundaki SOD aktivitesinin % 34, CAT aktivitesinin ise % 130 artış gösterdiği tespit edilmiştir [251]. DM'de SOD ve

CAT aktivitelerinin ölçüldüğü bazı çalışmalar bu enzimlerin aktivitesinde azalmalar gösterse de bazı çalışmalar SOD ve CAT aktivitelerinin arttığını bildirmiştir. Bu çelişkili sonuçlar, doku özgüllüğüne, hastalığın şiddetine ve süresindeki farklılıklara veya diğer deneysel koşullara bağlı olabilir [252, 253]. Bizim çalışmamızda diyabetik sıçanların karaciğer dokusundaki SOD ve CAT aktivitelerinde ciddi azalmalar tespit edilmiştir. Bu durum, diyabetik sıçanların karaciğer dokularında antioksidan sistemin önemli ölçüde zayıfladığının bir göstergesi olabilir.

Krosin, serbest radikallerin neden olduğu patolojik değişikliklere karşı direnç gösterebilecek antioksidan aktiviteye sahiptir ve karaciğer dokusu oksidatif stres belirteçlerinin seviyelerinde dikkate değer bir iyileştirme sağlamaktadır [254, 255]. Yapılan bir çalışmada STZ ile deneysel model oluşturulan sıçanlarda 40 mg/kg/gün krosin tedavisinin karaciğerde SOD ve CAT enzim aktivitelerinde artış sağlarken, MDA seviyesinde azalma sağlayarak oksidatif hasarı iyileştirdiği gözlenmiştir [256]. Glukoz seviyelerini düşürücü ve antioksidan özellikte olduğu bilinen Astragaloside IV maddesinin doza bağımlı olarak STZ kaynaklı diyabet oluşturulmuş sıçanlardaki etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada karaciğer dokusu SOD ve CAT aktivitesinin anlamlı derecede arttığı ve MDA düzeyinin ise önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir [257]. Bizim çalışmamızda diyabetli sıçanların krosin ile tedavi edilmesi karaciğer dokusundaki antioksidan enzim aktivitelerinde ciddi iyileşmeler oluşturmuştur.

TAS ve TOS değerleri, plazma, vücut sıvıları veya dokulardaki tüm antioksidanların ve oksidanların toplam etkilerini yansıtmaktadır [258]. TOS/TAS oranı diğer bir ifade ile OSİ değeri, plazma veya doku üzerindeki genel oksidatif stres durumunu belirtmektedir [259]. Diyabetik hastalarda TAS'ın azalması, hiperglisemi ve lipid peroksidasyonu ile ilişkilidir. Benzer şekilde, TAS'ın azalması, oksidatif hasarı durdurmak için gerekli olan potansiyel endojen kapasitenin aktivitesini de yansıtmaktadır [260]. STZ ile diyabet oluşturulmuş bir çalışmada diyabetik sıçanların karaciğer dokusunda TAS, TOS ve OSİ değerleri anlamlı derecede yüksek bulunmuşken [261] alloksan ile diyabet oluşturulmuş bir başka çalışmada ise hayvanların karaciğer dokusunda TAS seviyelerinin azaldığı gözlenmiştir [262]. Bizim çalışmamızda STZ enjeksiyonu yaptığımız hayvanların karaciğer dokusunda TOS ve OSİ düzeyleri önemli ölçüde artarken TAS düzeylerinde ise önemli ölçüde

azalma gözlenmiştir. Melatonin, hücre ve dokuları radikal hasardan koruma yeteneği ile birçok araştırmada odak noktasıdır [263]. Ayrıca bir antioksidan olarak melatoninin TOS, TAS ve OSI değerlerini iyileştirdiği ileri sürülmektedir [264-266]. Çalışmamızda pinealektomi yapılmış hayvanların karaciğer dokularında TAS seviyesinde düşüş gözlenirken TOS ve OSI seviyesinde artış gözlenmiştir.

Çalışmamızda diyabetik hayvanların karaciğer histolojik yapısında konjesyon, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve çok miktarda piknotik hepatosit tespit edilmiştir. STZ verilen gruplarda karaciğer dokularının histopatolojik hasar skorunda artış meydana gelmiştir ve krosin uygulamasının diyabetik hayvanlarda hasar skorunu azalttığı tespit edilmiştir. STZ ile diyabet oluşturulan hayvanlarda karaciğer hasarının incelendiği bir çalışmada hematoksilen-Eozin boyaması sonucunda karaciğer hücrelerinin bazı kısımlarının şiştiğini ve hafif yağlı bir dejenerasyona sahip olduğunu gösterilmiştir [267]. Yapılan başka bir araştırmada diyabetik sıçanlarda karaciğer histopatolojik sonuçlarında lipid damlacıkları ve önemli bir dejeneratif değişiklikler gözlenmiştir [268].

Sonuç olarak yeni ilaç tedavilerinin keşfedilmesi diyabete bağlı artan morbidite ve mortaliteyi azaltacaktır. Krosinin hipoglisemik ajan olması, diyabetin patogenezinde etkili olan inflamatuvar ve apoptotik değişiklikler üzerinde olumlu etki yaratmasından dolayı diyabet tedavisinde kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca antioksidan olan krosin, melatonin yoksunluğunda (pinealektomi) oluşabilecek oksidatif stres ve glukoz intoleransına karşı da savunma sağlamaktadır. Krosin hiperglisemi ve oksidatif stres kaynaklı oluşan karaciğer hasarını da hafifletmiştir. Yapılan çalışmalar ve bizim bulgularımız göz önünde bulundurulduğunda krosinin diyabet hastalığının ilerlemesini önleyici ve diyabet kaynaklı oluşan karaciğer doku hasarında tedavi edici ajan olarak kullanılabilmesini düşünmekteyiz. Ancak bu düşüncenin desteklenmesi için daha çok çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır.

**EK AÇIKLAMALAR B.**

**KAYNAK GÖSTERİMİ**

## KAYNAKLAR

1. Tasdemir, S., Samdanci, E., Parlakpınar, H., Polat, A., Tasdemir, C., Cengiz, N., Sapmaz, H., & Acet, A., “Effects of pinealectomy and exogenous melatonin on the brains, testes, duodena and stomachs of rats”, *European Review For Medical and Pharmacological Sciences*, 16(7): p. 860-866 (2012).
2. Khan, R., Chua, Z., Tan, J. C., Yang, Y., Liao, Z., & Zhao, Y., “From Pre-Diabetes to Diabetes: Diagnosis, Treatments and Translational Research”, *Medicina (Kaunas)*, 55(9): p. 546 (2019).
3. Kolahian, S., Leiss, V., & Nürnberg, B., “*Diabetic lung disease: fact or fiction?*”, *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 20(3): p. 303-319 (2019).
4. Wolnik, B., Wiza, D., Szczepanik, T., Syta, A., & Klupa, T., “Switching from Neutral Protamine Hagedorn Insulin to Insulin Glargine 300 U/mL Improves Glycaemic Control and Reduces Hypoglycaemia Risk: Results of a Multicentre, Prospective, Observational Study”, *Journal of Diabetes Research*, (2020).
5. Calero Bernal, M. L., & Varela Aguilar, J. M., “Infant-juvenile type 2 diabetes”, *Revista Clínica Española (English Edition)*, 218(7): p. 372-381 (2018).
6. Kaur, K. and R.W. Joyner, “Diabetes Intraoperative Management, in StatPearls”, [Internet]. StatPearls Publishing (2019).
7. Amorim, R. G., Guedes, G., Vasconcelos, S., & Santos, J., “Kidney Disease in Diabetes Mellitus: Cross-Linking between Hyperglycemia, Redox Imbalance and Inflammation”, *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 112(5): p. 577-587 (2019).
8. Kwon, H., & Pessin, J. E., “Adipokines mediate inflammation and insulin resistance”, *Front Endocrinol (Lausanne)*, 4: p. 71 (2013).
9. Gheban, B. A., Rosca, I. A., & Crisan, M., “The morphological and functional characteristics of the pineal gland”, *Medicine and Pharmacy Reports*, 92(3): p. 226-234 (2019).



10. Luc, K., Schramm-Luc, A., Guzik, T. J., & Mikolajczyk, T. P., “Oxidative stress and inflammatory markers in prediabetes and diabetes”, *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*, 70(6) (2019).
11. Yaribeygi, H., Butler, A. E., Barreto, G. E., & Sahebkar, A., “Antioxidative potential of antidiabetic agents: A possible protective mechanism against vascular complications in diabetic patients”, *Journal of cellular physiology*, 234(3): p. 2436-2446 (2019).
12. Yaribeygi, H., Mohammadi, M. T., & Sahebkar, A., “PPAR-alpha Agonist Improves Hyperglycemia-Induced Oxidative Stress in Pancreatic Cells by Potentiating Antioxidant Defense System”, *Drug research*, 68(6): p. 355-360 (2018).
13. Hurrle, S., & Hsu, W. H., “The etiology of oxidative stress in insulin resistance”, *Biomedical journal*, 40(5): p. 257-262 (2017).
14. Yaribeygi, H., Farrokhi, F. R., Butler, A. E., & Sahebkar, A., “Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms”, *Journal of cellular physiology*, 234(6): p. 8152-8161 (2019).
15. Yaribeygi, H., Sathyapalan, T., Atkin, S. L., & Sahebkar, A., “Molecular Mechanisms Linking Oxidative Stress and Diabetes Mellitus”, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020: p. 8609213 (2020).
16. Guo, S., Mao, X., Yan, Y., Zhang, Y., & Ming, L., “Changes of liver transcriptome profiles following oxidative stress in streptozotocin-induced diabetes in mice”, *PeerJ*, 8: p. e8983. (2020).
17. Lao-ong, T., Chatuphonprasert, W., Nemoto, N., & Jarukamjorn, K., “Alteration of hepatic glutathione peroxidase and superoxide dismutase expression in streptozotocin-induced diabetic mice by berberine”, *Pharmaceutical biology*, 50(8): p. 1007-12 (2012).
18. Papaccio, G., Latronico, M., Frascatore, S. & Pisanti, F. A., “Superoxide dismutase in low-dose-streptozocin-treated mice. A dynamic time-course study”, *Int J Pancreatol*, 10(3-4): p. 253-60 (1991).
19. Severcan, F., Bozkurt, O., Gurbanov, R. & Gorgulu, G., “FT-IR spectroscopy in diagnosis of diabetes in rat animal model”, *Journal of biophotonics*, 3(8-9): p. 621-631 (2010).
20. Sánchez, S. S., Abregú, A. V., Aybar, M. J. & Sánchez Riera, A. N. , “Changes in liver gangliosides in streptozotocin-induced diabetic rats”, *Cell biology international*, 24(12): p. 897-904 (2000).

21. Jamaludin Mohamed, A. H. Nazratun Nafizah, A. H. Zariyantey & S. B. Budin, "Mechanisms of Diabetes-Induced Liver Damage: The role of oxidative stress and inflammation.", *Sultan Qaboos Univ Med J*, 16(2): p. e132-41 (2016).
22. Keith G Tolman, Vivian Fonseca, Anthony Dalpiaz & Meng H Tan, "Spectrum of liver disease in type 2 diabetes and management of patients with diabetes and liver disease.", *Diabetes Care*, 30(3): p. 734-43 (2007).
23. Aulinas, A., *Physiology of the Pineal Gland and Melatonin*, in *Endotext*, K.R. Feingold, et al., Editors. 2000: South Dartmouth (MA).
24. Shariq Najeeba, Zohaib Khurshid, Sana Zohaib & Muhammad Sohail Zafar, "Therapeutic potential of melatonin in oral medicine and periodontology.", *Kaohsiung J Med Sci*, 32(8): p. 391-6 (2016).
25. Ehsan Dehdashtian, Saeed Mehrzadi, Bahman Yousefi, Azam Hosseinzadeh, Russel J.Reiter, Majid Safa, Habib Ghaznavi & Masood Naseripour, "Diabetic retinopathy pathogenesis and the ameliorating effects of melatonin; involvement of autophagy, inflammation and oxidative stress.", *Life Sci*, 193: p. 20-33 (2018).
26. Xiao Meng, Ya Li, Sha Li, Yue Zhou, Ren-You Gan, Dong-Ping Xu & Hua-Bin Li, "Dietary Sources and Bioactivities of Melatonin.", *Nutrients*, 9(4) (2017).
27. Safia Costes, Marti Boss, Anthony P. Thomas & Aleksey V. Matveyenko, "Activation of melatonin signaling promotes  $\beta$ -cell survival and function.", *Molecular Endocrinology*, 29(5): p. 682-692 (2015).
28. Anteneh Mehari Tizazu, Ma Shwe Zin Nyunt, Olivier Cexus, Koolarina Suku, Esther Mok, Chin Hui Xian, Joni Chong, Crystal Tan, Wilson How, Sandra Hubert, Emilie Combet, Tamas Fulop, Tze Pin Ng & Anis Larbi, "Metformin Monotherapy Downregulates Diabetes-Associated Inflammatory Status and Impacts on Mortality.", *Front Physiol*, 10: p. 572 (2019).
29. Zhiqiang Ma, Liqun Xu, Dong Liu, Xiaoyan Zhang, Shouyin Di, Weimiao Li, Jiao Zhang, Russel J. Reiter, Jing Han, Xiaofei Li & Xiaolong Yan, "Utilizing Melatonin to Alleviate Side Effects of Chemotherapy: A Potentially Good Partner for Treating Cancer with Ageing.", *Oxid Med Cell Longev*, 2020: p. 6841581 (2020).
30. Mohammad Hossein Pourhanifeh, Azam Hosseinzadeh, Ehsan Dehdashtian, Karim Hemati & Saeed Mehrzadi, "Melatonin: new insights on its therapeutic properties in diabetic complications.", *Diabetol Metab Syndr*, 12: p. 30 (2020).

31. Jose A. Fernández-Albarral, Rosa de Hoz, Ana I. Ramírez, Inés López-Cuenca, Elena Salobrar-García, María D. Pinazo-Durán, José M. Ramírez & Juan J. Salazar, "Beneficial effects of saffron (*Crocus sativus* L.) in ocular pathologies, particularly neurodegenerative retinal diseases.", *Neural Regen Res*, 15(8): p. 1408-1416 (2020).
32. Eirini Christodoulou, Nikolaos PE Kadoglou, Nikolaos Kostomitsopoulos & Georgia Valsami, "Saffron: a natural product with potential pharmaceutical applications.", *J Pharm Pharmacol*, 67(12): p. 1634-49 (2015).
33. Ziba Rajaei, Mousa-Al-Reza Hadjzadeh, Habibollah Nemati, Mahmoud Hosseini, Marzieh Ahmadi & Somayeh Shafiee, "Antihyperglycemic and antioxidant activity of crocin in streptozotocin-induced diabetic rats.", *J Med Food*, 16(3): p. 206-10 (2013).
34. Siamak Asri-Rezaei, Esmaeal Tamaddonfard, Behnaz Ghasemsoltani-Momtaz, Amir Erfanparast & Sima Gholamalipour, "Effects of crocin and zinc chloride on blood levels of zinc and metabolic and oxidative parameters in streptozotocin-induced diabetic rats.", *Avicenna J Phytomed*, 5(5): p. 403-12 (2015).
35. Hossein Hosseinzadeh & Hani M Younesi, "Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and petal extracts in mice.", *BMC Pharmacol*, 2: p. 7 (2002).
36. Paul Zimmet, K. George Alberti, Dianna J. Magliano & Peter H. Bennett, "Diabetes mellitus statistics on prevalence and mortality: facts and fallacies.", *Nat Rev Endocrinol*, 12(10): p. 616-22 (2016).
37. Ashcroft, F.M. & P. Rorsman, "Diabetes mellitus and the beta cell: the last ten years.", *Cell*, 148(6): p. 1160-71 (2012).
38. Roden, M., "[Diabetes mellitus: definition, classification and diagnosis].", *Wien Klin Wochenschr*, 128 Suppl 2: p. S37-40 (2016).
39. Schmidt, A.M., "Highlighting Diabetes Mellitus: The Epidemic Continues.", *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 38(1): p. e1-e8 (2018).
40. Stein, S.A., K.L. Maloney, & T.I. Pollin, "Genetic Counseling for Diabetes Mellitus.", *Curr Genet Med Rep*, 2(2): p. 56-67 (2014).
41. Xie, F., J.C. Chan, & R.C. Ma, "Precision medicine in diabetes prevention, classification and management.", *J Diabetes Investig*, 9(5): p. 998-1015 (2018).

42. Arun Nanditha, Ronald C.W. Ma, Ambady Ramachandran, Chamukuttan Snehathala, Juliana C.N. Chan, Kee Seng Chia, Jonathan E. Shaw, & Paul Z. Zimmet, "Diabetes in Asia and the Pacific: Implications for the Global Epidemic.", *Diabetes Care*, 39(3): p. 472-85 (2016).
43. Sheri R. Colberg, Ronald J. Sigal, Bo Fernhall, Judith G. Regensteiner, Bryan J. Blissmer, Richard R. Rubin, Lisa Chasan-Taber, Ann L. Albright, & Barry Braun, "Exercise and type 2 diabetes: the American College of Sports Medicine and the American Diabetes Association: joint position statement executive summary.", *Diabetes Care*, 33(12): p. 2692-6 (2010).
44. Pulgaron, E.R. and A.M. Delamater, "Obesity and type 2 diabetes in children: epidemiology and treatment.", *Curr Diab Rep*, 14(8): p. 508 (2014).
45. Inaishi, J. and Y. Saisho, "Beta-Cell Mass in Obesity and Type 2 Diabetes, and Its Relation to Pancreas Fat: A Mini-Review.", *Nutrients*, 12(12) (2020).
46. S.S. Sánchez, A.V. Abregú, M.J. Aybar, A.N. Sánchez Riera, "Changes in liver gangliosides in streptozotocin-induced diabetic rats.", *Cell Biol Int*, 24(12): p. 897-904 (2000).
47. Manuel Garciacaballero, Alexander Reyes-Ortiz, José Manuel Martínez-Moreno, José Antonio Toval-Mata, "Glycemic and lipid metabolic disorders in diabetic and non-diabetic patients bmi < 35 or > 35 before gastric bypass.", *Nutr Hosp*, 29(5): p. 1095-102 (2014).
48. M. J. Müller, M. Pirlich, H. J. Balks and O. Selberg, "Glucose intolerance in liver cirrhosis: role of hepatic and non-hepatic influences.", *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 32(10): p. 749-58 (1994).
49. Rizza, R.A., "Pathogenesis of fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes: implications for therapy.", *Diabetes*, 59(11): p. 2697-707 (2010).
50. M. C. Moore, A. D. Cherrington, G. Cline, M. J. Pagliassotti, E. M. Jones, D. W. Neal, C. Badet, and G. I. Shulman, "Sources of carbon for hepatic glycogen synthesis in the conscious dog.", *J Clin Invest*, 88(2): p. 578-87 (1991).
51. M. C. Moore, Katie C. Coate, Jason J. Winnick, Zhibo An, Alan D. Cherrington, "Regulation of hepatic glucose uptake and storage in vivo.", *Adv Nutr*, 3(3): p. 286-94 (2012).
52. Douglas L. Rothman, Inger Magnusson, Lee D. Katz, Robert G. Shulman, and Gerald I. Shulman, "Quantitation of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis in fasting humans with <sup>13</sup>C NMR.", *Science*, 254(5031): p. 573-6 (1991).
53. Petersen, M.C., D.F. Vatner, and G.I. Shulman, "Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease.", *Nat Rev Endocrinol*, 13(10): p. 572-587 (2017).

54. Carey, M., S. Kehlenbrink, and M. Hawkins, "Evidence for central regulation of glucose metabolism.", *J Biol Chem*, 288(49): p. 34981-8 (2013).
55. Otero, Y.F., J.M. Stafford, and O.P. McGuinness, "Pathway-selective insulin resistance and metabolic disease: the importance of nutrient flux.", *J Biol Chem*, 289(30): p. 20462-9 (2014).
56. Cryer, P.E., "Minireview: Glucagon in the pathogenesis of hypoglycemia and hyperglycemia in diabetes.", *Endocrinology*, 153(3): p. 1039-48 (2012).
57. Mihaela Vladu, Diana Clenciu, Ion Cristian Efrem, Mircea-Căţalin Forţofoiu, Anca Amzolini, Simona Tudorică Micu, Maria Moţa, and Maria Forţofoiu, "Insulin Resistance and Chronic Kidney Disease in Patients with Type 1 Diabetes Mellitus.", *J Nutr Metab*, 2017: p. 6425359 (2017).
58. Reaven, G., "Metabolic syndrome: pathophysiology and implications for management of cardiovascular disease.", *Circulation*, 106(3): p. 286-8 (2002).
59. Şenyiğit, A. and M.J.A.K.T.B.D. "Kanat, Tip 2 diyabette fizyopatolojik tedavi yaklaşımı ve pioglitazonun yeri.", 22(3): p. 220-226 (2017).
60. Pankaj Shah, Adrian Vella, Ananda Basu, Rita Basu, Aron Adkins, W. Frederick Schwenk, C. Michael Johnson, K. Sreekumaran Nair, Michael D. Jensen, Robert A. Rizza, "Effects of free fatty acids and glycerol on splanchnic glucose metabolism and insulin extraction in nondiabetic humans.", *Diabetes*, 51(2): p. 301-10 (2002).
61. Pankaj Shah, Adrian Vella, Ananda Basu, Rita Basu, Aron Adkins, W. Frederick Schwenk, C. Michael Johnson, K. Sreekumaran Nair, Michael D. Jensen, Robert A. Rizza, "Elevated free fatty acids impair glucose metabolism in women: decreased stimulation of muscle glucose uptake and suppression of splanchnic glucose production during combined hyperinsulinemia and hyperglycemia.", *Diabetes*, 52(1): p. 38-42 (2003).
62. Shulman, G.I. and B.R. Landau, "Pathways of glycogen repletion.", *Physiol Rev*, 72(4): p. 1019-35 (1992).
63. Pagliassotti, M.J. and A.D. Cherrington, "Regulation of net hepatic glucose uptake in vivo.", *Annu Rev Physiol*, 54: p. 847-60 (1992).
64. I. Magnusson, D. L. Rothman, L. D. Katz, R. G. Shulman, and G. I. Shulman, "Increased rate of gluconeogenesis in type II diabetes mellitus. A <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance study.", *J Clin Invest*, 90(4): p. 1323-7 (1992).
65. Boden, G., "Gluconeogenesis and glycogenolysis in health and diabetes.", *J Investig Med*, 52(6): p. 375-8 (2004).

66. B. R. Landau, J. Wahren, V. Chandramouli, W. C. Schumann, K. Ekberg, and S. C. Kalhan, "Contributions of gluconeogenesis to glucose production in the fasted state.", *J Clin Invest*, 98(2): p. 378-85 (1996).
67. Ananda Basu, Pankaj Shah, Michael Nielsen, Rita Basu, Robert A. Rizza, "Effects of type 2 diabetes on the regulation of hepatic glucose metabolism.", *J Investig Med*, 52(6): p. 366-74 (2004).
68. Gerlies Bock, Elizabeth Chittilapilly, Rita Basu, Gianna Toffolo, Claudio Cobelli, Visvanathan Chandramouli, Bernard R. Landau, Robert A. Rizza, "Contribution of hepatic and extrahepatic insulin resistance to the pathogenesis of impaired fasting glucose: role of increased rates of gluconeogenesis.", *Diabetes*, 56(6): p. 1703-11 (2007).
69. Cesar A. Prada-Medina, Kiyoshi F. Fukutani, Nathella Pavan Kumar, Leonardo Gil-Santana, Subash Babu, Flávio Lichtenstein, Kim West, Shanmugam Sivakumar, Pradeep A. Menon, Vijay Viswanathan, Bruno B. Andrade, Helder I. Nakaya & Hardy Kornfeld, "Systems Immunology of Diabetes-Tuberculosis Comorbidity Reveals Signatures of Disease Complications.", *Sci Rep*, 7(1): p. 1999 (2017).
70. American Diabetes, A., 2. "Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2021.", *Diabetes Care*, 44(Suppl 1): p. S15-S33 (2021).
71. Mayfield, J., "Diagnosis and classification of diabetes mellitus: new criteria.", *Am Fam Physician*, 58(6): p. 1355-62, 1369-70 (1998).
72. American Diabetes, A., "2. Classification and Diagnosis of Diabetes.", *Diabetes Care*, 40(Suppl 1): p. S11-S24 (2017).
73. Jinsha Liu, Joey Paolo Ting, Shams Al-Azzam, Yun Ding and Sepideh Afshar, "Therapeutic Advances in Diabetes, Autoimmune, and Neurological Diseases.", *Int J Mol Sci*, 22(6) (2021).
74. Janine Schmid, Barbara Ludwig, Andrew V. Schally, Anja Steffen, Christian G. Ziegler, Norman L. Block, Yassemi Koutmani, Mathias D. Brendel, Katia P. Karalis, Charmaine J. Simeonovic, Julio Licinio, Monika Ehrhart-Bornstein, and Stefan R. Bornstein, "Modulation of pancreatic islets-stress axis by hypothalamic releasing hormones and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase.", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(33): p. 13722-7 (2011).
75. International Expert, C., "International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes.", *Diabetes Care*, 32(7): p. 1327-34 (2009).
76. American Diabetes Association, "Diagnosis and classification of diabetes mellitus.", *Diabetes Care*, 36 Suppl 1(Suppl 1): p. S67-74 (2013).

77. David M. Maahs, Nancy A. West, Jean M. Lawrence, Elizabeth J. Mayer-Davis, "Epidemiology of type 1 diabetes.", *Endocrinol Metab Clin North Am*, 39(3): p. 481-97 (2010).
78. Tajima, N. and A. Morimoto, "Epidemiology of childhood diabetes mellitus in Japan.", *Pediatr Endocrinol Rev*, 10 Suppl 1: p. 44-50 (2012).
79. Valma Harjutsalo, Reijo Sund, Mikael Knip, Per-Henrik Groop, "Incidence of type 1 diabetes in Finland.", *JAMA*, 310(4): p. 427-8 (2013).
80. R. D. G. Leslie, H. Kolb, N. C. Schloot, R. Buzzetti, D. Mauricio, A. De Leiva, K. Yderstraede, C. Sarti, C. Thivolet, D. Hadden, S. Hunter, G. Schernthaner, W. Scherbaum, R. Williams, P. Pozzilli, "Diabetes classification: grey zones, sound and smoke: Action LADA 1.", *Diabetes Metab Res Rev*, 24(7): p. 511-9 (2008).
81. Naik, R.G., B.M. Brooks-Worrell, and J.P. Palmer, "Latent autoimmune diabetes in adults.", *J Clin Endocrinol Metab*, 94(12): p. 4635-44 (2009).
82. Smushkin, G. and A. Vella, "Genetics of type 2 diabetes.", *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 13(4): p. 471-7 (2010).
83. Javeed, N. and A.V. Matveyenko, "Circadian Etiology of Type 2 Diabetes Mellitus.", *Physiology (Bethesda)*, 33(2): p. 138-150 (2018).
84. Irene M Stratton, Amanda I Adler, H Andrew W Neil, David R Matthews, Susan E Manley, Carole A Cull, David Hadden, Robert C Turner, Rury R Holman, "Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study.", *BMJ*, 321(7258): p. 405-12 (2000).
85. Vaxillaire, M. and P. Froguel, "Monogenic forms of diabetes mellitus: an update.", *Endocrinol Nutr*, 56S4: p. 26-29 (2009).
86. Quantao Ma, Yaqi Li, Min Wang, Ziyang Tang, Ting Wang, Chenyue Liu, Chunguo Wang, and Baosheng Zhao, "Progress in Metabonomics of Type 2 Diabetes Mellitus.", *Molecules*, 23(7) (2018).
87. Chen, L., D.J. Magliano, and P.Z. Zimmet, "The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus--present and future perspectives.", *Nat Rev Endocrinol*, 8(4): p. 228-36 (2011).
88. American Diabetes, A., "Standards of medical care in diabetes--2014.", *Diabetes Care*, 37 Suppl 1: p. S14-80 (2014).

89. Derek LeRoith, Geert Jan Biessels, Susan S Braithwaite, Felipe F Casanueva, Boris Draznin, Jeffrey B Halter, Irl B Hirsch, Marie E McDonnell, Mark E Molitch, M Hassan Murad, Alan J Sinclair, "Treatment of Diabetes in Older Adults: An Endocrine Society\* Clinical Practice Guideline.", *J Clin Endocrinol Metab*, 104(5): p. 1520-1574 (2019).
90. Jasmine F. Plows, Joanna L. Stanley, Philip N. Baker, Clare M. Reynolds, and Mark H. Vickers, "The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus.", *Int J Mol Sci*, 19(11) (2018).
91. Bevier, W.C., L. Jovanovic-Peterson, and C.M. Peterson, "Pancreatic disorders of pregnancy. Diagnosis, management, and outcome of gestational diabetes.", *Endocrinol Metab Clin North Am*, 24(1): p. 103-38 (1995).
92. Feig, D.S. and R.G. Moses, "Metformin therapy during pregnancy: good for the goose and good for the gosling too?", *Diabetes Care*, 34(10): p. 2329-30 (2011).
93. Wendy Camelo Castillo, Kim Boggess, Til Stürmer, M. Alan Brookhart, Daniel K. Benjamin Jr, Michele Jonsson Funk, "Association of Adverse Pregnancy Outcomes With Glyburide vs Insulin in Women With Gestational Diabetes.", *JAMA Pediatr*, 169(5): p. 452-8 (2015).
94. L. Baeyens, S. Hindi, R. L. Sorenson, M. S. German, "beta-Cell adaptation in pregnancy.", *Diabetes Obes Metab*, 18 Suppl 1: p. 63-70 (2016).
95. Patrick M. Catalano, Elaine D. Tyzbir, Noreen M. Roman, Saeid B. Amini, Ethan A.H. Sims, "Longitudinal changes in insulin release and insulin resistance in nonobese pregnant women.", *Am J Obstet Gynecol*, 165(6 Pt 1): p. 1667-72 (1991).
96. Linda A. Barbour, Carrie E. McCurdy, Teri L. Hernandez, John P. Kirwan, Patrick M. Catalano, Jacob E. Friedman, "Cellular mechanisms for insulin resistance in normal pregnancy and gestational diabetes.", *Diabetes Care*, 30 Suppl 2: p. S112-9 (2007).
97. Robert E. Ratner, Costas A. Christophi, Boyd E. Metzger, Dana Dabelea, Peter H. Bennett, Xavier Pi-Sunyer, Sarah Fowler, Steven E. Kahn, "Prevention of diabetes in women with a history of gestational diabetes: effects of metformin and lifestyle interventions.", *J Clin Endocrinol Metab*, 93(12): p. 4774-9 (2008).
98. Leanne Bellamy, Juan-Pablo Casas, Aroon D. Hingorani, David Williams, "Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis.", *Lancet*, 373(9677): p. 1773-9 (2009).
99. Flannick, J., S. Johansson, and P.R. Njolstad, "Common and rare forms of diabetes mellitus: towards a continuum of diabetes subtypes.", *Nat Rev Endocrinol*, 12(7): p. 394-406 (2016).



100. Sanyoura, M., L.H. Philipson, and R. Naylor, "Monogenic Diabetes in Children and Adolescents: Recognition and Treatment Options.", *Curr Diab Rep*, 18(8): p. 58 (2018).
101. Wynne, K., B. Devereaux, and A. Dornhorst, "Diabetes of the exocrine pancreas.", *J Gastroenterol Hepatol*, 34(2): p. 346-354 (2019).
102. Phil A. Hart, Melena D. Bellin, Dana K. Andersen, David Bradley, Zobeida Cruz Monserrate, Christopher E. Forsmark, Mark O. Goodarzi, Aida Habtezion, Murray Korc, Yogish C. Kudva, Stephen J. Pandol, Dhiraj Yadav, Suresh T. Chari, "Type 3c (pancreatogenic) diabetes mellitus secondary to chronic pancreatitis and pancreatic cancer.", *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 1(3): p. 226-237 (2016).
103. N. Ewald, C. Kaufmann, A. Raspe, H. U. Kloer, R. G. Bretzel, P. D. Hardt, "Prevalence of diabetes mellitus secondary to pancreatic diseases (type 3c).", *Diabetes Metab Res Rev*, 28(4): p. 338-42 (2012).
104. Dorota Latek, Ewelina Rutkowska, Szymon Niewieczermal, Judyta Cielecka-Piontek, "Drug-induced diabetes type 2: In silico study involving class B GPCRs.", *PLoS One*, 14(1): p. e0208892 (2019).
105. Shivaswamy, V., B. Boerner, and J. Larsen, "Post-Transplant Diabetes Mellitus: Causes, Treatment, and Impact on Outcomes.", *Endocr Rev*, 37(1): p. 37-61 (2016).
106. A. Sharif, M. Hecking, A. P. J. de Vries, E. Porrini, M. Hornum, S. Rasoul-Rockenschaub, G. Berlakovich, M. Krebs, A. Kautzky-Willer, G. Scherthaner, P. Marchetti, G. Pacini, A. Ojo, S. Takahara, J. L. Larsen, K. Budde, K. Eller, J. Pascual, A. Jardine, S. J. L. Bakker, T. G. Valderhaug, T. G. Jenssen, S. Cohny, M. D. Säemann, "Proceedings from an international consensus meeting on posttransplantation diabetes mellitus: recommendations and future directions.", *Am J Transplant*, 14(9): p. 1992-2000 (2014).
107. Rodrigo, Emilio, Lidia Santos, Celestino Piñera, Juan Carlos Ruiz San Millán, Maria Estrella Quintela, Carmen Toyos, Natalia Allende, Carlos Gómez-Alamillo, and Manuel Arias, "Prediction at first year of incident new-onset diabetes after kidney transplantation by risk prediction models.", *Diabetes Care*, 35(3): p. 471-473 (2012).
108. P. Boerner Brian, Shivaswamy Vijay V. Desouza Cyrus, L. Larsen Jennifer, "Diabetes and cardiovascular disease following kidney transplantation.", *Curr Diabetes Rev*, 7(4): p. 221-34 (2011).
109. Kautzky-Willer, A., J. Harreiter, and G. Pacini, "Sex and Gender Differences in Risk, Pathophysiology and Complications of Type 2 Diabetes Mellitus.", *Endocr Rev*, 37(3): p. 278-316 (2016).

110. Hage Hassan, R., O. Bourron, and E. Hajduch, "Defect of insulin signal in peripheral tissues: Important role of ceramide.", *World J Diabetes*, 5(3): p. 244-57 (2014).
111. Konstantinos Papatheodorou, Maciej Banach, Michael Edmonds, Nikolaos Papanas, and Dimitrios Papazoglou, "Complications of Diabetes.", *J Diabetes Res*, 2015: p. 189525 (2015).
112. Forbes, J.M. and M.E. Cooper, "Mechanisms of diabetic complications.", *Physiol Rev*, 93(1): p. 137-88 (2013).
113. Amanda Natália Lucchesi, Natália Tavares de Freitas, Lucas Langoni Cassettari, Sílvio Fernando Guideti Marques, César Tadeu Spadella, "Diabetes mellitus triggers oxidative stress in the liver of alloxan-treated rats: a mechanism for diabetic chronic liver disease.", *Acta Cir Bras*, 28(7): p. 502-8 (2013).
114. Beckman, J.A., M.A. Creager, and P. Libby, "Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management.", *JAMA*, 287(19): p. 2570-81 (2002).
115. Joanna Teul, Francisco J. Rupérez, Antonia Garcia, Julie Vaysse, Stéphane Balayssac, Véronique Gilard, Myriam Malet-Martino, Jose Luis Martin-Ventura, Luis Miguel Blanco-Colio, José Tuñón, Jesús Egido, and Coral Barbas, "Improving metabolite knowledge in stable atherosclerosis patients by association and correlation of GC-MS and 1H NMR fingerprints.", *J Proteome Res*, 8(12): p. 5580-9 (2009).
116. Nguyen, D.V., L.C. Shaw, and M.B. Grant, "Inflammation in the pathogenesis of microvascular complications in diabetes.", *Front Endocrinol (Lausanne)*, 3: p. 170 (2012).
117. Filla, L.A. and J.L. Edwards, "Metabolomics in diabetic complications.", *Mol Biosyst*, 12(4): p. 1090-105 (2016).
118. William G. Couser, Giuseppe Remuzzi, Shanthi Mendis, Marcello Tonelli, "The contribution of chronic kidney disease to the global burden of major noncommunicable diseases.", *Kidney Int*, 80(12): p. 1258-70 (2011).
119. James L. Edwards, Andrea M. Vincent, Hsinlin T.Cheng, Eva L. Feldman, "Diabetic neuropathy: mechanisms to management.", *Pharmacol Ther*, 120(1): p. 1-34 (2008).
120. Ighodaro, O.M., "Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus.", *Biomed Pharmacother*, 108: p. 656-662 (2018).
121. Roja Rahimi, Shekoufeh Nikfar, Bagher Larijani, Mohammad Abdollahi, "A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications.", *Biomed Pharmacother*, 59(7): p. 365-73 (2005).

122. Habib Yaribeygi, Ali Noroozadeh, Mohammad Taghi Mohammadi, Thomas P. Johnston, and Amirhossein Sahebkar, "Crocine Improves Oxidative Stress by Potentiating Intrinsic Anti-Oxidant Defense Systems in Pancreatic Cells During Uncontrolled Hyperglycemia.", *J Pharmacopuncture*, 22(2): p. 83-89 (2019).
123. Rakesh Kakkar, Subrahmanyam V. Mantha, Jasim Radhi, Kailash Prasad, and Jawahar Kalra, "Increased oxidative stress in rat liver and pancreas during progression of streptozotocin-induced diabetes.", *Clin Sci (Lond)*, 94(6): p. 623-32 (1998).
124. Francesco Prattichizzo, Valeria De Nigris, Elettra Mancuso, Rosangela Spiga, Angelica Giuliani, Giulia Maticchione, Raffaella Lazzarini, Fiorella Marcheselli, Rina Recchioni, Roberto Testa, Lucia La Sala, Maria Rita Rippo, Antonio Domenico Procopio, Fabiola Olivieri, Antonio Ceriello, "Short-term sustained hyperglycaemia fosters an archetypal senescence-associated secretory phenotype in endothelial cells and macrophages.", *Redox Biol*, 15: p. 170-181 (2018).
125. Giacco, F. and M. Brownlee, "Oxidative stress and diabetic complications.", *Circ Res*, 107(9): p. 1058-70 (2010).
126. Rains, J.L. and S.K. Jain, "Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes.", *Free Radic Biol Med*, 50(5): p. 567-75 (2011).
127. Asmat, U., K. Abad, and K. Ismail, "Diabetes mellitus and oxidative stress-A concise review.", *Saudi Pharm J*, 24(5): p. 547-553 (2016).
128. Maritim, A.C., R.A. Sanders, and J.B. Watkins, 3rd, "Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review.", *J Biochem Mol Toxicol*, 17(1): p. 24-38 (2003).
129. Fatimo Biobaku, Husam Ghanim, Manav Batra, Paresh Dandona, "Macronutrient-Mediated Inflammation and Oxidative Stress: Relevance to Insulin Resistance, Obesity, and Atherogenesis.", *J Clin Endocrinol Metab*, 104(12): p. 6118-6128 (2019).
130. Al-Gubory, K.H., P.A. Fowler, and C. Garrel, "The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes.", *Int J Biochem Cell Biol*, 42(10): p. 1634-50 (2010).
131. Esra Birben, Umit Murat Sahiner, Cansin Sackesen, Serpil Erzurum, & Omer Kalayci, "Oxidative stress and antioxidant defense.", *World Allergy Organ J*, 5(1): p. 9-19 (2012).
132. Li, Senlin, Huiru Li, Xiaoding Xu, Phei Er Saw, and Lei Zhang, "Nanocarrier-mediated antioxidant delivery for liver diseases.", *Theranostics*, 10(3): p. 1262-1280 (2020).

133. Diplock, A. T., J-L. Charuleux, G. Crozier-Willi, F. J. Kok, C. Rice-Evans, Marcel Roberfroid, W. Stahl, and J. Vina-Ribes, "Functional food science and defence against reactive oxidative species.", *Br J Nutr*, 80 Suppl 1: p. S77-112 (1998).
134. Keller, Jeffrey N., Mark S. Kindy, Fredrick W. Holtsberg, Daret K. St Clair, Hsiu-Chuan Yen, Arriane Germeyer, Sheldon M. Steiner, Annadora J. Bruce-Keller, James B. Hutchins, and Mark P. Mattson, "Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neural apoptosis and reduces ischemic brain injury: suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction.", *J Neurosci*, 18(2): p. 687-97 (1998).
135. Nair, A. and B.J. Nair, "Comparative analysis of the oxidative stress and antioxidant status in type II diabetics and nondiabetics: A biochemical study.", *J Oral Maxillofac Pathol*, 21(3): p. 394-401 (2017).
136. Klotz, Martin G., Glen R. Klassen, and Peter C. Loewen, "Phylogenetic relationships among prokaryotic and eukaryotic catalases.", *Molecular Biology and Evolution*, 14(9): p. 951-958 (1997).
137. He, Long, Ting He, Shabnam Farrar, Linbao Ji, Tianyi Liu, and Xi Ma, "Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species.", *Cell Physiol Biochem*, 44(2): p. 532-553 (2017).
138. Mohammadi, M., "Oxidative Stress and Polycystic Ovary Syndrome: A Brief Review.", *Int J Prev Med*, 10: p. 86 (2019).
139. Valko, Marian, Dieter Leibfritz, Jan Moncol, Mark TD Cronin, Milan Mazur, and Joshua Telser, "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.", *Int J Biochem Cell Biol*, 39(1): p. 44-84 (2007).
140. Carrión-García, Cayetano Javier, Eduardo J. Guerra-Hernández, Belen Garcia-Villanova, and Esther Molina-Montes, "Non-enzymatic antioxidant capacity (NEAC) estimated by two different dietary assessment methods and its relationship with NEAC plasma levels.", *Eur J Nutr*, 56(4): p. 1561-1576 (2017).
141. Scalbert, A., I.T. Johnson, and M. Saltmarsh, "Polyphenols: antioxidants and beyond.", *Am J Clin Nutr*, 81(1 Suppl): p. 215S-217S (2005).
142. Rahal, Anu, Amit Kumar, Vivek Singh, Brijesh Yadav, Ruchi Tiwari, Sandip Chakraborty, and Kuldeep Dhama, "Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay.", *Biomed Res Int*, 2014: p. 761264 (2014).
143. Wu, J.Q., T.R. Kosten, and X.Y. Zhang, "Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia.", *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 46: p. 200-6 (2013).

144. Stehle, Jörg H., Anastasia Saade, Oliver Rawashdeh, Katrin Ackermann, Antje Jilg, Tamás Sebestény, and Erik Maronde, "A survey of molecular details in the human pineal gland in the light of phylogeny, structure, function and chronobiological diseases.", *J Pineal Res*, 51(1): p. 17-43 (2011).
145. Gheban, Bogdan-Alexandru, Horațiu Alexandru Colosi, Ioana-Andreea Gheban-Rosca, Bogdan Pop, Ana-Maria Teodora Domșa, Carmen Georgiu, Dan Gheban, Doinița Crișan, and Maria Crișan, "Age-Related Changes of the Pineal Gland in Humans: A Digital Anatomical-Histological Morphometric Study on Autopsy Cases with Comparison to Predigital-Era Studies.", *Medicina (Kaunas)*, 57(4) (2021).
146. Sato, K., Meng, F., Francis, H., Wu, N., Chen, L., Kennedy, L., Zhou, T., Franchitto, A., Onori, P., Gaudio, E. and Glaser, S., "Melatonin and circadian rhythms in liver diseases: Functional roles and potential therapies.", *J Pineal Res*, 68(3): p. e12639 (2020).
147. Velarde, Elena, Jose Miguel Cerdá-Reverter, Angel Luis Alonso-Gómez, Elisa Sánchez, Esther Isorna, and María Jesús Delgado, "Melatonin-synthesizing enzymes in pineal, retina, liver, and gut of the goldfish (*Carassius*): mRNA expression pattern and regulation of daily rhythms by lighting conditions.", *Chronobiol Int*, 27(6): p. 1178-201 (2010).
148. Şener, G.J.M.P.J., "Karanlığın hormonu: melatonin.", 14(3): p. 112-120 (2010).
149. Hardeland, Ruediger, Daniel P. Cardinali, Venkatramanujam Srinivasan, D. Warren Spence, Gregory M. Brown, and Seithikurippu R. Pandi-Perumal, "Melatonin--a pleiotropic, orchestrating regulator molecule.", *Prog Neurobiol*, 93(3): p. 350-84 (2011).
150. Lima, F.B., Machado, U.F., Bartol, I., Seraphim, P.M., Sumida, D.H., Moraes, S.M., Hell, N.S., Okamoto, M.M., Saad, M.J., Carvalho, C.R. and Cipolla-Neto, J., "Pinelectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats.", *Am J Physiol*, 275(6): p. E934-41 (1998).
151. PJ, Lardone, Alvarez-Sanchez Sanchez N, and Guerrero JM., "Melatonin and glucose metabolism: clinical relevance.", *Curr Pharm Des*, 20(30): p. 4841-53 (2014).
152. Espino, J., J.A. Pariente, and A.B. Rodriguez, "Role of melatonin on diabetes-related metabolic disorders.", *World J Diabetes*, 2(6): p. 82-91 (2011).
153. Hussain, Saad A., Haitham M. Khadim, Ban H. Khalaf, Sajida H. Ismail, Khalid I. Hussein, and Ahmed S. Sahib, "Effects of melatonin and zinc on glycemic control in type 2 diabetic patients poorly controlled with metformin.", *Saudi Med J*, 27(10): p. 1483-8 (2006).

154. Rasmussen, Dennis D., Dennis R. Mitton, Shana A. Larsen, and Steven M. Yellon, "Aging-dependent changes in the effect of daily melatonin supplementation on rat metabolic and behavioral responses.", *J Pineal Res*, 31(1): p. 89-94 (2001).
155. Champney, Thomas H., Richard W. Steger, Douglas S. Christie, and Russel J. Reiter, "Alterations in components of the pineal melatonin synthetic pathway by acute insulin stress in the rat and Syrian hamster.", *Brain Res*, 338(1): p. 25-32 (1985).
156. Liu, Jian Ping, Mei Zhang, Weiya Wang, and Sameline Grimsgaard, "Chinese herbal medicines for type 2 diabetes mellitus.", *Cochrane Database Syst Rev*, 2004(3): p. CD003642 (2002).
157. José Bagur, María, Gonzalo Luis Alonso Salinas, Antonia M. Jiménez-Monreal, Soukaina Chaouqi, Silvia Llorens, Magdalena Martínez-Tomé, and Gonzalo L. Alonso, "Saffron: An Old Medicinal Plant and a Potential Novel Functional Food.", *Molecules*, 23(1) (2017).
158. El Midaoui, A., Ghzaïel, I., Vervandier-Fasseur, D., Ksila, M., Zarrouk, A., Nury, T., Khallouki, F., El Hessni, A., Ibrahim, S.O., Latruffe, N. and Couture, R., "Saffron (*Crocus sativus* L.): A Source of Nutrients for Health and for the Treatment of Neuropsychiatric and Age-Related Diseases.", *Nutrients*, 14(3) (2022).
159. Moshiri, M., M. Vahabzadeh, and H.J.D.r. Hosseinzadeh, "Clinical applications of saffron (*Crocus sativus*) and its constituents: a review.", *Drug Research*, 65(06): p. 287-295 (2015).
160. Mollazadeh, H., S.A. Emami, and H. Hosseinzadeh, "Razi's Al-Hawi and saffron (*Crocus sativus*): a review.", *Iran J Basic Med Sci*, 18(12): p. 1153-66 (2015).
161. Hatziagapiou, K. and G.I. Lambrou, "The Protective Role of *Crocus Sativus* L. (Saffron) Against Ischemia- Reperfusion Injury, Hyperlipidemia and Atherosclerosis: Nature Opposing Cardiovascular Diseases.", *Curr Cardiol Rev*, 14(4): p. 272-289 (2018).
162. Bostan, H.B., S. Mehri, and H. Hosseinzadeh, "Toxicology effects of saffron and its constituents: a review.", *Iran J Basic Med Sci*, 20(2): p. 110-121 (2017).
163. Alavizadeh, S.H. and H. Hosseinzadeh, "Bioactivity assessment and toxicity of crocin: a comprehensive review.", *Food Chem Toxicol*, 64: p. 65-80 (2014).
164. Mard, Seyyed Ali, Ghaidafeh Akbari, Esrafil Mansouri, and Mahdi Parsanahad, "Renoprotective effect of crocin following liver ischemia/reperfusion injury in Wistar rats.", *Iran J Basic Med Sci*, 20(10): p. 1172-1177 (2017).

165. Kang, Changkeun, Hyunkyung Lee, Eun-Sun Jung, Ramin Seyedian, MiNa Jo, Jehein Kim, Jong-Shu Kim, and Euikyung Kim, "Saffron (*Crocus sativus* L.) increases glucose uptake and insulin sensitivity in muscle cells via multipathway mechanisms.", *Food Chem*, 135(4): p. 2350-8 (2012).
166. Motamedrad, Maryam, Alireza Shokouhifar, Mina Hemmati, and Maryam Moossavi, "The regulatory effect of saffron stigma on the gene expression of the glucose metabolism key enzymes and stress proteins in streptozotocin-induced diabetic rats.", *Res Pharm Sci*, 14(3): p. 255-262 (2019).
167. Demurtas, O.C., Frusciante, S., Ferrante, P., Diretto, G., Azad, N.H., Pietrella, M., Aprea, G., Taddei, A.R., Romano, E., Mi, J. and Al-Babili, S., "Candidate enzymes for saffron crocin biosynthesis are localized in multiple cellular compartments.", *Plant Physiology*, 177(3): p. 990-1006 (2018).
168. Hosseinzadeh, Hossein, Soghra Mehri, Ali Heshmati, Mohammad Ramezani, Amirhossein Sahebkar, and Khalil Abnous, "Proteomic screening of molecular targets of crocin.", *Daru*, 22(1): p. 5 (2014).
169. Bukhari, S.I., M. Manzoor, and M.K. Dhar, "A comprehensive review of the pharmacological potential of *Crocus sativus* and its bioactive apocarotenoids.", *Biomed Pharmacother*, 98: p. 733-745 (2018).
170. Shirali, S., S. Zahra Bathaie, and M. Nakhjavani, "Effect of crocin on the insulin resistance and lipid profile of streptozotocin-induced diabetic rats.", *Phytother Res*, 27(7): p. 1042-7 (2013).
171. Pashirzad, Mehran, Mojtaba Shafiee, Amir Avan, Mikhail Ryzhikov, Hamid Fiuji, Amirhossein Bahreyni, Majid Khazaei, Saman Soleimanpour, and Seyed Mahdi Hassanian, "Therapeutic potency of crocin in the treatment of inflammatory diseases: Current status and perspective.", *J Cell Physiol*, 234(9):p. 14601-14611 (2019).
172. Samaha, M.M., E. Said, and H.A. Salem, "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 beta-islets.", *Environ Toxicol Pharmacol*, 72: p. 103238 (2019).
173. Samarghandian, S., M. Azimi-Nezhad, and T. Farkhondeh, "Crocinn attenuate Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-alpha) and interleukin-6 (IL-6) in streptozotocin-induced diabetic rat aorta.", *Cytokine*, 88: p. 20-28 (2016).
174. Bandegi, Ahmad Reza, Ali Rashidy-Pour, Abbas Ali Vafaei, and Behshid Ghadroost, "Protective Effects of *Crocus Sativus* L. Extract and Crocin against Chronic-Stress Induced Oxidative Damage of Brain, Liver and Kidneys in Rats.", *Adv Pharm Bull*, 4(Suppl 2): p. 493-9 (2014).

175. Butnariu, M., Quispe, C., Herrera-Bravo, J., Sharifi-Rad, J., Singh, L., Aborehab, N.M., Bouyahya, A., Venditti, A., Sen, S., Acharya, K. and Bashiry, M., "The Pharmacological Activities of *Crocus sativus* L.: A Review Based on the Mechanisms and Therapeutic Opportunities of its Phytoconstituents.", *Oxid Med Cell Longev*, 2022: p. 8214821 (2022).
176. American Diabetes, A., "4. Lifestyle Management: Standards of Medical Care in Diabetes-2018.", *Diabetes Care*, 41(Suppl 1): p. S38-S50 (2018).
177. Bantle, J.P., Wylie-Rosett, J., Albright, A.L., Apovian, C.M., Clark, N.G., Franz, M.J., Hoogwerf, B.J., Lichtenstein, A.H., Mayer-Davis, E., Mooradian, A.D. and Wheeler, M.L., "Nutrition recommendations and interventions for diabetes: a position statement of the American Diabetes Association.", *Diabetes Care*, 31 Suppl 1: p. S61-78 (2008).
178. Mehta, Sanjeev N., Lisa K. Volkening, Barbara J. Anderson, Tonja Nansel, Jill Weissberg-Benchell, Tim Wysocki, Lori MB Laffel, and Family Management of Childhood Diabetes Study Steering Committee, "Dietary behaviors predict glycemic control in youth with type 1 diabetes.", *Diabetes Care*, 31(7): p. 1318-20 (2008).
179. Ewers, Bettina, Tina Vilsbøll, Henrik Ullits Andersen, and Jens Meldgaard Bruun, "The dietary education trial in carbohydrate counting (DIET-CARB Study): study protocol for a randomised, parallel, open-label, intervention study comparing different approaches to dietary self-management in patients with type 1 diabetes.", *BMJ Open*, 9(9): p. e029859 (2019).
180. Astbury, Nerys M., Carmen Piernas, Jamie Hartmann-Boyce, Sophia Lapworth, Paul Aveyard, and Susan A. Jebb, "A systematic review and meta-analysis of the effectiveness of meal replacements for weight loss.", *Obes Rev*, 20(4): p. 569-587 (2019).
181. Petroni, Maria Letizia, Lucia Brodosi, Francesca Marchignoli, Anna Simona Sasdelli, Paolo Caraceni, Giulio Marchesini, and Federico Ravaioli, "Nutrition in Patients with Type 2 Diabetes: Present Knowledge and Remaining Challenges.", *Nutrients*, 13(8) (2021).
182. Altinoz, E. Y. Ü. P., Z. Oner, H. Elbe, Y. I. L. M. A. Z. Cigremis, and Y. Turkoz, "Protective effects of saffron (its active constituent, crocin) on nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats.", *Hum Exp Toxicol*, 34(2): p. 127-34 (2015).
183. Gedik, Sema, Mehmet Erman Erdemli, Mehmet Gul, Birgul Yigitcan, Harika Gozukara Bag, Zeynep Aksungur, and Eyup Altinoz, "Hepatoprotective effects of crocin on biochemical and histopathological alterations following acrylamide-induced liver injury in Wistar rats.", *Biomed Pharmacother*, 95: p. 764-770 (2017).



184. Demir, M., et al, "The effects of lack of melatonin in experimental rat model of Alzheimer's Disease: relationship with FEZ1 gene expression.", *Medicine Science / International Medical Journal*, 2017.
185. Chamorro, V., Pandolfi, R., Moreno, L., Barreira, B., Martínez-Ramas, A., Morales-Cano, D., Ruiz-Cabello, J., Lorente, J.A., Duarte, J., Cogolludo, A. and Alvarez-Sala, J.L., "Effects of Quercetin in a Rat Model of Hemorrhagic Traumatic Shock and Reperfusion.", *Molecules*, 21(12) (2016).
186. Ohkawa, H., N. Ohishi, and K. Yagi, "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction.", *Anal Biochem*, 95(2): p. 351-8 (1979).
187. Ellman, G.L., "Tissue sulfhydryl groups.", *Arch Biochem Biophys*, 82(1): p. 70-7 (1959).
188. Sun, Y., L.W. Oberley, and Y. Li, "A simple method for clinical assay of superoxide dismutase.", *Clin Chem*, 34(3): p. 497-500 (1988).
189. Burnie, J.P., A. Coke, and R.C. Matthews, "Restriction endonuclease analysis of *Aspergillus fumigatus* DNA.", *J Clin Pathol*, 45(4): p. 324-7 (1992).
190. Lowry, Oliver H, "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.", *Journal of Biological Chemistry*, 193(1): p. 265-275 (1951).
191. Erel, O., "A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status.", *Clin Biochem*, 38(12): p. 1103-11 (2005).
192. 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): p. 277-285 (2004).
193. Alkorta-Aranburu, G., D. Carmody, Y. W. Cheng, V. Nelakuditi, L. Ma, Jazmyne T. Dickens, S. Das, S. A. W. Greeley, and D. Del Gaudio, "Phenotypic heterogeneity in monogenic diabetes: the clinical and diagnostic utility of a gene panel-based next-generation sequencing approach.", *Mol Genet Metab*, 113(4): p. 315-320 (2014).
194. Chadt, A. and H. Al-Hasani, "Glucose transporters in adipose tissue, liver, and skeletal muscle in metabolic health and disease.", *Pflugers Arch*, 472(9): p. 1273-1298 (2020).
195. Jourdan, T., Nicoloro, S.M., Zhou, Z., Shen, Y., Liu, J., Coffey, N.J., Cinar, R., Godlewski, G., Gao, B., Aouadi, M. and Czech, M.P., "Decreasing CB1 receptor signaling in Kupffer cells improves insulin sensitivity in obese mice.", *Mol Metab*, 6(11): p. 1517-1528 (2017).
196. Tack, Cees J., Rinke Stienstra, Leo AB Joosten, and Mihai G. Netea, "Inflammation links excess fat to insulin resistance: the role of the interleukin-1 family.", *Immunol Rev*, 249(1): p. 239-52 (2012).

197. Lao-ong, Thinnakorn, Waranya Chatuphonprasert, Nobuo Nemoto, and Kanokwan Jarukamjorn, "Alteration of hepatic glutathione peroxidase and superoxide dismutase expression in streptozotocin-induced diabetic mice by berberine.", *Pharmaceutical Biology*, 50(8): p. 1007-1012 (2012).
198. Furman, B.L., "Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats.", *Curr Protoc*, 1(4): p. e78 (2021).
199. Lai, A.K. and A.C. Lo, "Animal models of diabetic retinopathy: summary and comparison.", *J Diabetes Res*, 2013: p. 106594 (2013).
200. Brondum, E., H. Nilsson, and C. Aalkjaer, "Functional abnormalities in isolated arteries from Goto-Kakizaki and streptozotocin-treated diabetic rat models.", *Horm Metab Res*, 37 Suppl 1: p. 56-60 (2005).
201. Cai, Yu, JianWen Chen, JianMin Jiang, Weiwei Cao, and Lan He, "Zhen-wu-tang, a blended traditional Chinese herbal medicine, ameliorates proteinuria and renal damage of streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats.", *J Ethnopharmacol*, 131(1): p. 88-94 (2010).
202. Wang-Fischer, Y. and T. Garyantes, "Improving the Reliability and Utility of Streptozotocin-Induced Rat Diabetic Model.", *J Diabetes Res*, 2018: p. 8054073 (2018).
203. Tamaddonfard, Esmaeal, Amir Abbas Farshid, Siamak Asri-Rezaee, Shahram Javadi, Voria Khosravi, Bentolhoda Rahman, and Zahra Mirfakhraee, "Crocic improved learning and memory impairments in streptozotocin-induced diabetic rats.", *Iran J Basic Med Sci*, 16(1): p. 91-100 (2013).
204. Sefidgar, Seyed Mersad, Mahmood Ahmadi-Hamedani, Ashkan Jebelli Javan, Reza Narenji Sani, and Abbas Javaheri Vayghan, "Effect of crocin on biochemical parameters, oxidative/antioxidative profiles, sperm characteristics and testicular histopathology in streptozotocin-induced diabetic rats.", *Avicenna J Phytomed*, 9(4): p. 347-361 (2019).
205. Eizirik, D.L., M.L. Colli, and F.J.N.R.E. Ortis, "The role of inflammation in insulinitis and  $\beta$ -cell loss in type 1 diabetes.", *Nature Reviews Endocrinology*, 5(4): p. 219-226 (2009).
206. Spranger, Joachim, Anja Kroke, Matthias Mohlig, Kurt Hoffmann, Manuela M. Bergmann, Michael Ristow, Heiner Boeing, and Andreas FH Pfeiffer, "Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study.", *Diabetes*, 52(3): p. 812-817 (2003).
207. Westwell-Roper, C.Y., J.A. Ehses, and C.B.J.D. Verchere, "Resident macrophages mediate islet amyloid polypeptide-induced islet IL-1 $\beta$  production and  $\beta$ -cell dysfunction.", *Diabetes*, 63(5): p. 1698-1711 (2014).

208. Igoillo-Esteve, M., Marselli, L., Cunha, D.A., Ladrière, L., Ortis, F., Grieco, F.A., Dotta, F., Weir, G.C., Marchetti, P., Eizirik, D.L. and Cnop, M., "Palmitate induces a pro-inflammatory response in human pancreatic islets that mimics CCL2 expression by beta cells in type 2 diabetes.", *Diabetologia*, 53(7): p. 1395-1405 (2010).
209. Lecube, Albert, Cristina Hernández, Joan Genescà, Joan I. Esteban, Rosend Jardí, and Rafael Simó, "High prevalence of glucose abnormalities in patients with hepatitis C virus infection: a multivariate analysis considering the liver injury.", *Diabetes care*, 27(5): p. 1171-1175 (2004).
210. Rao, Zhuqing, Jie Sun, Xiongxiang Pan, Ziyang Chen, Heliang Sun, Panpan Zhang, Mei Gao, Zhengnian Ding, and Cunming Liu, "Hyperglycemia aggravates hepatic ischemia and reperfusion injury by inhibiting liver-resident macrophage M2 polarization via C/EBP homologous protein-mediated endoplasmic reticulum stress.", *Frontiers in immunology*, 8: p. 1299 (2017).
211. Ugochukwu, N.H. and C.L. Figgers, "Dietary caloric restriction modifies inflammatory responses in the livers of streptozotocin-induced diabetic rats.", *Nutrition Research*, 26(5): p. 221-226 (2006).
212. Alanazi, Ahmed Z., Faleh Alqahtani, Ramzi AA Mothana, Mohamed Mohany, Hatem M. Abuohashish, Mohammed M. Ahmed, and Salim S. Al-Rejaie, "Protective Role of *Loranthus regularis* against Liver Dysfunction, Inflammation, and Oxidative Stress in Streptozotocin Diabetic Rat Model.", *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020: p. 5027986 (2020).
213. El-Demerdash, Fatma M., Yousra Talaat, Raghda A. El-Sayed, Wenyi Kang, and Nora F. Ghanem, "Hepatoprotective Effect of *Actinidia deliciosa* against Streptozotocin-Induced Oxidative Stress, Apoptosis, and Inflammations in Rats.", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022: p. 1499510 (2022).
214. Vasicek, Caroline A., Benoît Malpoux, Patricia A. Fleming, and Nigel C. Bennett, "Melatonin secretion in the Mashona mole-rat, *Cryptomys darlingi*—influence of light on rhythmicity.", *Physiology & Behavior*, 83(5): p. 689-697 (2005).
215. Favero, Gaia, Lorenzo Franceschetti, Francesca Bonomini, Luigi Fabrizio Rodella, and Rita Rezzani, "Melatonin as an anti-inflammatory agent modulating inflammasome activation.", *International journal of endocrinology*, 2017 (2017).
216. Chen, L., Zhou, T., Wu, N., O'Brien, A., Venter, J., Ceci, L., Kyritsi, K., Onori, P., Gaudio, E., Sybenga, A. and Xie, L., "Pinealectomy or light exposure exacerbates biliary damage and liver fibrosis in cholestatic rats through decreased melatonin synthesis.", *Molecular Basis of Disease*, 1865(6): p. 1525-1539 (2019).

217. Abdraboh, Mohamed E., Mohamed A. El-Missiry, Azza I. Othman, Ahmed Nageeb Taha, Dalia S. Abd Elhamed, and Maggie E. Amer, "Constant light exposure and/or pinealectomy increases susceptibility to trichloroethylene-induced hepatotoxicity and liver cancer in male mice.", *Environ Sci Pollut Res Int*, 1-14, (2022).
218. Doğanlar, Oğuzhan, Zeynep Banu Doğanlar, Mehmet Akif Ovalı, Orkut Güçlü, Ufuk Demir, Ayten Doğan, and Metehan Uzun, "Melatonin regulates oxidative stress and apoptosis in fetal hearts of pinealectomised RUPP rats.", *Hypertension in Pregnancy*, 39(4): p. 429-443 (2020).
219. Ling, Pei-Ra, Claudia Mueller, Robert J. Smith, and Bruce R. Bistrian, "Hyperglycemia induced by glucose infusion causes hepatic oxidative stress and systemic inflammation, but not STAT3 or MAP kinase activation in liver in rats.", *Metabolism*, 52(7): p. 868-874 (2003).
220. Alotaibi, Moureq R., Amal J. Fatani, Ahmed T. Almnaizel, Mohammed M. Ahmed, Hatem M. Abuhashish, and Salim S. Al-Rejaie, "In vivo assessment of combined effects of glibenclamide and losartan in diabetic rats.", *Medical Principles and Practice*, 28(2): p. 178-185 (2019).
221. Margaritis, I., Angelopoulou, K., Lavrentiadou, S., Mavrovouniotis, I.C., Tsantarliotou, M., Taitzoglou, I., Theodoridis, A., Veskoukis, A., Kerasioti, E., Kouretas, D. and Zervos, I., "Effect of crocin on antioxidant gene expression, fibrinolytic parameters, redox status and blood biochemistry in nicotinamide-streptozotocin-induced diabetic rats.", *J Biol Res (Thessalon)*, 27: p. 4 (2020).
222. Naderi, Reyhaneh, Abbas Pardakhty, Mohammad Farajli Abbasi, Mehdi Ranjbar, and Maryam Iranpour, "Preparation and evaluation of crocin loaded in nanoniosomes and their effects on ischemia-reperfusion injuries in rat kidney.", *Sci Rep*, 11(1): p. 23525 (2021).
223. Zheng, Yong-Qiu, Jian-Xun Liu, Jan-Nong Wang, and Li Xu, "Effects of crocin on reperfusion-induced oxidative/nitrative injury to cerebral microvessels after global cerebral ischemia.", *Brain research*, 1138: p. 86-94 (2007).
224. Goyal, S. N., S. Arora, A. K. Sharma, S. Joshi, R. Ray, J. Bhatia, S. Kumari, and D. S. Arya, "Preventive effect of crocin of *Crocus sativus* on hemodynamic, biochemical, histopathological and ultrastructural alterations in isoproterenol-induced cardiotoxicity in rats.", *Phytomedicine*, 17(3-4): p. 227-232 (2010).
225. Zaghoul, Marwa S., Eman Said, Ghada M. Suddek, and Hatem A. Salem, "Crocinn attenuates lung inflammation and pulmonary vascular dysfunction in a rat model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis.", *Life Sci*, 235: p. 116794 (2019).

226. Zhang, L., M. Jing, and Q. Liu, "Crocini alleviates the inflammation and oxidative stress responses associated with diabetic nephropathy in rats via NLRP3 inflammasomes.", *Life Sciences*, 278: p. 119542 (2021).
227. Wang, Jian, Jianke Kuai, Zhonghua Luo, Wuping Wang, Lei Wang, Changkang Ke, Xiaofei Li, and Yunfeng Ni, "Crocini attenuates lipopolysacchride-induced acute lung injury in mice.", *Int J Clin Exp Pathol*, 8(5): p. 4844-50 (2015).
228. Jin, W., Zhang, Y., Xue, Y., Han, X., Zhang, X., Ma, Z., Sun, S., Chu, X., Cheng, J., Guan, S. and Li, Z., "Crocini attenuates isoprenaline-induced myocardial fibrosis by targeting TLR4/NF- $\kappa$ B signaling: connecting oxidative stress, inflammation, and apoptosis.", *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 393(1): p. 13-23 (2020).
229. Larcen, A., H. Lambert, M. C. Laprevote-Heully, and N. Delorme, "Light and electron microscopic study of hepatic lesions in the course of hyperlactatemia in diabetic patients (author's transl).", *Diabete & Metabolisme*, 5(2): p. 103-112 (1979).
230. Oršolić, Nada, Damir Sirovina, Dyana Odeh, Goran Gajski, Vedran Balta, Lidija Šver, and Maja Jazvinščak Jembrek, "Efficacy of Caffeic Acid on Diabetes and Its Complications in the Mouse.", *Molecules*, 26(11) (2021).
231. Barssotti, L., Abreu, I.C., Brandão, A.B.P., Albuquerque, R.C., Ferreira, F.G., Salgado, M.A., Dias, D.D., De Angelis, K., Yokota, R., Casarini, D.E. and Souza, L.B., "Saccharomyces boulardii modulates oxidative stress and renin angiotensin system attenuating diabetes-induced liver injury in mice.", *Sci Rep*, 11(1): p. 9189 (2021).
232. Joudaki, R. and M. Setorki, "The protective effect of Satureja bachtiarica hydroalcoholic extract on streptozotocin-induced diabetes through modulating glucose transporter 2 and 4 expression and inhibiting oxidative stress.", *Pharm Biol*, 57(1): p. 318-327 (2019).
233. Yang, Zhijie, Yuqin He, Haifang Wang, and Qiong Zhang, "Protective effect of melatonin against chronic cadmium-induced hepatotoxicity by suppressing oxidative stress, inflammation, and apoptosis in mice.", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 228: p. 112947 (2021).
234. Hu, Shilian, Shi Yin, Xiaodong Jiang, Dabing Huang, and Gan Shen, "Melatonin protects against alcoholic liver injury by attenuating oxidative stress, inflammatory response, and apoptosis.", *European Journal of Pharmacology*, 616(1-3): p. 287-292 (2009).
235. Cruz, Adolfo, Francisco J. Padillo, Eva Torres, Carmen M. Navarrete, Juan R. Muñoz-Castañeda, Francisco J. Caballero, Javier Briceño et al, "Melatonin prevents experimental liver cirrhosis induced by thioacetamide in rats.", *Journal of Pineal Research*, 39(2): p. 143-150 (2005).

236. Sayan, M., D. Karabulut, and S. Özdamar, "Assessment of the protective and therapeutic effect of melatonin against thioacetamide-induced acute liver damage.", *J Biochem Mol Toxicol*, 34(4): p. e22450 (2020).
237. Hajam, Y.A. and S. Rai, "Melatonin and insulin modulates the cellular biochemistry, histoarchitecture and receptor expression during hepatic injury in diabetic rats.", *Life Sciences*, 239: p. 117046 (2019).
238. Akbari, Ghaidafeh, Seyyed Ali Mard, Mahin Dianat, and Esrafil Mansouri, "The Hepatoprotective and MicroRNAs Downregulatory Effects of Crocin Following Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury in Rats.", *Oxid Med Cell Longev*, 2017: p. 1702967 (2017).
239. Konstantopoulos, P., Doulamis, I.P., Tzani, A., Korou, M.L., Agapitos, E., Vlachos, I.S., Pergialiotis, V., Verikokos, C., Mastorakos, G., Katsilambros, N.L. and Perrea, D.N., "Metabolic effects of Crocus sativus and protective action against non-alcoholic fatty liver disease in diabetic rats.", *Biomed Rep*, 6(5): p. 513-518 (2017).
240. Aydın, Abdurrahman Fatih, İlknur Bingül, Canan Küçükgergin, Işın Doğan-Ekici, Semra Doğru Abbasoğlu, and Müjdat Uysal, "Carnosine decreased oxidation and glycation products in serum and liver of high-fat diet and low-dose streptozotocin-induced diabetic rats.", *Int J Exp Pathol*, 98(5): p. 278-288 (2017).
241. Safhi, Mohammed M., Mohammad Firoz Alam, Sivagurunathan Moni Sivakumar, and Tarique Anwer, "Hepatoprotective Potential of Sargassum muticum against STZ-Induced Diabetic Liver Damage in Wistar Rats by Inhibiting Cytokines and the Apoptosis Pathway.", *Anal Cell Pathol (Amst)*, 2019: p. 7958701 (2019).
242. Filomeni, G., D. De Zio, and F. Cecconi, "Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs.", *Cell Death Differ*, 22(3): p. 377-88 (2015).
243. Zeng, H., Z.J.M.S.M.I.M.J.o.E. Liu, and C. Research, "Atorvastatin induces hepatotoxicity in diabetic rats via oxidative stress, inflammation, and anti-apoptotic pathway.", *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 25: p. 6165 (2019).
244. Forman, H.J., H. Zhang, and A. Rinna, "Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis.", *Mol Aspects Med*, 30(1-2): p. 1-12 (2009).
245. Xu, Lu, Yifan Yu, Rui Sang, Jinxia Li, Bingjie Ge, and Xuemei Zhang, "Protective Effects of Taraxasterol against Ethanol-Induced Liver Injury by Regulating CYP2E1/Nrf2/HO-1 and NF-κB Signaling Pathways in Mice.", *Oxid Med Cell Longev*, 2018: p. 8284107 (2018).

246. Sadi, G., M.C. Baloğlu, and M.B. Pektaş, "Differential gene expression in liver tissues of streptozotocin-induced diabetic rats in response to resveratrol treatment.", *PLoS One*, 10(4): p. e0124968 (2015).
247. Kuzgun, Gökçe, Rahman Başaran, Ebru Arıoğlu İnan, and Benay Can Eke, "Effects of insulin treatment on hepatic CYP1A1 and CYP2E1 activities and lipid peroxidation levels in streptozotocin-induced diabetic rats.", *J Diabetes Metab Disord*, 19(2): p. 1157-1164 (2020).
248. Gong, X., Q. Zhang, and S. Tan, "Inhibitory Effect of r-Hirudin Variant III on Streptozotocin-Induced Diabetic Cataracts in Rats.", *The Scientific World Journal*, 2013: p. 630651 (2013).
249. Alqahtani, Faleh, Mohamed Mohany, Abdullah F. Alasmari, Ahmed Z. Alanazi, Osamah M. Belali, Mohammed M. Ahmed, and Salim S. Al-Rejaie, "Angiotensin II receptor Nephilysin inhibitor (LCZ696) compared to Valsartan attenuates Hepatotoxicity in STZ-induced hyperglycemic rats.", *Int J Med Sci*, 17(18): p. 3098-3106 (2020).
250. Samadi-Noshahr, Zahra, Mousa-Al-Reza Hadjzadeh, Reyhaneh Moradi-Marjaneh, and Abolfazl Khajavi-Rad, "The hepatoprotective effects of fennel seeds extract and trans-Anethole in streptozotocin-induced liver injury in rats.", *Food Sci Nutr*, 9(2): p. 1121-1131 (2021).
251. Dias, Alexandre Simões, Marilene Porawski, María Alonso, Norma Marroni, Pilar S. Collado, and Javier Gonzalez-Gallego, "Quercetin Decreases Oxidative Stress, NF- $\kappa$ B Activation, and iNOS Overexpression in Liver of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats.", *The Journal of Nutrition*, 135(10): p. 2299-2304 (2005).
252. Sanders, Ruth A., Frederick M. Rauscher, and John B. Watkins III, "Effects of quercetin on antioxidant defense in streptozotocin-induced diabetic rats.", *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 15(3): p. 143-149 (2001).
253. Essani, N.J.J.I., "Endotoxin-induced activation of the nuclear transcription factor  $\kappa$ B in hepatocytes, Kupffer cells and endothelial cells in vivo.", *The Journal of Immunology*, 156: p. 2956-2963 (1996).
254. Pari, L., M.J.B.C. Latha, and A. Medicine, "Protective role of Scoparia dulcis plant extract on brain antioxidant status and lipidperoxidation in STZ diabetic male Wistar rats.", *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 4(1): p. 1-8 (2004).
255. Metodiewa, D. and C.J.N.R. Koška, "Reactive oxygen species and reactive nitrogen species: relevance to cyto (neuro) toxic events and neurologic disorders. An overview.", *Neurotoxicity Research*, 1(3): p. 197-233 (1999).

256. Yaribeygi, H., M.T. Mohammadi, and A. Sahebkar, "Crocins potentiates antioxidant defense system and improves oxidative damage in liver tissue in diabetic rats.", *Biomed Pharmacother*, 98: p. 333-337 (2018).
257. Han, D., "Treatment with astragaloside IV reduced blood glucose, regulated blood lipids, and protected liver function in diabetic rats.", *J Int Med Res*, 49(3): p. 300060519841165 (2021).
258. Erel, O.J.C.b., "A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status.", *Clinical biochemistry*, 38(12): p. 1103-1111 (2005).
259. Witko-Sarsat, Véronique, Miriam Friedlander, Chantal Capeillère-Blandin, Thao Nguyen-Khoa, Anh Thu Nguyen, Johanna Zingraff, Paul Jungers, and Béatrice Descamps-Latscha, "Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia.", *Kidney International*, 49(5): p. 1304-1313 (1996).
260. Al-Kuraishy, Hayder M., Nawar R. Hussian, Marwa S. Al-Naimi, and Ali I. Al-Gareeb, "Statins role in vitiligo: A mini-review.", *Turkish Journal of Dermatology*, 14(1): p. 1 (2020).
261. Celik, Veysel Kenan, Zeynep Deniz Şahin, Ismail Sari, and Sevtap Bakir, "Comparison of oxidant/antioxidant, detoxification systems in various tissue homogenates and mitochondria of rats with diabetes induced by streptozocin.", *Exp Diabetes Res*, 2012: p. 386831 (2012).
262. Majidi, Zahra, Alireza Mohajjel-Nayebi, Amir Mansour Vatankhah, Solmaz Asnaashari, and Parvin Zakeri-Milani, "Effects of Heracleum persicum Hydroalcoholic Extract on Insulin, Serum Anti-Oxidant Enzymes, Glucose, and Lipid Profiles in Alloxan-Induced Diabetic Rats.", *Iran J Med Sci*, 45(3): p. 199-206 (2020).
263. Reiter, Russel J., Juan C. Mayo, Dun-Xian Tan, Rosa M. Sainz, Moises Alatorre-Jimenez, and Lilan Qin, "Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers.", *Journal of Pineal Research*, 61(3): p. 253-278 (2016).
264. Akkaya, Recep, Erkan Gümüş, Birnur Akkaya, Sebahattin Karabulut, Kader Gülmez, Mustafa Karademir, Yaşar Taştumur, and Ahmet Şevki Taşkıran, "Wi-Fi decreases melatonin protective effect and increases hippocampal neuronal damage in pentylenetetrazole induced model seizures in rats.", *Pathophysiology*, 26(3-4): p. 375-379 (2019).
265. Taskin, Eylem, Celal Guven, Salih Tunc Kaya, Leyla Sahin, Sayad Kocahan, Arife Zuhail Degirmencioglu, Fatih Mehmet Gur, and Yusuf Sevgiler, "The role of toll-like receptors in the protective effect of melatonin against doxorubicin-induced pancreatic beta cell toxicity.", *Life Sci*, 233: p. 116704 (2019).
266. Hardeland, R.J.C. and M.L. Sciences, "Melatonin and the electron transport chain.", *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(21): p. 3883-3896 (2017).



267. Wang, X.T., S.S. Chen, and M.Y. Qi, "[Effects of ursolic acid on liver injury and its possible mechanism in diabetes mellitus mice].", *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*, 34(2): p. 134-136 (2018).
268. Abid, Sanae, Hassane Mekhfi, Abderrahim Ziyat, Abdekhaleq Legssyer, Mohammed Aziz, and Mohamed Bnouham, "Beneficial Effect of Thymelaea hirsuta on Pancreatic Islet Degeneration, Renal Fibrosis, and Liver Damages as Demonstrated in Streptozotocin-Induced Diabetic Rat.", *ScientificWorldJournal*, 2021: p. 6614903 (2021).



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



**TOPLANTI TARİHİ** : 01/04/2021  
**TOPLANTI NO** : 2021/04

- 3- Karabük Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'nın 2021-05-01/04 Protokol no'lu "Pinealektomi Yapılmış ve Streptozotosin ile Diyabet Oluşturulmuş Ratlarda Krosinin Karaciğer Dokusu Üzerine Etkisinin 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

Melike KARAYAKALI 1995 yılında Karabük'te doğdu; ilk ve ortaöğrenimini aynı şehirde tamamladı. Alpaslangazi Anadolu Lisesi mezunudur. 2015 yılında Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü'nde öğrenime başlayıp 2019 yılında şeref öğrenci olarak mezun oldu. 2020 yılında Karabük Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim dalında yüksek lisans programına başladı.